

棕色固氮菌 *nifE* 缺失突变株(DJ35)钼铁蛋白的特性赵颖^{①②} 边少敏^{①②} 张纯喜^③ 周会娜^{①②} 王煌平^{①④} 赵剑峰^① 黄巨富^{①*}

(① 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093; ② 中国科学院研究生院, 北京 100039;

③ 中国科学院化学研究所光化学重点实验室, 北京 100080; ④ 福建师范大学生物工程学院, 福州 360007. * 联系人,

E-mail: jfhuang@ibcas.ac.cn)

摘要 从棕色固氮菌缺失 *nifE* 的突变株 DJ35 中纯化得到纯度约为 80% 的 MoFe 蛋白(*AnifE* Av1). 与野生种 OP 中纯化出的 MoFe 蛋白(OP Av1)相比, *AnifE* Av1 具有与之相同的亚基组成, 并可与 OP Av1 的抗体发生免疫交叉反应, 但在厌氧天然电泳中的迁移率略大于 OP Av1. 金属含量测定表明, *AnifE* Av1 的 Mo 和 Fe 含量均显著下降. *AnifE* Av1 单独与 OP Fe 蛋白互补时不具乙炔还原活性, 但可被从 OP Av1 中抽提出的 FeMo-co 体外激活. *AnifE* Av1 的圆二色谱 450 nm 附近区域与 OP Av1 的相似, 而电子顺磁共振谱中 $g \approx 3.7$ 的信号则完全消失, $g \approx 4.3$ 和 2.0 处的信号也分别下降 75% 和 50% 左右. 上述结果表明, 从 DJ35 中纯化出的 *AnifE* Av1 是一种 FeMo-co 缺失而 P-cluster 正常的 MoFe 蛋白.

关键词 棕色固氮菌 *AnifE* Av1 FeMo-co P-cluster 电子顺磁共振

生物固氮是自然界最重要的化学反应之一. 催化这一反应的是一种厌氧金属酶——固氮酶. 经典的含钼固氮酶由 2 个独立的组分蛋白——MoFe 蛋白和 Fe 蛋白组成. 由 *nifH* 编码的 Fe 蛋白是相同亚基组成的二聚体(γ_2). MoFe 蛋白则是一个 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体, 2 个亚基分别由 *nifD* 和 *nifK* 编码. MoFe 蛋白中存在 2 种独特的金属原子簇: FeMo-co(MoFe₇S₉+ 高柠檬酸)和 P-cluster(Fe₈S₇). 其中 FeMo-co 被公认为底物结合和还原的位点^[1,2]. FeMo-co 的生物合成是一个复杂的过程, 至少需要 6 个固氮基因(*nif*)的参与: *nifN*, *nifE*, *nifB*, *nifH*, *nifQ* 和 *nifV*^[3,4]. 尽管上述 6 基因任一缺失或突变都会因 FeMo-co 无法合成而形成缺失 FeMo-co 的 MoFe 蛋白(apo-MoFe 蛋白), 但不同基因缺失形成的突变株 apo-MoFe 蛋白在结构和特性上仍存在差异^[5,6]. FeMo-co 缺失且 P-cluster 正常的 MoFe 蛋白对于研究完整 MoFe 蛋白的成熟过程以及 P-cluster 的特征具有重要价值^[7]. 例如, Schmid 等人^[8]对 *AnifB* Av1 分辨率 0.23 nm 的结构研究, 揭示了完整 MoFe 蛋白合成过程的最后一步——FeMo-co 插入的通路. 对于不同 apo-MoFe 蛋白的对比研究, 必将有助于固氮酶催化过程的动态研究, 从而最终阐明固氮酶的作用机理.

nifE 是 FeMo-co 生物合成中间过程的重要基因之一. 在棕色固氮菌中, NifE 和 NifN 分别合成后组装成一个金属蛋白四聚体, 作为 FeMo-co 合成的脚手架. NifEN 复合体已被成功纯化, 对其特性和生物功能也已有研究^[9-13]. 研究认为, FeMo-co 生物合成所需的 Fe 和 S 原子首先聚集于 NifB 上形成 NifB-co (FeMo-co

