

## 光合细菌 *Chromatium vinosum* 可溶性氢酶的 FTIR 谱的研究

龙敏南<sup>1</sup>, 苏文金<sup>1</sup>, S P J Albracht<sup>2</sup>, 张凤章<sup>1</sup>, 许良树<sup>1</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门, 361005;

2. E. C Slater Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands)

**摘要:**光合细菌 *Chromatium vinosum* 含有一种可溶性氢酶和一种膜结合态氢酶。氧化态可溶性氢酶在红外光谱区 ( $1860 - 2140 \text{ cm}^{-1}$ ) 有四个特征吸收峰 ( $2103.7$ ,  $2086.2$ ,  $2054.8$  和  $1962.5 \text{ cm}^{-1}$ )。其中  $1962.5 \text{ cm}^{-1}$  处吸收带的位置与已知的 NiFe-氢酶活性中心 -CO 基团所产生的吸收带位置相近; 另外三条吸收带的位置与已知的 NiFe-氢酶活性中心 -CN 基团所产生的吸收带的位置相近。以 2,6-二氯酚靛酚(DPIP)氧化可溶性氢酶时, 四条吸收谱带的位置基本上没有发生变化。可溶性氢酶被  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  充分还原时, -CO 基团的吸收带移至  $1946.8 \text{ cm}^{-1}$ , 而 -CN 基团的三条吸收带中的两条分别移至  $2076.8 \text{ cm}^{-1}$  和  $2093.1 \text{ cm}^{-1}$  处, 另一条则消失了。还原态可溶性氢酶与 CO 反应后, 其红外光谱显示七条吸收带, 在 -CO 基团红外光谱区和 -CN 基团红外光谱区各产生了两条新的吸收带。研究表明, *C. vinosum* 可溶性氢酶的活性中心的结构类似于其它已知的 NiFe-氢酶, 但与活性中心金属原子相连的可能包括三个 -CN 基团和一个 -CO 基团, 结合可溶性氢酶的 EPR 谱特征, 推测 *C. vinosum* 可溶性氢酶活性中心的结构可能为  $\text{Ni}(\text{CN})\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ 。

**关键词:** *Chromatium vinosum*; 可溶性氢酶; FTIR 谱

**中图分类号:** Q554 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)02-0267-08

氢酶是一类催化放氢与吸氢的酶, 由于它在氢能源开发与利用中的诱人前景而备受人们的重视<sup>[1]</sup>。根据氢酶在细胞中的位置, 可分为可溶性氢酶和膜结合态氢酶; 根据氢酶所含的金属元素可分为 NiFe-氢酶<sup>[2]</sup>, Fe-氢酶<sup>[3]</sup>及不含任何金属元素的氢酶<sup>[4]</sup>。NiFe-氢酶由一个大亚基(47-72kDa)和一个小亚基(21-35kDa)组成<sup>[2,5]</sup>。NiFe-氢酶的小亚基至少包含一个 [4Fe-4S] 簇, 它与位于大亚基的活性中心  $[\text{NiFe}(\text{CN})_2(\text{CO})]$  一起构成氢酶的反应中心<sup>[6-8]</sup>。NiFe-氢酶活性中心金属原子氧化还原状态的改变会影响 -CN 和 -CO 基团的伸缩振动频率, 从而引起其红外 (IR) 光谱吸收带位置的改变。在  $2140 - 1860 \text{ cm}^{-1}$  红外光谱区, NiFe-氢酶具有特异的吸收峰<sup>[9-11]</sup>; 对 Fe-氢酶 IR 谱的研究也得到了相似的结果<sup>[12]</sup>。

光合细菌 *Chromatium vinosum* 含有一种膜结合态氢酶<sup>[13]</sup>。近来, 我们发现 *C. vinosum* 还含有一种可溶性氢酶, 并对该酶进行了分离提纯, 获得了纯化的可溶性氢酶, 该酶由 52kD 和 21.5kD 两个亚基组成。研究表明, 可溶性氢酶是一种新的催化放氢的氢酶, 其催化放  $\text{H}_2$  的速率约为催化吸  $\text{H}_2$  速率的 10 倍<sup>[14]</sup>。本文研究了可溶性氢酶 FTIR 谱的某些特性。

收稿日期: 2000-10-24

基金项目: 教育部重点科技项目资助 (No. 99070)

