

## 在棕色固氮菌中诱导的硝酸还原酶和固氮酶相互关系的初步研究

钟泽璞 李久蒂 王继文 图 亚

(中国科学院植物研究所, 北京)

0.1 M  $\text{NaNO}_3$  可使棕色固氮菌诱导出硝酸还原酶, 其粗提物的比活性为 21.9  $\text{NO}_3^-$  毫微克分子/分钟·毫克蛋白。在诱导硝酸还原酶过程中, 诱导的粗提物中固氮酶活性比未诱导的下降更迅速。实验结果表明这是由于在诱导过程中固氮酶铁蛋白失活, 而与钼铁蛋白无关。

应用相同的方法对缺乏  $\text{Fe} \cdot \text{Mo}$  辅因子的棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$  进行诱导, 结果出现硝酸还原酶活性, 证明硝酸还原酶和固氮酶钼铁蛋白不共享相同的含钼亚基。

近年来, 许多工作者研究了硝酸还原酶和固氮酶钼铁蛋白的结构, 指出两种蛋白可能含有共同的钼辅助因子或共享相同的含钼亚基<sup>[1-4]</sup>。Hotchkiss<sup>[5]</sup> 亦认为苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 的固氮酶和硝酸还原酶有共基因的可能。但 Pienkos 等人<sup>[6]</sup> 认为硝酸还原酶钼活性中心和固氮酶钼活性中心是不相同的。对这个问题我们进行了研究。在我们的实验中发现, 在棕色固氮菌中硝酸还原酶的诱导不影响固氮酶的钼铁蛋白活性, 而影响固氮酶的铁蛋白活性; 进一步用硝酸盐诱导缺乏  $\text{Fe} \cdot \text{Mo}$  辅因子的棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$ , 出现硝酸还原酶。本文还讨论了固氮酶钼铁蛋白和硝酸还原酶是否共享相同的含钼亚基等问题。

### 材料和方法

#### (一) 菌种来源和培养方法

所用棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* 230) 由中国科学院东北林业土壤研究所提供, 采用 Burk's 培养基<sup>[7]</sup>, 在发酵罐内 (500—1000 升) 通气培养 14—18 小时, 再离心收获细菌。所得到的菌糊在  $-20^\circ\text{C}$  下冻存。实验前将冻菌糊加 0.025 M pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液融化, 洗涤, 然后离心

备用。

棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$ , 由威斯康辛大学微生物系提供, 采用 Burk's 限制  $\text{NH}_4^+$  培养基<sup>[7]</sup>, 在发酵罐中 (500—1000 升) 通气培养 12 小时, 待  $\text{NH}_4^+$  耗尽后, 再通气培养 3 小时, 离心收获细菌。菌糊的保存和实验前的准备工作和上述相同。

#### (二) 硝酸还原酶的诱导和活性测定

洗涤过的菌糊悬浮于含 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  的 0.025 M, pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液中, 在  $30^\circ\text{C}$  下, 静置保温 6、12 和 24 小时, 以诱导硝酸还原酶<sup>[8]</sup>。诱导后离心去掉 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  溶液, 再用两倍体积的 0.025 M, pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液洗涤菌糊。

硝酸还原酶活性测定参考 Nason 等人的方法<sup>[9]</sup>。该酶的总活性单位用毫微克分子  $\text{NO}_3^-$ /分钟·总蛋白表示, 比活性单位用毫微克分子  $\text{NO}_3^-$ /分钟·毫克蛋白表示。

#### (三) 固氮酶的分离和固氮酶的 $\text{C}_2\text{H}_2$ 还原活性的测定

参照前文<sup>[10]</sup>。将诱导过的菌糊或未诱导的菌糊悬浮于等体积 Tris-HCl 缓冲液中, 用超声波破碎, 离心后得粗提物。然后将粗提物加到用 0.1 M NaCl 溶液平衡的 DEAE-52 纤维素层析柱上, 收集流出液, 再用 0.25 M NaCl 和 0.4 M NaCl 溶液分别洗脱固氮酶组份 I (钼铁蛋白部分) 和组份

本文于 1978 年 5 月 20 日收到。

II (铁蛋白部分)。不同浓度的 NaCl 洗脱液都用 0.025 M pH7.4 Tris-HCl 缓冲液配制。所用的缓冲液都经过抽气, 充氩气饱和, 并按 0.2—0.3 毫克  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /毫升加入  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 以保证厌氧。

