

仪器与装置

固氮酶金属簇纯化及分析装置的研制*

黄河清

(厦门大学生物系, 厦门, 361005)

摘要 介绍了一台用普通分光光度计(配有自制的简易流动式比色池)、样品收集器、双笔记录仪、恒流泵、液相色谱柱及厌氧箱等装配成的厌氧型制备液相色谱装置,主要用于棕色固氮菌固氮酶金属簇的分离纯化及定性定量分析。实验结果证明,该装置具有简单、快速、准确的特点。这台装置也可在常压下对各种蛋白质、糖类及核酸等生物大分子进行分离纯化和定性定量分析。对与该装置配套使用的自制碱性 NMF 蒸馏装置和 MC 金属簇高效浓缩装置也作了说明。

关键词 制备型液相色谱装置 固氮酶 金属簇 定性分析 定量分析

1 引言

随着生物化学及分子生物学的迅速发展,对各种蛋白质、糖类、核酸等生物大分子的分析与纯化,已成为目前生命科学研究中的重要内容。在现有的分离技术中,液相色谱法尤其高效液相色谱(HPLC)或高效蛋白质纯化系统,已被生物工作者普遍认为是当前分离分析生化样品最有效的技术手段^[1,2]。HPLC 与其它常规分离技术相比较,在分离、纯化及定性定量分析蛋白质、核酸及复合金属簇等方面具有分离效果好、选择性好、快速准确等优点。但是,由于目前 HPLC 售价较高,而使用频率在一些单位并不太高,所以在普通生化分析室,例如医院生化分析室及生物制品工厂的检验科,尚难以普及和推广使用。然而,这些单位有时也需要使用 HPLC 分离及分析特殊混合物,尤其是短肽药物或生物大分子。因此,利用实验室现有的普通生化分析仪器,自己组装常压或低压液相色谱装置,以满足实验需要,仍不失为一种可供选择的方法

固氮微生物能利用机体内的固氮酶进行生物固氮。固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白(iron protein)组成。钼铁蛋白金属簇可分为含钼的铁硫

簇(活性中心, M Center, MC)及非含钼的铁硫簇。1977年, Shah^[3]首次成功地从钼铁蛋白中提取出含钼的铁硫簇。随后,国内外一些固氮研究组也报道了有关含钼铁硫簇的提取工作。但这些报道中,含钼铁硫簇中的元素比、活性及分子结构等理化参数有明显差异^[4-5]。例如单钼铁硫簇(铁钼辅基, FeMo cofactor, FeMoco)^[3]或双钼铁硫簇(MC)^[2]。出现这种现象很可能与提取、分离及定量分析过程中所使用的方法及设备有关^[6-7]。

针对上述问题,我们组装了一台厌氧型常压制备液相色谱装置,并与自制的 NMF 蒸馏装置和 MC 金属簇高效浓缩装置配套使用,用于固氮酶 MC $[\text{Mo}_2 \text{Fe}_4^{2+} \text{Fe}_8^{3+} \text{S}_{12}]^{4-}$ 金属簇的分离纯化及定性定量分析。这套装置也可用于其他蛋白质、多元组分有机化合物和复合多金属簇的分离纯化及定量分析,具有分离效果好、选择性好、快速准确等优点,因此是一种适合在常规生化分析室使用的分析装置。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

常压制备液相色谱装置(自己组装)。

* 国家教育部留学回国人员基金及福建省自然科学基金资助项目(No. 99006)。

色谱柱, 耐压 202.65 ~ 304kPa。

厌氧箱;

小型电动离心机等。

N-甲基甲酰胺 (NMF), 联二亚硫酸钠, 无水氧化钡等 (均购自 Sigma 公司)。

2.2 碱性 NMF 的制备

棕色固氮菌 (*azotobacter vinelandii*) 固氮酶 MC 金属簇提取能否成功的关键是制备具有还原性的碱性 (pH 13.0) NMF。制备过程为: 常温下, 在重蒸后的新鲜 NMF (pH 7.25) 溶剂中加入过量的无水 BaO, 搅拌 24h。随后, 在减压蒸馏装置中慢速蒸馏还原型碱式 NMF。NMF 是一种低沸点、易燃的有机溶剂, 因此在蒸馏时不允许用电炉直接加热。此外, 在蒸馏过程中, 蒸馏容器需要处于高真空状态。根据这些特殊要求, 我们自制了一套 NMF 蒸馏系统, 见图 1。

