

固氮酶单、双钼铁钼辅基的制备和特性*

黄河清¹ 张凤章¹ 邱雪慧¹ 林庆梅²

(厦门大学生物学系¹及环境科学研究中心² 厦门 361005)

摘 要

固氮酶单、双钼铁钼辅基的制备与 N-甲基甲酰胺碱性有关。质子激发 X 射线发射光谱和电感耦合等离子体发射光谱分析技术测定单、双钼铁钼辅基的钼铁硫元素组成比值均为 1:6:6。在紫外可见光谱区内,单、双钼铁钼辅基均无特征吸收峰,不含高柠檬酸盐。

关键词:固氮酶;铁钼辅基;单、双钼铁硫簇;光谱分析

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FeMo COFACTORS CONTAINING SINGLE AND DOUBLE Mo FROM NITROGENASE

Huang Heqing¹, Zhang Fengzhang¹, Qiu Xuehui¹ & Li Qingmei²

(Department of Biology¹, Research Center of Environment Science², Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract

Preparation of FeMo cofactors containing single and double Mo was related with basicity of N-methylformamide. The minimal elemental composition of FeMo cofactor containing single and double Mo was found to be Mo₁Fe₆S₆ by using inductively coupled plasma and proton induced X-ray emission analytical technique. FeMo cofactors containing single and double Mo showed featureless absorbance peak in the ultraviolet and visible spectral range and did not contain homocitrate.

Key words Nitrogenase; FeMo cofactor; Fe-S clusters containing single and double Mo; spectral analysis

固氮微生物能利用体内的固氮酶在常温常压下把大气中的氮分子转化为氨并被农作物直接利用,它很可能在短期内成为农业生产所需的天然、无污染氮肥。固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白组成。钼铁蛋白含有 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体蛋白结构,金属簇大致可划分为含钼铁硫簇(M 中心)和非含钼铁硫簇(P 簇)^[1]。M 中心是固氮酶氮催化还原活性中心,P 簇位于 α 和 β 亚基之间,它起着传递电子给钼铁蛋白 M 中心的作用^[2]。铁蛋白具有活化传递电子给钼铁蛋白 P 簇的生理功能。

1977年,Shah 首次从钼铁蛋白中提取一种含钼的铁硫簇,简称铁钼辅基(FeMo cofactor,简称 FeMoco)并测定 FeMoco 元素组成比为 Mo:Fe:S=1:8:6^[3]。Mossbauer, ENDOR, EPR, EXAFS 等技术^[4]研究 FeMoco 的理化特性结果指出,FeMoco 含有6个铁原子。³⁵S 标记技术测得结果却认为 FeMoco 含有8个 Fe 原子,但其中2个 Fe 原子可能不是 M 中心的固定结构,而是外加的,易于螯合除去^[5]。近期我们的研究结果却认为,高质量的 FeMoco 是

收稿日期:1996-04-30 接受日期:1996-10-18

* 国家自然科学基金资助及国家教委出国留学人员基金资助项目

一种含双钼的铁硫簇,其金属簇 M , 为 $1\ 395 \pm 30$, 分子组成为 $[\text{MoFe}_2\text{S}_2]^{4-}$ [简称 $\text{FeMoco}(b)$] [6,7]。经亚甲基蓝氧化后,该簇引起 EPR 总自旋 $S=3/2$ 消失,但并不影响它的生物重组活性 [4]。目前,国内外许多固氮研究机构采用许多理化技术和生物技术研究了 FeMoco 的理化特性 [8], 但所获的结果差异较大。本文侧重于探讨单、双钼铁钼辅基的制备和特性,它对固氮酶氮还原机理和化学模拟生物固氮的深入研究提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

N-甲基甲酰胺(NMF)等分析纯试剂购于美国 Sigma 公司。棕色固氮菌 OP 菌株和缺 FeMoco 的棕色固氮菌突变菌株 UW45 由美国 Wisconsin 大学固氮研究中心提供。

1.2 高碱度 NMF 的制备

按文献 [4] 方法, M , (FeMoco) 测定按 Huang 方法 [6]。钼铁硫元素分析用原子吸收分光光度计(AA), 电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP, Perkin Elmer Plasma)和质子激发 X-射线发射光谱仪(PIXE, Nicolet Model R_s)测定。

1.3 FeMoco 提取

参考 Shah [3] 方法。金属簇中的亚铁含量测定参考 Huang [9] 和黄河清等 [10] 的方法。生物重组活性按 shah [3] 和张凤章 [11] 的方法。

