

## 固氮螺菌 (*Azospirillum. brasilense* Yu-62) 中 固氮酶活性的氮关闭现象\*

李久蒂 李永兴 王继文

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

**摘 要** 固氮螺菌 (*A. brasilense*) Yu-62 在以谷氨酸为氮源好气液体培养条件下, 氮离子使固氮酶迅速失活, Western blotting 实验证明这种失活的分子基础是固氮酶铁蛋白一亚基被修饰。测定加  $\text{NH}_4^+$  后细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 和 glutamine 的含量。 $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine 比值在加  $\text{NH}_4^+$  后瞬间下降然后上升, 而细胞内 ATP/ADP 的比值没有明显变化。谷氨酸合成酶的抑制剂 azaserine 使固氮酶失活。Western blotting 实验表明这种失活的分子基础也是固氮酶铁蛋白一亚基被修饰。测定加 azaserine 后细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 及 glutamine 比值的变化以及外源  $\alpha$ -ketoglutarate 及 glutamine 对细胞固氮活性的影响, 表明细胞内一些小分子化合物的变化可能是作用于固氮酶活性氮关闭的重要因素。

**关键词** 巴西固氮螺菌,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine 固氮酶活性

生物固氮受固氮酶复合物的催化, 固氮酶合成在 *nif* 基因转录水平上受结合态氮、氧和温度的控制<sup>[1]</sup>。在深红螺细菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中还存在一固氮酶活性的翻译后调节机制, 结合态氮、光、暗等因素皆迅速和可逆地使固氮酶失活, 这种调节机制是与固氮酶铁蛋白第 100 位精氨酸残基被 ADP-ribo 可逆共价修饰与去修饰有关<sup>[2]</sup>。催化这一修饰去修饰的酶系统称 dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DRAT) 及 dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (DRAG), DRAT 催化固氮酶铁蛋白的修饰, 而 DRAG 催化固氮酶铁蛋白去修饰<sup>[3]</sup>, 这两个酶在固氮酶调节系统中的作用已被体内和体外的实验所证实<sup>[4]</sup>。固氮螺菌 *Azospirillum* spp. 是除光合细菌以外被证实存在固氮酶共价修饰机制的固氮生物<sup>[5,6]</sup>。在固氮螺菌中,  $\text{NH}_4^+$  及厌氧条件都迅速可逆地使固氮酶失活。对引起固氮酶可逆失活过程细胞内小分子效应剂的研究表明, glutamine 库是固氮酶活性  $\text{NH}_4^+$  关闭过程的效应剂, 而 ATP/ADP 比值的变化是固氮酶活性厌氧关闭过程的重要信号分子<sup>[7,9,10]</sup>。本文用从河北地区玉米根际分离得到的巴西固氮螺菌 (*A. brasilense* Yu-62) 为材料进一步研究了固氮螺菌固氮酶活性氮关闭过程中细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine 比值的变化及 ATP/ADP 比值的变化。提出  $\alpha$ -ketoglutarate 和 glutamine 比值的变化是固氮酶活性氮关闭过程的重要效应剂。

### 1 材料和方法

\* 本文为 '863' 项目。

本文于 1993 年 1 月 12 日收到。1994 年 6 月 8 日定稿。

## 1.1 菌种

固氮螺菌 (*A. brasilense* Yu-62) 由北京农业大学提供。

## 1.2 培养基

采用乳酸钠-谷氨酸钠液体培养基<sup>[8]</sup>。

## 1.3 培养条件

容量为 250ml 三角瓶含 60ml 液体培养基, 于 32℃, 100r/min 培养 24 小时。

## 1.4 整体菌固氮活性分析

取菌液 5ml 在 25ml 容量的小三角瓶内加反耳塞, 加 0.5ml  $C_2H_2$  振荡培养, 间隔一定时间取样, 用气相色谱测乙烯形成。

## 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫转渍

电泳样品采用快速取样法<sup>[10]</sup>, 免疫转渍 Western blotting 见文献<sup>[11]</sup>。用抗 *A. vinelandii* 固氮酶铁蛋白抗血清为第一抗体。电泳胶扫描图显示免疫转渍结果。

## 1.6 萤光素-萤光素酶法测定细胞内 ATP 及 ADP 含量

参照文献<sup>[9]</sup>所叙方法测定。

## 1.7 细胞内 $\alpha$ -ketoglutarate 及 glutamine 含量测定<sup>[10]</sup>

10ml 菌液用玻璃纤维滤纸 whatman GF/C 迅速过滤, 滤纸立即投入 5ml 磷酸缓冲液在 100℃ 水浴提取 10 分钟, 离心, 上清液用氨基酸分析仪定量分析, 用电泳纯  $\alpha$ -ketoglutarate 及 glutamine 为标样。在取样的同时测固氮酶活性。

