

铁-硫蛋白共振拉曼光谱研究进展

晏孝皋

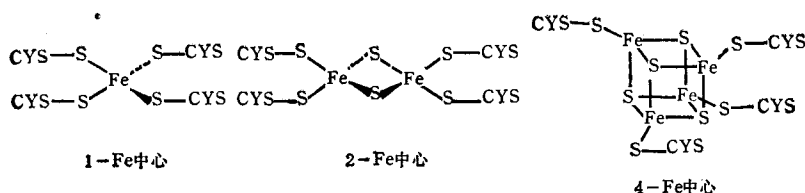
(天津师范大学化学系)

提 要

本文概述了近几年铁-硫蛋白共振拉曼光谱研究的一些进展。先简介铁-硫蛋白中 Fe-S 中心的代表性结构,铁-硫蛋白共振拉曼增强的原理,以及铁-硫蛋白共振拉曼光谱研究的发展历史。后重点对 1-Fe、2-Fe、4-Fe 和 3-Fe 蛋白的代表性测定结果进行描述和分析,并从中得出主要的结论。

拉曼光谱正日益广泛地应用到生物化学研究中^[1]。本文概述铁-硫蛋白 RR (共振拉曼) 光谱研究进展,以供读者参考。

铁-硫蛋白在自然界分布十分广泛,它们在各种生物体系中起电子载体的作用。铁-硫蛋白中 Fe-S 中心的一些代表性结构如下^[2]:



铁-硫蛋白的可见和 UV (紫外) 吸收带是由 S→Fe 荷移 (Charge-transfer) 跃迁引起的,可以预料它们将提供 Fe-S 伸缩模的 RR 增强,这些伸缩模的频率可用做判断构象的变化^[3]。1970—1977 年有人报道过 1-Fe 蛋白、[2Fe-2S] 蛋白和 [4Fe-4S] 分子的 RR 光谱^[4-9]。但因铁-硫蛋白特别是它们的模拟物在激光照射下容易分解,它们的 RR 增强比许多别的发色团(如血红素或多烯类)低得多,加上铁-硫蛋白样品常常表现过高的荧光本底等困难,所以其 RR 光谱研究的进展十分缓慢。近几年 Spiro, T. G. 等采用改进的实验技术,已获得足够质量的 RR 光谱,可以用其表征各种 Fe-S 类的振动模^[10-15]。

1-Fe 分子: 最早文献^[4,9]报道的 Rd (红素氧还蛋白)的 RR 光谱,可解释为是由一个四

面体的 FeS_4 络合物产生的。它包含一个强偏振带 (314cm^{-1} , $A_1\text{FeS}_4$ 呼吸模),一个较弱的去偏振带 (368cm^{-1} , $T_2\text{Fe-S}$ 伸缩模),和两个低频带 (150 和 126cm^{-1} , T_2 和 E 弯曲模)。最近 Spiro, T. G. 等得到了出人意外的结果(图 1),Rd 模拟物 $\text{Fe}(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^-$ 的 RR 光谱在 Fe-S 伸缩区显示四个带: 两个强带 (321 和 297cm^{-1}) 和两个弱带 (374 和 350cm^{-1})。Rd 的 RR 光谱在这个区也有四个带。原来被指定为 T_2 伸缩模的 368cm^{-1} 带实际上是两个带 (371 和 359cm^{-1})。另外,强的 312cm^{-1} 带宽而且不对称,显然在高频一边有另一组分。这个组分可借助偏振光谱被分辨出,其位置在 $\sim 325\text{cm}^{-1}$ 。由此可见, Rd 的 RR 光谱在 Fe-S 伸缩区相似于 $\text{Fe}(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^-$ 。他们还作了简正模计算,结果表明, Rd 及其模拟物 $\text{Fe}(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^-$ 的 RR

光谱之间的 A_1FeS_4 呼吸模的频率差 ($15cm^{-1}$), 可以根据 Fe-S 伸缩和 S—C—C 弯曲之间的耦合来解释; T_2 Fe-S 伸缩模很宽地分裂成三个组分, 可以根据它们与附近配位体模的耦合加以说明。

