

[5] 郑荣梁等: «生物化学与生物物理学报»(待发表)。
 [6] Leavitt, J. et al.: *Nature*, 269, 63, 1977.
 [7] Marklund, S.: *J. Biol. Chem.*, 251, 7504, 1976.
 [8] Jr, Beers, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 195, 133, 1952.

[9] Hartree, E. F.: *Anal. Biochem.*, 48, 422, 1972.
 [10] Fridovich, I.: *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147, 1975.

[本文于1983年9月19日收到]

Mo-S 结构在含钼酶中的作用

——含钼酶模型研究

钱露萍 陈冬兰 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所)

微量元素钼,在许多氧化还原酶的活性中,起很重要的作用。目前已知有固氮酶、NADH脱氢酶、硝酸还原酶、亚硫酸氧化酶、醛氧化酶、黄嘌呤脱氢酶、黄嘌呤氧化酶等七种含钼酶^[1],它们的共同特点是分子量大,底物专一性差,转换率低。除了酶蛋白以外,还含有其它辅基成分,每分子含1—2个钼原子,金属铁或细胞色素b和黄素。

Schrauzer^[2]的钼-半胱氨酸络合物(图1),能够模拟固氮酶的许多功能,我们曾利用它作为固氮酶模型,探讨固氮酶反应中ATP和Fe-S原子簇的作用^[3],初步认为Mo-SH结构参与固氮酶的活性中心,Fe-S原子簇与电子传递有关。

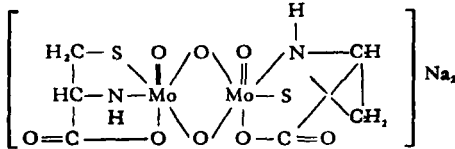


图1 Mo-S 络合物结构式

本文按同法,用Mo-SH络合物,模拟硝酸还原酶,亚硫酸氧化酶,黄嘌呤氧化酶催化性能,以观察Mo-SH结构在含钼酶中的作用。

一、材料和方法

1. Mo-SH 络合物合成 按Kay^[4]法,在水溶液中用连二亚硫酸钠(保险粉)还原钼酸钠至紫红色,加适量半胱氨酸盐酸盐,用乙醇抽

提,重结晶数次,成土黄色粉末,抽干备用,使用时新鲜配置。

2. 菠菜Fd提取 参阅文献[3]。

3. Mo-SH 络合物催化活性分析

a) 催化NO₃⁻还原成NO₂⁻ 参阅Filner^[5]硝酸还原酶测定法。每毫升反应液含Mo-SH络合物3μmoles, KNO₃ 20μmoles; NADH 1μmole或保险粉3μmoles,以0.1M磷酸盐缓冲液pH7.5稀至终体积,厌氧操作,以注入新制保险粉或NADH为反应开始,于30℃水浴中保温,不同时间取样,显色反应。即1毫升反应液加1毫升1%磺胺(溶于3N HCl)和1毫升0.02% N-1-萘乙烯二亚胺二盐酸盐,室温17℃,10分钟后在540nm读光密度,以NaNO₂为标准曲线。

另法,按Garrett^[6]法测定NADH的氧化。3.5毫升反应液内含Mo-SH络合物0.1μmole; NADH 1μmole, KNO₃ 20μmoles, 0.1M磷酸盐缓冲液pH7.5稀至终体积,15℃于340nm不同时间测光吸收的降低。

b) 催化黄嘌呤氧化 类似黄嘌呤氧化酶的分析^[7],用黄嘌呤为还原底物, O₂作受体,以华氏微量呼吸法测定O₂的摄入。因为黄嘌呤氧化不伴随CO₂释放,所以华氏瓶的主室中心杯可以不加碱。2毫升反应液内含Mo-SH络合物4μmoles,黄嘌呤20μmoles(溶于NaOH),

空气饱和的 0.05M 焦磷酸盐缓冲液 pH8.5 稀释至终体积。底物黄嘌呤放在侧臂内,于 30°C 平衡 10 分钟后,由侧臂倒入主室作为反应开始,不同时间读数,活力以 Q_{O_2} 微升表示。

c) 催化 SO_3^- 氧化 参阅亚硫酸氧化酶的活力分析^[8],测定 O_2 的摄入。2 毫升反应液内含 Mo-SH 络合物 4 μ moles, Na_2SO_3 40 μ moles (新鲜配置,溶于 0.1M Tris-HCl 缓冲液 pH9.0,防止自动氧化),以空气饱和的上述缓冲液稀至终体积。