前体)^[9], 然后传递到 NifEN^[10,11]. 最近, Hu 等人^[13]指出, 通过需要固氮酶 Fe 蛋白参与和 MgATP 水解的 FeMoco 成熟过程, 结合于 NifEN 的 FeMo-co 前体才能随着 Mo 和柠檬酸盐的加入而得以成熟. 但 FeMo-co 在 NifEN 上组装和成熟的途径仍未完全阐明. 一般说来, *nifE* 缺失将导致合成的固氮酶失去活性. 但一项以 *nifE* 荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)为对象的研究^[14]却显示, 尽管 NifEN 复合体无法合成, 该突变种仍具有较低的固氮生长和乙炔还原能力, 并且 Mo 的存在可以使其活性提高. 对纯度约为 40% 的 MoFe 蛋白(*nifE*⁻ Rcl)的 EPR 谱和金属含量分析证实其中含有 FeMo-co(1.7 mol FeMo-co/mol 四聚体). 这一发现无疑是对传统研究结果的一个挑战——*nifE* 对于 FeMo-co 的生物合成, 或许并非是必需的. FeMo-co 在无 *nifE* 参与的条件是如何合成的? 是否有其他基因产物可以替代 NifE 的功能? 这种现象是否具有普遍性, 抑或是一条仅存于荚膜红细菌中的替代途径? 欲解决以上问题, 一条重要的途径就是构建其他固氮生物的 *nifE* 缺失突变株, 研究其 MoFe 蛋白的结构与特性.

棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii* Lipmann)是固氮酶研究的常用模式生物. 在以前的研究中, 我们从棕色固氮菌 *nifE* 缺失突变株 DJ35 中首次纯化出了 FeMo-co 缺失的 MoFe 蛋白(*AnifE* Av1)^[15], 并对其结晶条件进行了初步探讨^[16]. 本文着重于 *AnifE* Av1 的生物化学与波谱学特性研究, 并与野生种 OP Av1 和其他 FeMo-co 缺失 MoFe 蛋白的特性进行对比, 以期从结

构与功能间关系的角度, 推动固氮酶研究的发展.

1 材料与方法

(i) 菌种与培养条件. 棕色固氮菌野生种 OP 和 *nifE* 缺失突变株 DJ35 由美国加州大学 Burgess 教授惠赠. DJ35 的构建方法见文献[17]. OP 采用修改的 Burk's 培养基[18], 在 10 L 发酵罐中培养. 培养条件: 温度 30°C, 转速 300 r/min, 通气量 $V_{\text{media}}/V_{\text{air}} = 3.5$. 培养至对数生长期后期 ($A_{660 \text{ nm}} = 1.0$ 左右) 离心收获菌体. 培养 DJ35 时, 培养基中按 0.5 g/L 的比例加入乙酸铵, 在培养过程中用 Nessler's 试剂定时监测, 待氨耗完 3 h 后停止发酵, 收获菌体. 其余条件同 OP 培养.

(ii) Av1 的纯化. 菌糊用 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 洗 1 次, 在厌氧条件下用 French Pressure cell press 压榨机 (Amicon) 破碎细胞. OP Av1 和 *ΔnifE* Av1 的纯化步骤分别参照 Burgess 等人[19] 和 Zhao 等人[15] 的方法进行. 纯化过程所用一切缓冲液预先抽气充氩, 用前加入 1.7 mmol/L 连二亚硫酸钠 (DT). 纯化得到的 OP Av1 和 *ΔnifE* Av1 保存于液氮中.

(iii) 蛋白质电泳与免疫印迹. 厌氧天然电泳参照 Ornstein[20] 的方法, 在氩气流下 4°C 进行, 分离胶浓度为 6%. 凝胶贮液和电极缓冲液使用前均充分抽气充氩. 免疫印迹参照骆爱玲等人[21] 的方法. 3,5-二氨基苯甲酸染铁参照 Kuo 等人[22] 的方法. SDS-PAGE 参照 Laemmli[23] 的方法, 分离胶浓度 12%.

(vi) 金属含量分析. 蛋白质样品消化参照 Blanchard 等人[24] 的方法进行. 采用 Perkin Elmer OPTIMA 2000 DV 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定消化样品的 Mo 和 Fe 含量. Mo (0, 0.4, 2.0, 4.0 μg/L) 和 Fe (0, 4.0, 12.0, 20.0 μg/L) 的混合外标溶液用 2% 硝酸配制.