1.4 FeMoco 光谱测定

选用紫外可见,全自动扫描、双光束分光光度计,全波长扫描时间均在 1 s 以内。

1.5 FeMoco 纯化

1.5.1 纯化装置 FeMoco 纯化系统主要由厌氧箱、NMF 恒压器、层析柱、紫外可见分光光度计、样品收集仪和双笔记录仪等组成(见图 1)。

1.5.2 纯化过程 NMF 恒压器提供洗脱 FeMoco 样品的洗脱液的恒速流量。粗 FeMoco 样品经 Sephadex G-25 和 Tsk-Gel Toypearl 层析柱纯化。紫外可见分光光度计和记录仪检测 FeMoco 纯化过程和纯度。样品收集仪自动收集经纯化后的 FeMoco 样品和其它杂质。

1.6 单、双钼 FeMoco 膜透析过程

FeMoco 透析系统由透析室、磁力搅拌器和 PM-1000 透析膜组成(见图 2)。透析过程:把经纯化的 FeMoco 置于厌氧的透析室 A 区中。在严格厌氧条件下搅拌 1 h 左右,此时小于透析膜截留 M , ($M < 1\ 000$) 的 FeMoco 能通过扩散方式由 A 透析室进入 B 透析室中。

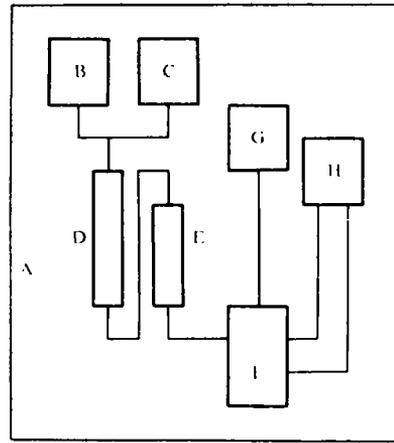


图1 FeMoco 纯化系统

Fig. 1 Purification system of FeMoco

A: 厌氧箱 Anaerobic box, B: NMF 恒压器 Pressure equalizer of NMF, C: NMF 容器 NMF apparatus, D: Sephadex G-25 层析柱 Sephadex G-25 column, E: Tsk-Gel Toypearl 层析柱 Tsk-Gel Toypearl column, G: 样品收集器 Sample collecting vessel, F: 紫外可见分光光度计 UV/visible Spectrophotometer, H: 记录仪 Recorder

2 结果与讨论

2.1 铁钼辅基理化特性

如何提取高质量的 FeMoco 一直是生物固氮工作者探讨的难题 [4]。我们的实验结果指出:提取高产量、高生物重组活性的 FeMoco 的关键之一是控制酸解钼铁蛋白的 pH 和时间 [7]。此外, NMF 的碱度也是提取高

质量 FeMoco 不可忽视的重要因素之一。表1结果表明:未经处理的 NMF 呈中性(pH 7.3)。该溶剂用于提取 FeMoco 时,所获得 FeMoco 产量极低,样品呈黄绿色并几乎丧失生物重组活性。用 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 处理后的 NMF 碱度稍偏碱性(pH 9.0~9.5),所提取的 FeMoco[简称 FeMoco(a)]产量也较低,FeMoco(a)颜色偏绿,生物重组活性也不高。如果用 BaO 处理使 NMF 成高碱度(pH13)的 FeMoco 提取剂,不仅所得 FeMoco[简称 FeMoco(b)]产量高,样品颜色偏深棕色,而且生物重组活性高,它是提取高质量 FeMoco(b)的理想提取剂的碱度(表1)。早期国内外固氮研究机构对 FeMoco 的颜色、光谱特性及 M_r 等理化特性报道差异较大并一直持有不同的看法,根据表1所示其主要原因可能与 FeMoco 提取剂 NMF 的处理方法和碱度有关。

2.2 FeMoco 的光谱特性(图3)

未经纯化的 FeMoco 样品中常常含有 Cl^- 、 Na^+ 、 HPO_4^{2-} 、

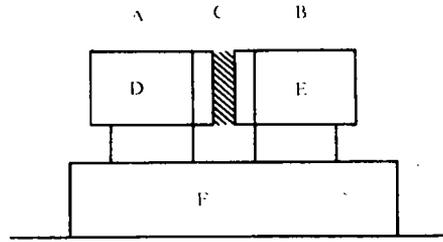


图2 单、双钼铁钼辅基的透析系统

Fig. 2 Osmotic system of FeMo cofactor containing single and double Mo

A、B:透析室 Osmotic room, C:透析膜(PM-1000)Osmotic membrane(PM-1000), D、E:磁力搅拌棒 Magnetic bar, F: 磁搅拌器 Magnetic stirrer

