

· 研究简报 ·

固氮酶铁钼辅基在分离纯化中结构变化的新证据*

张凤章 黄河清 龙敏南 邱雪慧 许良树**

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

New Evidence for Structure Change of Iron-molybdenum Cofactor from Nitrogenase MoFe-Protein in Separation

ZHANG Fengzhang, HU AN Heqing, LONG Minnan, QIU Xuehui, XU Liangshu

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The iron-molybdenum cofactor (FeMoco) of nitrogenase MoFe-protein from *Azotobacter Vinelandii* OP was extracted by N-methylformamide (NMF). Effects of FeMoco (in NMF) on electronic spectrum and fluorescence intensity (in 1 mol/L NaOH) were investigated by fluorophotometric titrations and compared with results of effects of $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ and its complexes with Na_2S , Na_2S_2 and $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ on relative properties of FDMA. It was found that titration curve for quenching of FDMA with FeMoco was very similar to that for quenching of FDMA with complexes of $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ and Na_2S_2 (1:3, mol/mol). The results showed that FeMoco(N) probably contained S-S bonds and its structure was found to be a changing one.

Key words Nitrogenase, Iron-molybdenum cofactor, Fluorophotometric titration, Structural change

根据 Kim-Rees 模型^[1], 固氮酶铁钼辅基(即 FeMoco 或 M 簇), 是由一个 MoFe_3S_3 簇和一个 Fe_4S_3 簇通过三个 S-桥连接而成。然而, 自 Shah 等 (1977) 首次从结晶的钼铁蛋白中分离出具有生物重组活性的 FeMoco 以来, 固氮酶研究者一直致力于研究提取和分离纯化 FeMoco 的方法, 试图制备其结晶, 从而研究其结构与功能, 但至今未能成功。许多研究者测定的溶于 N-甲基甲酰胺(NMF) 中的 FeMoco (以下简称 FeMoco(N)) 的化学组成大都不一致^[2], 其主要原因可能是由于 FeMoco 极不稳定, 特别是极端的氧敏感性, 人们难以分离出完整的 M-簇。换句话说, FeMoco(N) 在化学组成和结构上与 Kim-Rees 模型所表达的不尽一致。FeMoco(N) 可能存在无机的 S-S 配基^[3]; 不同 pH 值的 NMF 可提取出单 Mo 或双 Mo 的 FeMoco(N)^[4]; 在 NMF 溶液中, FeMoco 可能以二聚体或多聚体形式存在^[5]。基于 FeMoco(N) 的结构类似于一些合成的化学模拟物^[6]; 以及合成模拟物大多数以 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$, FeCl_2 及一些无机或有机硫化物为原料等实验事实, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$, Na_2S , Na_2S_2 , 和 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ 为参比物, 研究 FeMoco(N) 及这些硫化物对醋酸汞荧光素

的电子光谱和荧光强度的影响, 获得了一些有关 FeMoco(N) 结构变化的新信息。

1 材料与方法

1.1 试剂

醋酸汞荧光素(FDMA), Aldrich 公司产品, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液配制。

$(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 按文献[7]方法合成; Na_2S_2 由等摩尔结晶 S 和 Na_2S 混合并在真空下加热制备, Na_2S 和 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ 为二级和三级试剂, NaOH 为一级试剂, 其它试剂均为分析纯。

1.2 FeMoco 的分离和硫化物浓度测定方法

FeMoco(N) 分离纯化按文献[3]方法进行, 采用示波极谱法和原子吸收分光光度法测定 Mo 和 Fe 元素含量, 其 Mo:Fe 为 1:6, FeMoco(N) 的摩尔浓度以其含钼量计算。采用亚甲蓝形成法测定硫

* 国家自然科学基金资助项目(39470165)

** 联系人 Tel: (0592) 2185360

E-mail: Lsxu@jingxian.xmu.edu.cn

张凤章, 男, 1940年8月生, 副教授

收稿日期: 1998-01-04, 修回日期: 1998-04-30

化物浓度.