作者简介: 龙敏南, 1965 年生, 博士, 副教授, Tel: (0592)2185731, E-mail: longmn@jingxian.xmu.edu.cn.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌体培养

*C. vinosum* DSM 185 菌株(由荷兰阿姆斯特丹大学 E. C. Slater 研究所提供)培养在 700L 的密闭容器中,其培养条件和方法如文献[13]所述。菌体细胞通过 Sharples 连续离心机离心收集,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 可溶性氢磷的分离提纯

菌体细胞(500g)以 1L 冰冷的( $-20^{\circ}\text{C}$ )丙酮进行抽提以除去光合色素和脂类物质,重复三次。待残存的丙酮蒸发后,再以缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4)进行抽提。经高速离心( $35000\times g$ , 45min)后,将上清液转移到 DEAE-纤维素(Whatman DE-23)柱上,先以缓冲液将未与柱物质结合的蛋白质洗脱下来,然后进行梯度洗脱(0-0.5mol/L NaCl)。合并含可溶性氢磷的洗脱液,经透析后装入 TSK-DEAE (Merck)柱(1)并进行非连续梯度洗脱(0.1, 0.13, 0.15mol/L NaCl)。收集含可溶性氢磷的洗脱液,经浓缩后以 Ultragel AcA-44 (LKB-IBF)柱进行纯化。合并含可溶性氢磷的洗脱液,透析后依次过 TSK-DEAE 柱(II)和 FPLC Superdex TM 75 (Pharmacia)柱作进一步纯化。

### 1.3 氢磷活性的测定

采用氢电极法测定氢磷催化放氢的活性。反应在 2ml 厌氧池内进行,以磷酸缓冲液(50mmol/L, pH6.0)为反应介质。测定放氢活性时被连二亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )还原的甲基紫精(Methyl viologen, 简称 MV)作电子供体,反应系统包括终浓度为 1.5mmol/L 的 MV 和 50mmol/L 的连二亚硫酸钠及适量的酶样品。

### 1.4 蛋白质含量的测定

取  $50\mu\text{l}$  酶样品和 2.5ml 显色液(配制:85%磷酸 100ml,考马斯亮蓝 G-250 100mg,无水乙醇 50ml,加水至 200ml)注入一次性比色杯中。于室温下反应 5min 后,测定在 595nm 处的吸收值。以只加显色液的处理作为空白对照。以牛血清蛋白为标准蛋白。

### 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及染色

聚丙烯酰胺凝胶电泳在一垂直装置中进行,丙烯酰胺的浓度为 7.5%,电泳的电流强度为 30mA。

考马斯亮蓝染色:电泳后,将凝胶块置于染色液(0.25% 考马斯亮蓝 R-250, 10% 乙酸, 40% 甲醇)中染色 30min,然后在洗脱液(10% 乙酸, 40% 甲醇)中洗脱 1-2h。

氢磷活性染色:电泳后,将凝胶块置于反应液(50mmol/L 磷酸缓冲液, pH6.0, 50mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇和 1mmol/L 甲基紫精)中 30min,然后将凝胶块转移到真空器中,反复抽气充  $\text{H}_2$  以除去残留的氧,最后充以 100%  $\text{H}_2$ ,在室温下保持 30-60min,待甲基紫精被氢还原,蛋白带呈现蓝色后,在 Ar 气氛下加入 2.5% 三苯基四氮唑盐酸盐溶液,于室温保持约 20min,至蛋白带由蓝色变为稳定的红色。

### 1.6 可溶性氢磷的 FTIR 谱的测定

测定可溶性氢磷的 FTIR 谱时,将酶样品浓缩至  $1\text{U}/\mu\text{l}$ 。

氧化态可溶性氢磷样品的处理:将酶样品加入到 0.5ml 离心管中,置离心管于 8ml 的血清瓶内,密封瓶口,抽气充 Ar。然后加入终浓度为 2mmol/L 的 2,6-二氯酚靛酚(DPIP,  $E_0' = +215\text{mv}$ ),分别于室温下反应 1h, 12h 和 24h。

还原态可溶性氢酶样品的处理:将酶样品加入 0.5ml 离心管中,置于密封的血清瓶内,反复抽气充 Ar。加入终浓度为 20mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,分别于室温下反应 2h、3h。

氢酶与 CO 的作用:将酶样品加入到 0.5ml 离心管中,置于密封的血清瓶内,先抽气充 Ar,加入终浓度为 20mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,然后反复抽气充 CO(8次),于室温下反应 5h。