表1 铁钼辅基的物理化学性质

Table 1 The Physico-chemical properties of FeMo cofactor

NMF 处理方法 NMF treatment	NMF 碱度 NMF basicity	提取量 Extracting quantity	FeMoco 颜色 Colour of FeMoco	生物重组活性 Activity of biological recombination*
—	7.5	少量 A little	黄绿色 Green-yellow	0~5
NaHCO_3	9	少量 A little	绿色 Green	28
Na_2CO_3	9.5~10	少量 A little	绿色 Green	28
BaO	13	大量 Much	黑棕色 Black-brown	280

* 生物重组活性单位 (Unit of activity of biological recombination): $n(\text{C}_2\text{H}_4 \text{ formed}) \cdot t^{-1} \cdot n^{-1}(\text{Mo}) / \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{nmol}^{-1}$

柠檬酸盐、 $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ 、水及残余蛋白质等杂质^[4],这些污染物往往给准确定量分析 FeMoco 组成、结构、分子量及理化性带来一定的误差^[4]。常规纯化 FeMoco 的方法是用 Sephadex G-25或 G-100层析柱除去杂蛋白和非 FeMoco 组分的有机物^[6,7]。图3(A)结果表明了:用含有 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的 NMF(pH 10~13)所提取的 FeMoco 在紫外光谱区315 nm 处呈弱吸收峰,FeMoco 的整体光谱吸收强度随着波长红移而呈下降趋势。溶于 NMF(pH 10~13)的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 在紫外光区315 nm 处有强吸收峰[见图3(B)],因此我们认为,FeMoco 在紫外区315 nm 处有弱吸收峰的现象很可能是 $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ 络合于 FeMoco 所引起,并不是 FeMoco 自身特有的弱吸收峰。FeMoco(a)和 FeMoco(b)分别经 Sephadex G-25和 Tsk-Gel Toyoperal 层析柱纯化后,两者在紫外可见光谱区中均不含特征吸收峰,吸收峰的强度随着波长红移而减弱。图3(C)结果也表明:溶于 NMF(pH 10~13)的高柠檬酸盐在紫外区325 nm 处也有明显特征吸收峰,而经纯化的 FeMoco(a)和 FeMoco(b)在紫外可见光谱区中均不含特征吸收峰,因此,我们认为两者铁钼辅基都不含高柠檬酸盐组分,这一结论与我们近期选用色谱、质谱联用技术(GC/MS)研究 FeMoco 不含高柠檬酸盐的结论一致。

2.3 FeMoco(a, b)的 M_r

Smith 曾报道 FeMoco 的 M_r 在700~1 500之间,不含柠檬酸配位体的 M_r 为800,加入柠檬酸成为1 500^[8]。图4结果表明了:FeMoco(a)和 FeMoco(b)经 Sephadex G-25和 Tsk-Gel Toyoperal 层析柱进行分子量测定时,两者在层析柱中的停留时间不一致,前者在层析柱中停留时间长于后者在层析柱中的停留时间。按 Huang^[6]的方法测定 FeMoco(a)和 FeMoco(b)的 M_r 分别为 650 ± 50 和 $1 390 \pm 60$,显然 FeMoco(a)的 M_r 明显小于 FeMoco(b)的 M_r 。根据凝胶渗透色谱原理^[12]可知,FeMoco(a, b)的 M_r 不同与两者金属簇的结构上可能存在较大差异性有关,但与是否加入柠檬酸盐无关。

2.4 FeMoco(a,b)元素分析

多数固氮研究者均认为,固氮酶 FeMoco 仅由钼铁硫组成,不含有有机化合物,但对 FeMoco 的结构、电荷、钼铁硫的组成比却持不同的见解^[4],其根本原因与 FeMoco 的纯度和元素分析方法有关。表2结果表明了:用 AA,ICP 和 PIXE 技术测定经严格厌氧纯化的 FeMoco(a)和 FeMoco(b)的钼铁硫元素组成比值均为1:6:6。显然两者铁钼辅基最小钼铁硫化学组成为 $MoFe_6S_6$ 。FeMoco(b)的 M_r 几乎大于 FeMoco(a) M_r 的1倍(见图4),两者含钼铁硫簇又不含有化合物^[4]。因此,如果 FeMoco(a)的分子组成式是 $MoFe_6S_6$,则 FeMoco(b)的分子组成式很可能是 $(MoFe_6S_6)_2$ 或 $(Mo_2Fe_{12}S_{12})_2$,应属于双钼铁硫簇结构。虽然 FeMoco(a)和 FeMoco(b)具有相似光谱性质(图3),但由于它们结构上的差异而引起它们的生物重组活性明显不同(表1,图3)。

