

铁氰化钾氧化固氮酶钼铁蛋白与铁、钼、 硫化合物重组的研究

骆爱玲 黄巨富 梁寅初 周靖东 李永兴 张慧苗

(中国科学院植物研究所, 北京)

翟建材 吴学超

(清华大学工程物理系, 北京)

棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白经铁氰化钾氧化后变为“漂白蛋白”, 其活性损失约 75%, 同时释放出 80% 的钼和 50% 左右的铁。与铁、钼、硫重组溶液重组, 金属组成和乙炔还原活性均得到明显恢复。穆斯鲍尔 (Mössbauer) 谱表明, 重组溶液中的 Fe、Mo、S 已形成 FeMoS 原子簇的类似物, “重组蛋白”的 Mössbauer 谱和天然 MoFe 蛋白相似。

关键词 棕色固氮菌; 固氮酶钼铁蛋白; 铁氰化钾氧化; 活性重组; 穆斯鲍尔谱

固氮酶由两个蛋白质组成, 一个分子量较大, 含钼和铁, 称为钼铁 (MoFe) 蛋白; 另一个分子量较小, 只含铁, 称为铁 (Fe) 蛋白。目前一般认为 MoFe 蛋白是氮分子的络合还原中心, 而 Fe 蛋白是电子活化中心^[1]。用 Mössbauer 谱和 EPR 谱确定 MoFe 蛋白分子中金属是以原子簇形式存在^[2]。Shah 和 Brill 用有机溶剂萃取的方法, 从 MoFe 蛋白得到一个含铁钼硫的因子 (FeMoCo), 该因子与突变种 UW₄ 粗提物重组具有明显的乙炔还原活性, 但单独 FeMoCo 并无此活性。因此除 FeMoCo 外, MoFe 蛋白的其它部分也起重要作用^[3]。对 MoFe 蛋白的氧化失活机理及无机 Fe、Mo、S 对“漂白蛋白” (Apo-MoFe) 活性恢复的研究, 无疑对阐明金属原子簇和 Apo-MoFe 蛋白对活性的贡献有重要意义。近来 Gomez-Moreno 进行了巴氏梭菌固氮酶 MoFe 蛋白重组的研究, MoFe 蛋白经铁氰化钾 [K₃Fe(CN)₆] 无氧氧化后, 用无机 Fe、Mo、S 溶液重组得到“重组蛋白”, 其 EPR 信号与氧钝化的 MoFe 蛋

白相似, 但没有测出活性^[4]。本文就铁氰化钾对棕色固氮菌固氮酶 MoFe 蛋白不同程度的氧化性质, 以及失活蛋白能否与无机 Fe、Mo、S 化合物重组得到有催化活性的 MoFe 蛋白, 进行了研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. “漂白蛋白” (Apo-MoFe): 根据 Gomez-Moreno 等人的方法^[4]略加改进。将厌氧的 NaOH 溶液注入到结晶 MoFe 蛋白溶液中, 调 pH 到 8.0—8.5, 置 23℃ 恒温水浴中, 待温度平衡后, 再加入厌氧 K₃Fe(CN)₆ 溶液, 保温 7 分钟。将反应混合物通过 Sephadex G-25 (1.8 × 21cm) 柱进行层析, 分管收集流出液, 分别测定其蛋白浓度、活性和金属含量。分离得到的蛋白为“漂白蛋白”。

2. 重组溶液: 分别用无氧蒸馏水配制钼酸钠和柠檬酸铁母液, 用充分除氧的 0.025M Tris-HCl pH 7.4 缓冲液配制硫酸钠和二硫苏糖醇 (DTT) 母液。然后按钼酸钠、柠檬酸铁、DTT、硫化钠的先后顺序用注射器注入到带有反尔塞的

