

镍对荚膜红假单胞菌氢酶和固氮酶活性的促进作用

朱长喜 陈秉俭 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道了过渡金属镍离子对荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 菌株 N₃ 氢酶吸氢活性和固氮酶乙炔还原活性的促进作用, 当培养基内的镍离子浓度为 $1\mu\text{M}$ 时, 生长菌体的氢酶具有最大的吸氢活性, 但镍离子对固氮酶活性的最适浓度为 $5\mu\text{M}$ 。镍离子加入到整体细胞或无细胞提取液中, 对氢酶活性无促进作用。镍离子加入到整体细胞中, 固氮酶活性也没有被促进。其它一些过渡金属离子, 例如 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对氢酶和固氮酶活性均无促进作用。无论有无镍离子存在, 螯合试剂 *O*-phenanthroline 和 EDTA 对生长菌体的氢酶和固氮酶的活性均有少量的抑制作用。

基于以上试验结果, 对 Ni^{2+} 参与 *Rps. capsulata* 氢酶蛋白质合成以及有关作用机理进行了讨论。

关键词 荚膜红假单胞菌; 氢酶; 固氮酶

人们发现过渡金属镍能在生物体内行使某些生理功能, 近年来又认识到镍是一些细菌氢酶的重要成分, 它参与构建氢酶催化活性中心结构, 并具有一类新型 $[\text{3Fe-3S}]$ 活性中心原子簇, 而大大促进氢酶的催化吸氢反应活性^[1-3]。然而在生物固氮体系中, 镍对与氢酶关系极为密切的固氮酶乙炔还原活性有何影响, 至今尚无报道。

我们在研究紫色非硫光合细菌荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 生物固氮体系时, 观察到镍不仅赋与氢酶很高的吸氢反应活性, 而且也大大提高了其固氮酶乙炔还原活性。

材料和方法

(一) 菌种及培养条件

荚膜红假单胞菌 (*Rps. capsulata*) 菌株 N₃ 按前报道分离获得^[4], 光照厌氧培养, 光照强度约为 3000 lux。参照 Ormerod 培养基加苹果酸 (300 nM) 和谷氨酸 (7 mM) 分别作为碳、氮源。无机氮源培养基是以 $7.0\text{ mM}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 代替谷氨酸,

其它条件均相同。

(二) 整体细胞和无细胞提取液的制备

于 $25000 \times g(4^\circ\text{C})$ 离心 20 分钟收集菌体, 后以 25 mM 的 Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH} 7.2$) 洗一次, 再以同样的离心条件离心 10 分钟, 得到的菌体悬浮于适量同样的缓冲液中, 然后多次在封闭的瓶内抽气充氢, 达到无氧条件, 此作整体细胞分析用。无细胞提取液制备如上述, 得整体细胞后, 于冰-水浴中超声破碎 4 分钟 (超声破碎器功率为 250 W), 经 $25000 \times g(4^\circ\text{C})$ 离心 20 分钟, 上清液即为无细胞提取液, 充氢达到无氧条件, 供分析用。

(三) 酶活性测定方法

1. 固氮酶乙炔还原活性测定: 按前报道^[4], 用气相色谱方法测定, 以乙炔还原方法测定固氮酶活性。

2. 氢酶吸氢活性测定: 按前报道^[4], 用减压法测定, 以亚甲兰 (MB) 作为受体。

3. 蛋白质含量测定: 整体细胞和无细胞提取液的蛋白质含量按 Lowry 法^[5]。

本文于 1985 年 7 月 10 日收到。

(四) 化学试剂

O-Phenanthroline 和 EDTA 系 Sigma 产品,其余均系国产分析纯试剂。

结 果

(一) 镍离子对整体细胞氢酶和固氮酶活性的促进作用

Rps. capsulata 有可溶性和膜结合态两种形式的氢酶^[6], 以硫酸铵作为无机氮源培养基生长的膜结合态氢酶又存在着两种不同状态^[7]。当 $1\mu\text{M NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入正常培养基生长的菌体如表 1 所列, 整体细胞氢酶吸氢活性成倍地被促进, 同时生物固氮体系中与氢酶密切相关的固氮酶乙炔还原活性也几乎同步增加。虽然酶的比活性常常变化较大, 但比活性至少提高 2 倍以上。特别是以硫酸铵为氮源的培养基生长菌体, 由于 NH_4^+ 存在, 对其固氮酶活性有所抑制的情况下, 而 Ni^{2+} 的加入, 对固氮酶活性的促进则更加显著。