1.3 荧光滴定方法

参照文献[8]的方法, 滴定反应在一系列带翻口橡皮塞的试管中进行, 所有试剂均抽气充氩. 反应介质为 1 mol/L NaOH, 反应终体积为 6 ml, 硫化物的浓度由 0.05 ~ 3 mol/mol FDMA 递增. 以日立 850 型荧光分光光度计分别测量各管的荧光强度. 激发光波长 499 nm, 发射光波长 520 nm, 以荧光淬灭度 (%) 对 [硫化物]/[FDMA] 摩尔比作图. 比较荧光滴定曲线的特征, 推断 FeMoco(N) 的化学组成.

1.4 电子光谱测定

采用日立 UV240 型紫外可见分光光度计记录 FDMA (在 1 mol/L NaOH 中) 的电子光谱以及在不同硫化物和 FeMoco(N) 存在下的 FDMA 的电子光谱.

2 结 果

2.1 FeMoco(N) 及不同无机硫化物对 FDMA 电子光谱的影响

FDMA 在 1 mol/L NaOH 溶液中的电子光谱 (Fig. 1 曲线 1) 有一特征吸收峰 (499 nm 处), 而 FeMoco(N) 的吸收光谱除在 554 nm 和 565 nm 处有两个小的吸收峰外, 在 400 ~ 600 nm 光区几乎是一条平滑的曲线 (Fig. 1 曲线 2). 将 FeMoco(N)

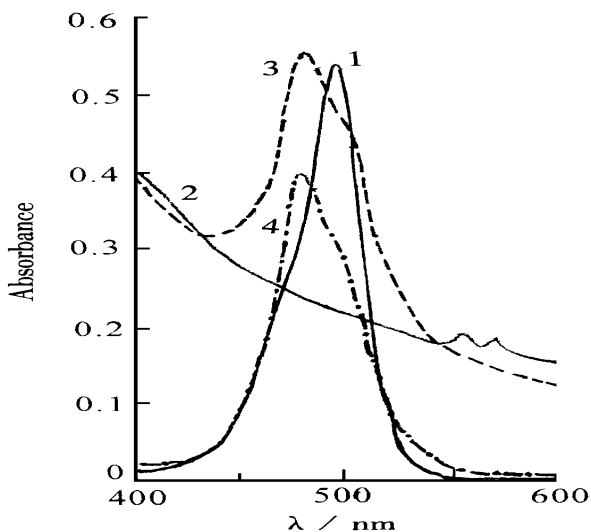


Fig. 1 Effect of some compounds containing sulfur on absorption spectrum of FDMA in 1 mol/L NaOH

1: 5×10^{-6} mol/L FDMA;

2: 4.2×10^{-5} mol/L FeMoco;

3: 5×10^{-6} mol/L FDMA + 1.8×10^{-6} mol/L FeMoco;

4: 5×10^{-6} mol/L FDMA + 1.5×10^{-6} mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$.

(1.8×10^{-6} mol/L) 加到 FDMA 溶液 (5×10^{-6} mol/L) 中, 则混合物的吸收光谱在 482 nm 处有最大吸收峰 (Fig. 1 曲线 3), 说明两者发生了某种结合作用, 致使 FDMA 碱溶液的特征吸收峰紫移了 17 nm.

$(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 的水溶液 (1 mol/L NaOH) 的吸收光谱有一特征吸收峰在 468 nm 处, 当 5×10^{-6} mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 与等浓度 FDMA 混合时, 其混合物的吸收光谱的特征吸收峰亦位移至 482 nm 处 (Fig. 1 曲线 4). Na_2S , Na_2S_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ 及它们与 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 的混合物均有类似的作用 (Fig. 1 中未示出). $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的作用则相反, 使 FDMA 溶液的吸收光谱特征吸收峰红移至 502 nm 处 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液的特征吸收峰在 315 nm), 这说明 FeMoco(N) 引起的 FDMA 溶液吸收光谱特征峰的紫移主要是 FeMoco(N) 对 FDMA 作用的结果.

2.2 FeMoco(N) 对 FDMA 碱溶液荧光强度的影响

以 FeMoco(N) 滴定 FDMA 碱溶液, 得滴定曲线 Fig. 2. 从 Fig. 2 中可见, 曲线是非线性的, “等当点”的摩尔比约为 0.2. 这个结果与 Syrtsova 等^[8]以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 为反应介质所得的结果不同, 虽然曲线形状相似, 但后者的滴定曲线没有明显的“等当点”.

