

固氮酶钼-铁蛋白结晶及晶体生长条件探索^{*,**}

李佳格 徐继 顾天青 荆玉祥

(中国科学院植物研究所)

刘德富 赵文 董北

(中国科学院生物物理研究所)

固氮酶是由钼-铁蛋白和铁蛋白组成的复合体,这两个蛋白各自存在时都无活性^[1,2]。其底物络合催化部位在钼-铁蛋白部分,铁蛋白则与输送电子有关^[3,4]。为了进一步了解钼-铁蛋白在固氮作用中的催化机理,可以用X光衍射法从弄清晶体结构着手研究。这需要有合适的晶型和一定大小的晶体。但以前报道所得的晶体均为针状且微小,不适宜进行X光衍射之用^[5,8,13,14]。为此,我们对改变钼-铁蛋白的晶型并使其长大进行了摸索。

材料和方法

材料用棕色固氮菌 *Azotobacter Vinelandii* (林土 230),固氮酶钼-铁蛋白的分离、提纯、结晶,按本实验室采用过的方法^[5],晶体培养是在无氧条件下进行。溶液全部抽气充氩,除注明外,均加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1 毫克/毫升。

聚丙烯酰胺凝胶电泳参考 Davis 方法^[6]。

蛋白质浓度测定用双缩脲法^[7]及紫外吸收法^[7]。

吸收光谱用 Unicam SP-500 型紫外分光光度计测定。

钼及铁的含量用中子活化分析法测定^{***}

蛋白质重量是以真空干燥至恒重计算。

结果与讨论

1. 钼-铁蛋白的纯度与性质

①纯度 其聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,只呈现一条谱带。吸收光谱与 Shah^[8]的结果相同(图 1)。中子活化分析测得每个钼-铁蛋白

分子有 1.6 个钼原子及 28 个铁原子(以分子量为 220,000 计算)。

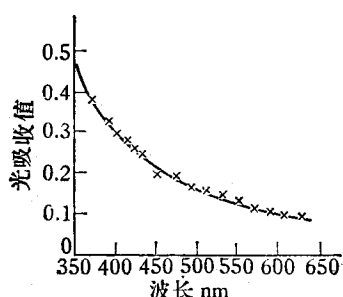


图 1 钼-铁蛋白吸收光谱

(蛋白浓度 1.4 毫克/毫升,测定液上盖一石蜡层)

②氧敏感性 钼-铁蛋白对氧极为敏感,遇氧后活性很快丧失,同时晶体由针状聚合为细长盘卷的线状,最后断裂为不定型颗粒(图 2)。根据我们的经验,在制备和生长晶体时,如果能保持良好的无氧条件,则钼-铁蛋白的针状晶体在室温下可保持两个月或更长些的时间。

③离子强度及蛋白浓度 在 0.25 M NaCl 中,钼-铁蛋白呈溶解状态,随离子强度降低,形成晶体。我们的实验表明:制备钼铁蛋白晶体的较适离子强度为 $<0.06\text{M}$ 。蛋白质浓度是 15—30 毫克/毫升。

2. 培养晶体的几种方法

①微量透析法 参考 Zeppezauer 方法^[9],装置是用一个带血清塞的小试管(10 毫米 × 100 毫米)作为外管,内装一细玻璃管(5 毫米 ×

* 植物所李久带、王继文、钟泽璞、王发珠同志参加部分工作。

** 北京大学刘德富同志与生物物理所协作、参加本工作。

*** 承中国科学院高能所中子活化分析组测定。



图2 Mo-Fe 蛋白针状结晶及遇氧后变化

(a) Mo-Fe 蛋白针状结晶, ($\times 800$) (暗视野) (b) 遇氧后 4 小时 (c) 12 小时 ($\times 400$)

70 毫米) 其下端缚以透析膜、作为内管。实验时首先将试管抽气充氩多次, 将浓度为 15—30 毫克/毫升, 含 NaCl 0.2M—0.25M 的钼-铁蛋白液 0.1—0.2 毫升注入内管, 然后将试液注入外管。(所用各种试液, 详见表 1—3) 放置于 25℃ 温箱中, 观察晶体的形成。

②静置法 参考森田方法^[10], 外管装置同前, 内管为一 4 毫米 $\times$ 70 毫米的平底小试管。实验时先抽气充氩数次。将钼-铁蛋白 0.1 毫升和 0.1 毫升试液(同前)注入内管, 混合均匀, 放置 25℃ 的温箱中, 静置。也可将钼-铁蛋白溶液及试液分层注入内管, 使形成自由界面, 在相同条件下观察晶体的生成。

③液桥法 参考 Mc pherson 等方法^[11—12], 全部操作在厌氧箱中进行, 又可分以下两种方法:

(a) 在一培养皿内(直径 80 毫米)放一载玻片(23 毫米 $\times$ 75 毫米), 将一长度为 20—30 毫米的毛细管置于其上。由一端注入蛋白浓液(同前)另一端注入不同的试液[见表 1—3], 待毛细管充满后, 封闭容器。室温静置数日, 观察两液接触后, 晶体生长情况。

