

# 棕色固氮菌中固氮酶与过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶的相关性研究\*

林永齐 马翥 杜建国 王菲 陈航

(吉林大学分子生物学系, 长春)

通过对棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 沈-230 菌株在不同时间培养下, 菌的生长、繁殖与固氮酶 ( $N_2ase$ )、过氧化物酶 (PER)、过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力变化研究, 发现棕色固氮菌中 PER、CAT、SOD 的活力水平与  $N_2ase$  活性变化有密切的相关性。在对数生长期,  $N_2ase$  活性随生长时间的延长而增加, 同时 CAT、PER 和 SOD 酶的活性也相应增加。对数期之后,  $N_2ase$  活力稍有下降, 其它酶的活力亦有相应的变化。

在研究酶活力变化的同时, 研究了同工酶谱的变化。该变化亦有很强的规律性。根据研究结果, 提出并讨论了棕色固氮菌中固氮酶的防氧保护机制。

**关键词** 固氮酶; 过氧化物酶; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 棕色固氮菌

自然界中氨态氮的主要来源是生物固氮。因此, 生物固氮引起科学家的广泛重视并开展了深入研究。

固氮微生物中有些菌是好氧的, 棕色固氮菌就是其中的一种。然而, 在这些菌中催化氮分子还原成氨的固氮酶却对氧极其敏感, 遇氧失去活性。因此, 对好氧固氮菌中固氮酶如何避开氧的破坏, 保证发挥高的合成氨催化效率的问题存在不同的看法。Gallon<sup>[1]</sup> 总结性地归纳成几点, 即: 回避氧气, 物理屏障, 代谢除氧, 构象保护, 固氮酶合成的调控等。

Mccord 等<sup>[2]</sup> 提出, 在生物代谢过程中产生的超氧负离子 ( $O_2^-$ ), 羟基自由基 ( $\cdot OH$ ) 及过氧化氢等氧代谢的中间体对细胞具有强毒性。Fridovich<sup>[3]</sup>, Halliwell<sup>[4]</sup> 提出超氧化物歧化酶等可通过清除这些氧代谢的中间体而为细胞提供对  $O_2$  毒性的第一线防御。

Asada<sup>[5]</sup> 在棕色固氮菌中发现了 Fe-SOD, 后来, 科学家分别研究了不同固氮

菌中的 Fe-SOD 和 Mn-SOD<sup>[6,7]</sup>。但未与固氮酶的保护机理联系起来。1986年, 我们在研究棕色固氮菌固氮酶的活性与超氧化物歧化酶、过氧化物酶同工酶的酶谱变化时发现了这几种酶之间有着密切的联系<sup>[8]</sup>。与此同时我们注意到 Steele 等人<sup>[9]</sup> 在研究固氮放线菌 (*Frankia*) 时也发现了这个现象。

本文进一步报道固氮酶与超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶及它们的同工酶相关性的研究结果。同时提出并讨论了固氮酶的防氧保护机理。

## 材 料 和 方 法

### (一) 棕色固氮菌的培养

菌种为沈-230 棕色固氮菌, 用改进的 Burk's 斜面培养基于 30℃ 培养 18h, 得到活化菌种。然后接一级摇瓶培养 (Burk's 培养基), 振荡 60 r/min, 18h 后, 接种二级摇瓶培养 (培养条件同

本文于 1987 年 10 月 29 日收到。

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

前)。不同时间取样,于 700 nm 处测定菌的生长曲线。并分别于 8、18、32、48 和 60h 离心,得到不同培养时间的菌糊。用 0.025 mol/L pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液洗后, -20℃ 冷冻备用。

### (二) 无细胞提取液制备

按菌糊:缓冲液=1:2 加入 0.025 mol/L pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液,再加入相当菌糊量 20% 的石英砂,用超声波(250W)破碎 15 min。离心去掉沉淀,得到深棕色透明的无细胞提取液。

### (三) 酶活力测定

1. 固氮酶活力测定: 采用乙炔还原为乙烯的方法,用气相色谱测定乙烯生成量,反应体系同文献[10]。

2. 过氧化氢酶活力测定: 采用 Beers 等<sup>[11]</sup>的分光光度法,并加以改进。活力单位定义为:在 25℃,每分钟分解 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为一个活力单位。

3. 过氧化物酶活力测定: 采用联苯胺法<sup>[12]</sup>并加以改进。活力单位定义为: 25℃,在本反应条件下,每分钟内使 OD 值上升 0.01 时为 1 个单位。