可溶性氢酶 FTIR 谱的测定在 FTS 60A 波谱仪 (Bio Rad) 上进行,该波谱仪配有 MCT 检测器。将酶样品以微量注射器注入密封的  $\text{CaF}_2$  窗(15 $\mu\text{l}$ )中。在室温下记录可溶性氢酶的 IR 谱。

Table 1 The purification of soluble hydrogenase from *C. vinosum*

Steps	Total protein (mg)	Total activity* (U)	Specific activity (U/mg prot)	Purification (folds)	Yield (%)
Crude enzyme	15312	415.2	0.027	1.0	100
DE-23 column	1942.5	312.2	0.16	5.9	75.2
TSK-DEAE (I) column	699.7	209.1	0.30	11.1	49.9
Ultrigel AcA-44 column	166.1	157.4	0.95	35.1	37.6
TSK-DEAE (II) column	51.7	118.5	2.29	84.8	28.3
Superdex TM 75 column	12.4	97.3	7.85	290.7	23.2

\*  $\text{H}_2$ -production activity, U =  $\mu\text{mol H}_2/\text{min}$

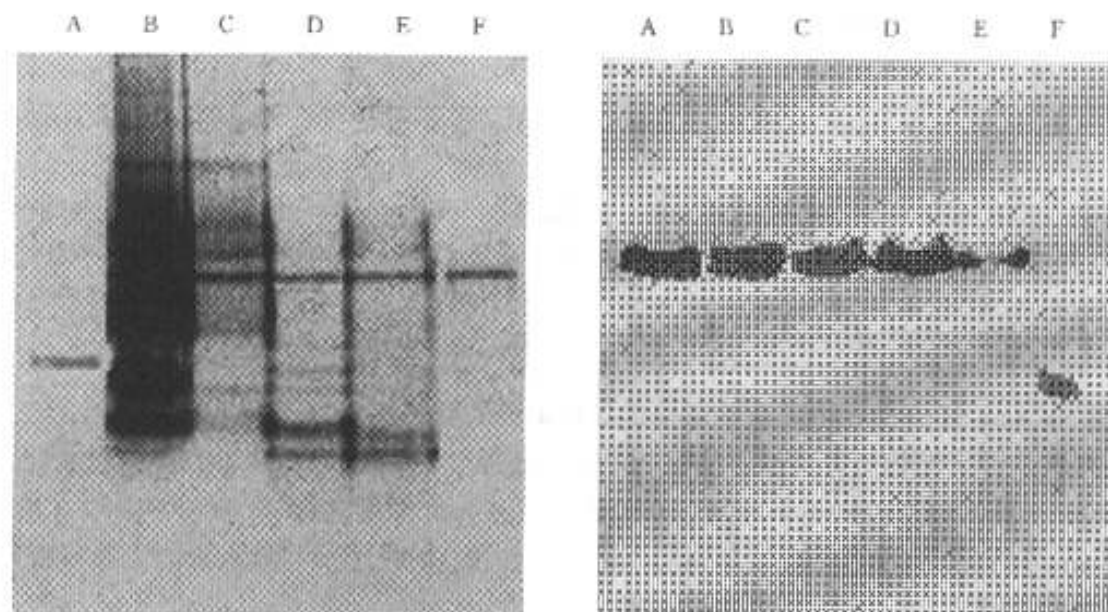


Fig.1 PAGE analysis of activity peak of soluble hydrogenase from various column chromatography. Left: staining with Coomassie-brilliant blue. A: *C. vinosum* MBH. B-F: activity peak from DE-23, TSK-DEAE(I), Ultrigel AcA-44, TSK-DEAE(II) and Superdex TM75 column. Right: activity staining. A-E: activity peak from DE-23, TSK-DEAE(I), Ultrigel AcA-44, TSK-DEAE(II) and Superdex TM75 column. F: *C. vinosum* MBH

## 2 结 果

### 2.1 可溶性氢酶的纯化

光合细菌 *C. vinosum* 可溶性氢酶经五次柱层析纯化后被纯化 290 倍, 得率为 23%, 其催化放氢的活性为  $7.8 \mu\text{mol H}_2 / \text{min} \cdot \text{mg prot}$  (Tab. 1)。