固氮酶活性是应用连接氢火焰检测器的 102 G 气相色谱仪测定乙炔还原量。固氮酶的总活性用毫微克分子  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原/分钟·总蛋白表示, 比活性用毫微克分子  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原/分钟·毫克蛋白表示。

#### (四) 蛋白测定

以牛血清清蛋白做标准, 用双缩脲法<sup>[11]</sup>进行测定。

## 结果和讨论

### (一) 硝酸还原酶的诱导对固氮酶活性的影响

取洗涤过的菌糊 6 份, 分别悬浮在 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  溶液中, 于 30℃ 保温 0, 0.5, 1, 3, 6 小时, 然后用超声波破碎, 随后分别测定粗提物的硝酸还原酶活性和固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性, 结果见图 1。

图 1 表明在诱导过程最初的 6 小时,  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性缓慢地下降, 硝酸还原酶活

性在诱导 3 小时后出现, 并迅速上升。随着诱导时间的增加, 粗提物内诱导的硝酸还原酶活性逐渐增加, 而固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性逐渐下降。

当诱导时间增加到 12 小时和 24 小时, 诱导粗提物的固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原比活性下降到零, 而硝酸还原酶比活性分别是 18.6 和 21.9。对照的粗提物在 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液中, 同样保温 12、24 小时, 其乙炔还原比活性分别是 7 和 1.4, 而硝酸还原酶比活性仅分别是 0.3 和 0.18。实验结果可以看出, 诱导硝酸还原酶的粗提物比未诱导的粗提物的  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原比活性更低, 硝酸还原酶的诱导导致固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性下降更迅速。

我们将诱导的粗提物和未诱导的粗提物在 DEAE 纤维素柱上进一步层析分离, 并分别测定各洗脱部分的硝酸还原酶和固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性, 结果见表 1。

从以上实验结果可以看出, 经  $\text{NaNO}_3$  诱导的粗提物和未经  $\text{NaNO}_3$  诱导的对照粗提物在 DEAE 纤维素柱上的层析行为大体上相同。诱导的 0.1 M NaCl 洗脱部分蛋白量比对照为高, 其 0.25 M NaCl 和 0.40 M NaCl 洗脱部分的蛋白量较为一致。分别测定诱导和对照粗提物各洗脱部分的硝酸还原酶活性和固氮酶组份的互补活性, 可以看出经  $\text{NO}_3^-$  诱导的 0.10 M NaCl 洗脱部分硝酸还原酶总活性为 17,600 单位, 而未经诱导的 0.10 M NaCl 洗脱部分的硝酸还原酶总活性为 164 单位, 仅是诱导处理的总活性的百分之一。其他相应洗脱部分都没有明显的硝酸还原酶活性。相反诱导的 0.25 M NaCl 洗脱部分和 0.40 M NaCl 洗脱部分的固氮酶两个组分的互补总活性为 3,140 单位, 仅是未诱导的相应洗脱部分的固氮酶组分互补活性的六分之一。

进一步研究结果见表 2。从表 2 (1)

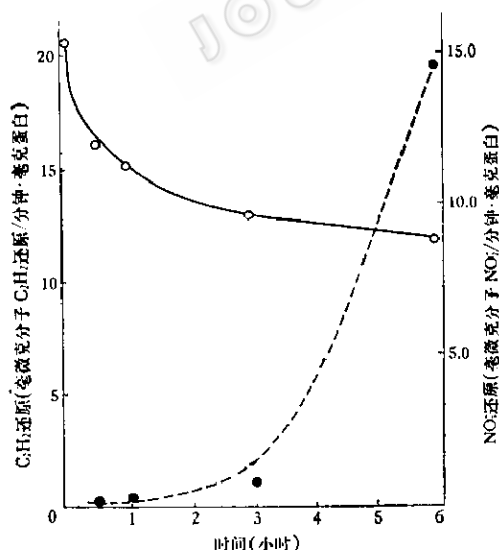


图 1 在不同诱导时间中棕色固氮菌粗提物的硝酸还原酶和固氮酶活性  
○—○ 固氮酶  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原活性  
●—● 硝酸还原酶  $\text{NO}_3^-$  还原活性

