

钼铁蛋白金属原子簇的拆卸与组装的 圆二色谱的研究*

黄巨富 骆爱玲 解雪梅

(中国科学院植物研究所, 北京)

王 蒸 金

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

用邻菲罗啉 (o-phen) 和氧分别或共同处理的棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 固氮酶钼铁蛋白的活性、圆二色谱 (CD) 和金属含量都发生变化。曝氧蛋白的活性随其在 660nm 和 450nm 的 $\Delta\epsilon$ (圆二向色性克分子消光系数) 的降低而降低; 而 o-phen 处理的蛋白活性只随其 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 和铁含量的降低而降低; 但在有氧时, o-phen 处理的蛋白活性的降低不仅与其 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 和铁含量降低有关, 而且还与其 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 和钼含量降低有关。然而, 当这些处理蛋白与由 Na_2MoO_4 、 Na_2S 、柠檬酸铁和二硫苏糖醇组成的重组溶液保温后, 重组蛋白的活性随它们的 CD 谱和金属含量的显著恢复而得到明显恢复。结果表明: (1) 不仅 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 可反映钼铁蛋白中 P-cluster 的状态和数目, 而且 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 也许也可反映蛋白中 FeMoco 的状态和数目; (2) o-phen 不仅可整合还原蛋白中 P-cluster 的铁原子, 而且也可整合曝氧蛋白中 FeMoco 和 P-cluster 的铁原子; (3) 钼铁蛋白中的这两种金属原子簇都可通过缺失原子簇的钼铁蛋白与重组溶液的保温而得到组装; (4) 这两种原子簇都是钼铁蛋白还原底物所必需的重要部分。

关键词 棕色固氮菌; 圆二色谱; 拆卸与组装; 金属原子簇; 钼铁蛋白

棕色固氮菌固氮酶钼铁 (MoFe) 蛋白中存在三种铁硫原子簇, 即 FeMoco (M 簇)、P-cluster (P 簇) 和二铁 (S) 簇^[1-7]。前两种原子簇分别约占蛋白含铁总量的 40% 和 50%。已有直接和间接证据表明, FeMoco 是络合和还原底物中心的主要组成部分^[1-4,7-10], P-cluster 也是蛋白具有活性的必需部分^[11]。因此, 人们对在蛋白中或从蛋白中抽提出来的原子簇进行了广泛的研究, 并得到了许多重要的结果。近来关于金属含量不全蛋白的制备及其体外重组的研究^[6,10-13], 无疑也会促进对原子簇的作用和固氮机理的阐明。然而, 在我们已报道的结果中^[11-13], 尚存在一些值得继续研究的问题。例如, 邻菲罗啉能否整合曝

氧 MoFe 蛋白中 FeMoco 的铁原子, 使处理蛋白的钼含量丢失程度随样品制备和处理过程中厌氧程度的改变而改变。本文就此问题及为制备缺失 FeMoco 的 MoFe 蛋白寻找新途径进行了研究。

材料和方法

(一) 材料

1. “还原的 MoFe 蛋白” [MoFe(R)]: 按文献^[8,9,15]制备。
2. “O₂ 和邻菲罗啉 (o-phen) 处理的

本文于 1989 年 2 月 28 日收到。

* 本课题得到中国科学院科学基金和国家自然科学基金的资助。

地质矿产部岩矿测试技术研究所协助测定金属含量, 特此致谢。

蛋白”: (1) “曝氧蛋白”[MoFe(O)]: 按文献[8,9,12]分别得到含有或不含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (DT) 的曝氧蛋白 [MoFe(O)]。按文献[8]用 DT 和甲基紫精 (MV) 使 MoFe(O) 还原。(2) “o-phen 处理蛋白”: 除 o-phen 与 MoFe(R) 保温时间为 90 分钟外, 均按文献[11,13]得到蛋白 [MoFe(C)]。(3) “o-phen 处理曝氧蛋白”: 按文献[11,13]使 MoFe(O) 与 o-phen 厌氧保温 90 分钟, 经 Sephadex G-25 柱 (2.2×23.0cm) 厌氧层析, 得到蛋白 [MoFe(O, C)]。(4) “o-phen 先在厌氧、后在有氧环境中处理蛋白”: 按文献[11,13]使 o-phen 与 MoFe(R) 厌氧保温 90 分钟后同时开启瓶塞和电磁搅拌, 在空气中再保温 15 分钟, 抽气充氩五次, 并经 Sephadex G-25 柱 (2.2×23.0cm) 厌氧层析, 得到蛋白 [MoFe(C, O)]。