(v) 波谱学分析. 可见光区圆二色谱 (Vis-CD) 于室温在 JASCO J-720 圆二色谱仪上测定, 波长范围 350~800 nm, 光径 0.5 cm. 液氮 EPR 谱用 Bruker Elexsys E500 EPR 仪测定. 测定参数为: 微波能量, 5 mW; 微波频率, 9.38 GHz; 调制幅度, 10 G; 测定温度, 7 K.

(vi) 重组与活性测定. *ΔnifE* Av1 重组体系含有 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 6.5 mmol/L DT, 1.25 mg 野生种 Fe 蛋白, 1.0 mg *ΔnifE* Av1, 总体积 1.0 mL. 加入 *N*-甲基甲酰胺 (NMF) 抽提的 FeMo-co 后 30°C 保温 1 h. 取混合物 50 μL, 参照 Burgess 等人[19] 的方法测定乙炔还原活性.

2 结果与讨论

2.1 柱层析与电泳行为

DJ35 粗提物经过 DEAE cellulose 52, Sephacryl S-200 和 Q-Sepharose 柱层析后, 得到 *ΔnifE* Av1 制备物. 与 OP Av1 相比, *ΔnifE* Av1 有相似的 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱保留体积, 以及 DE52 和 Q-Sepharose 柱洗脱盐浓度. 但厌氧天然电泳表明, *ΔnifE* Av1 迁移率略大于 OP Av1, 并且条带更加分散 (图 1(a)). 已有研究表明, FeMo-co 对于稳定 Av1 的结构起着重要的作用, 缺失 FeMo-co 的 *ΔnifH* Av1 具有多种构象[25]. 因此, 天然电泳中显示出的差异可能是由于 FeMo-co 缺失使得蛋白质分子量略微降低, 电荷性质有所改变, 甚至构象也发生了变化. 此外, 天然电泳结果显示, *ΔnifE* Av1 制备物纯度低于 OP Av1, 仅有 80% 左右. 这是由于二者纯化步骤的差异引起的: 在 OP Av1 纯化过程中, 粗提物柱层析前首先经过 60°C 加热处理以去除部分杂蛋白. 而考虑到 FeMo-co 缺失可能导致 Av1 热稳定性下降, 该步骤在 *ΔnifE* Av1 纯化过程中被省略. OP Av1 经 DEAE-52 柱梯度纯化后, 通过超滤脱盐浓缩的方法, 得到了高纯度高活性的 OP Av1 微晶. 但对 *ΔnifE* Av1 的超滤却未能获得微晶, 这意味着 *ΔnifE* Av1 与 OP Av1 相比稳定性较低, 或二者理化性质有所不同. 尽管天然电泳行为与 OP Av1 稍有差异, 但免疫印迹证明, *ΔnifE* Av1 可以与 OP Av1 的抗体发生交叉反应 (图 1(b)), 也可以被 3,5-二氨基苯甲酸染铁试剂专一性地显色 (图 1(c)). 此外, 在 SDS-PAGE 中, *ΔnifE* Av1 也显示出与 OP Av1 α 和 β 亚基分别对应的 2 条带 (图 2). 由此说明, *ΔnifE* Av1 是一种与 OP Av1 具有相同亚基组成的含铁蛋白.

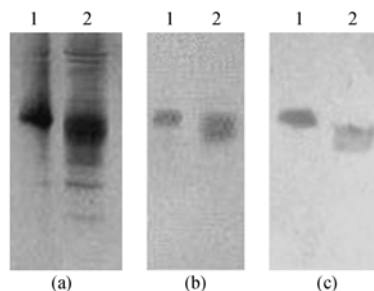


图 1 结晶 OP Av1 (1) 和 *ΔnifE* Av1 制备物 (2) 的厌氧天然电泳 (6%)

(a) 考马斯亮蓝染色; (b) 免疫印迹; (c) 染铁. (a) 和 (b), OP Av1 和 *ΔnifE* Av1 上样量分别为 11.6 和 36.8 μg; (c), OP Av1 和 *ΔnifE* Av1 上样量分别为 11.6 和 58.8 μg

