

用化学修饰法研究固氮酶钼铁蛋白中巯基和氨基的作用*

郭莉莉 林永齐 陶慰孙**

(吉林大学 化学系)

固氮酶钼铁蛋白分子中含有两类原子簇。一类是 Fe_4S_4 原子簇^[1,2], 在每个钼铁蛋白分子中(分子量为 22 万)含有四个。另一类是钼铁辅因子 (FeMo-Co)^[3,4], 每个钼铁蛋白分子中含有两个, 其元素组成是 1Mo , $7-8\text{Fe}$, 6S^{2-} (或 4S^{2-}), 其它元素尚未确定。前者在蛋白分子中起电子传递作用。而 FeMo-Co 位于底物还原部位, 是底物络合、还原的中心^[5]。

关于这两类原子簇与蛋白质肽链的连结方式以及它们在蛋白质分子中的排布和确切位置的研究, 对阐述固氮过程的机理, 说明钼铁蛋白结构与功能的关系等有重要意义。 Fe_4S_4 原子簇是通过蛋白质肽链上侧链巯基上的 $-\text{S}^-$ 与 Fe 配位, 使该蛋白质与 Fe_4S_4 连结。关于该原子簇所处的确切位置正在研究中^[6]。而 FeMo-Co 与蛋白质肽链的连接方式尚未见报道。

苏联化学物理所进行了一些固氮酶化学修饰工作^[7], 证明铁蛋白含有两个活性必须的巯基。用邻苯二甲醛修饰钼铁蛋白的氨基导致活性完全丧失。我们试图用化学修饰法来研究在钼铁蛋白分子中, 两类原子簇与蛋白质的连接方式, 以及它们与功能的关系, 以便进一步按一级结构来确定活性中心的位置。

一、材料和方法

1. 试剂 巯基特异修饰剂 NEM (N-乙基丁烯二酰亚胺; 日本产)。氨基特异修饰剂 TNBS (三硝基苯磺酸钠; 上海生化所东风厂)。二巯基苏糖醇(英国)。赖氨酸(上海生化所)。标准蛋白(英国)。多聚葡萄糖凝胶(瑞典)。其它试剂均

为国产。

2. 钼铁蛋白结晶的制备 按改进的 Shah^[8] 方法, 得到针状结晶。电泳和等电聚焦鉴定, 均为一条区带。活性测定按文献 [9]。

3. 蛋白质分子量测定 按文献 [10]。

4. 氨基酸分析 在日立 835 型氨基酸自动分析仪上进行。修饰后的蛋白质均需经过 Sephadex G-15 柱脱去修饰剂、终止剂等小分子后, 再进行分析。用 NEM 修饰的蛋白质, 水解 72 小时, 以保证 S-琥珀酰半胱氨酸的回收率高于 90%。修饰后的氨基酸衍生物, 用标准样品确定峰位。

5. 圆二色光谱 用 JASCO-20 圆二色谱仪在无氧下测定。350—500nm 区使用 1cm 光程杯。200—250nm 区使用 0.1cm 光程杯。

$$\text{计算: } \alpha\text{-螺旋}(\%) = \frac{[\theta]}{-62000}$$

$$[\theta] = \frac{\theta M_0}{10 \times L \times C}$$

θ 为实验中测得椭圆率(度/cm)。(以 222nm 处的 θ 值计算)。 M_0 为平均残基分子量(115)。 L 为比色杯厚度(cm)。 C 为样品浓度(g/ml)。

6. Fe_4S_4 原子簇及 FeMo-Co 的分离 使用 Sephadex G-15 柱层析。于 254nm 自动检测。用提纯的 FeMo-Co 和合成的 Fe_4S_4 原子簇来确定它们的峰位。洗脱体积分别为 50ml 和 60ml。

* 本文曾在第四届全国生化会上宣读。

** 赵莹, 董庆发同志参加部分工作。

7. 钼、铁和蛋白含量测定 按文献 [4]。

二、实验与结果

1. 钼铁蛋白中巯基的修饰 蛋白浓度为 2—3mg/ml,

(1) 相同量的修饰剂,不同的修饰时间。

钼铁蛋白:NEM = 1:50 (克分子比) 在 pH7.0, 25℃ 反应。不同间隔时间(一般为 30 分钟) 取样, DTT 终止反应。30 分钟后测定活性。测定活性时用的铁蛋白单独无活性, 不含有钼。钼铁蛋白被修饰以后活性缓慢下降 (表 1)。