(b) 在培养皿内放一载玻片, (23 $\times$ 75 毫米), 一端加一滴蛋白溶液(同前)相隔 2 厘米处加一滴试液[见表 1—3] 两滴之间用针划线形成液桥。密封容器, 室温静置, 观察。

④蒸气扩散法: 参考森田方法^[10]全部操作在厌氧箱中进行。所在器皿为一有盖的称量

瓶, (高 35 毫米, 直径 55 毫米), 内放一小杯(高 10 毫米, 直径 15 毫米)及一凹形载玻片。实验时将有机试剂或挥发性溶液[见表 3]加入小杯, 在凹载玻片上加一滴(约 20 毫升)含离子强度稍大于 0.06 M NaCl 的钼-铁蛋白溶液, 容器加盖密封。使试剂分子自蛋白溶液扩散, 蛋白溶液中的离子强度降低, 促使晶体形成。装置放于室温条件下, 观察晶体的形成。

上述几种方法都能培养出钼-铁蛋白的晶体, 其中蒸气扩散法和液桥法用样量极少, 但需在无氧条件下操作, 消耗大量氩气, 操作不便。微量透析法和静置法, 使用样品量较多, 但操作简便, 其中微量透析法培养晶体的成功率较高, 我们主要使用此法。

3. 培养晶体的条件

为了得到一个适用于 X 光衍射用的钼-铁蛋白的晶体, 我们对多种可能影响其形成与生长的条件进行了探索, 结果详见表 1, 2, 3。

由表可见 ①在我们的工作中钼-铁蛋白可在广泛的 pH 范围 (pH5—9) 内形成晶体, 但晶型均为针形。这与不少蛋白质往往在 pH 值稍加改变的情况下, 就会引起晶型的改变是不同的^[11—15]。②我们使用了广泛的缓冲液系统进行实验, 多数缓冲系统可以得到晶体, 但仍为针晶。③文献报道, 有半胱氨酸残基的蛋白进行晶体培养时, 加入温和的还原剂如半胱氨酸等, 往往能得到较好的衍射用的晶体^[11]。钼-铁蛋白虽有较多的半胱氨酸残基, 但在加入各种还

表 1 不同 pH 及缓冲液系统对 Mo-Fe 蛋白结晶形成的影响

缓 冲 液	pH	结 晶
磷酸氢二钠-柠檬酸	5.0	-
	6.0	-
	7.0	-
	8.0	+
磷酸二氢钾-磷酸氢二钠	7.4	+
磷酸二氢钾-氢氧化钠	6.0	+
	7.0	+
	8.0	+
柠檬酸-柠檬酸钠	4.0	-
	5.0	-
	6.0	+
	6.8	+
Tris-HCl*	5.0	+
	6.0	+
	7.0	+
	8.0	+
	9.0	+
甘氨酸-氢氧化钠	9.0	+
甘氨酸-盐酸	3.0	-
巴比妥-盐酸	6.8	+
	7.0	+
	7.1	+
	7.7	+
磷苯二甲酸氢钾	3.6	-
醋酸-醋酸钠	6.0	-

* 处理中加入 0.1mg/ml 二硫苏糖醇
(+) 形成结晶 (-) 未形成结晶

表 2 无机化合物对 Mo-Fe 蛋白结晶形成的影响

处 理*	浓度(M)	结 晶
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	+
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	-
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05	+
SnCl · 2H ₂ O	0.05	-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.05	+
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01	-
LiSO ₄ · H ₂ O	0.05	+
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.05	+
NaN ₃	0.05	+
V ₂ O ₅	0.005	+
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.05	+

* 无机化合物均溶在 0.025M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中
(+) 形成结晶 (-) 未形成结晶

表 3 有机化合物对 Mo-Fe 蛋白结晶形成的影响

处 理	浓度(M)	结 晶
半胱氨酸	0.01	+
	0.001	+
	0.0001	+
谷胱甘肽	0.01	+
	0.001	+
	0.0001	+
二硫苏糖醇	0.01	+
	0.001	+
	0.0001	+
巯基乙醇 + 2 甲基 2,4 戊二醇 + 甲苯	少 许	+
邻菲罗啉	0.01	+
咪 唑	0.01	+
邻菲罗啉(柠檬酸钠 pH7.4)	0.01	+
咪 唑(柠檬酸钠 pH7.4)	0.01	+
聚乙二醇	蒸气扩散	+

注: 除注明外均溶于 0.025M Tris-HCl (pH7.4) 的缓冲液中
(+) 形成结晶 (-) 未形成结晶

原剂(表 3)后,得到的仍为针晶。④一些金属离子及无机化合物往往有利于蛋白结晶的形成^[11],我们试用了十几种含金属离子的无机化合物进行实验(表 2)多数情况下能形成晶体,晶体为针形。⑤文献报道,离子强度对蛋白质的溶解度影响很大,在低离子强度中结晶的蛋白对温度特别敏感^[11]。我们的实验表明,钼-铁蛋白结晶的较适温度是 25℃ 左右,降低温度则溶解度增加。我们曾用变温的方法先在 4℃ 培养,然后再转移到 30℃ 培养,没有明显效果。