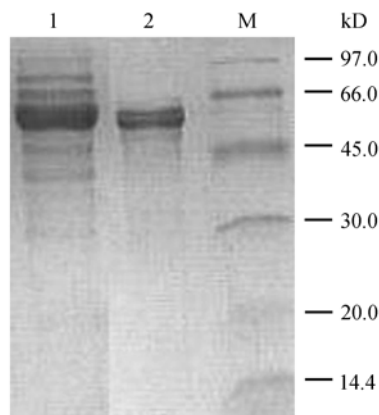


图2 $\Delta nifE$ Av1 制备物(1)和 OP Av1(2)的 SDS-PAGE(12%)
 $\Delta nifE$ Av1 制备物和 OP Av1 上样量分别为 5.0 和 2.3 μg .
 M, 低分子量标准

2.2 $\Delta nifE$ Av1 的 FeMo-co 体外激活

从 OP Av1 中抽提出的 FeMo-co 可以有效激活缺失 FeMo-co 的 UW45 $nifB^-$ Av1 [26,27]. 这种成功激活常被作为证明激活对象是缺失 FeMo-co 的 apo-Av1 的一个重要证据. $\Delta nifE$ Av1 与 $nifB^-$ Av1 一样, 可以被从 OP Av1 中抽提的 FeMo-co 激活, 重组成具有乙炔还原活性的固氮酶(表 1). 在相同条件下, $\Delta nifE$ Av1 和 $nifB^-$ Av1 的比活性分别为 552 和 896 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 这与在其他突变株报道的 MoFe 蛋白活性结果相近 [9,28,29].

表 1 $\Delta nifE$ Av1 的体外 FeMo-co 激活^{a)}

处理	比活性/ $\text{nmol C}_2\text{H}_4\text{-formed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ b)}$		
	$\Delta nifE$ Av1	$nifB^-$ Av1	OP Av1
缓冲液	10	12	2087
FeMo-co	552	896	ND ^{c)}

a) $nifB^-$ Av1(339 μg)和 $\Delta nifE$ Av1(689 μg)分别加入 10 μL FeMo-co 抽提物, 30°C 保温 70 min; b) 373 μg OP Fe 蛋白与 52 μg 重组 $\Delta nifE$ Av1 或 $nifB^-$ Av1 互补, 30°C 反应 8 min 后测定, 所有活性都减去了 OP Fe 蛋白中残存的 Av1 所引起的活性; c) 未测

与 OP Av1 相比, $\Delta nifE$ Av1 被 FeMo-co 激活的比活性较低, 原因可能有二: (i) $\Delta nifE$ Av1 制备物纯度低于 OP Av1, 仅有 80% 左右; (ii) FeMo-co 加入量不足. 由于 FeMo-co 抽提所用的有机溶剂 NMF 对固氮酶蛋白具有抑制或损伤作用, 因此用于激活的 FeMo-co 加入量仅为理论需要量的 1/3. 已有研究显示, 加入 3 倍于蛋白分子的 FeMo-co 并经 DEAE 52 柱层析除去抑制活性的抽提溶剂后, $nifB^-$ Av1 的比活性可达到 2000 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ [26,27,29]. 按此比例推算, $\Delta nifE$ Av1 完全激活后, 比活性可达到 2070 nmol

$\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. 由于 $nifE$ 缺失的突变株菌体本身不能固氮生长, 并且其粗提液也无乙炔还原活性, 而从其纯化出的 $\Delta nifE$ Av1 可被 FeMo-co 激活, 因此可以推断, $\Delta nifE$ Av1 与 $nifB^-$ Av1 一样, 也是一种含有 P-cluster 而缺失 FeMo-co 的 apo-Av1.