本文于 1986 年 4 月 23 日收到。

厌氧三角瓶中,最终浓度为: 钼酸钠 0.15mmol/L、柠檬酸铁 0.9mmol/L、硫化钠 0.6mmol/L、DTT 2.4mmol/L。

3. “重组蛋白” (Re-MoFe):10mg “漂白蛋白”与 1ml 重组溶液厌氧混合, 30℃ 保温 30 分钟或 1 小时, 得到“重组蛋白” Re-MoFe(m), 将其依次进行 Sephadex G-25 柱和 DEAE-52 (1.4 × 10cm) 柱层析, 以除去过量重组溶液, 分别得到 Re-MoFe (S) 和 Re-MoFe(D)。

4. 用于 Mössbauer 的测量样品使用 Fe⁵⁷ 富集的柠檬酸铁, 将样品冷冻干燥, 加入适量的可溶性淀粉充分混匀, 用模具压制成面积约为 1.5cm² 的薄片供测试。

(二) 方法

1. MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的分离、提纯、结晶乙炔还原活性和蛋白测定方法均同前^[5,6]。

2. 含钼量测定: 用催化极谱法^[7]。

3. 含铁量测定: 用原子吸收光谱法。

4. 可见光吸收光谱测定: 使用日立 356 双光束双波长分光光度计。

5. 氧化还原电位测定: MoFe 蛋白溶液介质的氧化还原电位测定是在充分去氧的小室中进行的, 以白金电极为指示电极, 饱和甘汞电极为参比电极。用日本东亚电波公司 HM-8 型精密 pH/ 电位差计连续测定电位变化。

6. Mössbauer 谱测定: Mössbauer 参数是用 261 厂生产的等加速型穆斯鲍尔谱仪及 1024 道分析器测定和记录。测量方式为透射式。探测器为 0.2mm 厚的 NaI(Tl) 晶体, 放射源为 10mCi 用铈衬底的 Co⁵⁷。低温 (~90K) 装置用内装液氮的铜容器制成。

重组溶液的室温谱每道总计数测到 80 多万, 其它样品也达 36 万以上, 使计数的统计涨落少于 0.2%, 化学位移的数值是对 α 铁谱的中心而言。计算机拟合处理全部数据。

结果和讨论

(一) K₃Fe(CN)₆ 厌氧氧化 MoFe 蛋白的特性

MoFe 蛋白的活性随加入 K₃Fe(CN)₆ 量的增加而降低, 表现为 S 形曲线 (图 1)。

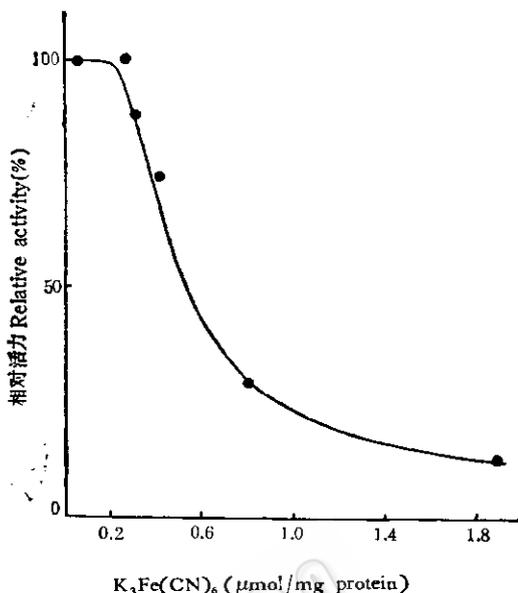


图 1 MoFe 蛋白活性与加入的铁氰化钾量的关系
Fig. 1 The effect of K₃Fe(CN)₆ on the activity of MoFe protein