将测定活性剩余的各样品经过无氧 Sepha-

表 1 用 NEM 不同时间修饰钼铁蛋白后,钼铁蛋白的活性及铁、钼含量

修饰时间 (分)	比活性 nMC ₂ H ₄ / 分、毫克蛋白	nMFe/nM 蛋白	nMMo/nM 蛋白
天 然	1757	32.0	2.0
35	1318	27.3	2.4
80	1157	17.0	2.2
130	573	19.0	2.2
180	507	12.0	1.4

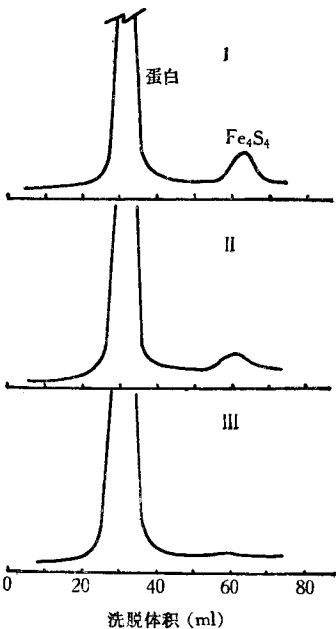


图 1 NEM 修饰钼铁蛋白后,经过 Sephadex G-15 柱层析图 (1.7×63cm)
60ml 处为 Fe₄S₄ 原子簇洗脱峰。I. 修饰 180 分钟 II. 修饰 80 分钟 III. 未修饰

dex G-15 柱层析, 将蛋白质与其它小分子分开 (图 1)。测定修饰后蛋白的 Mo、Fe 含量(图 2、表 1)。

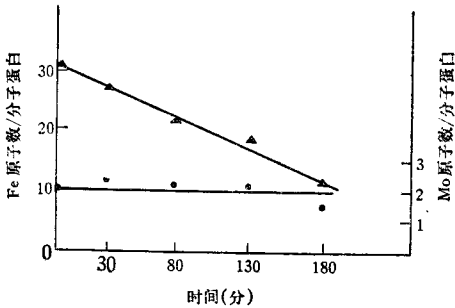


图 2 NEM 修饰钼铁蛋白后,蛋白中钼铁含量与修饰时间的关系
●为钼含量 ▲为铁含量

圆二色谱测定所用样品为修饰前和修饰 240 分钟以后, (图 3、4)。

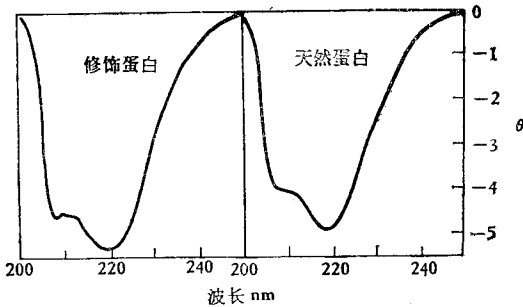


图 3 天然及 NEM 修饰后钼铁蛋白圆二色谱图(远紫外区)
天然蛋白: 浓度为 225μg/ml, α螺旋为 38.7%。
修饰蛋白: 浓度为 260μg/ml, α螺旋为 37.3%

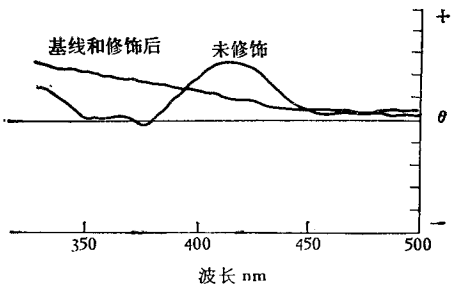


图 4 天然及 NEM 修饰后钼铁蛋白圆二色谱图(可见波段)
蛋白浓度 2mg/ml

(2) 不同量修饰剂,一定时间的修饰。

NEM 与钼铁蛋白的克分子比分别是 3.5、7.0、10.5、14、17.5、21、比 1。在 pH7.0, 25℃ 反应 4 小时。终止反应后测定活性 (图 5)。修饰后

的蛋白质氨基酸分析结果列于表 2。

修饰后的蛋白质电泳行为和分子量无变化。

在 345nm 处有最大吸收值。消光系数 $\epsilon = 1.45 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ 。根据消光系数的增加可计算出被修饰的氨基酸数列于表 3。