表 1 DEAE 纤维素柱层析各洗脱部分的硝酸还原酶及固氮酶  $C_2H_2$  还原活性

	柱层析各洗脱部分	总蛋白 (毫克)	回收率 (%)	MVH 硝酸还原酶活性		固氮酶 $C_2H_2$ 还原活性	
				比活性	总活性	比活性	总活性
$NO_3^-$ 诱导	0.1 M NaCl	857	58%	20.2	17,600	—	—
	0.25 M NaCl	449	30%	—	—	6*	3,140
	0.40 M NaCl	74	5%	—	—		
未诱导	0.1 M NaCl	685	44%	0.24	164	—	—
	0.25 M NaCl	485	35%	—	—	37*	19,900
	0.40 M NaCl	54	4%	—	—		

$NO_3^-$  诱导: 上柱蛋白量 1,480 毫克; 未诱导: 上柱蛋白量 1,375 毫克  
\* 固氮酶可分为两个组份, 钼铁蛋白部分 (0.25 M NaCl 洗脱部分) 和铁蛋白部分 (0.40 M NaCl 洗脱部分), 只有二个部分互补时才表现出固氮酶  $C_2H_2$  还原活性。

表 2 诱导的和未诱导的固氮酶各组分的互补活性

固氮酶组分	$C_2H_2$ 还原比活性*	固氮酶组分	$C_2H_2$ 还原比活性**
未诱导的钼铁蛋白		未诱导的铁蛋白	
(1) + 未诱导的铁蛋白	44	(5) + 未诱导的钼铁蛋白	140
(2) + 诱导的铁蛋白	5	(6) + 诱导的钼铁蛋白	160
诱导的钼铁蛋白		诱导的铁蛋白	
(3) + 未诱导的铁蛋白	54	(7) + 未诱导的钼铁蛋白	19
(4) + 诱导的铁蛋白	8	(8) + 诱导的钼铁蛋白	27

\* 固氮酶钼铁蛋白的比活性按毫微克分子  $C_2H_2$  还原/分钟·毫克钼铁蛋白计算;  
\*\* 固氮酶铁蛋白的比活性按毫微克分子  $C_2H_2$  还原/分钟·毫克铁蛋白计算。

和 (3) 可以看出无论用未诱导的钼铁蛋白或用诱导的钼铁蛋白互补未诱导的铁蛋白时, 表现出相近的固氮酶比活性。当二者分别互补诱导的铁蛋白时 [见表 2 (2) 和 (4)] 同样表现出相近的固氮酶比活性, 但比互补未诱导的铁蛋白时的比活性低。这说明用  $NaNO_3$  诱导过的棕色固氮菌的固氮酶钼铁蛋白不受硝酸还原酶的诱导的影响。从表 2 (5) (6) (7) (8) 可以看出, 用诱导的铁蛋白互补无论哪一种钼铁蛋白其比活性都比用未诱导过的铁蛋白互补任何一种钼铁蛋白的活性低。因此诱导过程中引起固氮酶活性下降更迅速的原因是由于固氮酶铁蛋白的失活。已有人证明  $NO_2^-$  对固氮酶  $C_2H_2$  还原具有抑制作用<sup>[2]</sup>。我们也有初步结果证明, 造成铁蛋白失活的原因

是由于  $NO_2^-$  的存在。至于  $NO_2^-$  抑制固氮酶铁蛋白的作用机制有待于研究。

(二) 棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$  中硝酸还原酶的诱导

现已分离出棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$ , 将它的粗提物和钼铁蛋白酸水解物<sup>[13]</sup>, 以及从钼铁蛋白提取出的  $Fe \cdot Mo$  辅因子<sup>[14]</sup> 互补时, 出现固氮酶活性。我们比较固氮酶和诱导的硝酸还原酶之间的生化遗传特性, 探讨含钼酶的共同辅助因子问题。用 0.1 M  $NaNO_3$  对棕色固氮菌突变种  $U_{w45}$  进行硝酸还原酶的诱导, 其结果见表 3。

棕色固氮菌诱导的硝酸还原酶既具有氧化甲基紫精 (MVH) 的活性, 同时也具有氧化  $FADH_2$  和  $NADPH$  的活性。其催化相对速度见表 4。