3. “重组蛋白”: 按参考文献[10,11,13]配制重组溶液, 使其分别与 MoFe(O)、MoFe(O, C) 和 MoFe(C, O) 保温, 再经

厌氧柱层析分别得到重组蛋白 [Re-MoFe(O)]、[Re-MoFe(O, C)] 和 [Re-MoFe(C, O)]。

(二) 方法

1. MoFe 蛋白和铁蛋白的分离、提纯、乙炔还原活性和蛋白浓度的测定参照文献[8,9,14,15]进行。

2. Mo 和 Fe 原子含量测定均按文献[11]进行。

3. 吸收光谱 (ABS) 和圆二色谱 (CD) 的测定分别按文献[11,12]进行。

4. 单位表示: 乙炔还原活性为 $n \text{ mol} \cdot \text{mg} \text{ 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。 $\Delta\epsilon_1$ 、 ϵ_1 分别为圆二向色性克分子消光系数和吸收光谱克分子消光系数, $AR(\Delta\epsilon/\epsilon)$ 为各向异性比值 (Anisotropy ratio)^[13]。 MoFe 蛋白分子量以 240000 计^[14]。

结果和讨论

(一) o-phen 和 O₂ 处理蛋白特性的比较

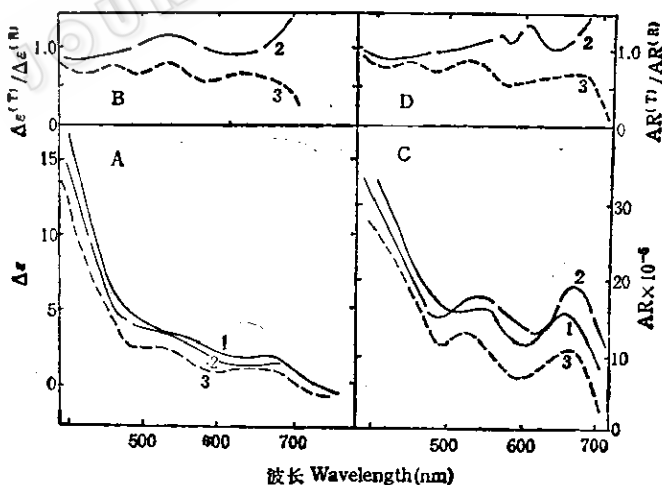


图1 氧和 o-phen 对 MoFe 蛋白 CD 和 AR 的影响

Fig. 1 The effect of O_2 and of o-phen on CD and AR spectra of MoFe protein

1. MoFe(R); 2. MoFe(C); 3. MoFe(O)

A. $\Delta\epsilon$; B. $\Delta\epsilon^{(T)}/\Delta\epsilon^{(R)}$; C. AR; D. $AR^{(T)}/AR^{(R)}$

(R): MoFe(R); (T): MoFe(C), MoFe(O)

1. 金属含量与催化活性: 溶液中的蛋白 MoFe(R) 曝氧失活速度随温度、蛋白浓度、溶液的界面和厚度等的改变而改变^[8]。曝氧 15 分钟使蛋白失去 44% 的活性, 而 o-phen 处理 90 分钟才使蛋白失去 30% 的活性(表 1), 这与文献[1,8,12]相一致的结果表明, 氧单独作用远比 o-phen 大得多, 然而, 氧只使蛋白损伤而不使金属原子含量发生改变, 而 o-phen 却使蛋白的 Fe 含量和活性同时降低。

2. 金属原子簇与圆二色谱: MoFe(C) 与 MoFe(O) 的 CD 和 AR 谱不完全相同(表 1 和图 1)。MoFe(C) 的 $\Delta\epsilon$ 和 AR 除在 380—500nm 区域降低外, 在其它区域不发生显著变化; 而 MoFe(O) 的 $\Delta\epsilon$ 和 AR 则在所测区域都显著降低, 而且波长越长, 降低越多。