表 1 Ni^{2+} 对 *Rps. capsulata* 整体细胞氢酶和固氮酶活性的影响*

Table 1 Effect of nickel on hydrogenase and nitrogenase activities in whole cells of *Rps. capsulata* N_2 *

培养基 Medium	Ni^{2+}	吸氢活性 H_2 -uptake activity ($\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ protein/min)	乙炔还原活性 C_2H_2 -reduction activity ($\text{nmol C}_2\text{H}_2/\text{mg}$ protein/h)
苹果酸+谷氨酸 Malate + glutamate	-	4.83	94.9
	+	14.21	205.4
苹果酸+硫酸铵 Malate + (NH_4) ₂ SO_4	-	4.70	50.1
	+	12.30	143.5

* Ni^{2+} 加入培养基内, 菌体收集之前, 于 28°C 光照培养 24 小时。
** 镍加入的最终浓度为 $10\mu\text{M}$ 。
* Ni^{2+} was added to the culture medium and cells were grown photosynthetically for 24h at 28°C before harvesting.
** Ni^{2+} added to $10\mu\text{M}$ final concentration as $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

为了检测 Ni^{2+} 对 *Rps. capsulata* 氢酶和固氮酶活性促进作用的最适浓度, 我们曾向培养基内加入不同量的 Ni^{2+} (1nM — $100\mu\text{M}$), 进而分析酶活性, 除 $100\mu\text{M NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度外, 其它浓度对菌体生长速率和菌体获得量无大差异。从图 1 可以看出, $1\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 存在于培养基中生长的菌体, 酶活性达到最大值, 其中氢酶吸氢活性的最适浓度为 $1\mu\text{M NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 固氮酶乙炔还原活性的最适值为 $5\mu\text{M NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

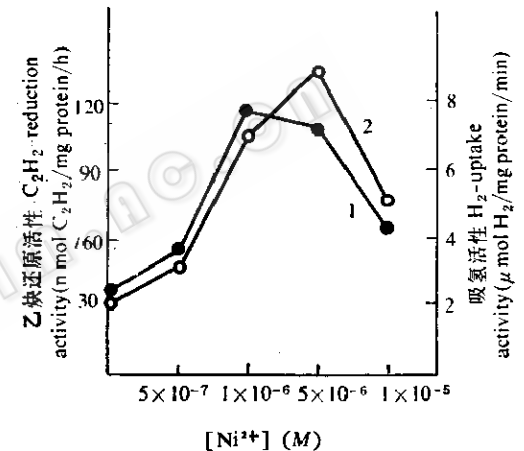


图 1 加入的 Ni^{2+} 量对 *Rps. capsulata* 整体细胞氢酶和固氮酶活性的影响
Fig. 1 Effect of added Ni^{2+} on hydrogenase and nitrogenase activity in whole cells of *Rps. capsulata* N_2
1. 吸氢活性; 2. 乙炔还原活性
第一点为培养基内没有 Ni^{2+} 的活性。
1. H_2 -uptake activity 2. C_2H_2 -reduction activity
The first point is the activity obtained in medium without Ni^{2+} supplements.

(二) 某些过渡金属钴 (Co^{2+})、锌 (Zn^{2+})、铜 (Cu^{2+}) 对整体细胞氢酶和固氮酶活性的影响

首先观察了与镍在化学结构上极相似的过渡金属钴 (Co^{2+}) 对整体细胞氢酶和固氮酶活性的作用 (表 2), 不同浓度的钴对酶活性均无促进作用, 相反, 当 Co^{2+} 浓度增加到较高时, 对酶活性还有不同程度

的抑制作用。

表 2 钴离子对 *Rps. capsulata* N₃ 整体细胞氢酶和固氮酶活性的影响

Table 2 Effect of Co²⁺ on hydrogenase and nitrogenase activity in whole cells of *Rps.capsulata* N₃

金属离子 Metal	终浓度 Final conc. (μM)	吸氢活性 H ₂ -uptake activity (μmolH ₂ /mg protein/min)	乙炔还原活性 C ₂ H ₂ -reduction activity (nmolC ₂ H ₂ /mg protein/h)
None		7.65	127.4
NiCl ₂ · 6H ₂ O	1	16.8	389.2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	7.21	103.4
	1	5.96	63.8
	10	4.35	43.2