2.3 金属含量分析

天然电泳染铁实验显示, 尽管 $\Delta nifE$ Av1 上样量远大于 OP Av1, 其显色强度却明显较弱, 表明 $\Delta nifE$ Av1 的 Fe 含量远低于 OP Av1 (图 1(c)). 利用 ICP-OES 进行的金属含量测定证实了这一观察结果(表 2). 每摩尔 OP Av1 含 Mo 和 Fe 分别为 1.82 和 30.01 mol, 而对于 $\Delta nifE$ Av1 制备物的测定值却分别只有 0.36 和 9.96 mol. 若纯度以 80% 计算, 则 $\Delta nifE$ Av1 中含 Mo 和 Fe 的摩尔数分别为 0.45 和 12.45. 与 Fe 含量降低相比, $\Delta nifE$ Av1 的 Mo 含量降低更明显, 从而使它的 Fe/Mo 比相当于 OP Av1 的 1.7 倍. 这说明 $\Delta nifE$ Av1 最可能缺失的原子簇是 FeMo-co 而非 P-cluster. Hawkes 等人 [30] 曾报道, 尽管 *Klebsiella pneumoniae* 的 $\Delta nifB$ Kp1 也是一种 FeMo-co 缺失的 MoFe 蛋白, 每分子却仍可检测到含有 0.4~0.9 个 Mo 原子, 但这部分 Mo 来源于污染, 而并未用于组成 FeMo-co. 因此同样可以推断, 在 $\Delta nifE$ Av1 中存在的少量 Mo 并未参与组装 FeMo-co, 而 Fe 全部来源于 P-cluster. 这个推断与 FeMo-co 激活实验的结果一致.

表 2 OP Av1 和 $\Delta nifE$ Av1 的金属组成和乙炔还原活性

蛋白	金属含量		Fe/Mo	比活性/nmol C ₂ H ₄ · min ⁻¹ · mg ⁻¹ pro
	/mol atom · mol ⁻¹ pro			
	Fe	Mo		
OP Av1	30.01±1.32	1.82±0.17	16.49	2087
<i>ΔnifE</i> Av1	9.96±0.94	0.36±0.10	27.67	10

2.4 $\Delta nifE$ Av1 的 EPR 特性

OP Av1 中处于还原态的 FeMo-co 可在 $g \approx 4.3$, 3.7 和 2.0 的位置显示自旋态 $S = 3/2$ Fe 的 EPR 信号 [31]. 与在 $g \approx 4.3$ 和 2.0 处的信号相比, $g \approx 3.7$ 处的信号可能因更少与来自于其他含铁原子簇信号发生叠加而更能专一反映 FeMo-co 的氧化状态和数目, 因此, MoFe 蛋白 EPR 测定的大多实验都采用 $g \approx 3.7$ 处的信号来反映 FeMo-co 的状态和数目. 从图 3 中可以看出, OP Av1 在 $g \approx 4.3$, 3.7 和 2.0 的位置具有 $S = 3/2$ EPR 信号. 而 $\Delta nifE$ Av1 的 EPR 信号则与 OP Av1 明显不同: $g \approx 3.7$ 处的 EPR 信号完全消失, $g \approx 4.3$ 和 2.0 处的 EPR 信号强度也分别降低了 75% 和 50% 左右. 此外, 在 g

≈ 3 和 2 处还出现 2 个较小的 EPR 信号. Gavini 等人^[6]发现, 缺失 FeMo-co 的 *AnifH* Av1 (DJ54) 在 $g \approx 2$ 处出现一个与 OP Av1 不同的 EPR 信号(图 3 插图). 最近 Hu 等人^[32]也报道, 缺失 FeMo-co 的 His-tagged *AnifZ* *AnifB* Av1(AvYM6A) 和 FeMo-co 正常的 His-tagged *AnifZ* Av1(DJ1182)也都在 $g \approx 2$ 处出现一个与 *AnifH* Av1(DJ54)相同的信号. 他们认为, 这些蛋白中的一个 P-cluster 已被由 2 个 [4Fe-4S] 簇组成的 P-cluster 前体取代, 从而在 $g \approx 2.0$ 的位置出现与 OP Av1 不同的又与之叠加的信号. 然而, *AnifE* Av1 在 $g \approx 2.0$ 处的信号形状却与含 [8Fe-7S] 的 OP Av1 相同. 由此可见, *AnifE* Av1 含有正常的 P-cluster. 正因如此, *AnifE* Av1 只在与 FeMo-co 保温后, 才能与固氮酶 Fe 蛋白形成具有活性的固氮酶. 至于在 $g \approx 3$ 和 $g \approx 2$ 间的 2 个较小 EPR 信号, 可能来源于污染蛋白而非 FeMo-co.