金属含量和波谱变化的结果表明, o-phen 主要是螯合蛋白中 P-cluster 的 Fe 原子, 使 MoFe(C) 的 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 随蛋白的 Fe 原子减少而成比例降低^[11], 但与 Mo 含量变化无关; 而这种蛋白的活性只随 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 的降低而降低, 但与 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 的变化无明显关系, 从而使 $\Delta\epsilon_{660nm}/\Delta\epsilon_{450nm}$ 比值增大(>1.0)(图 3 和表 1)。这又表明, 只在 450nm 附近的 $\Delta\epsilon$ 才与 P-cluster 的含量有关。

还原而又不含 DT 的 MoFe 蛋白曝氧失去 25% 左右的活性时, 在 400—800nm

的 CD 谱都发生明显的改变^[6,12]; 被 DT 和 MV 还原后, 蛋白的 CD 谱除在 660nm 区域与活性一样不能恢复外, 在其余区域都得到完全恢复。随着曝氧加剧, $\Delta\epsilon_{450nm}$ 与 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 一样, 再也不能被恢复, 并随活性的降低而降低(图 2)。由于在 660nm 的 CD 信号较小, 易引起测定误差, 才使其与活性的相关性不像 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 成一直线, 而略有散射, 但总趋势仍可看出。与 MoFe(C) 相

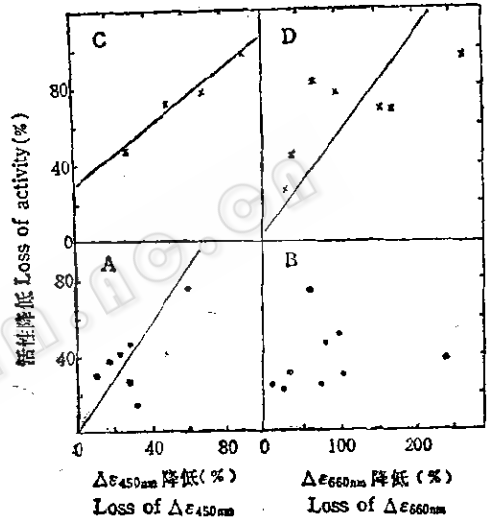


图 2 MoFe(O) 和 MoFe(C) 的活性与在 450nm 和 660nm 的 CD 谱的关系
Fig. 2 The relationship between the activity and CD spectra at 450nm and 660nm of MoFe (O) (x) and MoFe(C) (·)

比, MoFe(O) 的 CD 谱还有如下差异:
(1) $\Delta\epsilon_{450nm}$ 在蛋白失去 25% 活性后才开

表 1 氧对 o-phen 处理 MoFe 蛋白的影响
Table 1 The effect of O₂ on the treatment of MoFe protein with o-phen

| 样 品 Sample | 比 活 Specific activity (SA) | Mo/mol | Fe/mol | $\Delta\epsilon$ (%) | | $\Delta\epsilon_{660nm}/\Delta\epsilon_{450nm}$ (%) |
|--------------------------|----------------------------------|--------|--------|----------------------|-------|--|
| | | | | 450nm | 660nm | |
| MoFe(R) | 2250 | 2.00 | 33.54 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| MoFe(C) | 1566 | 2.00 | 28.87 | 85.9 | 100.0 | 116.4 |
| MoFe(C) + O ₂ | 1111 | 1.10 | 25.78 | 26.2 | 17.4 | 66.4 |
| MoFe(O) | 1253 | 2.00 | 33.65 | 74.4 | 65.1 | 87.5 |
| MoFe(O)+o-phen | 1143 | 1.11 | 15.73 | 40.7 | 16.9 | 41.5 |

始降低,而 MoFe(C) 的 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 则从蛋白开始失去活性时就开始降低。这表明,前者是 P-cluster 不受损伤的可逆的氧化,而后者则是 Fe 原子被螯合引起的 P-cluster 的解体。(2) MoFe(O) 的 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 比 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 降低快,使其比值下降,而 MoFe(C) 则相反,它的 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 几乎不变,因而使 $\Delta\epsilon_{660nm}/\Delta\epsilon_{450nm}$ 比值总是上升(>1.0)。这说明,蛋白曝氧后,由 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 表示的与活性有关的部位受到的损伤比 P-cluster 来得早,而且损伤快,即对氧最敏感。而黄巨富等^[9]从 FeMoco 激活曝氧 MoFe 蛋白的研究中已证明, FeMoco 比 P-cluster 更早受到氧损伤。因此,不难看出, $\Delta\epsilon_{660nm}$ 的变化与 FeMoco 的状态和数目有关。尽

管目前还不能排除 FeMoco 以外的部位与 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 的相关性,但这一推论将为下面的结果所证明。