同时，我们也观察了 Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 对整体细胞酶活性的作用。培养基中分别除去 Zn²⁺ 和 Cu²⁺，然后再加此离子，并与含 Ni²⁺ 培养基生长的菌体酶活性相比较，发现 Zn²⁺、Cu²⁺ 对氢酶和固氮酶活性无明显作用，与 Co²⁺ 相似，高浓度时还有抑制作用。

已知氢酶和固氮酶均属铁-硫蛋白，铁均参与这两个酶活性中心原子簇^[8]。除培养基内含有微量 Fe³⁺ 之外，再加微量 (0.1 μM) Fe³⁺ 以及 Ni²⁺ 于培养基内时，其氢酶和固氮酶活性比单加入 Ni²⁺ 时的酶活性有少量的增加(数据未列出)。

表 4 螯合剂对 *Rps. capsulata* N₃ 无细胞提取液氢酶吸氢活性的影响

Table 4 Effect of chelators on H₂-uptake activity in cell-free extract of *Rps. capsulata* N₃

螯合剂 Chelator	浓度 Conc. (μM)	氢酶吸氢活性 H ₂ -uptake activity		含 Ni ²⁺ 氢酶吸氢活性 H ₂ -uptake activity in the presence of Ni ²⁺	
		数值 Value (μmol H ₂ /mg protein/min)	抑制作用 Inhibition (%)	数值 Value (μmol H ₂ /mg protein/min)	抑制作用 Inhibition (%)
None		5.64	0	17.93	0
O-phenathroline	50	0.16	97	2.33	82
	20	1.12	80	5.74	68
	1	4.79	15	16.49	8
EDTA	500	1.69	70	7.53	58
	50	4.51	20	15.59	13
	5	5.19	8	17.63	5

表 3 以不同方式加入 Ni²⁺ 对氢酶和固氮酶活性的影响

Table 3 Effect of added Ni²⁺ form on hydrogenase and nitrogenase activity in cell-free extract of *Rps. capsulata* N₃

加入方式 Way of addition	Ni ²⁺ 1×10 ⁻⁶ (M)	吸氢活性 H ₂ -uptake activity (μmol H ₂ /mg protein/min)	乙炔还原活性 C ₂ H ₂ -reduction activity (nmol C ₂ H ₂ /mg protein/h)
加入到培养基中 Added to medium	0	3.86	142.2
	1	10.21	304.5
加入到无细胞提取液中 Added to cell-free extract	1	3.49	98.4
	5	2.16	67.5
	10	1.33	23.6

(三) 镍离子的不同加入方式对无细胞提取液氢酶和固氮酶活性的影响

结果见表 3。以不同方式加入 Ni²⁺，其无细胞提取液的酶活性截然不同。Ni²⁺ 于培养基中时，生长菌体的无细胞提取液氢酶和固氮酶活性均成倍促进。而 Ni²⁺ 直接加入酶的无细胞提取液中时，虽然改变它们的浓度，但氢酶和固氮酶活性均无促进，反之，随着加入 Ni²⁺ 浓度的增加，酶的活性却有不同程度的降低。固氮酶的无细胞提取液的全部制备过程都必然在严格厌氧条件下进行，稍有暴氧，都将大大降低固氮酶的乙炔还原活性，这给进一步从

离体研究镍对固氮酶作用带来困难。

(四) 螯合剂对氢酶活性的影响

螯合剂 *o*-Phenanthroline、EDTA 加入培养基中, 生长菌体的氢酶吸氢活性几乎完全消失。如表 4 所列, 若螯合剂加入氢酶整体细胞内, 底物量的螯合剂对氢酶活性有少量的抑制作用, 十倍于底物量的螯合剂, 对其活性的抑制作用有所增强。两种螯合剂加入无细胞提取液时, 作用与上述整体细胞相似(数据未列出), 这与前人报道的结果一致^[9]。

螯合剂对含有 Ni^{2+} 培养基生长菌体的整体细胞和无细胞提取液氢酶活性的抑制作用, 与不含 Ni^{2+} 上述试验结果基本一致, 不过活性被抑制的程度稍弱。