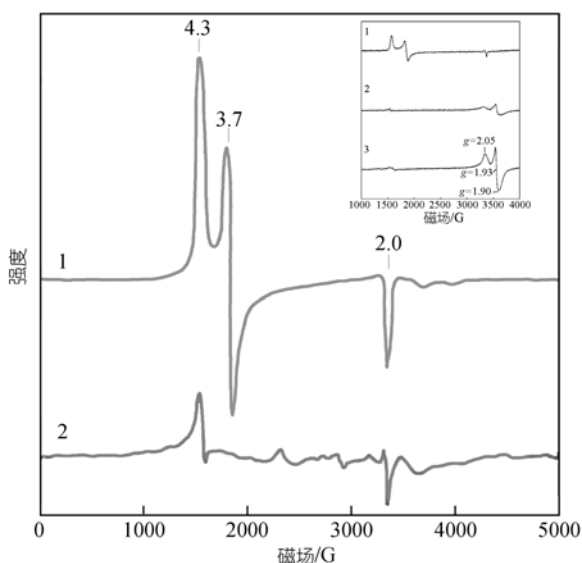


图 3 DT 还原的 OP Av1(1)和 *AnifE* Av1 的 EPR 谱
蛋白浓度均为 10 mg/mL. 插图所示为 OP Av1(1), *AnifB* Av1(2)
和 *AnifH* Av1(3)的 EPR 谱(引自文献^[7])

上述研究表明, 在棕色固氮菌中, *nifE* 的缺失将导致 FeMo-co 无法合成. 然而, 令人惊奇的是荚膜红细菌正常合成的 MoFe 蛋白(B10S Rc1)及其 *nifE*⁻ 突变株合成的 MoFe 蛋白(*nifE*⁻ Rc1)都具有与 OP Av1 相同的 3 个 EPR 特征信号^[13], 相关研究也证明 *nifE*⁻ Rc1 中含有 FeMo-co, 表明 *nifE* 并不是 FeMo-co 合成所必需的基因. 如果这一结果能够得以证实, 那么 *nifE* 是否为 FeMo-co 合成所必需很可能是取决于固氮菌的种属差异. 除此之外, 目前还无法解释这一矛盾结果.

2.5 *AnifE* Av1 的圆二色谱

固氮酶 MoFe 蛋白的 CD 谱研究表明, 可见光范围的 CD 谱对于金属原子簇周围蛋白质结构, 即肽链的构象变化非常敏感, 当还原态 MoFe 蛋白发生可逆氧化时, 它在 450 nm 附近区域的摩尔椭圆率 ($[\theta]_{450 \text{ nm}}$) 随其 P-cluster 的氧化而降低; 随后还原剂又可使 P-cluster 还原, 从而使降低的摩尔消光系数得到完全恢复. 而 520 nm 附近或大于 520 nm 区域的 MoFe 蛋白的 CD 谱变化远不如在 450 nm 附近的变化, 但仍可观察到随另外一种原子簇——FeMo-co 氧化状态和数目的改变而发生的变化. 因此, $[\theta]_{450 \text{ nm}}$ 和 $[\theta]_{\geq 520 \text{ nm}}$ 可以分别反映 P-cluster 和 FeMo-co 的数目和状态^[6,33,34]. 图 4 比较了 DT 还原状态的 OP Av1 和 *AnifE* Av1 的 Vis-CD 谱. 由于二者处于相同的氧化-还原状态, 因此其 CD 谱主要反映的是金属原子簇数量的变化. 由图 4 可以看出, 二者在 350~700 nm 范围内大致趋势相似, 但 *AnifE* Av1 的摩尔椭圆率总体稍低, 这可能部分由其纯度较低所致. 就相对值而言, 与 OP Av1 相比, *AnifE* Av1 的 $[\theta]_{450 \text{ nm}}$ 降低较少, 而 $[\theta]_{\geq 520 \text{ nm}}$ 降低较多, 这为 *AnifE* Av1 中可能含有与 OP Av1 相同的 P-cluster, 但不含 FeMo-co 的推论提供了又一证据.