至今尚未测出 FeMoco 抽提物的 CD 信号,这可能是 FeMoco 脱离蛋白后结构有所变化或失去了蛋白对它的 CD 信号的原有作用所引起的。因此,不能简单否定 FeMoco 具有 CD 信号^[15]。我们观察到,过量的强氧化剂与氧一样,对还原而又不含 DT 的 MoFe(R) 在 660nm 以上区域的 CD 信号也会产生明显的影响,用还原剂还原后,即使其它波长的 CD 信号完全恢复至天然状态,在 660nm 的 CD 信号也与活性一样都比天然状态低^[8]。这也表明, $\Delta\epsilon_{660nm}$ 与活性中心的重要部位的 FeMoco 存在相关性并不是不可能的。

3. 蛋白部分与 CD 谱: CD 谱不仅对蛋白中生色团(如金属原子簇)的改变敏感,而且对其周围蛋白部分的改变比吸收光谱和磁圆二色谱都更敏感。由于在用同一比色杯测定样品的 ABS 和 CD 谱时可避免蛋白浓度和光程的误差($\Delta\epsilon/s = \frac{\Delta A}{OD}$),

因此, $AR(\Delta\epsilon/s)$ 就对蛋白部分改变更灵敏,也能更好辨明各种来源的蛋白间的差异^[15]。MoFe(C) 和 MoFe(O) 除在 450nm 和 660nm 附近的 AR 谱有差异外,在其他波长也存在差异(图 1)。尽管目前对这种变化还不能作出满意的解释,但这种变化与 MoFe(C) 遇氧易变性、氧对与金属原子簇连接部位的损伤^[8]以及 MoFe(O) 重组后活性不能完全恢复^[12]的结果一样,都可说明这些处理蛋白的结构已发生了不同的变化。

(二) 氧对 o-phen 整合作用的影响

先在厌氧(90 分钟)、后在有氧条件下(15 分钟)用 o-phen 处理还原的 MoFe 蛋白和用 o-phen 厌氧处理(90 分钟)已经曝

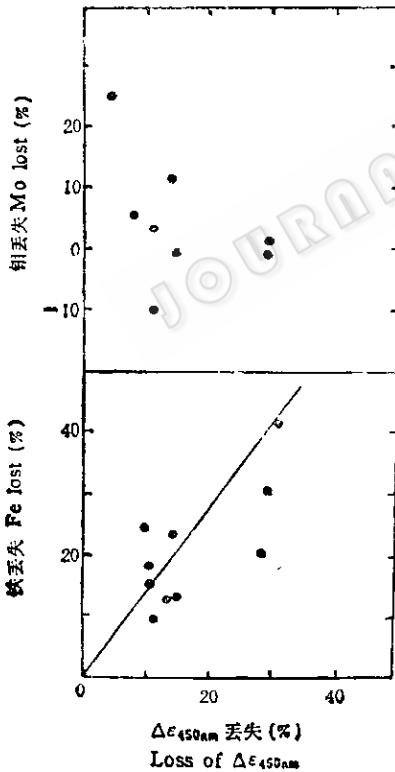


图 3 o-phen 处理的 MoFe 蛋白的 Mo 和 Fe 含量丢失与 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 降低的关系

Fig. 3 The relationship between Mo, Fe content and $\Delta\epsilon_{450nm}$ of MoFe protein treated with o-phen

氧(15分钟)的 MoFe 蛋白分别得到蛋白 MoFe(C, O) 和 MoFe(O, C), 这两种蛋白的活性、Mo 和 Fe 含量、 $\Delta\epsilon_{660\text{nm}}$ 和 $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ 及其比值均以几乎相同比例迅速降低(表 1 和图 4、图 5)。这表明, 还原的或曝氧 MoFe 蛋白中的 P-cluster 都能被 o-phen 螯合解体, 但对蛋白中的 FeMoco 就像从蛋白中抽提的 FeMoco 一样^[46], 只有在蛋白曝氧后才能被 o-phen 螯合解体。因此, 在有氧条件下用 o-phen 处理, 便可得到同时缺失这两种主要原子簇的 MoFe 蛋白。

