

固氮酶钼铁蛋白羧基的化学修饰

周 慧 赵志壮 付学奇 林永齐

(吉林大学分子生物学系)

提 要

在室温, pH6.4 的条件下, 钼铁蛋白迅速被大过量的 Woodward 试剂 K 所失活。紫外吸收光谱跟踪表明: 随着时间延长, 修饰程度不断加深。结合氨基酸分析结果算出当修饰 2 分钟时, 活力丧失 96%, 有 2—5 个羧基被修饰。

一、引 言

用 N-乙基丁烯二酰亚胺修饰钼铁蛋白 硫基证明其没有与活性相关的快反应巯基、但硫基参入连接 Fe_4S_4 原子簇。用三硝基苯磺酸修饰氨基证明氨基参入连接 $\text{FeMoCo}^{[1]}$ 。在用 N-甲基甲酰胺抽提 FeMoCo 时, 总发现有谷氨酸和门冬氨酸随之一一起抽出。这激起了我们想要了解羧基在固氮酶催化反应中的作用。本文报道用 N-乙基-5-苯基异噁唑-3'-磺酸(Woodward Reagent K) 修饰钼铁蛋白的结果。

二、材料和方法

DEAE-11 纤维素 (上海第二化学试剂厂), Sephadex G15 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden), Woodward 试剂 K (日本产品), 其他试剂均系国产分析纯。

1. 钼铁蛋白结晶的制备

将棕色固氮菌 230 用超声波破碎后, 2 万转/分离心 20 分钟。上清于 60℃ 水浴加热 8 分钟, 再 2.5 万/转离心 20 分。上清上 DEAE-11 纤维素柱, 阶段洗脱, 收集 0.25mol/L NaCl 洗脱部分, 超滤浓缩, 稀释离心, 收集结晶。室温 24 小时内活力不变。

2. 羧基的修饰

用 pH6.4 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液溶解钼铁蛋白结晶 (浓度约为 10^{-3}mol/L), 加入 Woodward 试剂 K (使其与钼铁蛋白的克分子比为 100)。在不同的时间取出部分反应液, 用丙氨酸终止修饰。

3. 钼铁蛋白修饰之后与小分子物质的分离

经过 Sephadex G15 柱 ($1.5 \times 60\text{cm}$) 可除去修饰剂和终止剂。

4. 活力测定: 参考文献 [2] 方法。电泳参考 [3] 的方法。氨基酸分析: 用日立 835 型自动氨基酸分析仪。

三、结果与讨论

用大过量的 Woodward 试剂 K 修饰钼铁蛋白, 在 2 分钟内酶活力迅速下降。2 分钟时活力只剩 4%。见表 1 和图 1。

修饰不同时间的钼铁蛋白经 Sephadex G15

表 1 钼铁蛋白在不同修饰时间的活力

修饰时间(分钟)	0	1	2	4
C_2H_4 峰高(厘米)	8.9	6.3	0.35	0.7
C_2H_2 峰高(厘米)	3.8	4.6	6.9	8.5
$\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_2$	2.3	1.4	0.1	0.1
活力 C_2H_4 mmol	22.2	16.4	0.9	0.9
残余活力百分数	100	73.8	4.1	4.1