各步柱层析洗脱的氢酶活性峰样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 分别进行考马斯亮蓝染色和活性染色, 其电泳图谱见 Fig. 1。

### 2.2 可溶性氢酶在 DPIP 氧化过程中 FTIR 谱变化特征

有氧条件下纯化的可溶性氢酶在  $1920 - 2140 \text{cm}^{-1}$  红外光谱区有五个 FTIR 谱峰:  $2103.7$ ,  $2086.2$ ,  $2054.8$ ,  $1979.9$  和  $1962.5 \text{cm}^{-1}$  (Fig. 2A), 其中  $1962.5 \text{cm}^{-1}$  处的信号最强。当可溶性氢酶与氧化剂 DPIP 作用 1h 后, 在  $1920 - 1940 \text{cm}^{-1}$  光谱区出现一个新的谱峰 ( $1929.3 \text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 2B); 继续氧化至 12h 时, 其 FTIR 谱峰无明显变化 (Fig. 2C); 再继续氧化至 24h 时, 在  $2120 - 2020 \text{cm}^{-1}$  光谱区的特征谱峰只发生了微小的位移; 而  $1900 - 2000 \text{cm}^{-1}$  光谱区的吸收带只剩下  $1962.5 \text{cm}^{-1}$  处的谱峰, 其它两条弱的谱峰则基本上消失 (Fig. 2D)。

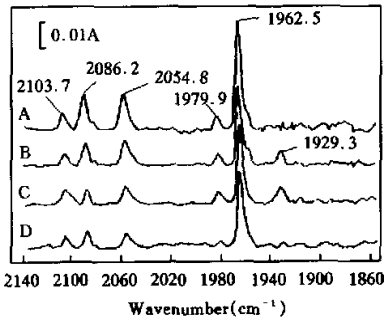


Fig. 2 FTIR spectra of soluble hydrogenase from *C. vinosum*. A: enzyme purified under aerobic; B - D: enzyme oxidized with DPIP for 1h, 12h and 24h

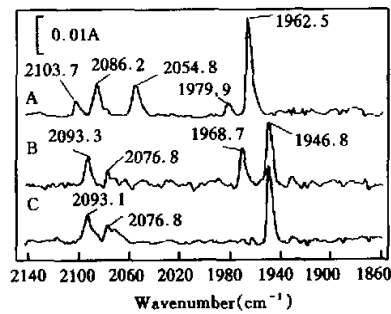


Fig. 3 FTIR spectra of reduced soluble hydrogenase from *C. vinosum*. A: enzyme purified under aerobic; B: enzyme reduced with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  for 2h; C: enzyme reduced with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  for 3h

### 2.3 在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原过程中可溶性氢酶的 FTIR 谱的变化特征

在有氧条件下纯化的可溶性氢酶被  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原 2h 后, 其 FTIR 谱发生显著变化, 位于  $2054.8 \text{cm}^{-1}$  处的谱带消失了, 而其它四条吸收带移向低频区 ( $2093.3$ ,  $2076.8$ ,  $1968.7$  和  $1946.8 \text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 3B); 当可溶性氢酶与  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  作用 3h 后, 位于  $1968.7 \text{cm}^{-1}$  处的谱带也消失了 (Fig. 3C)。

### 2.4 可溶性氢酶与 CO 作用后的 FTIR 谱特性

CO 是氢酶的抑制剂, 它能与反应底物  $\text{H}^+$  或  $\text{H}_2$  竞争性地结合在 NiFe-氢酶活性中心的 Ni 原子上。以  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原可溶性氢酶并在 100% CO 气氛中反应 5h 后, 其红外光谱发生变化。与还原态可溶性氢酶的 FTIR 谱相比, 在  $2100 - 2020 \text{cm}^{-1}$  光谱区出现两条新的谱带 ( $2071.7$  和  $2063.9 \text{cm}^{-1}$ ); 在  $2000 - 1900 \text{cm}^{-1}$  光谱区也出现两条新的谱带 ( $1967.7$  和

1954.7 $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig.4)。此外, 在 2100 - 2020 $\text{cm}^{-1}$  光谱区内的两条谱带 (2093.3, 2076.8  $\text{cm}^{-1}$ ) 也发生了位移 (2092.8 和 2079.2 $\text{cm}^{-1}$ )。