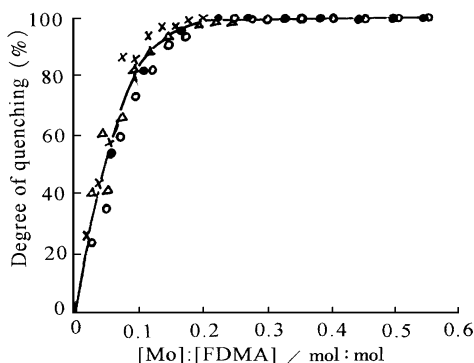


Fig. 2 Titration curve for quenching of FDMA with FeMoco

考虑到 FeMoco(N) 中含有的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 可能干扰其荧光滴定, 因此以提取 FeMoco 的溶剂 NMF (含 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和磷酸盐等) 滴定 FDMA 作为空白对照, 以消除 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 对滴定的影响.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 对 FDMA 的滴定, 在 1 mol/L NaOH 介质中进行时, 其荧光淬灭度随 $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4]/[\text{FDMA}]$ 比的增大, 几乎保持在 5% 的水平上. 而在 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中滴定, 其滴定曲线几乎与 FeMoco(N) 的滴定曲线相似, 严重干扰 FeMoco

(N) 的荧光滴定. 因此以 1 mol/L NaOH 溶液为滴定反应介质比较适合.

另一方面, 考虑到 $FeMooco(N)$ 中可能含有 S-S 键, 而 S-S 键在中性或弱碱性介质中会分解而释放出单质 S, 采用 1 mol/L NaOH 为反应介质防止可能的分解反应发生.

2.3 不同无机硫化物对 FDMA 荧光强度的影响

以 $(NH_4)_2MoS_4$ 、 Na_2S 、 Na_2S_2 、 $(NH_4)_2S_x$ 的水溶液分别滴定 FDMA, 获得不同的荧光滴定曲线 (Fig. 3 及 Fig. 5 曲线 1). 从图中可见, 用 $(NH_4)_2MoS_4$ 和 Na_2S 滴定所得的曲线均呈现双线性曲线, 其“等当点”的摩尔比为 0.46 和 2.2; 前者与 Syrtsova 等的结果相似, 后者则明显不同. 而 Na_2S_2 和 $(NH_4)_2S_x$ 的滴定曲线均为非线性曲线 (见 Fig. 3 曲线 2 和 3), 其荧光淬灭的最大值在摩尔比为 1 附近.

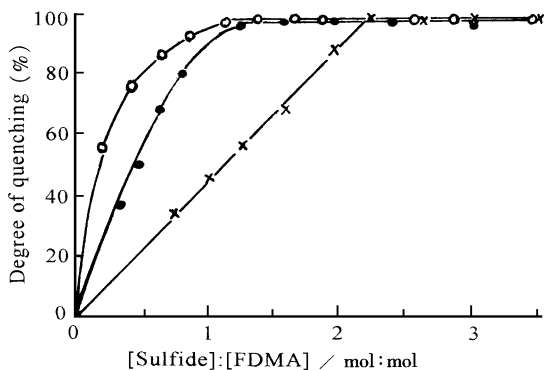


Fig. 3 Titration curves for quenching of FDMA with different compounds containing sulfur

x-x Na_2S ; — Na_2S_2 ; — $(NH_4)_2S_x$

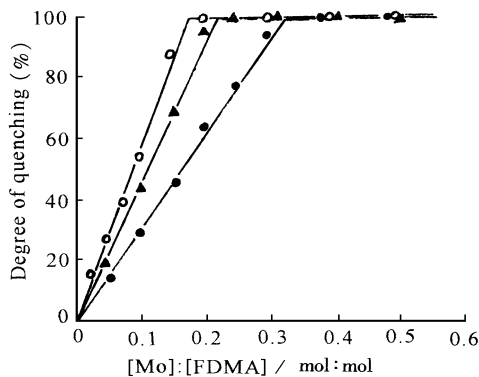


Fig. 4 Titration curves for quenching of FDMA with MoS_4^{2-} plus Na_2S

The mole ratio of MoS_4^{2-} and Na_2S :