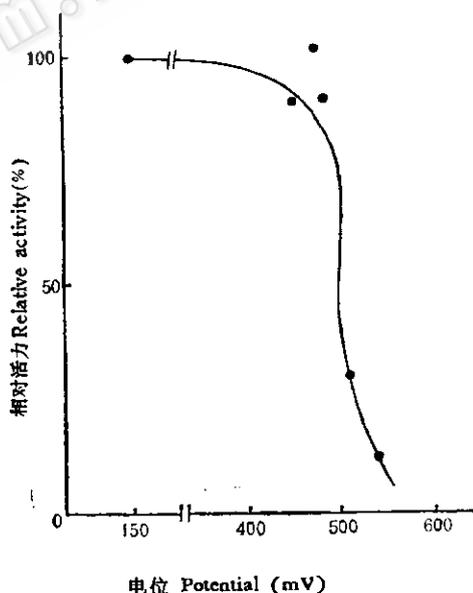


图 2 MoFe 蛋白的活性与其介质电位的关系
Fig. 2 The relationship between the activity and potential of the medium of MoFe protein

当加入 K₃Fe(CN)₆ 的量低于 0.3 μmol/mg 蛋白时, 活性几乎不降低或降低很少。由于少量氧化剂首先被溶液中的 Na₂S₂O₄ 所

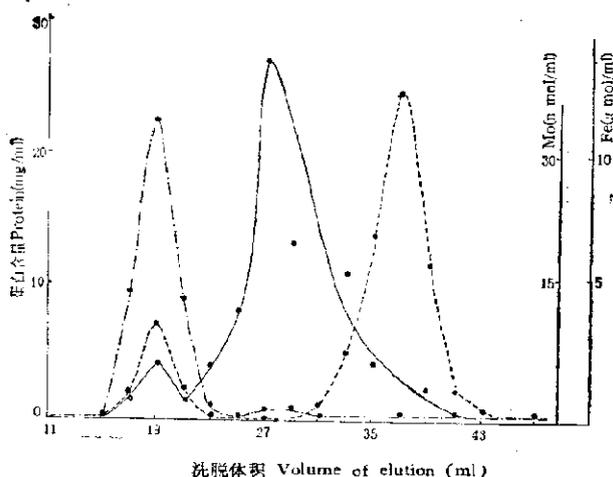


图3 氧化后的 MoFe 蛋白通过 Sephadex G-25 柱的洗脱图谱

Fig. 3 The elution profile MoFe protein oxidized by ferricyanide from a Sephadex G-25 column

---蛋白质 protein; — Fe; ··· Mo

消耗,然后用于蛋白中 FeMoCo 和铁硫原子簇的可逆氧化反应,所以不影响活性。但再增加 $K_3Fe(CN)_6$ 量,活性迅速降低。如果继续加入氧化剂,当 $K_3Fe(CN)_6$ 量高于 $0.7 \mu mol/mg$ 蛋白时,活性丢失变慢。图 2 也呈现相同现象,电位在 $500mV$ 以下时,活性损失达 10% 左右,但在 $500-540mV$ 范围内,活性丢失达 90%。表明 MoFe 蛋白经氧化后,在一狭小的电位变化

区域,蛋白分子中为乙炔还原所必需的某些基团遭受损伤,导致活性迅速丢失。

MoFe 蛋白经 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化后,其金属原子簇和蛋白部分均受到不同程度的破坏,表 1 和图 3 表明,80% 以上的钼原子和 50% 左右的铁原子及小分子量的肽段从蛋白中断裂下来。

(二)“重组蛋白”的活性和金属含量的恢复

丢失大部分金属原子的 Apo-MoFe 蛋白与重组溶液保温后,得到重组蛋白,其金属含量得以恢复。表 1 表明经 Sephadex G-25 柱处理后,Re-MoFe(S) 的 Mo、Fe 含量仍比天然蛋白的含量高。再经 DEAE 纤维素-52 柱层析,虽使 Re-MoFe(D) 的 Fe 含量接近于正常蛋白,但 Mo 含量仍偏高,这可能是上述两种层析柱不能使过量的重组溶液完全分离所致。