至此, 对与 o-phen 厌氧保温的 MoFe(R) 蛋白丢失少量 Mo 原子^[12]的原因就不难解释了。在 MoFe 蛋白制备或随后与 o-phen 保温过程中很难完全排除微量氧的存在, 这就使蛋白的 FeMoco 受损伤。而损伤失活的 FeMoco, 又仍结合在蛋白上^[9, 12], 因而在与 o-phen 保温后蛋白的活性和 CD 谱也就不因其螯合解体而降低, 也就使反映 FeMoco 数量的 $\Delta\epsilon_{660\text{nm}}$ 与蛋白活性、Mo 含量无关。

(三) P-cluster 和 FeMoco 的组装

P-cluster 和 FeMoco 损伤或解体的

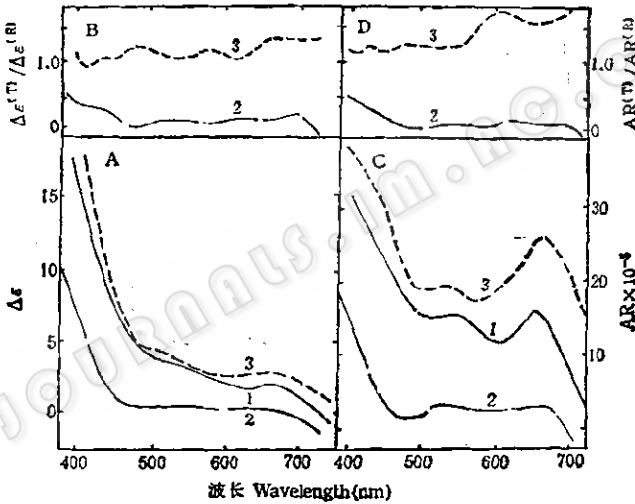


图 4 重组溶液对 o-phen 和 O₂ 处理的 MoFe 蛋白 CD 和 AR 谱的影响
Fig. 4 The effect of the reconstituting solution on CD and AR spectra of MoFe protein treated with o-phen and O₂

1. MoFe(R); 2. MoFe(C, O); 3. Re-MoFe(C, O)
A. $\Delta\epsilon$; B. $\Delta\epsilon^{(T)}/\Delta\epsilon^{(R)}$; C. AR; D. $AR^{(T)}/AR^{(R)}$
(R): MoFe(R) (T): MoFe(C, O), Re-MoFe(C, O)

蛋白分别与重组溶液保温所得蛋白 [Re-MoFe(O), Re-MoFe(O, C) 和 Re-MoFe(C, O)] 的活性和 CD、AR 谱都随其金属组成的恢复而得到不同程度的恢复(图 4—6、表 2)。

活性恢复最多(94.9%)的 Re-MoFe(C, O) 在 400—750nm 区域的 $\Delta\epsilon$ 和 AR

也都得到完全恢复, 甚至在 400—550nm 区域比天然状态还略高一些, 在 660nm 以上增加更明显, 分别使 $\Delta\epsilon_{660\text{nm}}$ 、 $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ 及其比值增加 30%、10% 和 20%。这说明新组装的 P-cluster 和 FeMoco 除用于代替氧和 o-phen 处理而缺失的两种金属原子簇外, 还使在菌体合成和随后蛋白提纯

表 2 重组溶液对 O₂ 和 o-phen 处理的 MoFe 蛋白活性、金属含量和 CD 谱的影响
 Table 2 The effect of the reconstituting solution on the activity, metals content and CD spectra of MoFe protein treated by O₂ and o-phen

| 样 品 Sample | 重 组 前 Before reconstitution (%) | | | | | 重 组 后 After reconstitution (%) | | | | |
|---------------|------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------|------------------|-------|-------|-------|
| | 比活 SA | $\Delta\epsilon$ | | Mo | Fe | 比活 SA | $\Delta\epsilon$ | | Mo | Fe |
| | | 450nm | 660nm | | | | 450nm | 660nm | | |
| MoFe(R) | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | — | — | — | — | — |
| MoFe(O) | 55.7 | 74.4 | 65.1 | 100.0 | 100.0 | 81.1 | 132.9 | 69.7 | 141.5 | 100.4 |
| MoFe(O, C) | 50.8 | 40.7 | 16.9 | 55.5 | 46.9 | 83.8 | 94.9 | 62.6 | 155.5 | 114.3 |
| MoFe(C, O) | 49.4 | 26.2 | 17.4 | 55.0 | 76.9 | 94.9 | 109.3 | 132.3 | 275.5 | 110.4 |