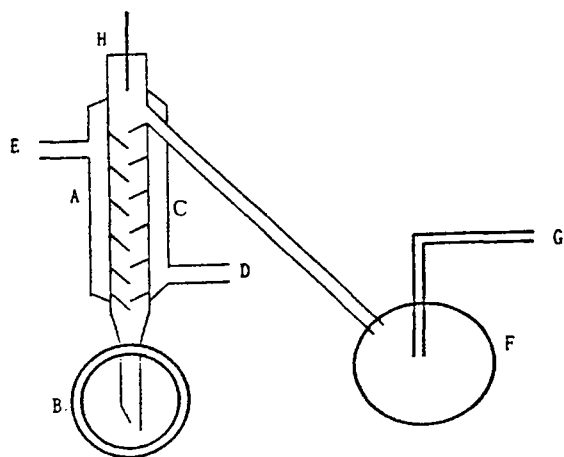


图1 碱性 NMF 减压蒸馏装置

A. 减压蒸馏装置 B. 恒温加热包 C. 冷却装置 D. 进水管
E. 出水口 F. 样品收集容器 G. 真空泵 H. 温度计

它与常规有机蒸馏系统的不同之处在于: (1) 由恒温加热控制包自动控制低温加热 NMF, 这样既安全, 又能控制 NMF 的蒸馏速度; (2) 采用直接减压蒸馏, 避免了过长的真空管道 (降低了真空度), 提高了蒸馏效率。通过多次实验, 证明该蒸馏装置用于蒸馏 NMF, 比常规减压蒸馏装置效率高, 速度快。

2.3 固氮酶 MC 金属簇的提取

棕色固氮菌-OP 菌株引自美国威斯康新大学细菌系。菌体发酵采用改良的 Burk 无氮培养基培养, 按对数生长期或根据实验所需的时间收集菌体。固氮酶的分离及纯化参考了文献^[8]。固氮酶 MC 金属簇的提取参考文献^[3,5-7]。

2.4 MC 金属簇元素分析及光谱测定

MC 金属簇中钼铁硫元素含量均用电感耦合等离子发射光谱仪 (ICP) 或质子激发 X 射线光谱仪 (PIXE) 测定^[2]。样品的光谱测定使用美国 HP 快速扫描分光光度计, 全波长扫描时间均在 0.5s 内。

2.5 MC 金属簇的分子结构

标准金属簇 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SEt})_9]^{3-}$ 和 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{3-}$ 由美国 Exxon 研究工程集团提供; $[(\text{C}_p\text{Mo}-\mu\text{-S})_2\text{S}_2\text{CH}_2]$ 和 $[(\text{C}_p\text{Mo})_2(\text{S}_2\text{CH}_2)(\text{SCH}_3)_2]^+$ 金属簇由美国科罗拉多大学化学系提供; $[\text{FeMo}_6\text{S}_6(\text{CO})_{16}]^{2-}$ 金属簇由美国维吉利亚大学化学系提供。这些金属簇的主要作用是在测定固氮酶 MC 金属簇分子量与结构过程中作为标准参比物。

3 结果与讨论

3.1 MC 金属簇的高效浓缩装置

早期的研究表明, 按 Shah^[3] 方法从固氮酶或钼铁蛋白中直接提取 FeMoco 或 MC 金属簇^[5] 并不难, 但要想浓缩 MC 金属簇并得到晶体, 却不是一件容易的事。为此, 我们自制了能高效快速浓缩 MC 金属簇的装置, 见图 2。