# 2 结果和讨论

## 2.1 $NH_4^+$ 对 *A. brasilense* Yu-62 中固氮酶活性的关闭

在谷氨酸为氮源液体培养基中好气生长 24 小时菌液中加  $NH_4^+$  (最终浓度 2mmol/L)。固氮酶活性迅速被抑制。Western blotting 实验结果表明, 加  $NH_4^+$  使固氮酶铁蛋白亚单位大部分被共价修饰, 导致固氮酶失活 (图 1)。

## 2.2 固氮酶活性、 $NH_4^+$ 关闭过程细胞内 ATP/ADP 比值的变化

从生长 24 小时的菌液中取样, 测固氮酶活性, 并同时取样测细胞内 ATP 与 ADP 含量。加  $NH_4^+$  (2mmol/L) 后 15 分钟取样做同样测定。结果表明在固氮酶活性被  $NH_4^+$  关闭前后细胞内 ATP 与 ADP 的比值分别为 0.34 及 0.36, 比值没有明显变化。

## 2.3 $NH_4^+$ 对细胞中 $\alpha$ -ketoglutarate 和 glutamine 含量的影响

从生长 24 小时的菌液中取样测固氮酶活性及  $\alpha$ -ketoglutarate 与 glutamine 含量, 加  $NH_4^+$  后间隔时间再取样做同样测定。结果表明, 加  $NH_4^+$  后固氮酶活性迅速被抑制, 细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 含量随时间延长而略有上升。而 glutamine 含量在瞬间迅速增加, 然后下降。 $\alpha$ -ketoglutarate 与 glutamine 的比值 0 时为 0.32, 2 分钟时为 0.15, 5 分钟时为 0.34, 10 分钟时为 0.36, 20 分钟时增至 0.43。 $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine 比值在加  $NH_4^+$  后瞬间下降然后逐步上升, 反映了细胞内小分子物质的一种状态。

## 2.4 Glutamine 和 $\alpha$ -ketoglutarate 对固氮酶活性的影响

在乳酸钠-谷氨酸液体培养基 (谷氨酸的浓度为 5mmol/L) 培养的菌体, 当加 glutamine 时 (终浓度达 1mmol/L) 对固氮酶活性没有明显抑制效应, 但加 glutamine

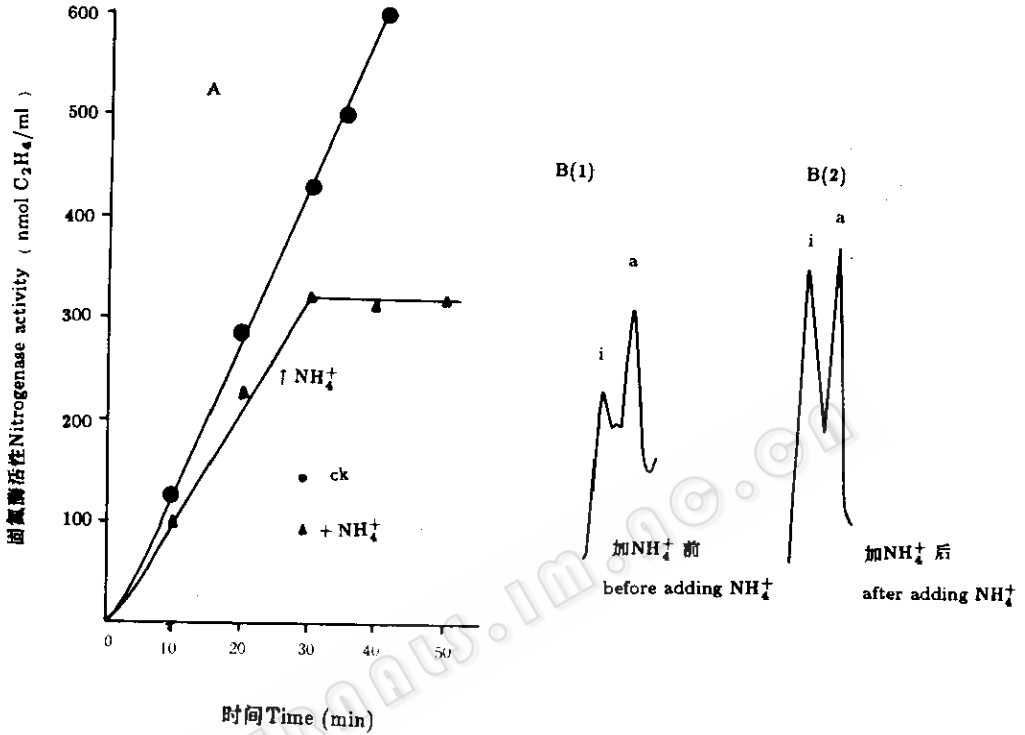


图1  $\text{NH}_4^+$  对 *A. brasilense* Yu-62 固氮酶活性的关闭

A. 整体细胞固氮酶活性;

B. 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的细胞粗提物免疫转染图的扫描图.

(1) 加  $\text{NH}_4^+$  前;

(2) 加  $\text{NH}_4^+$  (2mmol/L) 后 15 分钟.

a 峰表示未被修饰的铁蛋白亚单位;

i 峰表示被修饰的铁蛋白亚单位.