讨 论

1. 本试验结果与前人报道^[10]基本一致, 过渡金属镍能赋予 *Rps. capsulata* N_2 氢酶以较高的吸氢反应活性。从不同方式加入 Ni^{2+} , 以及螯合剂对氢酶活性的作用的差异表明, Ni^{2+} 可能参与了氢酶蛋白质的合成。虽然已有报道 Ni^{2+} 参与构造氢酶活性中心结构, 并且具有 $[\text{3Ni-3S}]$ 原子簇^[1], 但是 Yage^[12] 对硫酸盐还原细菌(*D. desulfoviri*)可溶性氢酶的研究结果确认, 可溶性氢酶内不含有 Ni^{2+} 。光合细菌 *Rps. capsulata* 菌株 N_2 氢酶是否含有 Ni^{2+} 以及是否它也具有 $[\text{3Ni-3S}]$ 原子簇活性中心结构, 还有待于此氢酶的进一步分离纯化, 进而测定其有关生化特性而证明。

2. 氢酶和固氮酶均属铁-硫蛋白。氢酶除了 $[\text{Fe-S}]$ 原子簇之外, 还有 $[\text{Ni-S}]$ 原子簇, 它们能大大促进氢酶反应活性。固氮酶是一种严格厌氧酶, 活性中心除了含有 Fe、S 外, 还含有过渡金属钼(Mo), 而构成多 $[\text{Mo-Fe-S}]$ 活性中心原子簇^[13]。

已知一些细菌含有 Ni^{2+} 的短肽, 通常称为辅助因子, 它们能行使很多特有的生理功能^[14]。我们试验结果表明, Ni^{2+} 对固氮酶乙炔还原活性也有显著促进作用, 至今尚未见相似的报道。 Ni^{2+} 对固氮酶活性促进作用的可能机理, 有待进一步探索。

3. Ni^{2+} 既能大大提高光合细菌 *Rps. capsulata* 氢酶的吸氢活性, 又几乎同步促进固氮酶乙炔还原活性。众所周知, 在生物固氮过程中, 固氮酶进行固氮是一个耗能过程, 它消耗约 30% 的能量而以“废物”氢气形式放出, 而主要行使吸氢功能的氢酶却能吸收固氮酶需能过程放出的氢气, 进行再循环而加以利用, 更有效的应用此能量, 从而大大提高固氮效率, 这在理论上和实际应用上都是令人感兴趣的问题^[15]。

参 考 文 献

- [1] Mour, J. J. G. et al.: *J. Mol. Catal.*, 231(2—3): 303, 1984.
- [2] Schneider, K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 138(3): 533, 1984.
- [3] Stults, L. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 159(1): 153, 1984.
- [4] 宋鸿遇等: *植物生理学报*, 5: 141—150, 1979.
- [5] Lowry, D. H.: *J. Biol. Chem.*, 195: 265—275, 1951.
- [6] 朱长喜等: *植物生理学报*, 10: 147—155, 1984.
- [7] 朱长喜等: *科学通报*, 29: 51—54, 1984.
- [8] LeGall, J. et al.: *Iron-sulfur Proteins*, John Wiley & Sons, New York, p. 177—218, 1982.
- [9] Partridge, C. D. P. and M. G. Yates: *Biochem. J.*, 204: 339—344, 1982.
- [10] Takakuwa, S. and J. P. Wall: *FEMS Microbiology Letter*, 12: 359—363, 1981.
- [11] Teixeira, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 130(3): 481, 1983.
- [12] Yagi, T. 私人通讯, 1985.
- [13] Harry, C. W. and R. H. Burris: *Ann. Rev. Biochem.*, 45: 409, 1976.
- [14] Thauer, R. K. et al.: *Naturwissenschaften*, 70(2): 60, 1983.
- [15] Evans, H. J. et al.: *Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation 4th p.* 84—96, 1981.

ENHANCEMENT OF HYDROGENASE AND NITROGENASE ACTIVITIES IN *RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA* BY NICKEL

Zhu Changxi Chen Binjian Song Hongyu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

The enhancement of H_2 -uptake and C_2H_2 -reduction activities in *Rhodopseudomonas capsulata* strain N₃ by Ni^{2+} added to the medium was investigated. The optimal concentration of $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ for the stimulation of H_2 -uptake activity was $1 \mu M$, but that for C_2H_2 -reduction was $5 \mu M$. There was always at least a 2-fold stimulation when cells were grown with Ni^{2+} added. The activities of both enzymes could not be stimulated by Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} added to the whole cells

or cell-free extract. Little inhibition of H_2 -uptake activity was found after the addition of chelators such as *o*-phenanthroline and EDTA to whole cell or cell-free extract of *Rps. capsulata* grown in the presence of Ni^{2+} or not.

Key words

Rhodopseudomonas capsulata; Hydrogenase; Nitrogenase