二、结果与讨论

1. Mo-SH 络合物的催化活性

以 Mo-SH 络合物,模拟各氧化还原酶的催化活性,见图 2(a、b、c)。从图 2 可见,在相同条件下,单独存在 MoO_4^- , 半胱氨酸 (cys), 或 Fe-S 原子簇,均无催化活性,只有 Mo-SH 络合物才显示催化活性,表明 Mo-SH 结构是含

钼酶络合底物的必需功能团,而 Fe-S 原子簇不能络合底物。

2. Ferredoxin (Fd) 对 Mo-SH 络合物催化活性的影响

菠菜 Fd 是 2Fe-2S 中心的 Fe-S 蛋白,前面实验已证明它不是钼酶的必需基团,至于对 Mo-SH 络合物催化活性的影响,由图 3a、b,可以看到它均有促进作用。在这二个氧化还原反应中, O_2 是受体,底物是供体,加入的 Fd,可能是一个中间载体,起传递电子的作用,缩短供体与受体之间的势矩而加速氧化还原,或者是还原的 Fd,使 Mo-SH 络合物进一步还原,即 $Mo(V) \rightarrow Mo(IV)$,而 $Mo(IV)$ 更具催化活性。天然黄嘌呤氧化酶,硝酸还原酶,除了是含钼酶外,又是 Fe-S 酶,尤其是黄嘌呤氧化酶,含的 Fe-S 原子簇完全与菠菜 Fd 相同。亚硫酸氧化酶也含 Fe 辅基,估计钼酶中的 Fe-S 原子簇均起电子传递作用。

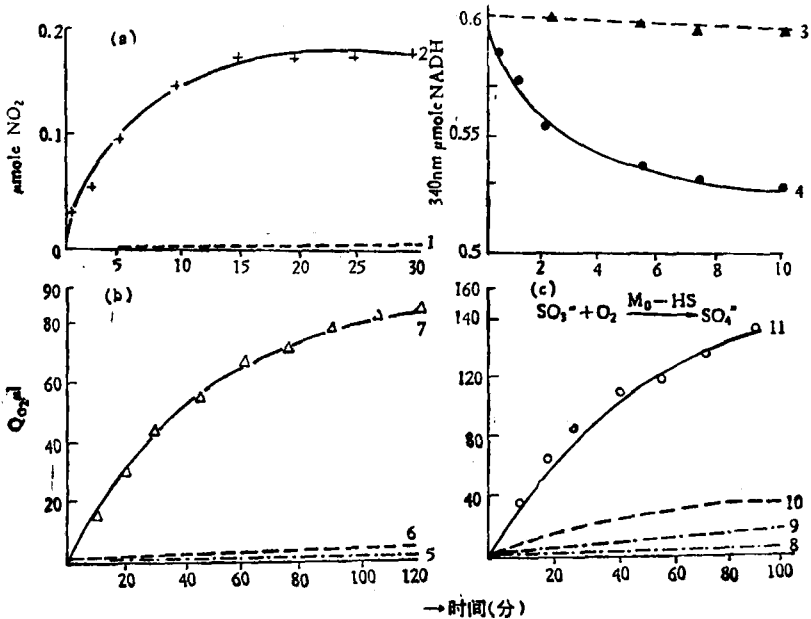


图 2 Mo-SH 络合物催化各底物氧化还原的活性

- a) 模拟硝酸还原酶, $NO_3^- + e \xrightarrow{Mo-SH} NO_2^-$, 左: 测 NO_2^- 的还原 曲线 1: $MoO_4^{2-} 5 \mu M$ 对照 曲线 2: Mo-SH 络合物, 详见方法。右: 测 NADH 的氧化 曲线 3: MoO_4^{2-} 对照 曲线 4: Mo-SH 络合物, 见方法述。
- b) 模拟黄嘌呤氧化酶, $黄嘌呤 + O_2 \xrightarrow{Mo-SH} 尿酸$, 条件见方法, 曲线 5: Fd 0.02 μM , 对照 曲线 6: MoO_4^{2-} 对照 曲线 7: Mo-SH 络合物。
- c) 模拟亚硫酸氧化酶, $SO_3^{2-} + O_2 \xrightarrow{Mo-SH} SO_4^{2-}$, 条件见方法。曲线 8: Fd 0.02 μM 对照。曲线 9: 半胱氨酸 (cys.) 5 μM 对照。曲线 10: MoO_4^{2-} 对照。曲线 11: Mo-SH 络合物。