已有研究表明, 在棕色固氮菌突变株 *AnifH* Av1 (DJ54) 中, 除了 FeMo-co 缺失外, P-cluster 的结构或氧化-还原状态也与 OP Av1 的不同^[6,32]. 根据 *AnifH* Av1 的 Fe 含量(相当于 OP Av1 的 54%), 以及出现于 $g = 2.04$ 和 1.94 两处的 EPR 信号, Gavini 等人^[6]和 Hu 等人^[32]推测, *AnifH* Av1 中正常的 P-cluster 被 2 个类似于 [4Fe-4S] 的原子簇取代, 而 P-cluster 是在 Av1 蛋白部分构象重排过程中, 通过金属原子簇的缩合而形成的. 我们通过对 Vis-CD 谱和 EPR 谱的综合分

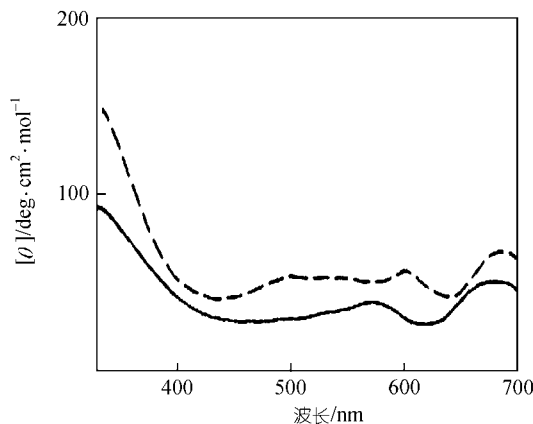


图 4 OP Av1(虚线)和 *AnifE* Av1(实线)的可见光区 CD 谱
蛋白浓度均为 10 mg/mL

析,认为 *AnifE* Av1 中含有正常结构的 P-cluster. 由此可见,尽管 *nifH* 和 *nifE* 都是 FeMo-co 而非 P-cluster 合成所必需的基因,但不同缺失可能由于作用机理的差异,影响 P-cluster 的合成和存在状态,甚至影响到整个蛋白的结构.

总之,对 DJ35 中 *AnifE* Av1 的纯化和特性研究初步证实,该蛋白是一种缺失 FeMo-co 而含有正常 P-cluster 的 MoFe 蛋白. 与其他突变株 FeMo-co 缺失的 MoFe 蛋白相比, *AnifE* Av1 既有共性,又有不同之处. 对其特性和结构的深入阐述对于固氮酶研究具有重要意义. 欲解析其结构,首先需要对 *AnifE* Av1 结晶条件进行优化,培养出适于进行 X-射线晶体衍射分析的优质大单晶. 这项工作目前正在进行中.

致谢 感谢李佳格先生在英文写作方面提供的指导. 本工作作为国家重点基础研究发展规划(批准号: 001CB1089-06)、国家自然科学基金(批准号: 30270296)和国家杰出青年基金(批准号: 20403024)资助项目.