重组溶液不能单独与 Fe 蛋白组成可还原乙炔的活性复合物,但它可以激活 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化失活的 Apo-MoFe 蛋白。表 2 和 3 表明,失活的 Apo-MoFe 蛋白与重组溶液重组后,再与 Fe 蛋白互补,还原乙炔的总活性和比活性都有显著提高,重组蛋白活性恢复程度似乎与蛋白氧化损伤程度有关,损伤越严重,恢复越少;损伤越轻,活性恢复越多。表 3 还说明,重组溶液可以更

表 1 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化和重组 MoFe 蛋白的金属含量*

Table 1 Metal contents of the oxidized with $K_3Fe(CN)_6$, and reconstituted MoFe protein*

样品 Sample	金属含量 Metal contents	Mo (g. atom/mol)	Fe (g. atom/mol)
MoFe(cry)		1.3	29.31
Apo-MoFe		0.2	16-17
Re-MoFe(S)		26	65.6
Re-MoFe(D)		8-12	27.9

* MoFe 蛋白分子量以 250,000 计。

* The molecular weight of the MoFe protein was taken as 250000 daltons.

表 2 重组溶液对 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化 MoFe 蛋白的激活作用Table 2 The reactivation of the MoFe protein oxidized by $K_3Fe(CN)_6$ with reconstituting solution

样 品 Sample	总蛋白 Total protein (mg)	乙炔还原活性 C_2H_2 reduction activity	
		总活性 Total activity (nmol/min)	比 活 Specific activity (nmol/min·mg)
Apo-MoFe	52.5	9576.0	182.2
Re-MoFe(M)	52.2	23341.5	444.6
Re-MoFe(S)	38.5	32316.4	848.2
Re-MoFe(D)	12.8	14970.9	1169.6

表 3 重组溶液对 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化 MoFe 蛋白的激活效率Table 3 Efficiency of reactivation of the MoFe protein oxidized by $K_3Fe(CN)_6$ with the reconstituting solution

样品 Sample	相对比活 Relative specific activity	实 验 I Exp. I		实 验 II Exp. II
		乙炔还原 C_2H_2 reduction	氢 释 放 H_2 evolution	乙炔还原 C_2H_2 reduction
MoFe (cry)		100	100	100
Apo-MoFe		4.0	0.12	0.008
Re-MoFe(m)		26.0	36.3	9.0
Re-MoFe(D)		38.7	65.0	22.5

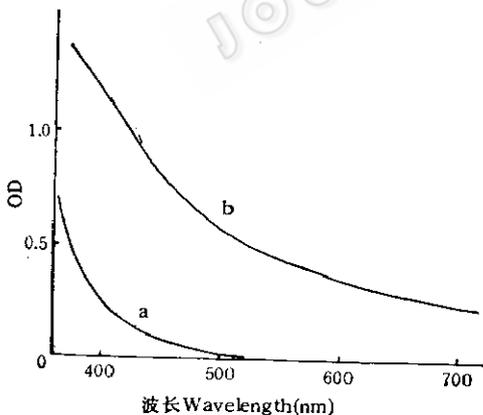


图 4 柠檬酸铁溶液(a)和重组溶液(b)的吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectrum of ferric citrate (a) and the reconstituting solution (b)

有效地激活 Apo-MoFe 蛋白释放 H_2 的活性。表明在遭受氧化损伤后, H_2 释放中

心比乙炔还原中心更易恢复。

(三) 重组溶液的某些特性

重组溶液是由钼酸钠、柠檬酸铁、DTT 和硫化钠按一定比例顺序混合配制的溶液, 呈棕褐色。它的光谱既不同于任何一种组成物的光谱, 也不是它们的光谱叠加, 而与天然 MoFe 蛋白光谱有些相似(图 4)。虽然重组溶液与 Fe 蛋白混合不具有乙炔还原活性, 但是以硼氢化钠 ($NaBH_4$) 为还原剂时, 重组溶液单独具有乙炔还原活性(表 4)。还原乙炔的量基本与加入溶液的量成线性关系, 按 Mo 原子计算, 最高活性为 FeMoCo 的 3.5%^[8]。这一还原活性有可能进一步提高(表 4)。重组溶液曝氧数分钟, 对活性没有显著影响, 与测定 Mössbauer 谱线的结果(表 5)一致。但曝