4. 超氧化物歧化酶活力测定: 采用修改的 Markland 法<sup>[13]</sup>。活力单位定义为: 在 25℃,抑制邻苯三酚自氧化速率 50% 时的活力为一单位。

### (四) 蛋白质浓测定

采用 Folin-酚法<sup>[14]</sup>

### (五) 同工酶测定

在聚丙烯酰胺凝胶电泳后的胶条上进行特异性活性显色。过氧化氢酶活性显色按文献[15]进行。过氧化物酶活性显色用联苯胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 法<sup>[16]</sup>。超氧化物歧化酶活性显色用四氮唑兰法<sup>[17]</sup>。

### (六) 电泳及染色法

聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等均参考文献[18]。蛋白质染色用考马氏亮兰 R250 和氨基黑。钼染色用 0.2% 的二硫酚溶液。铁染色用 0.1% 的邻菲罗啉溶液。

## 结 果

### (一) 棕色固氮菌 (Av-230) 的生长曲线

培养期间不同时间取样,用 UV-120

分光光度计在 700 nm 处测定培养液的浊度(图 1)。

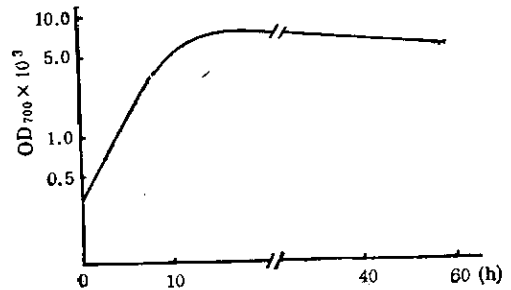


图 1 Av-230 生长曲线 (30℃)

Fig. 1 The growth curve of Av-230

在 18h 前后,菌体生长量达到最大值。随时间延长,出现轻微自溶现象,最后达到稳态。

### (二) 不同培养时间酶活力变化

不同培养时间 Av-230 无细胞提取液中 PER、CAT、SOD 及 N<sub>2</sub>ase 酶活力列表 1 中。固氮酶比活性在 18h 前后达到最大值,随后稍下降,32h 后出现平稳趋势。而 PER、CAT 和 SOD 酶的比活性最高点出现在 32h 前后,随后出现轻微下降或平稳。

表 1 不同培养时间, N<sub>2</sub>ase、PER、CAT 和 SOD 酶活力比较

Table 1 Comparison of the activities of PER, CAT, SOD, and N<sub>2</sub>ase from Av-230 at different growth time

酶 Enzyme	时间 (h)				
	8	18	32	48	60
CAT	5.0	12.1	36.1	37.4	36.5
PER	2.3	16.9	32.3	27.4	28.4
SOD	12.7	38.0	70.5	58.4	50.7
N <sub>2</sub> ase	7.2	8.6	5.9	5.7	5.5

### (三) 不同培养时间,同工酶谱变化

Av-230 中, PER、CAT、SOD 酶同

工酶谱及固氮酶钼铁蛋白电泳图谱随培养时间不同而变化(图2—5)。从图中可以看出,随着固氮菌培养时间的增长,固氮酶钼铁蛋白高聚体增加。三种与氧化代谢有关酶的同工酶谱带数增加,各谱带活性亦增高。(图2、3、4、5中样品编号相同:1为培养8h;2为18h;3为32h;4为48h;5为60h)。