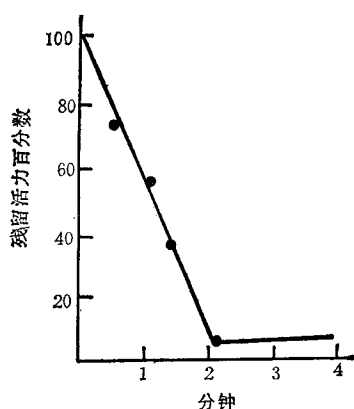


图1 修饰时间与活力的关系

表2 修饰不同时间钼铁蛋白的电泳 Rf 值*

修饰时间(分钟)	0	1	2	4	8
Rf 值	0.320	0.327	0.319	0.364	0.377

* 聚丙烯酰胺圆盘电泳,胶浓度为 7.5%。

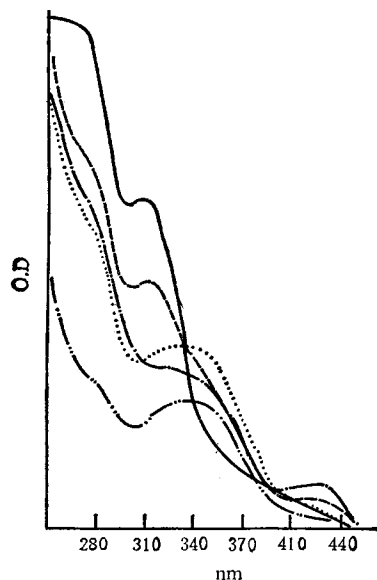


图2 修饰不同时间钼铁蛋白的紫外吸收光谱

- : 修饰0分钟,蛋白浓度为 0.23mg/ml
- : 修饰1分钟,蛋白浓度为 0.24mg/ml
- : 修饰2分钟,蛋白浓度为 0.24mg/ml
- : 修饰3分钟,蛋白浓度为 0.26mg/ml
- : 修饰5分钟,蛋白浓度为 0.24mg/ml

柱后,我们测了它们的电泳迁移率和紫外光谱,见表2和图2。

在用 Woodward 试剂K修饰钼铁蛋白的过程中,随着活力下降,其蛋白带对正极的泳动

速度也加快。修饰剂使钼铁蛋白带上更多的负电荷。化学修饰使钼铁蛋白在 300nm 的吸收峰变宽,峰尖移到了 340nm 处。其吸收比 280:250 和 280:340 可作为 Woods 试剂修饰程度的量度^[4]。钼铁蛋白在 5 分钟内,修饰时间越长,其 280:250 和 280:340 的比值越低。结果见表3。

表3 修饰不同时间,钼铁蛋白其 280:250 和 280:340 比值变化

修饰时间(分钟)	蛋白浓度	280nm/340nm 吸收	280nm/250nm 吸收
0	0.23	3.27	
1	0.24	2.1	0.71
2	0.24	2.0	0.65
3	0.26	1.6	0.64
5	0.24	1.4	0.57

结合氨基酸分析仪分析乙胺生成量,得出修饰2分钟,活力丧失 96% 时,每个钼铁蛋白分子约有 2—5 个羧基被修饰。钼铁蛋白为 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。分子量为 22.5 万。在近 2000 个氨基酸中,谷氨酸、谷氨酰胺。门冬氨酸和门冬酰胺总数约为 400 个。在只修饰 2—5 个羧基的情况下,活力下降到只剩 4%,看来这几个羧基与活性中心的关系密切,有着比较特殊的作用。

为了了解羧基是否参与 Fe_4S_4 、 FeMoCo 等原子簇的结合,我们测定了修饰后钼铁蛋白中钼铁的含量(以上所有试验样品都是修饰后经 Sephadex G15 除小分子的)。结果是钼铁含量为 $\text{Mo}2$, $\text{Fe}32/\text{mol}$, 与修饰前比没有改变。说明羧基并不是连结这二种原子簇的主要基团。不象巯基是连结 Fe_4S_4 , 氨基是连结 FeMoCo 的主要基团。

四、结 论

用 Woodward 试剂K修饰棕色固氮菌钼铁蛋白,使其活力迅速下降。修饰2分钟时,活力下降到最低点,残留活力为 4%。修饰过程中钼铁蛋白的紫外吸收光谱不断变化,280nm/340nm 和 280nm/250nm 的吸收比值逐渐降低。

(下转第41页)