2-Fe 分子: Spiro, T. G. 等报道了最新结果: 菠菜铁氧还蛋白 (Sp. Fd) 和皮质铁氧还蛋白 (Ad) 的详细 RR 光谱。用 $^{34}S_{br}$ (br 代表桥式) 取代、模拟络合物的 IR 和 RR 光谱, 并作简正模计算, 指定了 2Fe-2S 蛋白的全部 Fe-S 模 (见表 1 和图 2)。

$Fe_2S_2Cl_4^{2-}$ 的结构非常接近具有理想 D_{2h} 对称性。由于螯合配位体而使 $Fe_2S_2(S_2-O-xyl)_2^{2-}$ 的结构仅有 C_2 对称性。但 $Fe_2S_2S_4$ 部分几乎与 $Fe_2S_2Cl_4^{2-}$ 同结构。因此, 在 $Fe_2S_2Cl_4^{2-}$ 的拉曼光谱中看不到 IR 活性模。但是, IR 模微弱地出现在 $Fe_2S_2(S_2-O-xyl)_2^{2-}$ 的 RR 光谱中, 这是由于螯合的邻-苯二甲基环使对称性降低; 且

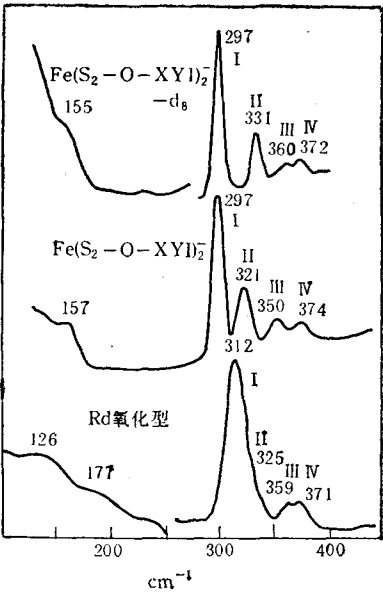


图 1 Rd 及其模拟物的 RR 光谱
 $S_2-O-xyl$ 代表邻-苯二甲基- α, α' -二硫醇基, d_8 表示 $S_2-O-xyl$ 中的亚甲基氢全为氘所取代。

表 1 Fe_2S_2 蛋白及其模拟物的基频 Fe-S (和 Fe-Cl) 伸缩模 (cm^{-1})

指 定 ^a	$Fe_2S_2Cl_4^{2-}$		$Fe_2S_2(S_2-O-xyl)_2^{2-}$		Sp.Fd氧化型RR	Ad氧化型RR	计算值 ^b
	RR	IR	RR	IR			
B_{3u}^{br}		415	417	413	424(5) ^c	419(9) ^c	411(7) ^c
A_{1g}^{br}	401		392		393(6)	391(8)	398(6)
B_{2g}^{br}			347 ^d		369(8)	372(7)	345(5)
B_{1u}^{br}		345		338	336(2)	346(3)	360(3)
B_{2u}^{br}		334		326			338(0)
B_{3g}^{br}	331		324		326(0)	312(1)	338(0)
A_{1g}^{br}	318		~310		~310	326(3)	310(3)
B_{1u}^{br}		287	279	275	284(5)	289(5)	286(3)

a. 在理想 D_{2h} 点群中的模对称性: 上标 br = Fe— S_{br} 伸缩, br = 桥式; 上标 t = Fe—St (或 Fe—Cl) 伸缩, t = 端式。
 b. 用 $Fe_2S_2(SCH_2CH_3)_4$ 作模型。
 c. 括号内数字为 $^{34}S_{br}$ 同位素取代后的频率移动。
 d. 指定不肯定。

IR 模强烈地出现在蛋白质 RR 光谱中, 特别是 B_{1u} 模更是如此, 这表明蛋白质引起的 Fe_2S_2 络合物两端不均等, 很可能是因氢键对配位于 Fe 原子之一的半胱氨酸 S 原子的不对称配置所致。

桥式模可借助它们在蛋白质 RR 光谱中大的 $^{34}S_{br}$ 同位素移动加以识别。Sp. Fd 和 Ad 在 420、390、370 和 285 cm^{-1} 附近都显示带, 这