表 4 重组溶液在以 NaBH_4 为还原剂时的乙炔还原活性Table 4 C_2H_2 -reduction activity of the reconstituting solution using NaBH_4 as a reductant

含 Mo 量 Mo content (nmol)	活性 Activity	实验 I* Exp. I		实验 II Exp. II		实验 III** Exp. III	
		Total activity (nmol)	Specific activity (nmol/min. nmol Mo)	Total activity (nmol)	Specific activity (nmol/min. nmol Mo)	Total activity (nmol)	Specific activity (nmol/min. nmol Mo)
重组溶液 Reconstituting solution	15.16	10.00	0.66	2.65	0.175	2.51	0.66
	45.48	24.78	0.54	14.00	0.308	11.6	1.02
	75.80	70.93	0.94	18.05	0.238	22.49	1.19
	151.60	74.51	0.49	24.99	0.164	29.23	0.79
曝氧重组溶液 Reconstituting solution exposed to O_2 3h	75.8	/	/	19.5	0.257	/	/
	75.8	/	/	0	0	/	/
钼酸钠溶液 NaMoO_4	60.64	11.79	0.2	0	0	/	/
柠檬酸铁溶液 Ferric citrate	45.17***	0.076	0.0017	0.15	0.0033	/	/

* 以 Tris-HCl 为缓冲系统,其它均以硼酸为缓冲系统。

Buffer: Tris-HCl pH7.4 for Exp. I; Borate-NaOH pH9.6 for Exp. II and Exp. III.

** 重组溶液含 Mo 量仅为其它实验的 25%。

Mo content is 25% of that in Exp. I and Exp. II.

*** 以含铁量计算。

Based on Fe amount.

氧几小时,由深棕色变为黄色,活性也完全消失。表明重组溶液中存在具有一定结构和氧化还原特性的某些化合物。

重组溶液的 Mössbauer 谱是由两组四级分裂双峰组成。与它的柠檬酸铁的一组对称四极分裂双峰明显不同(图 5, 6)。

无钼溶液由柠檬酸铁和 DTT 两种成分组成,在过量还原剂 DTT 存在下,柠檬酸铁的三价铁离子全部还原成二价铁离子,因此,它的两组双峰(图 7)都是二价铁的特征。第一组双峰的化学位移

$$\delta_1 = 1.21\text{mm/sec},$$

四极裂距 $\Delta E_{\text{QI}} = 2.51\text{mm/sec}$, 与高自旋亚铁的典型数值 $\delta = 1.0-1.5\text{mm/sec}$ $\Delta E_{\text{Q}} = 2.0-3.7\text{mm/sec}$ 相符^[9]。所以,第

一组双峰是高自旋亚铁(Fe^{2+})的反映。而第二组双峰显然是低自旋二价铁的反映, δ_2 和 ΔE_{Q2} 值(表 5)与文献列举的低自旋二价铁的范围一致。

重组溶液与无钼溶液的 Mössbauer 谱形相似,都表现为两组四极分裂双峰,但其参数不完全相同。重组溶液的 δ_1 和 ΔE_{Q1} 值均属高自旋亚铁的典型数值范围。与无钼溶液比较,重组溶液的 δ_1 值略小,而 ΔE_{Q1} 又略大(表 5),这是由于溶液中的铁和钼未形成多核络合物时,钼的存在有使化学位移减少和四极分裂增大的趋势。因此,重组溶液中第一组双峰表明了高自旋二价铁的存在。