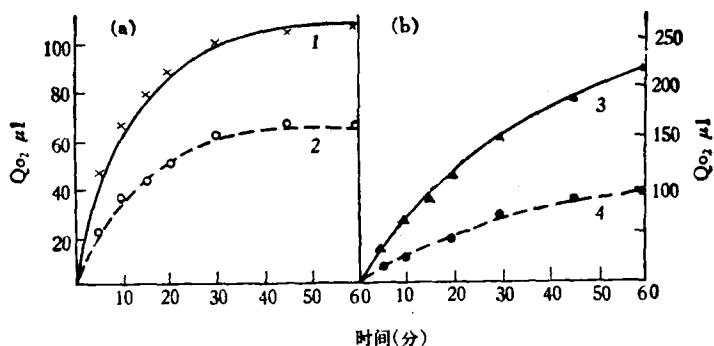


图3 Fd对Mo-SH络合物催化活性的影响

- a) Fd对Mo-SH络合物模拟黄嘌呤氧化酶的影响 反应条件同图2b, 曲线1: Mo-SH + Fd0.02 μ m 曲线2: Mo-SH络合物
 b) Fd对Mo-SH络合物模拟亚硫酸氧化酶的影响, 条件同图2c; 曲线3: Mo-SH + Fd0.02 μ m 曲线4: Mo-SH络合物

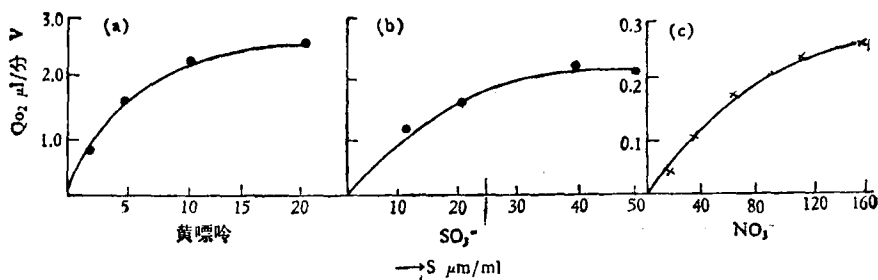


图4 底物浓度和Mo-SH络合物催化速度的关系

- a) 黄嘌呤氧化, 底物浓度变化如图, 测定系统见本文“方法”部分 b) 亚硫酸氧化 c) 硝酸氧化

表1 天然酶系抑制剂对Mo-SH络合物催化活性影响

抑制剂	最终浓度 (M)	抑制百分数 (%)		
		NO ₃ ⁻ 还原	黄嘌呤氧化	SO ₃ ²⁻ 氧化
KCN	1 × 10 ⁻³	—	30	41
Na ₂ AsO ₃	1 × 10 ⁻³	15	0	20
NaN ₃	1 × 10 ⁻³	26	—	—

实验条件: 抑制剂与Mo-SH络合物预保温10分钟, 然后加入底物开始反应。其余见“方法”部分。

3. 抑制剂影响

试验天然酶系的抑制剂对Mo-SH络合物催化活性的影响(表1), 结果表明酶的抑制剂, 对模型系统同样具有抑制作用, 反应类似。

4. 底物亲和力

Mo-SH络合物依各种底物浓度的反应速度, 示于图4。以速度和浓度的双倒数作图, 可求得米氏常数 K_m , 在实验条件下分别求得 NO₃⁻ 还原 $K_m = 4.5 \times 10^{-2} M$; 黄嘌呤氧化 $K_m =$

$3 \times 10^{-3} M$; 对 SO₃²⁻ 氧化 $K_m = 1 \times 10^{-2} M$, 与天然酶系相比, 亲和力差 10—100 倍。

二、讨 论

模型 Mo-SH 络合物能有效地模拟固氮酶以外的含钼酶, 包括催化行为、产物、对抑制剂的反应等, 与天然酶系极为相似, 说明 Mo-SH 络合物是含钼酶共同的活性中心模型, Fe-S 原子簇不能络合底物, 却能促进 Mo-SH 络合物的催化作用, 表明它仅与促进电子传递有关, 而并不参与必需的功能团。从与底物亲和力计算, 模型系统转换率只是天然酶系的 1—10%。

参 考 文 献

- [1] Bray, R. C. et al.: *Structure and Bonding*, 11, 107, 1972.
 [2] Schrauzer, G. N.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 1008, 1970.