些带在 $^{34}S_{br}$ 取代后移动 5—9 cm^{-1} , 因此被指定为桥式模, 它们的频率和同位素移动适与计算值一致。 $Fe_2S_2Cl_4^{2-}$ 和 $Fe_2S_2(S_2-O-xyl)_2^{2-}$ 在 415 和 280 cm^{-1} 附近有 IR 带, 证实了最高和最低频率桥式模的 B_{3u} 和 B_{1u} 指定。所有 [2Fe-2S] 类在 395 cm^{-1} 附近都显示强 RR 带, 这个带在 Sp. Fd 和 Ad 中 $^{34}S_{br}$ 取代后分别移动 6 和 8 cm^{-1} , 因此容易指定为 A_{1g}^{br} (原子簇呼吸模)。剩下的

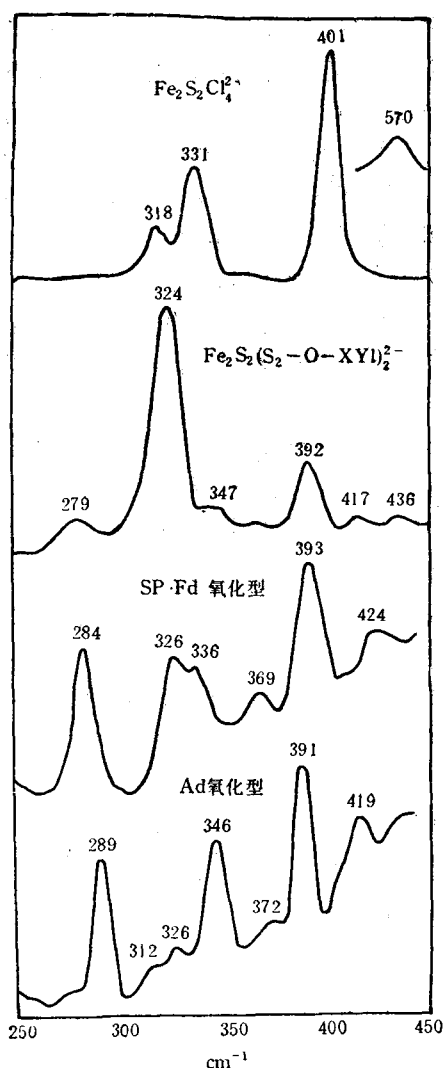


图2 Fe_2S_2 蛋白及其模拟物的RR光谱

$\sim 370\text{cm}^{-1}$ 桥式模具有 B_{2g} 对称性。有趣的是，在 $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4^{2-}$ 的RR光谱中观察到 570cm^{-1} 带，被指定为 287cm^{-1} IR 带的泛音，它是拉曼活性

的 ($2 \times B_{1u} = A_{1g}$)。

$\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4^{2-}$ 和 $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^{2-}$ 分别在 334 、 345 和 326 、 338cm^{-1} 显示一对强IR带，它们对应于两个预期的端式 B_{1u}^i 、 B_{1u}^o 模。相应的 B_{1g}^i 、 A_{1g}^i 模被认为是 $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4^{2-}$ 的 331 、 318cm^{-1} 对RR带； $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^{2-}$ 有 324cm^{-1} 宽带，且在低频一边有不对称性，这表明在 $\sim 310\text{cm}^{-1}$ 有另一带。因为 B_{1u}^o 和 B_{1g}^i 模仅在桥两边的 Fe-S_t (或 Fe-Cl) 伸缩的相位上有差别，且两个模都不与任何别的模相互作用，所以它们出现在基本上相同的频率处。因此，将 $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4^{2-}$ 在 334 和 331cm^{-1} ，以及 $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{S}_2\text{-O-xyl})_2^{2-}$ 在 326 和 324cm^{-1} 的几乎一致的IR和RR带，分别被指定为 B_{1u}^o 和 B_{1g}^i 。剩下的IR (345 和 338cm^{-1}) 和RR (318 和 $\sim 310\text{cm}^{-1}$) 带，分别被指定为 B_{1u}^i 和 A_{1g}^o 。