重组溶液与无钼溶液的第二组双峰比

表 5 各种样品的 Mössbauer 参数*

Table 5 Mössbauer parameters of various sample measured

样 品 Sample	测量温度 Temp. for measurement	δ_1 (mm/sec)	ΔE_{Q1} (mm/sec)	δ_2 (mm/sec)	ΔE_{Q2} (mm/sec)	η
重组溶液 Reconstituting solution	室温 Room temp.	1.14	2.80	0.38	0.67	2.4
	~90K	1.14	3.07	0.35	0.73	2.0
无钼溶液 Mo-free solution	室温 room temp.	1.21	2.51	0.38	0.59	1.0
氧化溶液** Oxidized solution	室温 room temp.	1.12	2.79	0.38	0.69	5.7
重组蛋白 Reconstituted protein	室温 room temp.	/	/	0.37	0.78	/
	~90K	/	/	0.36	0.96	/
柠檬酸铁 Ferric citrate	室温 room temp.	$\delta = 0.45$		$\Delta E_Q = 0.58$		/

* δ_1 和 ΔE_{Q1} 为高自旋亚铁部分的双峰参数。

δ_1 and ΔE_{Q1} are parameters of two peaks of high-spin ferrous iron.

δ_2 和 ΔE_{Q2} 为其它组分的双峰参数。

δ_2 and ΔE_{Q2} are parameters of two peaks of other components.

η 值为两组双峰面积之比。

η value is area ratio of two peaks of groups.

** 重组溶液曝氧 30 分钟。

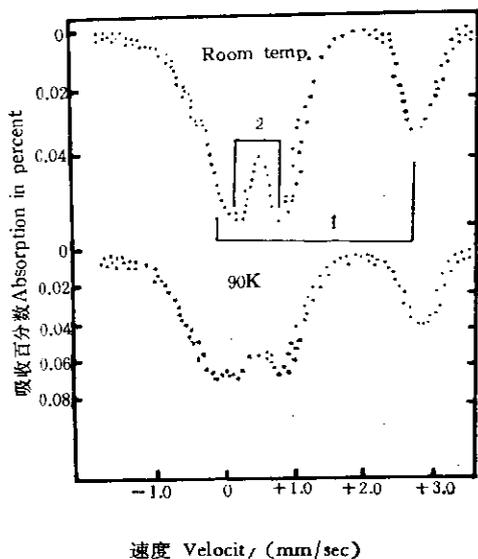
Reconstituting solution to O_2 for 30 min.

较, δ_2 值相同, 均为 0.38mm/sec, 仅 ΔE_{Q2} 值前者略大于后者 (表 5)。这与形成 FeMoS 原子簇化合物时的 Mössbauer 谱的趋势相符。具有稳定构型的 Fe-S 原子簇中少量铁被钼置换时, 使原子簇中铁周围的配位场对称性降低, 结果 ΔE_{Q2} 值增大。表明重组溶液中除有高自旋二价铁外, 还有类似 FeMoS 原子簇的化合物。

Wall 等^[10]提出 FeMoS 原子簇化合物是通过“自兜式”反应而简单合成的。重组溶液正符合这类化学反应的特点, 从而支持了在重组溶液中生成 FeMoS 原子簇或类似物的观点。

(四) 重组蛋白的 Mössbauer 谱

重组蛋白的 Mössbauer 谱是一组四极分裂双峰(图 8)。重组溶液在与 Apo-MoFe 蛋白重组过程中, 原表示高自旋亚铁的第一组双峰明显消失。与 Smith^[11] 等用染料氧化天然 MoFe 蛋白的 Mössbauer 谱形变化类似。染料氧化后的蛋白, 表示高自旋亚铁的峰也明显消失, Mössbauer 谱中 MEPR 部分无变化, 并仍保留乙炔还原活性。重组溶液经 30 分钟氧化后, 谱线形状无变化, η 值由 2.4 增大至 5.7, 表明高自旋亚铁成分有所减少, 在以 $NaBH_4$ 为还原剂时, 乙炔还原活性基本不受影响。但氧化 3 小时, 活性完全丧失 (表 4)。说明重组溶液与 Apo-MoFe 蛋白重组的过程类