2.5 单、双钼铁钼辅基的区别

早期的研究结果一直认为,FeMoco 的是一种单钼铁硫金属簇,其分子组成式为 $MoFe_{4-8}S_{4-8}$ ^[4,8],所报道 FeMoco 的分子组成式、电荷、光谱等理化特性的差异与 FeMoco 纯度、提取方法及元素分析手段^[4,6,8]有关。FeMoco(a)和 FeMoco(b)膜透

析实验(方法1.6)结果表明:FeMoco(a)能自由地通过扩散方式由 A 透析室扩散到 B 透析室,可见 FeMoco(a)的 M_r 小于透析膜载留 $M_r(1\ 000)$ 。根据 FeMoco(a)的钼铁硫元素组成比为1:6:6和 M_r 为 650 ± 30 (图4,表2)的特点,我们可比较肯定地认为 FeMoco(a)的化学组成式是 $MoFe_6S_6$ [$M_r(ther) = 625$]。此外,膜透析实验也表明了 FeMoco(b)不能通过扩散方式由 A 透析室进入 B 透析室,从中可知 FeMoco(b)的 M_r 大于透析膜载留 M_r 。根据 FeMoco(b)的钼铁硫元素组成比值和 M_r 及膜透析实验结果,我们同样也可以推知 FeMoco(b)的化学组成式是 $(MoFe_6S_6)_2$ 或 $(Mo_2Fe_{12}S_{12})_2$ [$M_r(理论值) = 1\ 248$]。

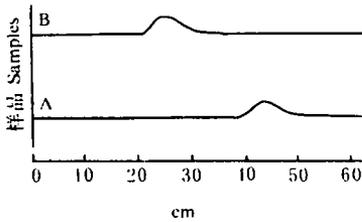


图4 铁钼辅基分子量测定层析图

Fig. 4 Chromatogram of molecular determination of FeMoco

A: FeMoco(a) B: FeMoco(b)

FeMoco 对柠檬酸、 Cl^- 和 NMF 具有一定的络合能力^[4],外加高柠檬酸钠,ATP 能大幅度地提高 FeMoco 的生物重组活性^[11]。因此溶于 NMF 的 FeMoco 很可能络合若干个 NMF,这种现象引起用层析法测定的 FeMoco

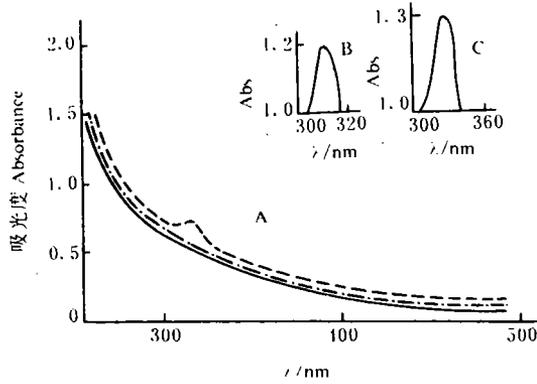


图3 FeMoco, $Na_2S_2O_4$ 和高柠檬酸盐在紫外可见区中的吸收光谱
Fig. 3 Absorbance spectra of FeMoco, sodium dithionite, and homocitrate in the ultraviolet-visible range.

(A) FeMoco 在紫外可见光谱区中的吸收光谱 (Absorbance spectra of FeMoco in the ultraviolet-visible range)

—— FeMoco(a)的吸收光谱。(Absorbance spectra of FeMoco(a)),

- - - FeMoco(b)的吸收光谱(Absorbance spectra of FeMoco(b))

.... 含有 $S_2O_4^{2-}$ 的 FeMoco 吸收光谱(Absorbance spectra of FeMoco containing $S_2O_4^{2-}$)

(B) $Na_2S_2O_4$ 在紫外区的吸收光谱 (Absorbance spectra of $Na_2S_2O_4$ in the ultraviolet range)

(C) 高柠檬酸盐在紫外区的吸收光谱 (Absorbance spectra of homocitrate in the ultraviolet range)

表2 FeMoco 的元素分析

Table 2 Elemental analysis of FeMoco

类型 Species	分析方法 Analytical methods								
	AA			ICP			PIXE		
	Mo	Fe	S	Mo	Fe	S	Mo	Fe	S
FeMoco(a)	1	6	6	1	6	6	1	6	6
FeMoco(b)	1	6	6	1	6	6	1	6	6