蛋白质RR光谱在端式模区显著不同。Ad显示 346cm^{-1} 强带， 326 和 312cm^{-1} 弱带；而Sp-Fd则显示 336 和 326cm^{-1} 强带， 326cm^{-1} 带在低频一边有不对称性，这表明在 $\sim 310\text{cm}^{-1}$ 有另一带。对于Ad， $^{34}\text{S}_{br}$ 敏感的 326 和 346cm^{-1} 带分别被指定为 A_{1g}^i 和 B_{1u}^o ，它们都与相应对称性的桥式模相互作用； 312cm^{-1} 带基本上没有同位素移动，因此可指定为 B_{1g}^o 。对于Sp-Fd， 336cm^{-1} 带显示 2cm^{-1} 的 $^{34}\text{S}_{br}$ 同位素移动而被指定为 B_{1u}^i 模，这个移动是由于与 B_{1u}^o 模的相互作用引起的；但是 326cm^{-1} 带不表现 $^{34}\text{S}_{br}$ 同位素移动，这和所预料的关于 B_{1g}^i 模不与任何别的模相互作用一致。

另外，Spiro, T. G. 等发现，Ad的还原

表2 对 $[\text{Fe}_4\text{S}_4\text{S}(\text{SB}_2)_4]^{2-}$ 类的振动指定

指定 (T_d)	$[\text{Fe}_4\text{S}_4\text{S}(\text{SB}_2)_4]^{2-}$		频率 (cm^{-1})			
	RR	IR	ox. Cl. Past. Fd RR	red. Cl. Past. Fd RR	HIPIP _{red} RR	HIPIP _{ox} RR
$\text{Fe-S}_{br}(T_2)$	386	382(7) ^a	394(6) ^a	395		
$\text{Fe-S}_t(A_1, T_2)$	358	356(3) ^b	356	356	362	370
$\text{Fe-S}_{br}(A_1)$	335(9) ^a		335(5) ^a	334	339	338
$\text{Fe-S}_{br}(E)$	272		271(5) ^a			
$\text{Fe-S}_{br}(T_2)$	244(5) ^a	247(6) ^a	247(4) ^a	248	247	

a. $^{34}\text{S}_{br}$ 取代时的下移。 b. $^{34}\text{S}_t$ 取代时的下移。

使桥式模频率下移 16—24 cm^{-1} ，这与预期的桥式键被削弱是一致的。他们还仔细地查找了文献^[8,9]中早已报道过的 770、1080、1475、1930 cm^{-1} Sp. Fd RR 带和 995 cm^{-1} Ad RR 带，但未找到，因此认为这些带可能是自所在实验条件下，由激光诱致蛋白质破坏所造成的人工产物。

4-Fe 分子：尽管 [4Fe-4S] 是已知 Fe-S 中心中最复杂的，但目前对 [4Fe-4S] 分子的指定是最可靠的。Spiro, T. G. 等发表了 [4Fe-4S] 蛋白及其模拟物的改进 RR 光谱，其质量比他们过去报道的^[7]好得多，因此新的指定取代了旧的尝试性指定。代表性的结果总结在表 2 和图 3 中。这里，所用缩略语有：Bz，苯甲基；ox，氧化型；red，还原型；Cl. Past. Fd，巴斯德氏梭菌属铁氧还蛋白；HIPIP，高电势铁蛋白。

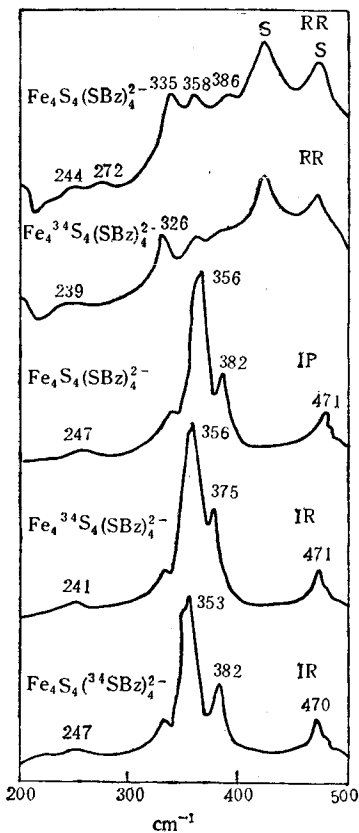


图 3 $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SBz})_4^{2-}$ 及其 ^{34}S 取代物的 RR 和 IR 光谱。溶剂带标有“S”