参 考 文 献

- Howard J B, Rees D C. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem Rev*, 1996, 96: 2965~2982[DOI]
- Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, 1992, 257: 1677~1682
- Smith B E, Eady R R. Metalloclusters of the nitrogenases. *Eur J Biochem*, 1992, 205: 1~15[DOI]
- Burgess B K. The iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Chem Rev*, 1990, 90: 1377~1406[DOI]
- Tal S, Chun T W, Gavini N, et al. The *AnifB*(or *AnifE*) FeMo cofactor-deficient MoFe protein is different from the *AnifH* protein. *J Biol Chem*, 1991, 266: 10654~10657
- Gavini N, Ma L, Watt G, et al. Purification and characterization of a FeMo cofactor-deficient MoFe protein. *Biochemistry*, 1994, 33: 11842~11849[DOI]
- Ribbe M W, Hu Y, Guo M, et al. The FeMo-co-deficient MoFe protein produced by a *nifH* deletion strain of *Azotobacter vinelandii* shows unusual P-cluster features. *J Biol Chem*, 2002, 277: 23469~23476[DOI]
- Schmid B, Ribbe M W, Einsle O, et al. Structure of a cofactor-deficient nitrogenase MoFe protein. *Science*, 2002, 296: 352~356[DOI]
- Allen R M, Chatterjee R, Ludden P W, et al. Incorporation of iron and sulfur from NifB cofactor into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26890~26896[DOI]
- Roll J T, Shah V K, Dean D R, et al. Characteristics of NIFNE in *Azotobacter vinelandii* strains. *J Biol Chem*, 1995, 270: 4432~4437[DOI]
- Goodwin P J, Agar G N, Roll J T, et al. The *Azotobacter vinelandii* NifEN complex contains two identical [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry*, 1998, 37: 10420~10428[DOI]
- Suh M H, Pulakat L, Gavini N. Functional expression of the FeMo-cofactor-specific biosynthetic genes *nifEN* as a NifE-N fusion-protein synthesizing unit in *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299: 233~240[DOI]
- Hu Y, Fay A W, Ribbe M W. Identification of a nitrogenase FeMo cofactor precursor on NifEN complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3236~3241[DOI]
- Siemann S, Schneider K, Behrens K, et al. FeMo cofactor biosynthesis in a *nifE*⁻ mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1940~1952[DOI]
- Zhao J F, Zhao Y, Wang Z P, et al. Purification and activation *in vitro* of MoFe protein from a *nifE* deleted mutant strain of *Azotobacter vinelandii*. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 815~819
- Zhao Y, Zhao J F, Lü Y B, et al. Crystallization of nitrogenase MoFe protein from a mutant *nifE* deleted strain of *Azotobacter vinelandii*. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 427~431
- Brigle K E, Weiss M C, Newton W E, et al. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. *J Bacteriol*, 1987, 169: 1547~1553
- Strandberg G W, Wilson P W. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Can J Microbiol*, 1968, 14: 25~31
- Burgess B K, Jacobs D B, Stiefel E I. Large scale purification of high activity *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 614: 196~209
- Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci*, 1964, 121: 321~349
- 骆爱玲, 王继伟, 李佳格. 一种简便快速的蛋白质免疫印渍法介绍. *植物学通报*, 1995, 12: 63~64
- Kuo C F, Fridovich I. A stain for iron-containing proteins sensitive to nanogram levels of iron. *Anal Biochem*, 1988, 170: 183~185[DOI]
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- Blanchard C Z, Hales B J. Isolation of two forms of nitrogenase VFe protein from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 1996, 35: 472~478[DOI]
- Robinson A C, Chun T W, Li J G, et al. Iron-molybdenum cofactor insertion into the apo-MoFe protein of nitrogenase involves the iron protein-MgATP complex. *J Biol Chem*, 1989, 264: 10088~10095
- McLean P A, Wink D A, Chapman S K, et al. A new method for extraction of iron-molybdenum cofactor(FeMo-co)from nitrogenase adsorbed to DEAE-cellulose. 1. Effects of anions, cations, and preextraction treatments. *Biochemistry*, 1989, 28: 9402~9406[DOI]
- Wink D A, McLean P A, Hickman A B, et al. A new method for extraction of iron-molybdenum cofactor(FeMo-co)from nitrogenase adsorbed to DEAE-cellulose. 2. Solubilization of FeMo-co in a wide range of organic solvents. *Biochemistry*, 1989, 28: 9407~9412[DOI]
- Rangaraj P, Ryle M J, Lanzilotta W N, et al. *In vitro* biosynthesis of iron-molybdenum cofactor and maturation of the *nif*-encoded apodinitrogenase. Effect of substitution for NifH with site-specifically altered forms of NifH. *J Biol Chem*, 1999, 274: 19778~19784[DOI]
- Christiansen J, Goodwin P J, Lanzilotta W N, et al. Catalytic and biophysical properties of a nitrogenase Apo-MoFe protein produced by a *nifB*-deletion mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 1998, 37: 12611~12623[DOI]
- Hawkes T R, Smith B E. Purification and characterization of the inactive MoFe protein(NifB-Kp1)of the nitrogenase from *nifB* mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem J*, 1983, 209: 43~50
- Hawkes T R, Smith B E. The inactive MoFe protein(NifB⁻ Kp1)of the nitrogenase from *nifB* mutants of *Klebsiella pneumoniae*: its interaction with FeMo-cofactor and the properties of the active MoFe protein formed. *Biochem J*, 1984, 223: 783~792
- Hu Y, Fay A W, Dos Santos P C, et al. Characterization of *Azotobacter vinelandii* *nifZ* deletion strains. *J Biol Chem*, 2004, 279: 54963~54971[DOI]
- Stephens P J, McKenna C E, McKenna M C, et al. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of reduced molybdenum-iron of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochemistry*, 1981, 20: 2857~2864[DOI]
- 黄巨富, 骆爱玲, 解雪梅, 等. 钼铁蛋白金属原子簇的拆卸与组装的圆二色谱的研究. *微生物学报*, 1991, 31: 232~239

(2005-05-23 收稿, 2005-07-26 收修改稿)