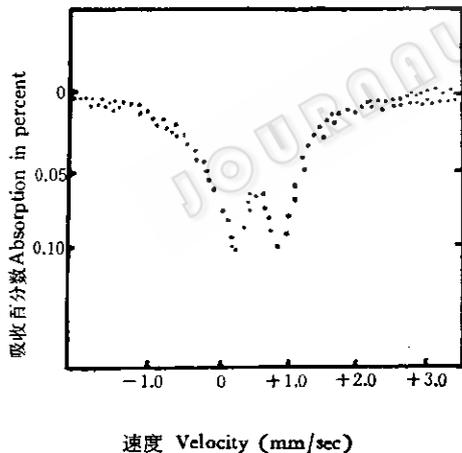


速度 Velocity (mm/sec)

图5 重组溶液的 Mössbauer 谱

Fig. 5 Mössbauer spectra of the reconstituting solution

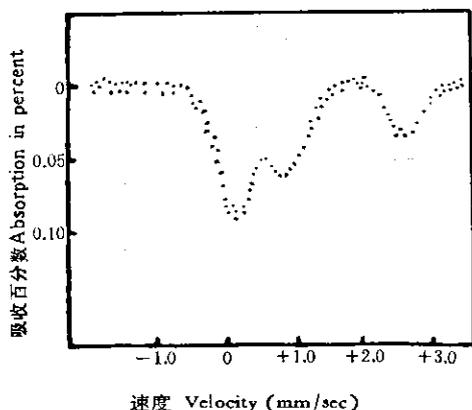
- 1. 第一组双峰 First group double peaks
- 2. 第二组双峰 Second group double peaks



速度 Velocity (mm/sec)

图6 柠檬酸铁的 Mössbauer 谱(室温)

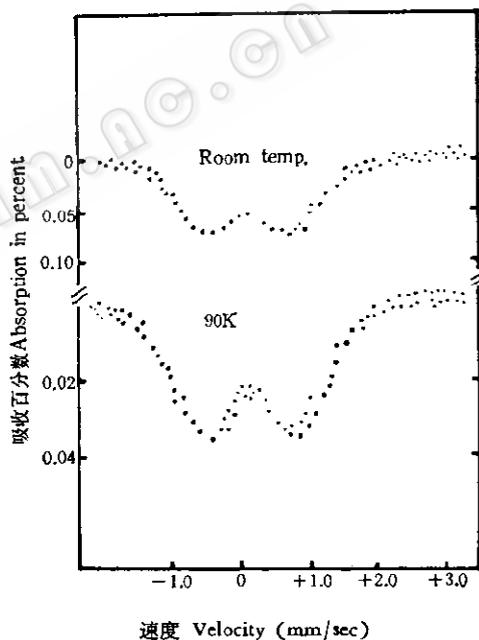
Fig. 6 Mössbauer spectrum of ferric citrate solution (Room temp.)



速度 Velocity (mm/sec)

图7 无钼溶液的 Mössbauer 谱(室温)

Fig. 7 Mössbauer spectrum of the solution without Mo (Room temp.)