在 ox, Cl, Past. Fd 的 RR 光谱中，有四个带显示 $^{34}\text{S}_{\text{br}}$ 同位素下移：247(—4)、271(—5)、335(—5) 和 394(—6) cm^{-1} 。它们可归属于理想 Td 对称性中四个预期的 Fe-S_{br} 伸缩模： A_1 、E 和 $2T_2$ (它们都是拉曼活性的)。在模拟物 $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SBz})_4^{2-}$ 的 RR 和 IR 光谱中，358 cm^{-1} RR 带和 356 cm^{-1} IR 带在 $^{34}\text{S}_{\text{t}}$ 取代后下移，因此可归属于 Fe-S_t 伸缩模。在 Td 对称性中，应该有两个 Fe-S_t 模： A_1 (拉曼活性的) 和 T_2 (拉曼和 IR 活性的)，但因端键不与共有原子相连，所以它们可能是重合的。382 和 247 cm^{-1} IR 带在 $^{34}\text{S}_{\text{br}}$ 取代后下移，且有 386 和 244 cm^{-1} RR 对应物，因此它们是 $T_2\text{Fe-S}_{\text{br}}$ 模。 $^{34}\text{S}_{\text{br}}$ 敏感的 335 cm^{-1} 强 RR 带显然是 $A_1\text{Fe-S}_{\text{br}}$ 模。分别在 ox. Cl. Past. Fd 和 $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SBz})_4^{2-}$ 中的 271 和 272 cm^{-1} RR 带被指定为 EFe-S_{br} 模。

ox. Cl. Past. Fd 被还原出人意外地对 RR 光谱没有影响。着色菌属 HIPIP_{red} 的 RR 光谱显示两个主要带 362 cm^{-1} (A_1 , $T_2\text{Fe-S}_{\text{t}}$ 模) 和 339 cm^{-1} ($A_1\text{Fe-S}_{\text{br}}$ 模)，以及中等强度的 247 cm^{-1}

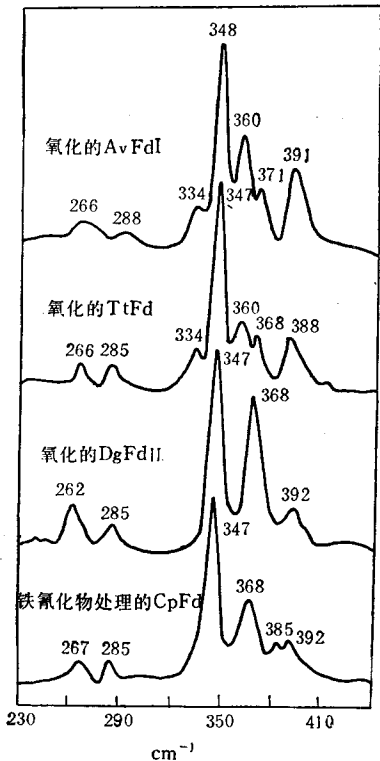


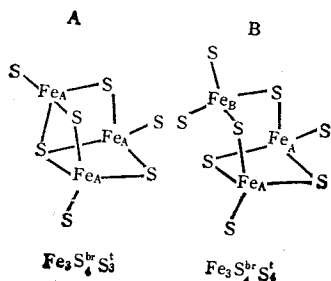
图 4 AvFdI、TtFd 和 DgFdII (都是游离的) 以及铁氧化物处理的 CpFd 的低温 RR 光谱

($T_2\text{Fe}-S_{br}$ 模)带。HIPIP_{red} 的氧化使 $\text{Fe}-S_t$ 模增加 8cm^{-1} , 暗示 $\text{Fe}-S_t$ 键被加强。