### 3 讨 论

已知的 NiFe - 氢酶的活性中心由 Ni、Fe 两原子通过两个硫桥 (Cys 的巯基) 连接起来, 其结构模式如图 5(左) 所示, 与 Ni 原子相连的包括两个 Cys, 与 Fe 原子相连的包括一个非蛋白组分 - CO 基团和两个非蛋白组分 - CN 基团<sup>[8]</sup>。氢酶活性中心的 Ni 原子可以被人工氧化剂和还原剂所氧化或还原而成为氧化态或还原态氢酶<sup>[2]</sup>。在 2100 - 1900 $\text{cm}^{-1}$  红外光谱区内, 氧化态 *C. vinosum* 膜结合态氢酶及其它 NiFe - 氢酶的红外光谱均产生一组三条特征的 FTIR 吸收带<sup>[10,15]</sup>(Fig. 5 右)。这些吸收带对应于与 Fe 原子相连的 - CO 基团和 - CN 基团伸缩的振动吸收, 谱带的位置和强度因酶所处的氧化还原状态的不同而有所变化<sup>[10]</sup>, 其中 - CO 基团的红外吸收谱带变化位于 2000 - 1900 $\text{cm}^{-1}$  光谱区内, - CN 基团的红外吸收谱带变化位于 2100 - 2020 $\text{cm}^{-1}$  光谱区内<sup>[8]</sup>。

有氧条件下纯化的 *C. vinosum* 可溶性氢酶在 1860 - 2140 $\text{cm}^{-1}$  红外光谱区内有五条吸

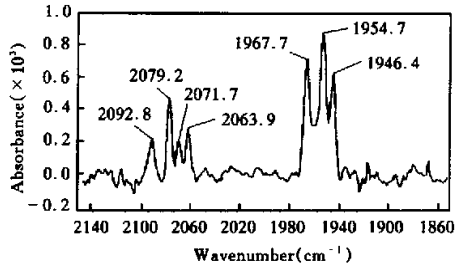


Fig.4 FTIR spectra of *C. vinosum* soluble hydrogenase after reacted with CO. The enzyme was reduced with 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  and incubated with CO for 5h

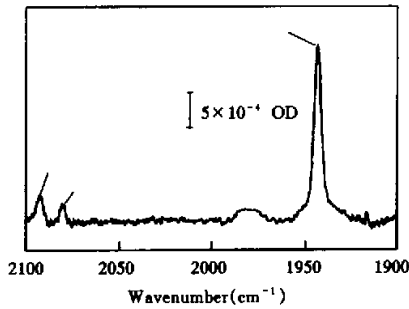
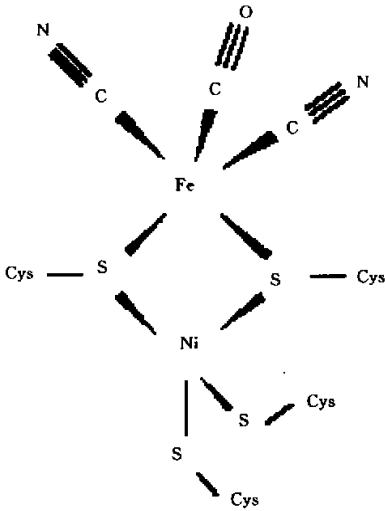


Fig.5 The structure model of NiFe - hydrogenase active site (left) (from reference 8) and the FTIR spectra of oxidized *Alcaligenes eutrophus* NiFe - hydrogenase (Right) (from reference 15)

收带 ( $2103.7$ ,  $2086.2$ ,  $2054.8$ ,  $1979.9$  和  $1962.5\text{cm}^{-1}$ ), 其中三条谱带位于  $2110 - 2020\text{cm}^{-1}$  光谱区, 对应于  $-\text{CN}$  基团的特征吸收带; 其余两条谱带位于  $2000 - 1900\text{cm}^{-1}$  光谱区, 对应于  $-\text{CO}$  基团的特征吸收带。当酶被充分氧化时, 位于  $-\text{CN}$  基团谱带区内的吸收带基本上没有变化; 而位于  $-\text{CO}$  基团谱带区内的吸收带主要表现为一条吸收带 ( $1962.5\text{cm}^{-1}$ ), 另外一条较弱的谱带则基本上消失, 推测这条较弱的谱带可能是由于可溶性氢酶在纯化过程中与空气中微量的  $\text{CO}$  结合而产生的(当酶被氧化或被还原时, 该谱带都会消失)。因此, 结合可溶性氢酶的 EPR 谱特征, 可以推断 *C. vinosum* 可溶性氢酶属于 NiFe-氢酶家族, 其活性中心的结构也类似于其它 NiFe-氢酶, 但可溶性氢酶的活性中心可能含有三个  $-\text{CN}$  基团和至少一个  $-\text{CO}$  基团, 而不像其它 NiFe-氢酶的活性中心只含有两个  $-\text{CN}$  基团和一个  $-\text{CO}$  基团。