— 1:0.46; — 1:2; — 1:4

2.4 不同摩尔比的 $(NH_4)_2MoS_4$ 与其它硫化物的混合物对 FDMA 荧光强度的影响

将 $(NH_4)_2MoS_4$ 水溶液与 Na_2S 、 Na_2S_2 或 $(NH_4)_2S_x$ 的水溶液按溶质的不同摩尔比混合, 以混合物滴定 FDMA, 获得一系列滴定曲线 (见 Fig. 4 ~ Fig. 6). 比较这些曲线的特征, 可以看出与 $FeMooco(N)$ 的荧光滴定曲线特征最为相似的曲线为 Fig. 5 中的曲线 3. 这可能意味着 $FeMooco(N)$ 的化学组成为 $MoFe_6S_{10}$.

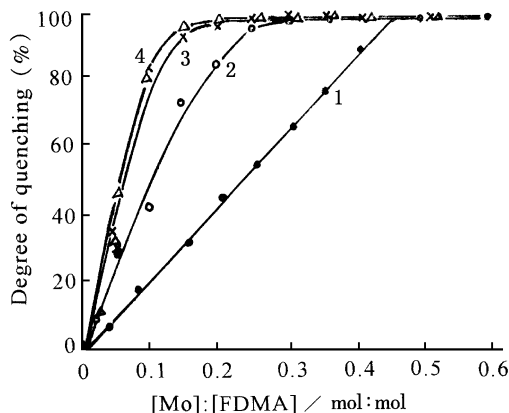


Fig. 5 Titration curves for quenching of FDMA with MoS_4^{2-} plus Na_2S_2

The mole ratio of MoS_4^{2-} and Na_2S_2 :

— 1:0; — 1:2; x-x 1:3; — 1:4

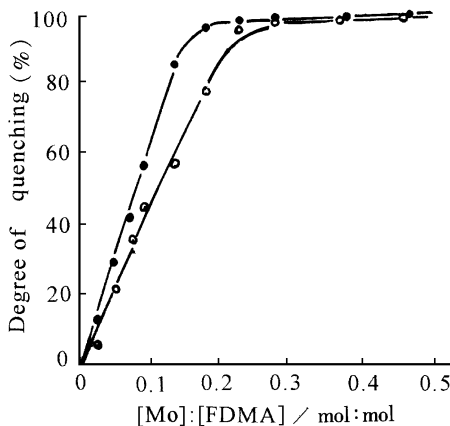


Fig. 6 Titration curves for quenching of FDMA with MoS_4^{2-} plus $(NH_4)_2S_x$

The mole ratio of MoS_4^{2-} and $(NH_4)_2S_x$:

— 1:1; — 1:2

3 讨论

有证据表明, $FeMooco(N)$ 在有机汞化合物的作用下, Fe-S 键会发生断裂, 而断裂后的 S 原子会与

FDMA 的汞共价结合^[9];二硫化物也能发生不同情形的裂解.不同的硫化物具有不同形状特征的荧光滴定曲线^[8].这是用荧光滴定方法分析各种硫化物及其铁硫化合物(FeMoCo)的依据.这种共价结合也使 FDMA 溶液的电子光谱发生位移.因此,采用 MoS₄²⁻ 与 S²⁻ 或 S₂²⁻ 和 S₂²⁻ 等组成的混合体系,进行模拟荧光滴定,从而可以间接推断出 FeMoCo(N) 的化学组成.

FeMoCo(N) 用 O₂ 氧化会释放出 MoOS₃²⁻, 在 Na₂S₂O₄ 存在下, MoOS₃²⁻ 会被还原为 MoS₄²⁻^[10], 说明 FeMoCo(N) 含有 MoS₃ 的结构单元, 故当 FDMA 作用于 FeMoCo, Fe-S 键发生断裂时, 会产生 MoS₃, 而在 Na₂S₂O₄ 存在下, MoS₃ 可能转化为 MoS₄²⁻, 而 MoS₄²⁻ 与 FDMA 结合又能使荧光淬灭, 因此, 用 MoS₄²⁻ 和 Na₂S₂ 或 Na₂S_x 组合物滴定 FDMA, 其滴定曲线的形状特征接近 FeMoCo(N) 的滴定曲线. 这样 FeMoCo(N) 的化学组成应是 MoFe₆S₉.