(a,b)的 M_1 的实验值分别与它们各自 M_1 的理论值略有不同。

近期 X-射线晶体结构技术成功地解剖了钼铁蛋白 M 中心整体金属簇结构,指出 M 中心金属簇由 2 个分子 FeMoco 金属簇组成,每个分子 FeMoco 由含钼的铁硫簇 (MoFe_3S_3) 和铁硫簇 (Fe_4S_3) 组成为一体^[13]。因此,我们认为钼铁蛋白 M 中心整体金属簇铁硫簇分子组成可视为 ($\text{Mo}_2\text{Fe}_4\text{S}_{12}$), 它的金属簇组成与 FeMoco(b) 组成相似。用低碱度 NMF 提取的 FeMoco(a) 很可能是 M 中心金属簇的部分含钼铁硫簇,呈单钼铁硫簇结构 (MoFe_4S_6), 剩余金属簇仍留在残余蛋白中,所以残余蛋白仍呈棕色^[7]。用高碱度 NMF 提取的 FeMoco(b) 很可能是整个 M 中心金属簇,则呈双钼铁硫簇结构 ($\text{Mo}_2\text{Fe}_4\text{S}_{12}$), 由于 FeMoco(a) 和 FeMoco(b) 在结构上存在明显不同,因此它们的生物重组活性明显不同。双钼铁硫簇结构更有利固氮酶底物催化还原反应。

参考文献

- 1 Watt GD, Burns A, Tennent DL. Stoichiometry and spectral properties of the MoFe cofactor and noncofactor redox centers in the MoFe protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. 1981, 201:7272~7277
- 2 Watt GD, Huang HQ, Reddy KRN. Redox properties of the nitrogenase protein. *Molybdenum Enzymes cofactor and Model Systems*. 1993, 535:243~256
- 3 Shah VK, Brill WJ. Isolation of iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1977, 74: 3249~3253
- 4 Burgess BK. The iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Chem. Rev.* 1990, 90:1377~1460
- 5 Yang SS, Pan WH, Friesen GD. Iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *J Biol Chem.* 1982, 257:8042~8048
- 6 Huang HQ, Kofford M, Watt GD *et al.* Purification, composition, charge, and molecular weight of FeMo cofactor from *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J Inorgan Biochem.* 1993, 52:59~75
- 7 黄河清, Watt GD. 固氮酶铁钼辅基理化特性的研究. *生物化学杂志*. 1995, 11(4):465~469
- 8 Smith BE, Rady RR. Metalloclusters of the nitrogenase. *Eur J Biochem.* 1985, 205:1~15
- 9 Huang HQ, Watt RK, Frankel RK *et al.* Role of phosphate in Fe(II) binding to horse spleen ferritin. *Biochemistry*, 1993, 32: 1681~1687
- 10 黄河清, 张凤章, 许良树等. 细菌铁蛋白铁释放动力学研究. *生物物理学报*. 1996, 12(1):37~42
- 11 张凤章, 尹蓓, 黄河清等. 高柠檬酸盐对固氮酶铁钼辅基重组活性的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*. 1996, 35(1): 100~106
- 12 刘国诠等主编. *生物工程下游技术*. 北京: 化学工业出版社, 1993
- 13 Kim JS; Rees DC. Structure models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, 1992, 257: 1677~1682

欢迎订阅1998年《生态农业研究》

《生态农业研究》由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会共同主办的生态学与大农业相结合性学术期刊, 科学出版社出版, 系中国科学引文数据库来源期刊。本刊旨在探索与研究生态农业理论、方向和内容等, 推动学科发展。主要刊登具有创造性生态农业研究论文、研究技术简报(包括理论与应用研究、生态农业工程技术与适用生物技术), 报道国内外生态农业最新研究成果、学术动态和生态农业建设典型经验。适合国内外从事生态农业与相关学科研究人员(包括生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等)、高等院校师生和技术、管理工作读者阅读。本刊1993年创刊, 国内外公开发行, 刊号(ISSN 1004-8219, CN 13-1165/S), 季刊, 季末出版, 16开本, 80页。定价: 5元/册, 20元/年, 全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 18-158。漏订者也可直接向本刊编辑部订阅, 本刊另备有1993、1994、1995、1996和1997年合订本均为20元/套(含邮资), 欢迎订阅。编辑部地址: (050021) 河北省石家庄市槐中路176号《生态农业研究》编辑部, 电话: (0311)5818007