有氧条件下纯化的可溶性氢酶被  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  充分还原时, 位于  $-\text{CN}$  基团谱带区中的两个吸收带 ( $2103.7$ ,  $2086.3\text{cm}^{-1}$ ) 移向低频区, 而另外一谱带 ( $2054.8\text{cm}^{-1}$ ) 则消失了, 表明这三个  $-\text{CN}$  基团与活性中心结合的方式可能存在差异, 其中一个  $-\text{CN}$  基团可能与  $\text{Ni}^{3+}$  结合, 因为  $-\text{CN}$  是一个很弱的  $\pi$ -电子受体, 当  $\text{Ni}^{3+}$  被还原为  $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Ni}^0$  时, 就会大大影响  $-\text{CN}$  与 Ni 原子的配位结合, 进而影响  $-\text{CN}$  基团的振动吸收, 因而不同于与 Fe 原子结合的  $-\text{CN}$  基团的振动吸收。另一方面, 当可溶性氢酶被还原时,  $-\text{CO}$  基团谱带区的吸收带也发生变化, 原来的谱带消失了, 产生了两个新的吸收带 ( $1968.7$  和  $1946.8\text{cm}^{-1}$ ); 当酶被进一步还原时, 只剩下一条吸收带 ( $1946.8\text{cm}^{-1}$ ), 表明至少有一个  $-\text{CO}$  基团与 Fe 原子结合。

$\text{CO}$  与氢酶的结合是可逆的, 当还原态可溶性氢酶与  $\text{CO}$  作用后, 在  $-\text{CN}$  基团谱带区共有四条谱带, 其中两条是新产生的谱带 ( $2071.7$  和  $2063.9\text{cm}^{-1}$ ), 而另外两条谱带 ( $2093.3$  和  $2076.8\text{cm}^{-1}$ ) 也发生了微小的位移 ( $2092.8$  和  $2079.2\text{cm}^{-1}$ ); 在  $-\text{CO}$  基团谱带区共有三条谱带, 其中两条是新出现的谱带 ( $1954.7$  和  $1967.7\text{cm}^{-1}$ ), 这两条谱带可能是由于  $\text{CO}$  与活性中心的 Ni(或 Fe)原子结合而产生的, 而在  $1946.8\text{cm}^{-1}$  处的吸收带只发生微小的位移, 推测  $\text{CO}$  可能与活性部位的 Ni 原子结合, 因为这样的结合不会对 Fe 原子上的  $-\text{CO}$  基团的振动吸收发生大的影响, 与实验所得的结果相一致。还原态可溶性氢酶与  $\text{CO}$  作用后, 结合  $\text{CO}$  的酶与未结合  $\text{CO}$  的酶之间处于动态平衡  $[\text{Ni}(\text{CN})\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$  和  $\text{Ni}(\text{CN})(\text{CO})\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})]$ , 两种酶分子的红外光谱叠加在一起, 故在  $2100 - 1900\text{cm}^{-1}$  光谱区出现了七条吸收带。

根据实验结果和以上讨论, *C. vinosum* 可溶性氢酶活性中心可能含有三个非蛋白组分  $-\text{CN}$  基团和一个非蛋白组分  $-\text{CO}$  基团, 其中一个  $-\text{CN}$  基团不同于另外两个  $-\text{CN}$  基团, 它可能结合于活性中心的 Ni 原子上。由此, 我们推测 *C. vinosum* 可溶性氢酶的活性中心的结构可能为  $\text{Ni}(\text{CN})\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ , 这种结构与氢酶所表现的催化放氢的特性是一致的。