速度 Velocity (mm/sec)

图8 重组蛋白的 Mössbauer 谱

Fig. 8 Mössbauer spectra of the reconstituted MoFe protein

似于染料氧化,也近似重组溶液的 30 分钟氧化,估计 Fe^{2+} 的硫化物具有较低的氧化-还原电位,受氧化剂作用时首先被氧化,然而对表征为第二组双峰的 $FeMoS$ 原子簇化合物有一定的保护作用,而乙炔还

原活性可能正是这第二组双峰所提供。重组蛋白的 Mössbauer 参数; 90K $\delta = 0.36$, $\Delta E_Q = 0.96$ (表5);染料氧化 MoFe 蛋白 77K $\delta = 0.37$, $\Delta E_Q = 0.75$;天然 MoFe 蛋白 90K $\delta = 0.37$, $\Delta E_Q = 0.81$ ^[11,12]。由此可见,三种蛋白的 δ 值基本相似,而 ΔE_Q

值有差异,可能是 FeMoS 原子簇与蛋白部分络合的方式或紧密程度不同所致,使三种状态的 MoFe 蛋白都具有一定的乙炔还原活性,只是表现水平不同。

以上实验表明, $K_3Fe(CN)_6$ 对 MoFe 蛋白的氧化作用可能分为三个阶段。第一阶段为可逆氧化还原,加入 $K_3Fe(CN)_6$ 量较少,活性几乎不损失。第二阶段为可激活氧化,此时加入足够量的 $K_3Fe(CN)_6$,蛋白中 FeMoCo 和 FeMoS 原子簇受到破坏,活性丢失,但当加入适量的 Fe、Mo、S 重组溶液后,可恢复其金属组成和乙炔还原活性,已由本实验所证明。第三阶段为不可激活氧化,此时加入的 $K_3Fe(CN)_6$ 量过大或氧化时间过长,蛋白分子中除金属原子簇破坏外,蛋白分子的某些结构也受到严重破坏,以致再加入 Fe、Mo、S 重组溶液也不能恢复其活性。

参 考 文 献

- [1] Motenson, L. E. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**: 387—418, 1979.
- [2] Smith, B. E.: *J. Less-common Metals*, **54**: 465, 1977.
- [3] Shah, V. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**: 3249—3253, 1977.
- [4] Gomez-Moreno, C. et al.: *Molecular and Cellular Biochem.*, **26**: 111—118, 1979.
- [5] 中国科学院植物研究所七室: *植物学报*, **15**: 281—284, 1973.
- [6] 黄巨富等: *植物学报*, **24**: 341—346, 1982.
- [7] 骆爱玲, 梁寅初: *植物生理学通讯*, **102**: 45—47, 1984.
- [8] Shan, S. K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **81**: 232—236, 1978.
- [9] Fairhurst, S. A. et al.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **34**: 38—53, 1978.
- [10] Wolff, T. E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**: 4140—4150, 1979.
- [11] Smith, B. E. et al.: *Biochem. J.*, **137**: 169—180, 1974.
- [12] Rawlings, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**: 1001—1004, 1978.

STUDIES ON RECONSTITUTION OF THE NITROGENASE MoFe PROTEIN OXIDIZED BY $K_3Fe(CN)_6$ WITH THE RECONSTITUTING SOLUTION CONTAINING Mo, Fe, S

Luo Ailing Huang Jufu Liang Yinchu Zhou Jingdong

Li Yingxing Zhang Huimiao

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

Zhai Jiancai Wu Xuechao

(Department of Engineering physics, Qinghua University, Beijing)

After anaerobically oxidized by ferricyanide about 80 per cent of molybdenum atoms and 50 per cent of iron atoms are released from the molybdenum-iron protein of nitrogenase, the activity of the oxidized protein lost about 75%. By incubating Apo-MoFe protein with reconstituting solution containing Mo, Fe, S, the composition of the metals and acetylene reduction activity of the reconstituted MoFe protein can be restored markedly. The studies of Mössbauer spectrum show that

in the reconstituting solution iron and molybdenum atoms have been constructed as an analogue of Fe-Mo-S cluster. The Mössbauer spectrum of reconstituted MoFe protein is similar to that of the native MoFe protein of nitrogenase.

Key words

Azotobacter vinelandii; Nitrogenase MoFe protein; Oxidation by $K_3Fe(CN)_6$; Activity reconstitution; Mössbauer spectra