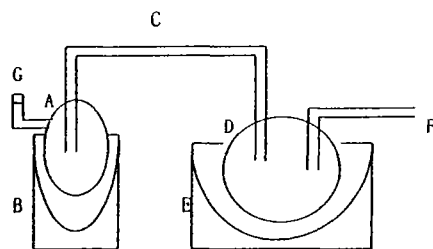


图2 固氮酶 M 中心样品浓缩装置

A. 容器 (装有稀 MC 样品) B. 保温瓶 (装有冰块及冰水)
C. 连接管 D. 容器 + NMF E. 保温瓶 (装有液氮)
F. 高效真空泵 G. 样品注入口

该装置具体操作步骤和各部件功能如下：
 (1)把溶于 NMF 的稀 MC 金属簇通过进样口 G 直接厌氧注入容器 A。因为 MC 金属簇对温度及氧气较敏感，常常因室温过高而分解，所以用装有冰及冰水的容器 B 进行冷却，避免在浓缩过程中分解。
 (2)容器 D 配有高效真空系统，使整个浓缩装置处于真空状态，并对容器 A 中的低沸点 NMF 进行减压蒸馏，从而达到浓缩 MC 金属簇的效果。
 (3)容器 E 装有液氮，用于把所蒸馏的 NMF 快速冷冻在容器 D 中，目的是对昂贵的 NMF 进行强制性回收，避免 NMF 散发在空气中造成环境污染。因为 NMF 对人体神经系统有强烈的毒害作用，所以绝不允许在浓缩过程中通过真空泵散发到实验室。

实验结果证明，该装置不仅能高效地对固氮酶 MC 金属簇进行浓缩，甚至能使其成为干粉，而且能百分之百地回收 NMF。用其它有机溶剂浓缩器或旋转薄膜浓缩仪，均无法对 MC 金属簇进行高效快速浓缩及回收 NMF 溶剂，而且因浓缩时间过长，温度过高会加速 MC 金属簇的分解。该浓缩装置不仅适于对 MC 金属簇进行快速浓缩，而且还可以对溶于有毒溶剂的其它生物大分子进行浓缩，并对其溶剂进行强制性回收。

3.2 厌氧型制备液相色谱装置

MC 金属簇是固氮酶钼铁蛋白催化活性中心，用 NMF 提取时常混有其它金属簇，因而要对 MC 金属簇进行厌氧纯化。此外，由于 MC 金属簇对氧极为敏感，遇氧易分解，因此分离纯化过程需要在严格的厌氧环境中进行。针对这些问题，我们把普通分光光度计、样品收集器、恒流泵及液相色谱柱等组装成了一台简易制备型液相色谱分析装置，并把它放入厌氧箱中，成为厌氧型常压液相色谱分析装置（见图 3）。使用这套装置的目的是分离纯化 MC 金属簇及定性定量分析其理化参数。图中，恒流器用于把 NMF 容器中的 NMF 以恒流方式输送至色谱柱。色谱柱用来分离及纯化 MC 金属簇。如 MC 金属簇中混有与 MC 样品相似的组分时，可同时使用双色谱柱分离，以提高分辨率。分光

光度计用于检测 MC 金属簇并把电信号输送给记录仪。样品收集器按设定好的程序定时或定量收集样品，并把使用过的收集管数目以电信号的形式输送给记录仪。根据双笔记录仪记录的数据，就可以计算出样品所需洗脱液的体积，并用于分析 MC 金属簇的理化参数。

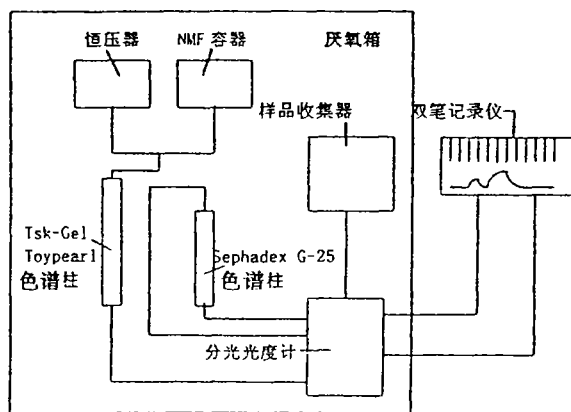


图3 MC金属簇分离纯化装置结构图

3.3 简易流动比色池

图4是自制的简易流动比色池。把该池置于分光光度计的比色盒中，用于检测经色谱柱分离和纯化的 MC 金属簇。流动管用石英管制成，宽度为 1cm。通过比较可知，用该流动比色池检测 MC 样品，灵敏度与商品 HPLC 检测结果很相似。此外，如果厌氧箱体积小，无法放入分光光度计，也可用密封性良好的管道把 MC 金属簇样品引出厌氧箱外进行测定。此时，MC 金属簇纯化、检测及收集过程仍处于管道厌氧环境中，MC 金属簇样品仍保持厌氧状态，不易被氧化。