## 参考文献:

- [1] Adams M W W, Stiefel E I. *Biological hydrogen production* [J]. *Science*, 1998, 282: 1483.
- [2] Albracht S P J. *Nickel hydrogenase: In search of the active site* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1188: 167-204.
- [3] Adams M W W. *The structure and mechanism of iron-hydrogenase* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1020: 115-145.
- [4] Hartmann G C, Klein A R, Linder D, et al. *Purification, properties and primary structure of H<sub>2</sub>-forming N-5, N(10)-methylene-tetrahydro- $\gamma$ -thiopterin dehydrogenase from Methanococcus thermolithotrophicus* [J]. *Arch Microbiol*, 1996, 165: 187-193.
- [5] Przybyla A E, Rovvins J, Menon N, et al. *Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenase* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, 88: 109-136.
- [6] Volbeda A, Charon M H, Paris C, et al. *Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas* [J]. *Nature*, 1995, 373: 580-587.
- [7] Volbeda A, Garcin E D, Piras C, et al. *Structure of the NiFe-hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands* [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 12989-12996.
- [8] Happe R P, Roseboom W, Pierik A J, et al. *Biological activation of hydrogen* [J]. *Nature*, 1997, 385: 126.
- [9] Bagley K A, Van Garderen C J, Chen M, et al. *Infrared studies on the interaction of carbon monoxide with divalent nickel in hydrogenase from Chromatium vinosum* [J]. *Biochemistry*, 1994, 33: 9229-9236.
- [10] Bagley K A, Duin E C, Roseboom W, et al. *Infrared-detectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from Chromatium vinosum* [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 5527-5535.
- [11] Happe R P, Roseboom W, Egert G, et al. *Unusual FTIR and EPR properties of the H<sub>2</sub>-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from Alcaligenes eutrophus* [J]. *FEBS Letters*, 2000, 466(2-3): 259-263.
- [12] Van der Spek T M, Arends A F, Happe R P, et al. *Similarity and architecture of the active sites of Ni-hydrogenase and Fe-hydrogenase detected by means of infrared spectroscopy* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 237: 629-634.
- [13] Coremans J M C C, van der Zwaan J W, Albracht S P J. *Distinct redox behavior of prosthetic groups on ready and unready hydrogenase from Chromatium vinosum* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1119: 157-168.
- [14] 龙敏南, 苏文金, S P J Albracht, 等. 光合细菌 *C. vinosum* 可溶性氢酶小亚基基因的克隆 [J]. 厦门大学学报(自然版), 2000, 39(2): 247-252.
- [15] Antonio J P, Milena S, Oliver L, et al. *Characterization of the active site of a hydrogen sensor from Alcaligenes eutrophus* [J]. *FEBS Letters*, 1998, 438: 231-235.

STUDIES ON FTIR SPECTRA OF SOLUBLE HYDROGENASE  
FROM *CHROMATIUM VINOSUM*

LONG Min-nan<sup>1</sup>, SU Wen-jin<sup>1</sup>, S P J Albracht<sup>2</sup>,  
ZHANG Feng-zhang<sup>1</sup>, XU Liang-shu<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. E C Slater Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands)

**Abstract:** Fourier transform infrared (FTIR) studies of oxidized soluble hydrogenase (SH) from *C. vinosum* revealed four absorption bands (2103.7, 2086.2, 2054.8 and 1962.5 $\text{cm}^{-1}$ ) in the 1860–2140 $\text{cm}^{-1}$  region. A strong band at 1962.5 $\text{cm}^{-1}$  is in the same region as the band due to the intrinsic –CO group bound to Fe in the active site of other NiFe–hydrogenases. The other three bands (2054.8, 2086.3 and 2103.7 $\text{cm}^{-1}$ ) are similar in position to those arising from the stretch vibrations of –CN group in other NiFe–hydrogenase. When the soluble hydrogenase was completely oxidized by 2, 6–dichlorophenolindophenol, no band shift was observed. When the soluble hydrogenase was fully reduced by  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , all the bands shifted. The  $\nu(\text{CO})$  band shifted to 1946.8 $\text{cm}^{-1}$ . The other bands moved to 2076.8 $\text{cm}^{-1}$  and 2093.1 $\text{cm}^{-1}$ . Addition of CO to the reduced enzyme resulted in changes of both the number and position of the bands. Two new bands (1954.7 $\text{cm}^{-1}$  and 1967.7 $\text{cm}^{-1}$ ) were observed in the –CO region, while two new bands (2063.9 $\text{cm}^{-1}$  and 2071.7 $\text{cm}^{-1}$ ) showed up in the –CN region.

**Key Words:** *Chromatium vinosum*; Soluble hydrogenase; FTIR spectra