[3] 钱露萍等:《植物生理学报》, 5, 49, 1979。
[4] Kay, A. et al.: *Nature*, 219, 267, 1968。
[5] Filner, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 299, 1966。
[6] Garrett, R. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58, 1063, 1967。

[7] Doisy, R. J., et al.: *J. Biol. Chem.*, 217, 307, 1955。
[8] Tager, J. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 111, 1955。

[本文于1983年9月19日收到]

生物发光分析中细菌荧光素酶及其与黄酶 在琼脂糖 4B 上固定条件的研究

聂松青

(北京医学院生物物理教研室)

一、引言

生物发光分析中常用的两个发光系统是萤火虫荧光素酶和发光细菌的荧光素酶^[1]。萤火虫酶发光系统已被广泛应用来定量检测各种样品中的 ATP, 细菌发光系统可用来检测 NADH、FMN、乳酸脱氢酶等多种酶和底物。生物发光分析具有特异性强、灵敏度高、速度快等优点。近年来建立的固定酶法, 与可溶性酶法相比, 具有酶可重复使用、稳定性好, 催化效率高^[2]等特点。本文报道细菌荧光素酶及其与黄酶(代替 NADH:FMN 氧化还原酶)用琼脂糖 4B 固定, 各种条件对生物发光分析的影响。

二、材料和方法

化学试剂: 琼脂糖 4B(pharmacia Fine chemicals, Sweden), 溴化氰(Estman chemicals Kodak), 癸醛、BSA(Sigma), NADH、FMN、黄酶均是西德产品。

酶的制备: 细菌荧光素酶是从冰冻的发光细菌(*Beneckea harveryi* strain B-392)按 Baldwin 等的方法分离提纯的^[3]。实验中所用的酶, 在使用前均以 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.0)稀释。

1. 酶的固定

(1) 琼脂糖 4B 的活化^[4] 5g 琼脂糖 4B 用水洗涤抽干, 加 10ml 2M K₂CO₃ 在冰浴上搅

拌, 不断加入 CNBr (溶于乙腈)。反应完后, 在玻璃漏斗上用水, 然后用 0.1M 焦磷酸液洗涤抽干。

(2) 酶的固定 活化的琼脂糖 4B 加酶溶液在试管中进行偶联反应, 用 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.0, 内含 10⁻⁴M DTT); 0.1M 磷酸缓冲液、10⁻⁴M DTT、1M NaCl pH7.0; 0.1M 磷酸缓冲液, 10⁻⁴M DTT 洗涤。最后悬浮在 1.5ml 0.1M 磷酸缓冲液中(pH7.0)。

2. 生物发光分析

(1) 荧光素酶活性测定 5 μ l 癸醛加 10ml 乙醇制得癸醛储备液。10 μ l 储备液加至 9.99ml 0.1M 磷酸缓冲液中得癸醛缓冲液。取 0.42ml 癸醛缓冲液于小管中, 加 10 μ l 固定酶溶液摇匀, 立即放至 Amico-chem-Glow 光度计上, 通过仪器密封垫向小管内注入事先在钨灯下光还原的 FMN 溶液 100 μ l (1.5 \times 10⁻⁴M FMN, 5 \times 10⁻³M EDTA 溶在 0.1M 磷酸缓冲液中)。FMN 光还原成 FMNH₂。记录产生的相对光强, 计算出固定酶活性。

(2) 黄酶活性测定 参照 Jablonski 的方法进行^[5]。

(3) 荧光素酶、黄酶偶联系统酶活性测定及 NADH 的发光分析 取 0.5ml 癸醛缓冲液, 10 μ l 1.5 \times 10⁻³M FMN, 10 μ l 2 \times 10⁻²M NADH 到分析小管中, 最后加 10 μ l 荧光素酶、黄酶偶