Fig. 1  $\text{NH}_4^+$  switch-off of nitrogenase activity in *A. brasilense* Yu-62

A. nitrogenase activity of the whole cells (arrow shows the time adding  $\text{NH}_4^+$ )

B. Scanning figure of immunoblots of crude extracts separated by SDS-PAGE

(1) crude extracts of cells before adding  $\text{NH}_4^+$ .

(2) crude extracts of cells after adding  $\text{NH}_4^+$  for 15min.

a: peak shows a Fe protein subunit unmodified;

i: peak shows a Fe protein subunit modified using antiserum against Fe protein of nitrogenase in *A. vinelandii* as the first antibody.

(终浓度达 1mmol/L) 和  $\alpha$ -ketoglutarate (终浓度达 0.5mmol/L) 确有较明显的抑制效应 (图 2)。从体外加入 glutamine 和  $\alpha$ -ketoglutarate 可能改变了体内二种物质的比值从而启动了固氮酶的修饰系统使固氮酶失活。

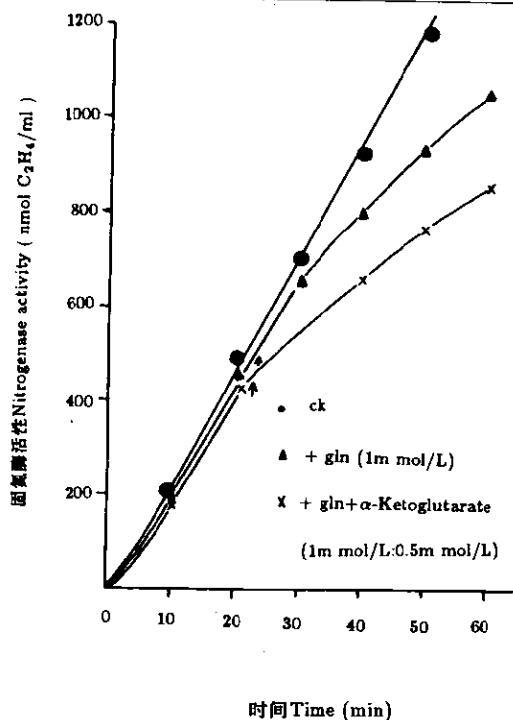


图2 Glutamine 与  $\alpha$ -ketoglutarate 对固氮酶活性的影响

Fig. 2 Effect of glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate on nitrogenase activity in whole cells  
箭头表示加 glutamine 和  $\alpha$ -ketoglutarate 的时间  
Arrow shows the time adding glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate.

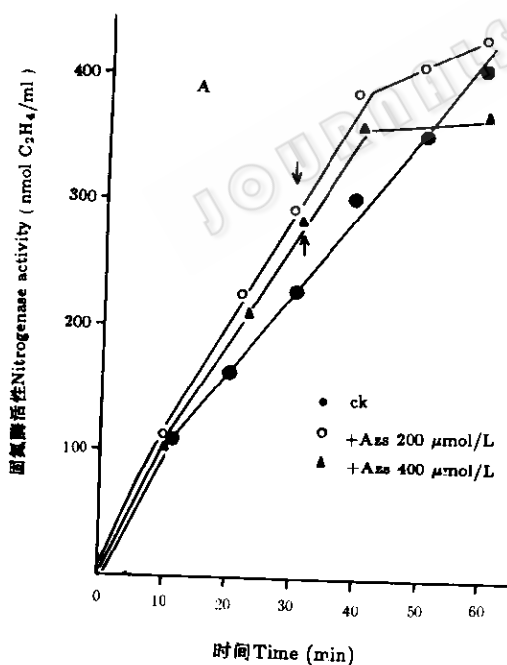
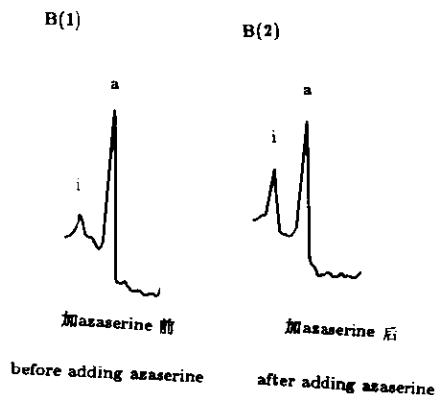


图3 Azaserine 对 *A. brasilense* Yu-62 固氮酶活性的关闭

Fig. 3 Effect of azaserine on nitrogenase activity

A. Nitrogenase activity of whole cells (arrow shows the time adding azaserine); B. Scanning figure of immunoblots of crude extract separated by SDS-PAGE. a peak shows a Fe protein subunit unmodified using antiserum against Fe protein of nitrogenase of *A. vinelandii* as the first antibody; i peak shows a Fe protein subunit modified.