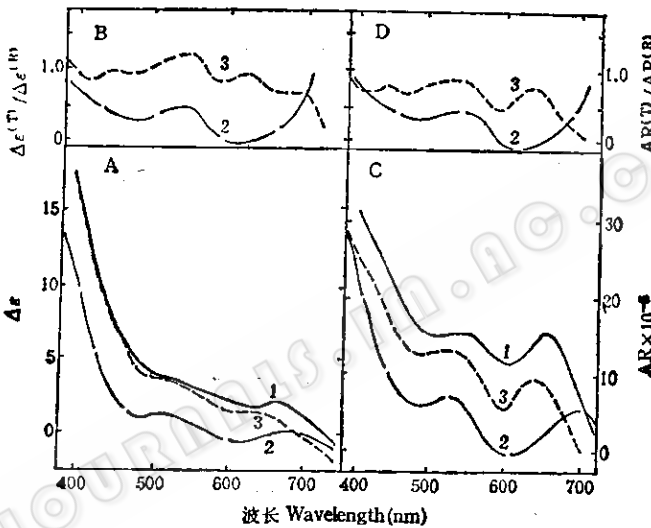


图 5 重组溶液对 o-phen 处理曝氧 MoFe 蛋白 CD 和 AR 谱的影响
 Fig. 5 The effect of the reconstituting solution on CD and AR spectra of O₂-damaged MoFe protein treated with o-phen
 1. MoFe(R) 2. MoFe(O,C) 3. Re-MoFe(O,C)
 A. $\Delta\epsilon$; B. $\Delta\epsilon^{(T)}/\Delta\epsilon^{(R)}$; C. AR; D. $AR^{(T)}/AR^{(R)}$
 (R):MoFe(R); (T):MoFe(O,C), Re-MoFe(O,C)

过程中产生的而金属含量不全的污染蛋白得到组装,从而使重组蛋白的金属含量和 CD 谱都超过天然蛋白^[12]。

活性恢复至 83.8% 的 Re-MoFe(O, C) 在波长低于 550nm 的 CD 谱的形状与天然蛋白相似,但 AR 值总比天然状态低 20—30%; 大于 550nm 的区域却与 Re-MoFe(O) 的谱形相似,在 620nm 附近显出 MoFe(O) 和 MoFe(O, C) 那种“凹”形。

Re-MoFe(O) 的 $\Delta\epsilon$ 和 AR 谱,在 400—550nm 区域比天然状态高,而在大于 550nm 则开始降低。这表明,曝氧蛋白的 P-cluster 比 FeMoco 更易得到重新组装或修复^[12],或损伤后仍结合在蛋白上的 Fe-Moco 阻碍新 FeMoco 的组装和置换。因而使其活性只恢复至 80% 左右^[12]。

从 $\Delta\epsilon$ 和 AR 与活性、金属含量恢复关系不难看出,只有 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 和 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 及其比值都得到恢复,重组蛋白的活性才能

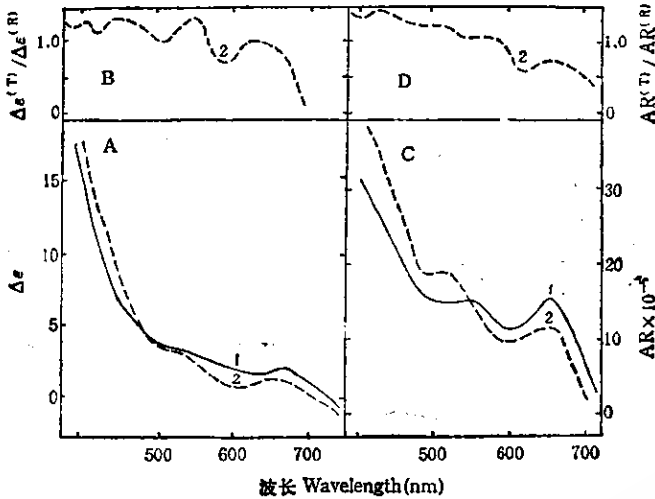


图 6 重组溶液对曝氧 MoFe 蛋白 CD 和 AR 谱的影响
Fig. 6 The effect of the reconstituting solution on CD and AR spectra of O_2 -damaged MoFe protein

1. MoFe(R); 2. Re-MoFe(O)
A. $\Delta\epsilon$; B. $\Delta\epsilon^{(T)}/\Delta\epsilon^{(R)}$; C. ΔAR ; D. $AR^{(T)}/AR^{(R)}$
(R): MoFe(R); (T): Re-MoFe(O)