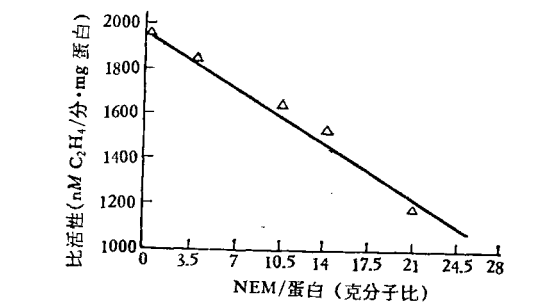


图 5 用不同量 NEM, 经一定时间(四小时)修饰后钼铁蛋白活性变化

表 2 用不同量的 NEM 修饰钼铁蛋白后, 其 S-琥珀酰半胱氨酸、组氨酸、赖氨酸含量的变化

nMNEM/nM 蛋白	nMS-琥珀酰半胱氨酸/nM 蛋白	nMHis/nM 蛋白	nMLys/nM 蛋白
天然	0	63.5	166
3.5	2	63.0	172
10.5	4	64.0	168
14.0	4	64.0	168
21.0	8	63.0	168

2. 钼铁蛋白中氨基的修饰 修饰时蛋白浓度为 2mg/ml。

钼铁蛋白: TNBS = 1: 10 (克分子比)。pH8.0, 25℃ 避光反应。不同间隔时间取样, 用赖氨酸终止反应。30 分钟后测定活性。图 6。

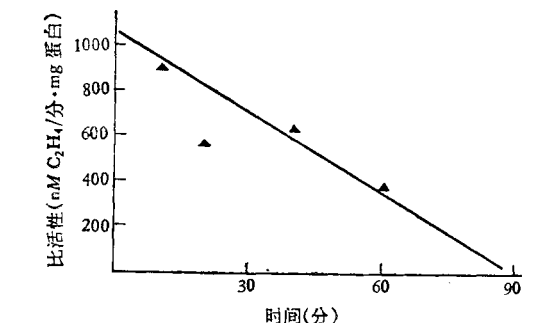


图 6 TNBS 修饰钼铁蛋白后, 活性与修饰时间的关系

修饰后蛋白经过 Sephadex G-15 柱分离 (图 7), 其蛋白部分的金属组成列表 3。该蛋白的电泳行为及分子量没有变化。修饰后的蛋白

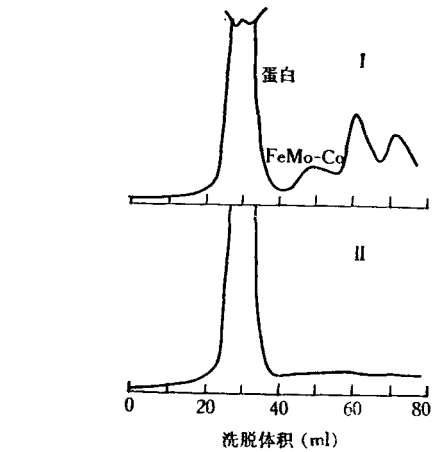


图 7 TNBS 修饰钼铁蛋白后, 经过 Sephadex G-15 柱层析洗脱图

50ml 为 FeMo-Co 洗脱峰。60ml 为 TNP-Lys 峰。
I. 修饰。II. 未修饰。

表 3 TNBS 修饰钼铁蛋白, 修饰时间与 TNP-氨基、Fe、钼含量的关系

修饰时间 (分)	nMTNP-氨基/nM 蛋白	nMFe/nM 蛋白	nMMo/nM 蛋白
天然	0	32.0	2.0
5	0.98	30.0	2.1
20	1.40	26.5	1.5
60	2.40	23.0	1.0

三、结果与讨论

1. N-乙基丁烯二酰亚胺 (NEM) 在中性 pH 值时可以特异性修饰蛋白质分子中半胱氨酸的巯基。反应生成的半胱氨酸衍生物对酸水解是稳定的。

从表 1 可以看出随修饰时间的延长, 活性逐渐下降, 但并不迅速完全丧失。说明该蛋白可能没有与活性有关的快反应巯基。从 Sephadex G-15 柱层析图谱 (图 1) 看出, 随修饰时间的延长, Fe₄S₄ 原子簇峰出现并逐渐加高。对修饰蛋白进行的金属分析 (图 2、表 1), 可以看出活性的峰降低和铁含量的减少是很一致的。而钼含量基本不变。修饰后可见区圆二色谱