## 2.5 谷氨酸合成酶抑制剂 azaserine 对固氮酶活性的影响

取 24 小时生长的菌液加 azaserine (最终浓度  $200\mu\text{mol/L}$ ), 固氮酶活性被迅速抑制, 但与  $\text{NH}_4^+$  的抑制作用相比有一个延后期。Western blotting 实验表明, 加 azaserine 后 20 分钟时固氮酶铁蛋白位置出现迁移率较慢的 i 峰, 表明固氮酶铁蛋白一亚基被修饰而使固氮酶失活。测定细胞内 glutamine 和  $\alpha$ -ketoglutarate 含量的变化表明加 azaserine 后细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 与 glutamine 的比值 0 时为 0.18, 5 分钟时为 0.296, 10 分钟时为 0.57, 20 分钟时为 0.50。比值随时间延长而上升, azaserine 产生的效应与  $\text{NH}_4^+$  相似 (图 3)。

上述实验结果表明,  $\text{NH}_4^+$  使固氮酶活性关闭是一复杂的生理过程,  $\text{Fu}^{[7]}$  和  $\text{Li}^{[10]}$  的结果指出, 在 *A. brasilense* 和 *R. rubrum* 的固氮酶活性的  $\text{NH}_4^+$  关闭过程中, 细胞内 glutamine 的变化是一重要效应剂, 我们的结果进一步表明除了 glutamine 外可能还有其他小分子物质在起作用,  $\alpha$ -ketoglutarate 就是重要的组分之一。不论通过什么途径加  $\text{NH}_4^+$ 、加 azaserine 或加 glutamine 和  $\alpha$ -ketoglutarate, 只要改变了细胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 和 glutamine 比值就可能启动固氮酶的修饰系统 (DRAT/DRAG), 使固氮酶铁蛋白被修饰, 从而导致固氮酶失活。这些小分子物质是如何起作用的还有待进一步深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Gussin G N. *Ann Rev Genet*, 1986, **20**: 576—591.
- [2] Rope M R, Murrell S A, Ludden P W. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3173—3177.
- [3] Saari L L, Rope M R, Murrell S A *et al.* *J Biol Chem*, 1986, **261**: 4973—4977.
- [4] Lowery R G, Saari L L, Ludden P W. *J Bact*, 1986, **166**: 513—518.
- [5] Hartmann A, Burris R. *J Bact*, 1987, **169**: 944—948.
- [6] Hartmann A, Fu H, Burris R. *J Bact*, 1986, **165**: 864—870.
- [7] Fu Haian, Lowery R G, Fitzmaurice W P *et al.* *J Bact*, 1989, **171**: 4679—4685.
- [8] 王继文, 李永兴, 李久蒂, 等. *微生物学报*, 1991, **31** (5): 351—356.
- [9] 李久蒂, 李永兴, 王继文, 等. *植物学报*, 1992, **34** (4): 245—250.
- [10] Li Jiudi, Hu Chang zheng, Yoch D C. *J Bact*, 1987, **169**: 231—237.
- [11] 李永兴, 胡长征, 王继文, 等. *生物化学与生物物理进展*, 1991, **18**: 242—243.

# $\text{NH}_4^+$ SWITCH-OFF OF NITROGENASE ACTIVITY IN *AZOSPIRILLUM. BRASILENSE* Yu-62

Li Jiudi Li Yongxing Wang Jiwen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

**Abstract**  $\text{NH}_4^+$  switch-off of nitrogenase activity in *A. brasilense* Yu-62 cultured aerobically in liquid medium with glutamate as N source was described. Western blotting experiment demonstrated that the molecular basis of inactivation of nitrogenase

was the modification of the Fe protein subunit.  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamine contents in cells were measured. after adding  $\text{NH}_4^+$ ,  $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine ratio reduced immediately then rised, but the ratio of ATP/ADP was no change. Azaserine (a inhibitor of GOGAT) inactivated nitrogenase activity rapidly, western blotting experiment demonstrated that the molecular basis of inactivation of nitrogenase was also the modification of the Fe protein subunit. To analyse the effects of azaserine on  $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine ratio and the effects of  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamine on the activity of nitrogenase in whole cells showed that the change of some small molecular in cells could be important factors in regulating  $\text{NH}_4^+$  switch-off of nitrogenase activity.

**Key words** *Azospirillum brasilense*,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine, Nitrogenase activity