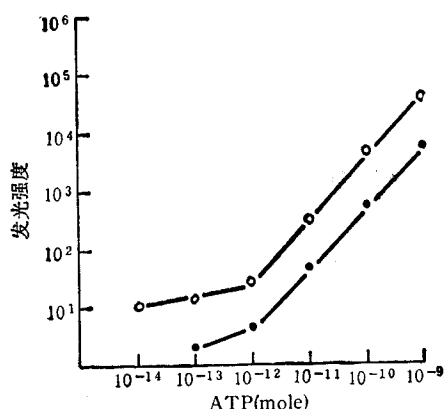
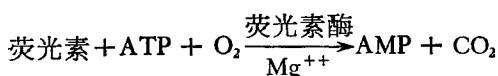


图 7 贮存一年的荧光素酶反应活性

○—○ 加荧光素 ●—● 不加荧光素

讨 论

荧光素酶催化的发光反应是:



+ hr + 氧化荧光素

反应生成物 AMP 和氧化荧光素是荧光素酶的竞争性抑制剂^[9,10], 它们抑制常数分别为 $2.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 和 $2.3 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 。氧化荧光素在荧光素酶的催化下象荧光素一样地发生反应, 但没有光发射^[11]。荧光素在有氧气的条件下会发生氧化^[12], 生成脱氢荧光素(氧化荧光素), 现已从萤火虫尾中分离得到了脱氢荧光素^[12]。荧光素酶配成溶液后, 在室温置放, 由于上述原因, 反应活性下降, 放置时间越长, 反应活性下

降越多。荧光素酶粉剂在制备和贮放过程中, 反应活性也可能由于以上原因下降, 但是都可以在添加荧光素后, 得到恢复并提高。作为商品的粗荧光素酶, 包括国外的产品^[13], 一般不用添加荧光素就可以用于测定 ATP 的量, 如果外加荧光素后, 可以适当减少荧光素酶的用量, 从而降低了抑制终产物的浓度、内源 ATP 和内源本底光发射, 提高了测定的灵敏度。但过分的降低荧光素酶浓度后, 使酶浓度成为影响测定 ATP 灵敏度的重要因素, 即使在反应系统中加荧光素至饱和, 发光强度的增加也是有限的。

参 考 文 献

- [1] 王维光:《植物生理学通讯》, (4), 38, 1982.
- [2] 李有则等:《实验生物学报》(13), 257, 1980.
- [3] 顾增辉、徐本美:《植物生理学通讯》, (5)55, 1983.
- [4] 林振武等:《科学通报》, (15), 945, 1983.
- [5] 许宁、刘天培:《中国药理学报》, (7), 44, 1986.
- [6] 李冰、张坤诚:《黄渤海海洋》, 2(2), 87, 1984.
- [7] 吴永强等:《植物生理学报》, 11(3), 286, 1985.
- [8] Morton, R. A. et al.: *Biochemistry*, 8, 1598, 1969.
- [9] Lundin, A.: *Clinical and Biochemical Analysis* vol. 12: *Clinical and Biochemical Luminescence*. Marcel Dekker INC, New York and Basel, 45, 1982.
- [10] Lemasters, J. J. et al.: *Biochemistry*, 16, 456, 1977.
- [11] Rhodes, W. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1538, 1958.
- [12] White, E. H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 337, 1963.
- [13] Webster, J. J. et al.: *J. Appl. Biochem.*, 1, 471, 1979.

[本文于 1987 年 1 月 5 日收到]

(上接第 49 页)

结合氨基酸分析得知修饰 2 分钟时大约修饰 2—5 个羧基。这几个羧基与活性部位关系紧密, 但并不直接参与蛋白质与 Fe_4S_4 和 FeMoCo 的结合。

本实验承赵宗键同志和本校分析教室的帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 郭莉莉等:《生物化学和生物物理进展》, 6, 1982.
- [2] V. K. Shah et al.: *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 81, 232, 1978.
- [3] 张龙翔编《生物化学实验方法和技术》北京大学, 1982.
- [4] Philip, H. Petra: *Biochemistry*, 10, 3163, 1971.

[本文于 1987 年 2 月 5 日收到]