FeS 的 NMF 溶液的吸收光谱在 565 nm 和 554 nm 处亦有两个小吸收峰, 可以认为 FeMoCo(N) 脱去一个 Fe²⁺, 而在 Na₂S₂O₄ 存在下, Fe²⁺ 与 S²⁻ 结合成为 FeS. 在 NMF 溶液中, FeMoCo 可能以二聚体或多聚体的形式存在^[5]; 用 pH 12 的 NMF 提取的 FeMoCo 是具有生物重组活性的含双钼的 FeMoCo, 其元素组成为 Mo₂Fe₁₂S₁₂^[4]. 种种迹象表明, FeMoCo 分离出来以后, 其结构发生了变化, 它可能含有 S-S 配基或多 S 配基. 这种变化有利于多聚体的形成, 因而能保持新构型的稳定. 在生物重组时, FeMoCo(N) 可能在缺辅基的 UW45 固氮酶的协调下, 又重新“组装”成 K-R 模型所示的那种结构, 从而表现出固氮活性, 而这种作用可能需要 ATP 的协同作用.

References

1 Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the

nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, 1992, **257**: 1677 ~ 1682

2 Burgess B K. The iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Chem Rev*, 1990, **90**: 1377 ~ 1460

3 张凤章, 许良树, 陈家, 黄河清, 曾定, 廖远琰, 袁路娃. 固氮酶铁钼辅基的激光喇曼光谱和电子光谱特性. 厦门大学学报. 自然科学版 (Zhang Fengzhang, Xu Liangshu, Chen Jiafan, Huang Heqing, Zeng Ding, Liao Yuanyan, Yuan Luwa. Some characteristics of laser raman and electronic spectra of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Xiamen Univ, Natural Science*), 1988, **27**(5): 572 ~ 577

4 黄河清, 张凤章, 邱雪慧, 林庆梅. 固氮酶单、双钼铁钼辅助基的制备和特性. 应用与环境生物学报 (Huang Heqing, Zhang Fengzhang, Qiu Xuehui, Lin Qingmei. Preparation and characteristics of a single and double Mo of FeMo-cofactor from nitrogenase. *Chin J Appl Env Biol*), 1997, **3**(3): 258 ~ 262

5 Huang H Q, Kofford M, Simpson F B, Watt G D. Purification, composition, charge, and molecular weight of the FeMo cofactor from *Azotobacter Vinelandii* nitrogenase. *J Inorg Biochem*, 1993, **52**: 59 ~ 75

6 Coucouvanis D. Fe-M-S complexes derived from MS₄²⁻ anions (M = Mo, W) and their possible relevance as analogues for structural features in the Mo site of nitrogenase. *Acc Chem Res*, 1981, **14**: 201 ~ 209

7 McDonald J W, Frisen G D, Rosenhein L D, Newton W E. Syntheses and characterization of ammonium thiomolybdates and thiotungstates. *Inorg Chim Acta*, 1983, **72**: 205 ~ 210

8 Syrtsova L A, Popko E V, Likhtenshtein G I, Druzhinin S Y. Study of the chemical composition of the Fe-Mo-cofactor of nitrogenase by a new fluorometric method of analysis of thio-compounds. *Biochemistry*, 1984, **48**(7): 1023 ~ 1031

9 张凤章, 许良树, 陈家, 黄河清, 曾定, 廖远琰, 袁路娃. 固氮酶铁钼辅基的激光喇曼光谱和电子光谱特性. 厦门大学学报. 自然科学版 (Zhang Fengzhang, Xu Liangshu, Chen Jiafan, Huang Heqing, Zeng Ding, Liao Yuanyan, Yuan Luwa. Some characteristics of laser raman and electronic spectra of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Xiamen Univ, Natural Science*), 1988, **27**(5): 572 ~ 577

10 Newton W E, Gheller S F, Hedman b, Hodgson K O, Lough S M, McDonald J W. Elicitation of thiomolybdates from the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase: Comparison with synthetic Fe-Mo-S complexes. *Eur J Biochem*, 1986, **159**: 111 ~ 115