表3 在  $U_{w45}$  和野生型 230 中诱导的硝酸还原酶的比活性

菌 种	MVH 硝酸还原酶比活性
野生型 230 诱导	8.6
$U_{w45}$ 未诱导	0.4
$U_{w45}$ 诱导	6.9

表4 棕色固氮菌中诱导的硝酸还原酶氧化三种电子供体活性的比较

电子供体	诱导的 $U_{w45}$	诱导的野生型 230
	相对速度	相对速度
NADPH	1.00	1.00
FADH <sub>2</sub>	0.34	0.50
MVH	1.12	0.88

当加入抑制剂  $NaN_3$  (0.02M) 到硝酸还原酶反应系统中, 其  $U_{w45}$  (诱导) 和野生型 230 (诱导) 的硝酸还原酶活性受到抑制, 总活性分别是对照的 6% 和 15%。

以上结果清楚地表明, 在和野生型棕色固氮菌相同条件下, 不能合成钼铁蛋白的  $Fe \cdot Mo$  辅因子的突变种  $U_{w45}$ , 也能诱导出硝酸还原酶, 并且对三种不同电子供体都有氧化活性。此外, 诱导的硝酸还原酶活性受到  $NaN_3$  的抑制, 表明该酶含有金属成份<sup>[15]</sup>。

因此, 硝酸还原酶  $Mo$  辅因子和固氮酶钼铁蛋白的  $Fe \cdot Mo$  辅因子是不同的。这个结论和 Pienkos 等人<sup>[6]</sup>的结论是一致的。

至于固氮酶钼铁蛋白的  $Fe \cdot Mo$  辅因子有无前身  $Mo$  辅因子, 以及它和硝酸还原酶的  $Mo$  辅助因子是否有相同结构有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Cheniae, G. M. and H. J. Evans: *Pl. Physiol.*, **35**: 454, 1960.
- [2] Nason, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **65**: 137, 1970.
- [3] Nason, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**: 3242, 1971.
- [4] Evans, H. J. and S. A. Russell: *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation* (ed. by J. R. Postgate) Plenum, London and New York 1971. p227.
- [5] Hotchkiss, R. D.: *Nature New Biology*, **246**: 153, 1973.
- [6] Pienkos, P. T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 5468, 1977.
- [7] Strandberg, G. W. and P. W. Wilson: *Can. J. Microbiol.*, **14**: 25, 1968.
- [8] Shigehiko Taniguchi and Kazuhiyo Ohmachi.: *J. Biochem.*, **48**: 50, 1960.
- [9] Garrett, R. H. and A. Nason: *J. Biol. Chem.*, **244**: 2870, 1969.
- [10] 中国科学院植物研究所七室: *植物学报*, **15**: 281, 1973 年。
- [11] Gornall, A. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **177**: 751, 1949.
- [12] Rigaud, J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **77**: 137, 1973.
- [13] Nagatami, H. H. et al.: *J. Bacteriol.*, **120**: 697, 1974.
- [14] Shah, V. K. and W. J. Brill: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 3249, 1977.
- [15] Nason, A.: *The Enzymes* vol. 7 (ed. by P. D. Boyer), Academic Press New York and London, 1963, p587.

## PRELIMINARY STUDIES ON THE CORRELATION BETWEEN INDUCED NITRATE REDUCTASE AND NITROGENASE IN *AZOTOBACTER VINELANDII*

Zhong Ze-pu      Li Jiu-di

Wang Ji-wen      Tu Ya

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

Nitrate reductase was induced in *Azotobacter vinelandii* cell suspension in 0.1 M NaNO<sub>3</sub> for several hours intervals and the activity of the cell free extract reached to a maximum of 21.9 nMoles NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/min. mg protein at 24 hr. The nitrogenase activity of the cell extract of these induced cells declined more rapidly than that of uninduced one. Experimental evidences indicate that this phenomena is

due to the inactivation of component II (Fe protein) but not component I (Fe.Mo protein) of nitrogenase during the induction period.

Cells of *Azotobacter vinelandii* U<sub>w45</sub> mutant (known as lack in Fe.Mo cofactor) also showed induced nitrate reductase activity by the same treatment, suggesting that the two Mo containing enzymes do not share a common subunit.