图2 PER 同工酶谱  
Fig. 2 PER isozymegraphs in Av-230



图3 CAT 同工酶谱  
Fig. 3 CAT isozymegraphs in Av-230

#### (四) 棕色固氮菌中的过氧化物酶

将棕色固氮菌中过氧化物酶提纯后,发现这些同工酶中含有卟啉铁,即在可见区 420nm 和 557nm 处有特征吸收。因此认为,同工酶谱的形成可能是以次级同

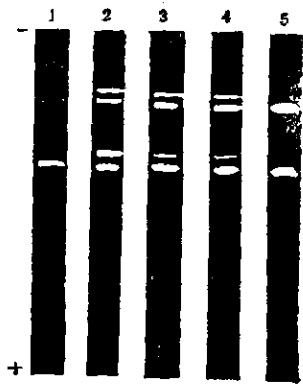


图4 SOD 同工酶谱  
Fig. 4 SOD isozymegraphs in Av-230

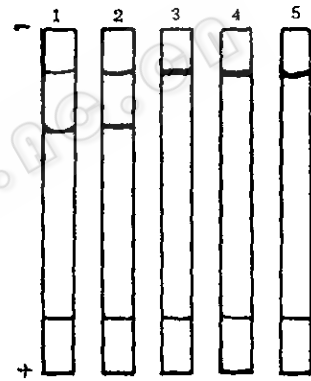


图5 Av-230 固氮酶谱的变化  
Fig. 5 The change of graphs of  $N_2ase$  in Av-230

工酶为主。

### 讨 论

从表1可以看到,随着固氮菌培养时间的增长,固氮酶活力变化与CAT、PER、SOD活力变化有密切的相关性。即菌在生长对数期,固氮酶活力迅速增加,CAT、PER、SOD的活性也在迅速增加。但是,固氮酶活力在培养18h达到最高,而CAT、PER、SOD的活性在30h左右达到最高。后三者与氧化代谢有关酶的活力最高峰出现时间在固氮酶之后,这可能是由于固氮酶活力达到最高时,正是固氮菌生

命活动最旺盛时期,呼吸作用最强。剧烈的呼吸作用会产生较多氧的中间体如  $O_2^-$  等。这些对固氮酶有害物质的产生一方面会使菌体老化,同时也诱导了该菌中 CAT、PER、SOD 等酶的加速合成,从而排除有害物质,使固氮酶活力保持相对稳定,使菌的老化有所延缓。

从同工酶谱(图 2、3、4)可以看出,菌在生长初期,存在一些 CAT、PER、SOD 酶。但随着培养时间的延长,新的更多的同工酶带出现,且活性增高。因此推测,在棕色固氮菌中 CAT、PER、SOD 等酶的活性调节可能是通过合成新的次级同工酶来实现的。

综上所述,认为在棕色固氮菌中可能存在着一个由 CAT、PER、SOD 等酶构成的防氧保护系统,以减少氧及其代谢中间体对固氮酶的损害。该保护系统的深入研究对固氮菌的生理生化研究有重要意义。

### 参 考 文 献

[1] Gallon, J. R.: *Tread in Biochemical Sciences*

- B, p. 19--23, 1981.
- [2] McCord, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049--6055, 1969.
- [3] Fridovich, I.: *Bioscience*, **27**: 462--466, 1977.
- [4] Halliwell, B.: *New Phytol.*, **73**: 1075--1086, 1974.
- [5] Asada, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**: 2801--2807, 1975.
- [6] Moore, E. R. B. et al.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **24**: 261--265, 1984.
- [7] Buchanan, A. G. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 441--447, 1980.
- [8] 马鑫等: 吉林大学自然科学学报, **3**, 123--124, 1987.
- [9] Steele, D. B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **32**: 409--413, 1986.
- [10] 宋鸿遇等: 植物生理学报, **5**, 141--150, 1979.
- [11] Beers, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **195**: 133--140, 1952.
- [12] Clara, R. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1222--1228, 1984.
- [13] Markland, S. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**: 469--474, 1974.
- [14] 北京大学生物系生化室: 生物化学实验指导, 人民教育出版社, 北京, p. 73--74, 1979.
- [15] 吴少伯: 植物生理学通讯, **1**: 30, 1979.
- [16] 王爱国等: 植物生理学报, **9**: 77, 1983.
- [17] 阎炳宗等: 实验生物学报, **16**: 113--118, 1983.
- [18] 张龙翔等: 生物化学实验技术, 高等教育出版社, 北京, p. 94--124, 1982.

## THE RELATION OF NITROGENASE WITH PEROXIDASE, CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN *AZOTOBACTER VINELANDII*

Lin Yongqi Ma Biao Du Jianguo Wang Fei Chen Hang

(Department of molecule Biology, Jilin University, Chang Chun)

Oxygen is potentially toxic to living cells. Aerobic organisms have evolved an enzymatic mechanism against oxygen damage. *Azotobacter vinelandii* 230 is aerobic bacterium. Under the different period of culture time, the activities of catalase, peroxidase and superoxide dismutase have close relation with that of nitrogenase. Before log-growth phase, the activity of nitrogenase increase with culture time, and at the same time the activities of the other three

enzymes also increase. After the log-growth phase, the nitrogen-fixing activity decrease slightly, and the other three enzymes have similar characteristics.

In this paper, the characteristics of peroxidase is also described.

### Key words

Nitrogenase; Peroxidase; Catalase; Superoxide dismutase; *Azotobacter vinelandii*