(图4)420nm左右峰消失;该峰是 Fe_4S_4 原子簇的特征。这些结果说明,NEM修饰钼铁蛋白之后,引起了 Fe_4S_4 原子簇脱落,同时活性下降。全修饰后每分子蛋白含有12—14个铁原子和两个钼原子,相当两个 FeMo-Co 的组成。说明修饰没有引起 FeMo-Co 的明显脱落。

从氨基酸分析结果(表2)表明,修饰时只有S-琥珀酰半胱氨酸含量不断增加,而可能产生副反应的赖氨酸,组氨酸含量没有明显变化。说明修饰专一性很好,只修饰了半胱氨酸。由此,我们认为 Fe_4S_4 原子簇是通过半胱氨酸的 $-\text{S}^-$ 与蛋白质连接。而 FeMo-Co 与蛋白连接主要不是通过半胱氨酸的 $-\text{S}^-$ 。

从修饰后钼铁蛋白的电泳行为、分子量, α -螺旋度无明显变化说明修饰没有引起高级结构的明显变化。活性的变化是由于 Fe_4S_4 原子簇脱落所引起。

2. 三硝基苯磺酸(TNBS)在偏碱性(pH8.0)条件下与 $-\text{NH}_2(-\text{NH})$ 反应。即专一的修饰氨基。从图6可以看出活性丧失速度远较修饰巯基时快。从Sephadex G-15柱层析图谱(图7),可以看到修饰后出现单独 FeMo-Co 的峰(50ml处),该峰含有Mo和Fe。60ml处的峰含Fe量很少,可能是三硝基苯磺酸与赖氨酸形成的化合物的峰。修饰后的蛋白化学分析结果(表3)表明,随活性下降,钼含量由每分子2个降为1个。铁含量由每分子30—32个降为23个左右,钼铁含量的损失数,相当于脱落一个 FeMo-Co 。测定修饰后蛋白在345nm处的吸收值,发现随修饰时间的增加而增加。说明修饰的氨基位于蛋白上。用消光系数计算,每修饰2个左右的氨基就脱落一个 FeMo-Co 。由此可见 FeMo-Co 是通过氨基与蛋白质连结。由于

FeMo-Co 是络合、活化、还原氮分子的核心,因此,修饰氨基必然引起活性的迅速丧失。至于为什么尚有一个 FeMo-Co 没有脱落,还不能很好解释。

以上结果对于解释用N-甲基甲酰胺抽提 FeMo-Co 是有用的。它不单纯是一个溶解过程,可能主要还是一个配位取代过程,即NMF中的 $-\text{NH}$ 取代了蛋白质的氨基配位,而将 FeMo-Co 拉下来。近来我们用几种较强的N-配位取代剂作了实验,有的能很好的将 FeMo-Co 全部拉下来。用配位取代法我们可以找到提纯 FeMo-Co 的新方法。至于 FeMo-Co 与蛋白质分子中哪一种氨基结合?处于肽段的什么位置?尚需进一步深入研究。

感谢中国科学院上海生物化学研究所、植物生理研究所、沈阳林业土壤研究所等单位对本工作的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] Kurtz, D. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4986, 1979.
- [2] L. E. Mortenson, et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 387, 1979.
- [3] Shah, V. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3249, 1977.
- [4] 化学系固氮组:《吉林大学自然科学学报》,1978年,第4期,73页。
- [5] Shah, V. K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm*, **81**, 232, 1978.
- [6] Lundell, D. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 6335, 1981.
- [7] Садков, А. П., и Д., *Извест. Академи. Наука С.С.С.Р.*, **4**, 610, 1977.
- [8] Shah, V. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **305**, 445, 1973.
- [9] 化学系固氮组:《吉林大学自然科学学报》,1973年,第2期,85页。
- [10] 化学系固氮组:《吉林大学自然科学学报》,1977年,第3期,82页。

[本文于1982年2月4日收到]

(上接第36页)

Desimone 和 C. Gross 用麻醉的短尾猴作实验,在上颞多种感觉区(STP)记录到7个细胞,它们的最适宜视觉刺激是人或猴的面孔,而对手和其它形状都无反应。这种细胞对各种脸的照片或图画不管大小及细微差别如何,都有很强烈的反应;将照片上的眼睛挖出,反应减弱;把照片剪成16块,再杂乱地拼在一起,就不

能引起反应。这些都说明这些细胞只选择“脸”这个总的形状,而并非其中某一特征。作者认为这些细胞要么是皮层上特化的专伺识别面孔或面部表情的系统的一个组成部分,要么是参与对面孔的运动反应的系统。

[*J. Neurophysiol.*, **46**, 369, 1981。刁云程编译]