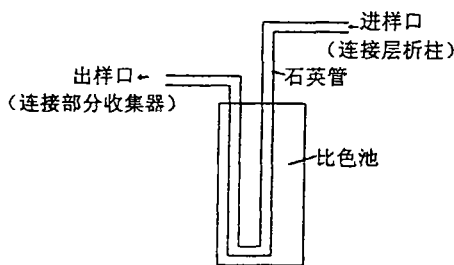


图4 流动石英比色池

3.4 单、双钼铁硫簇的分离纯化及结构分析

按文献^[3,5-7]方法,分别从固氮酶钼铁蛋白中提取 FeMoco 和 MC 金属簇并均匀混合。混合后的样品加入图 3 所示样品纯化系统中进行慢速(洗脱液流速为 0.6mL/min)纯化并收集,所获结果如图 5 所示。

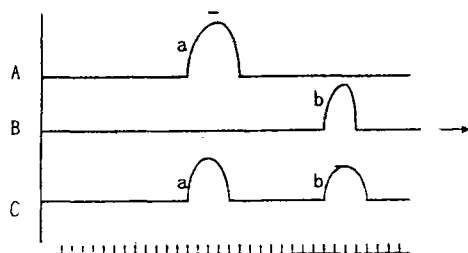


图 5 MC 金属簇纯化的色谱记录示意图

A. FeMoco 样品 B. MC 金属簇样品 C. FeMoco + MC
a. MC 金属簇 b. FeMoco

从图 5C 可看出,有两个样品吸收峰, a 和 b。如进一步与图 5A 与图 5B 比较,可知图 5C 中 a 峰与 b 峰分别为 MC 金属簇和 FeMoco, 两者的分子量明显不同。根据标准含钼金属簇的分子量及待分析样品的洗脱体积计算可知, MC 金属簇的分子量为 1390 ± 60 。经元素分析可知, MC 金属簇是含双钼的铁硫簇, 其分子结构式为 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_4^{2+}\text{Fe}_8^{3+}\text{S}_{12}]^{4-}$ 。这一结果与 Shah 所提出单钼结构明显不同。此外, 从图

5C 可看出, 自己组装的液相色谱装置能有效地分离纯化混合的复合金属簇, 并能对其理化参数进行定性定量分析。该装置也可用于铁蛋白 (ferritin) 或其它蛋白质的分离纯化及定量分析, 所获得的结果与用商品 HPLC 分析所获的结果相似^[9,10]。

参考文献

- 1 刘国诠. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 1993
- 2 Huang Heqing et al. Journal of Inorganic Biochemistry, 1993, 52: 59-65
- 3 Shah V K, Brill W J. Proc Natl Acad Sci, 1977, 79: 7056-7060
- 4 Watt G D, Huang Heqing. Molybdenum Enzymes, Cofactors and Model Systems. In: Stiffler E I et al eds. ACS Symposium, Series 535: 243-256
- 5 黄河清等. 生物化学杂志, 1995, 11: 465-469
- 6 黄河清等. 生物化学杂志, 1996, 12: 459-463
- 7 黄河清等. 福建分析测试, 1996, 4: 747-751
- 8 Burgess B K et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1980, 614: 196-209
- 9 Huang Heqing et al. Biochemistry, 1993, 32: 1681-1687
- 10 Huang Heqing et al. Journal of Protein Chemistry, 1988, 17: 45-51

收稿日期: 1999-01-15

黄河清, 男, 副教授, 主要从事生物电分析及蛋白质结构分析的研究工作。

Design of an apparatus for purifying and analyzing metal clusters of nitrogenase. Huang Heqing (Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

An anaerobic preparative liquid chromatographic apparatus has been assembled for separating and purifying metal clusters of nitrogenase active center and analyzing their physical and chemical parameters qualitatively and quantitatively. The apparatus consists of a chromatographic column, a flow pump, a conventional spectrophotometer (equipped with a home-made colorimetric flowing cell), a double-pen recorder, a sample collector and an anaerobic cabinet. It can be used for separating, purifying and analyzing other large biological molecules, such as proteins, carbohydrates and nuclear acids also. In addition, a device for recovering poisonous n-methylformamide during the preparative process is described.