3-Fe 蛋白: 含有 1-Fe、2-Fe 和 4-Fe 中心的铁-硫蛋白已经被确认和研究了多年,但只是新近才发现 3-Fe 中心,它们已引起人们广泛的兴趣和争论。现已表明,许多蛋白如 AvFdl、TtFd、DgFdII、铁氰化物处理的 CpFd 和鸟头酸酶等都含有 3-Fe 中心。

根据 Spiro, T. G. 等所报道的最近结果(图 4),在 DgFdII 和铁氰化物处理的 CpFd 中的 3-Fe 中心,有一个特征的易与 1-Fe、2-Fe 和 4-Fe 中心相区别的 RR 光谱。因为 DgFdII 只含有 3-Fe 原子簇,所以它代表了首次发表的这个新颖 Fe-S 中心的 RR 光谱。另外发现, DgFdII 被还原引起 RR 光谱的显著变化,这与 $[4\text{Fe}-4S]$ 原子簇情况下所见到的微小氧化还原效应形成对比。

四种蛋白的 RR 光谱之间有显著的相似性,它们都有 347cm^{-1} 最突出的带,且有 ~ 266 、 ~ 285 、 ~ 370 和 $\sim 390\text{cm}^{-1}$ 较弱的带。在 AvFdl 和 TtFd 的 RR 光谱中的 334cm^{-1} 带,是属于这两种蛋白同时含有的 4-Fe 原子簇的。用铁氰化物处理的 CpFd 中在 $^{34}S_{br}$ 取代后使 267 、 285 和 347cm^{-1} 带产生重大下移 ($4-7\text{cm}^{-1}$),这些带可归属于桥式 Fe-S 模。但是 347cm^{-1} 以上的三个带都不移动,因此可指定为端式 Fe-S 模。 347cm^{-1} 强偏振带被识别为全对称原子簇模。他们进一步作了简正模计算,确认观察到的光谱与用 X-射线晶体结构分析得出的,几乎呈平面的 $[3\text{Fe}-3S]$ 环状结构不一致;而与由 $[4\text{Fe}-4S]$ 立方烷结构衍生而来的,带有三个或四个端式配位体的 $[3\text{Fe}-4S]$ 结构相一致:



因此,含有 3-Fe 中心的蛋白都包含一个共同的 $[3\text{Fe}-4S]$ 结构。进而假设, $[3\text{Fe}-3S]$ 结构可能由 $[3\text{Fe}-4S]$ 结构通过化学方法除去一个桥式 S 原子而产生。

综上所述,对于含有桥式 S 原子的那些分子,如同从可见区多半是桥式 $S \rightarrow \text{Fe}$ 荷移跃迁占优势那样, RR 光谱是受全对称桥式模支配的。这些桥式 A_1 模被发现在原子簇类型所特征的频率处: $[2\text{Fe}-2S]$ 为 $\sim 392\text{cm}^{-1}$, $[3\text{Fe}-3S]$ 为 $\sim 347\text{cm}^{-1}$, $[4\text{Fe}-4S]$ 为 $\sim 335\text{cm}^{-1}$ 。除在考察过的 $[2\text{Fe}-2S]$ 蛋白中 $\sim 285\text{cm}^{-1} B_{1u}$ 模外,通常都以低得多的强度观察到其它非全对称桥式模。就 $[3\text{Fe}-3S]$ 和 $[4\text{Fe}-4S]$ 原子簇而言,非全对称模都是简并的,它们的分裂可能为构象变化提供指示,但是尚未观察到过大的这类分裂。

端式 Fe-SR 模频率在 $[4\text{Fe}-4S]$ 类中位于 360cm^{-1} 附近,在 $[3\text{Fe}-3S]$ 类中位于 370cm^{-1} 附近,它们都有中等程度增强。对于 $[2\text{Fe}-2S]$ 类,在 320cm^{-1} 附近发现一对端式 Fe-SR 带,它们有变化不定的相对强度。