通过上述各种实验条件的摸索,在大多数

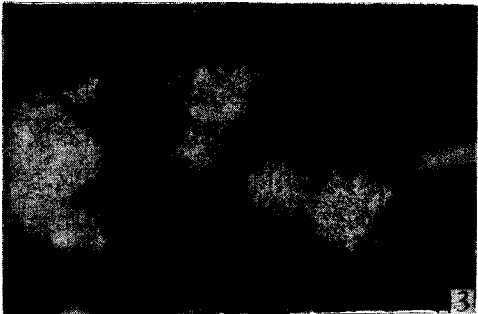


图 3 Mo-Fe 蛋白针状结晶 (×400 暗视野)
用微量透析法培养结晶: 透析液为 0.01M 谷胱甘肽溶于 0.025M Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液中。

情况下我们都得到了厌氧的钼-铁蛋白针状晶体,其中最大晶体宽4—6 μ ,长约200 μ ;只有在用谷胱甘肽处理后所形成的晶体呈簇状(图3)但在显微镜下观察,仍为针形。这些实验结果使我们对钼-铁蛋白可形成晶体的条件有了进一步的了解。遗憾的是这些大量的工作都没有得到预期的结果。这说明所使用的方法、条件还不足以影响钼-铁蛋白分子之间的关系,使晶型得到改变,另一个可能的原因是少量的遇氧后的钼-铁蛋白阻止晶型的改变。钼-铁蛋白结晶过程中所出现的晶癖,有待今后工作中消除。

参 考 文 献

- [1] Mertensen, L. E.: *Biochim, Biophys. Acta*, **127**, 18, 1966.
[2] Bulen, W. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **56**, 979, 1966.

- [3] Dalton, H. et al.: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 231, 1972.
[4] Bui, P. T. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **61**, 1021, 1968.
[5] 中国科学院植物研究所七室:《植物学报》1973年,15期,281页。
[6] Davis, B. J.: *Annals, N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.
[7] Layne, E.: *Methods in Enzymology*, Vol. **III**, (Ed. Colowick S. P. et al.), Acad. press, N. Y. 450, 1957.
[8] Shah, V. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 445, 1973.
[9] Zeppezauer, M. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 564, 1968.
[10] 森田,雄平:蛋白质、核酸、酶 **19**, 1049, 1974。
[11] Mcpherson, A.: *Methods of Biochem. Anal.*, **23**, 249, 1976.
[12] Fenna, R. E., et al.: *J. Mol. Biol.*, **84**, 231, 1974.
[13] Burns, R. C., et al.: *Biochim, Biophys. Acta*, **305**, 445, 1973.
[14] 辽宁省林土所:《应用微生物》,1974年,1期1页。
[15] Mcpherson, A.: *Biol. Chem.*, **251**, 6300, 1976.

[本文于1980年2月5日收到]

同种免疫核糖核酸在体外传递抗 S180 免疫活性的细胞免疫反应研究

洪长福 俞 慧

(浙江人民卫生实验院医学微生物免疫研究室)

丁仁瑞 张统文 查士隽

(杭州大学生物系)

大量研究表明,给予肿瘤免疫动物的淋巴细胞可将特异移植免疫反应传递给未曾处理的动物。输入从肿瘤免疫动物淋巴组织中抽提的RNA或经RNA孵育的脾细胞,亦同样能使动物获得抗该肿瘤的免疫性^[1-4]。

本实验室采用带瘤小鼠淋巴组织提取免疫RNA,用全血白细胞肿瘤细胞混合培养试验方法,在体外使正常小鼠淋巴细胞转变成为对肿瘤S180特异的致敏淋巴细胞。兹将此实验结果介绍如下:

材 料 和 方 法

1. S180 肉瘤肿瘤细胞悬液的制备

取接种10天左右的S180肉瘤,弃去坏死部分,将瘤块剪碎成糊状,加入适量生理盐水(1:5)在玻璃匀浆器中制成细胞匀浆。自然沉淀后,上清完整细胞计数为 1×10^7 /毫升。每毫升肿瘤细胞加50微克丝裂霉素C,37℃温浴1小时。用Hank's液洗二次,备用。

2. 免疫核糖核酸的制备

取制得的细胞匀浆于小白鼠前肢腋下接种0.2毫升/每克,7天后拉颈处死剖取脾脏,置于冰或液氮中保存。参照热酚法^[5]略加改进,提取RNA,将它置于75%乙醇中,-20℃保存。RNA制品 $E_{260}/E_{280} \geq 2$,蛋白质低于2%,DNA含量低于5%。