得到完全恢复。要使蛋白活性恢复，组成活性中心的重要部位 FeMoco 和 P-cluster 显然先要得到重组。因此，在有还原剂的条件下，MoFe 蛋白的 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 和 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 分别反映它们数目的推论，又从这结果中再次得以证明。

然而，即使反映金属原子簇数目的 $\Delta\epsilon_{660nm}$ 和 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 都完全恢复并比天然状态高出 10—30%，蛋白活性也只能恢复至天然状态^[2]，而不相应增加 10—30%；它们的 CD 和 AR 谱也不与天然状态完全相同。这表明 MoFe 蛋白活性不仅取决于这两种原子簇的状态和数目，而且还与蛋白部分等部位的状态有关。因此，继续研究构成 MoFe 蛋白各部分的特性，必将有助于阐明固氮机理。

参 考 文 献

- [1] 黄巨富：植物学通报，5: 135—139, 1988。
[2] Eady, R. R.: Nitrogen Fixation, 4: 1—49,

(Broughton, W. J. et al.), Clarendon press, Oxford, 1986.

- [3] Hawker, T. R. et al.: *Biochem. J.* 217: 317—321, 1984.
[4] Levchenko, L. A. et al.: *Dokl. Akad. Nauk, SSSR*, 277: 1003—1004, 1984.
[5] Robinson, A. E. et al.: *Biochem. J.*, 219: 495—503, 1984.
[6] Stephens, P. J.: *The Metal Ion in Biology*, 7: 117—159, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, (ed. Spiro, T. G.), 1985.
[7] Watt, G. D. et al.: *Biochem.*, 20: 7272—7277, 1981.
[8] 黄巨富：植物学报，28: 276—285, 1986。
[9] 黄巨富等：植物学报，24: 341—346, 1982。
[10] 骆爱玲等：微生物学报，27: 134—141, 1987。
[11] 黄巨富等：微生物学报，29: 51—57, 1989。
[12] 黄巨富等：植物学报，31: 785—791, 1989。
[13] 黄巨富等：植物学报，32: 112—118, 1990。
[14] Stephens, P. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 2585—2589, 1979.
[15] Stephens, P. J. et al.: *Biochem.*, 20: 2857—2864, 1981.
[16] Stiefel, E. I. et al.: *The Metal Ions in Biology*, 7: 89—116, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, (ed. Spiro, T. G.), 1985.

STUDIES ON THE CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY OF THE DISASSEMBLY AND ASSEMBLY OF METAL CLUSTERS IN MOLYBDENUM-IRON PROTEIN

Huang Jufu Luo Ailing Xie Xuemei

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

Wang Aojin

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

After the treatment of nitrogenase MoFe protein from *Azotobacter vinelandii* respectively or simultaneously with o-phenanthroline (o-phen) and O_2 , the treated proteins resulted in the changes in activity, CD spectra and metals content. The activity of O_2 -exposed protein was decreased with the decrease in its $\Delta\epsilon$ (molecular circular dichroic extinction coefficient) at both 660 and 450nm, and the activity of the protein treated with o-phen was decreased only with the decrease in its $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ and Fe content, but the decrease in the activity of MoFe protein treated with o-phen under the presence of O_2 was relative to the decrease not only in its $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ and Fe content, but also in its $\Delta\epsilon_{660\text{nm}}$ and Mo content. However, when the treated proteins were incubated with the reconstituting solution which consisted of Na_2MoO_4 , Na_2S , ferric citrate and DTT, their activity were significantly restored with a significant restoration

of their CD spectra and metals content. The results showed that: (1) not only $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ is able to reflect the state and content of P-cluster in MoFe protein but $\Delta\epsilon_{660\text{nm}}$ might also reflect the state and content of FeMoco in the protein; (2) o-phen is able to chelate Fe not only from P-cluster in the reduced MoFe protein, but also from FeMoco and P-cluster in the O_2 -exposed MoFe protein; (3) both P-cluster and FeMoco of the MoFe protein can be assembled by the incubation of clusters-deficient MoFe protein with the reconstituting solution; (4) these clusters of MoFe protein are the necessary and important fractions for the protein to reduce substrates.

Key words

Azotobacter vinelandii; CD spectra; Disassembly and assembly; Metal clusters; MoFe protein