在 $\text{Fe}(\text{SR})_2$ RR 光谱中的 Fe-SR 伸缩模,必须被考虑与硫醇基配位体模强烈耦合,它们对绕 S—C 键的取向是敏感的。虽然这种耦合使分析复杂化,但是有可能证实 Fe-SR 模频率在检测蛋白质构象差别上是有用的。已经表明, RR 光谱学能够清楚地区分 $[3\text{Fe}-3S]$ 和 $[4\text{Fe}-4S]$ 中心。

参 考 文 献

- [1] 晏孝皋:“生物拉曼”的现状与前景,第三届全国光散射学术会议,武汉,1985。
- [2] Jolly, W. L.: *Modern Inorganic Chemistry*, McGraw-Hill Book company, New York, 517, 1984.
- [3] Spiro, T. G.: *Iron-sulfur Proteins*, Wiley-Interscience, New York, 409, 1982.
- [4] Long, T. V. and Loehr, T. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6384, 1970.
- [5] Long, T. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 1809, 1971.
- [6] Tang, S.-P. W. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 869, 1973.
- [7] Tang, S.-P. W. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

(下转第 39 页)

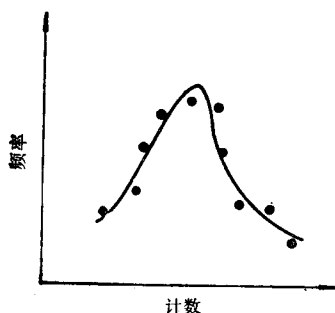


图6 系统稳定性分析

明除光子统计涨落引起的噪声外,还存在另外不可忽视的噪声源,系统应该重新调整。

四、应用前景和发展趋势

光子计数法特别适合于微弱信号的检测以及要求较高时间分辨本领的场合。它已深入到分子生物学,高分辨率光谱学,非线性光学,表面物理,化学,天文等学科中。

荧光衰减测量用于研究激发态及它们与环境的相互作用,从而给出分子内部和分子之间的能量交换过程,用于研究激发态络合物的形成,分子系统内和原子相互作用中无辐射过程,可以提供光化学反应中的基本数据,如量子产额,淬灭因子等。

光子计数法可以用于研究光生物学中的能量转换和原初过程,研究生物大分子如酶、多

肽和核酸的构象和动力学。通过测量卵磷脂中1-6二苯基各向异性的荧光发射,可以研究胆固醇在分子动力学方面的作用^[2]。

随着激发光源及PMT时间特性的改善,PS级脉冲技术和高速数字集成电路的发展,使光子计数技术达到PS区域,这使得研究紫膜蛋白质发色团的PS动力学成为可能^[3]。

在免疫分析中,采用镧系螯合物作为荧光标记物,用时间分辨光子计数法测其慢衰减荧光,其灵敏度超过已被广泛应用、灵敏度居各微量分析之首的放射免疫方法,并可避免放射性引起的各种麻烦^[4]。光子计数法将使免疫医学跨入超微量分析的新阶段。

光子计数技术本身还在不断发展,它在物理学,化学,尤其在生物学和医学领域将得到越来越广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Imhof, R. E. et al.: *Reports on progress in physics*, vol. 40(1), 9, 1977.
- [2] Suguru, Kawato, et al.: *Biochemistry*, vol. 17(23), 5026, 1978.
- [3] Alfand, R. R. et al.: *Biophysical Journal*, vol. 16(5), 541, 1976.
- [4] Erkki, Soini, et al.: *Clinical chemistry*, vol. 29(1), 65, 1983.

[本文于1986年10月6日收到]

(上接第35页)

- mun., 62, 1, 1975.
- [8] Adar, F. et al.: *FEBS LETT.*, 84, 214, 1977.
- [9] Blum, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 650, 1977.
- [10] Johnson, M. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 9806, 1981.
- [11] Johnson, M. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 2447, 1982.
- [12] Yachandra, V. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105,

6455, 1983.

- [13] Yachandra, V. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6462, 1983.
- [14] Czernuszewicz, R. S. and Johnson, M. K.: *Applied Spectroscopy*, 37, 297, 1983.
- [15] Johnson, M. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6671, 1983.

[本文于1986年9月16日收到]