

氧对固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu 62 固氮酶活性的调节作用*

王继文 李永兴 胡长征 李久蒂

(中国科学院植物研究所, 北京)

本文研究了在好气条件下, 在以谷氨酸为氮源的液体培养基中, 固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 固氮酶形成的条件及溶氧压对固氮酶活性的影响。厌氧使整体细胞固氮酶迅速失活; 而见氧后固氮酶又重新恢复活性。Western blotting 实验证实, 这种可逆失活的分子基础, 是由于固氮酶铁蛋白-亚基被修饰和去修饰。呼吸抑制剂 KCN 对固氮酶活性的抑制, 亦是由于固氮酶铁蛋白被修饰。因此推论细胞内的能量状态可能是启动固氮酶活化酶系统的重要信号。谷氨酰胺合成酶的抑制剂 MSX 不能去除厌氧和 KCN 引起的抑制作用。结果表明: 固氮酶活性的 NH_4^+ 和厌氧关闭可能通过不同的机制起作用。

关键词 固氮酶活性; 调节; 固氮螺菌

在生物进化过程中, 固氮生物产生了一个精密的调节机制, 以适应外界环境的变化, 除了在 *nif* 基因转录水平上固氮酶合成的调控外, 在某些固氮生物中, 如光合细菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 等还存在固氮酶翻译后的调节^[1]。当在介质中加入少量 NH_4^+ (0.5 mmol/L), 固氮酶活性迅速和可逆地被抑制, 这种固氮酶活性氮关闭 (switch-off) 的分子基础, 是由于固氮酶铁蛋白一个亚基在第 100 位上的精氨酸被 ADP-ribose 修饰和去修饰^[2,3]。在光合细菌中, 固氮酶活性除受 NH_4^+ 调控外, 还受到光、暗、金属离子 Mn^{3+} 、 Mg^{2+} 和一些抑制剂的调节。细胞内谷酰胺库的变化, 是调节固氮酶活性的重要信号分子^[4-6]。

1976 年以来, 固氮螺菌 (*Azospirillum*) 与禾本科植物根际的联合固氮关系, 引起科学界的极大重视。对固氮螺菌的生理生化和遗传的研究积累了大量的资料。Ludden 等^[7]证实 *A. brasilense* Sp7 的固氮酶系统也必须由活化酶所活化。Nair 等用 Western blotting 实验证明了在 *A.*

brasilense 中, 存在着与光合细菌失活铁蛋白相类似的两种固氮酶铁蛋白亚单位^[8]。Burris^[9,10] 实验室进一步证实, 在无氮液体培养基中, 固氮螺菌固氮酶活性受 NH_4^+ 和氧的调节。谷氨酰胺是固氮酶活性氮关闭过程中重要的信号分子。而氧对固氮酶活性的调节有二种机制, 在高溶氧压下 (2.0 kPa) 的固氮酶失活和厌氧条件下固氮酶活性的抑制。前者不导致固氮酶铁蛋白的修饰, 而后者与共价修饰有关。1988 年, Fu 等克隆并得到调控固氮酶共价修饰二个酶的基因^[11], 实验取得突破性进展。

固氮螺菌的微好氧固氮特性, 使研究固氮代谢调节和筛选 *nif*⁻ 突变株遇到很大困难。Yates 发现, *A. brasilense* 在好气条件下, 能在谷氨酸液体培养基中生长及固氮。这一发现, 无疑是一个很大的进展。

本文报道了在好气条件下, 在谷氨酸液体培养基中, 固氮螺菌固氮酶活性受氧

本文于 1990 年 2 月 20 日收到。

* 863 经费资助项目。

调节的规律, 厌氧和 NH_4^+ 是通过不同的途径调节固氮酶活性, 细胞的能量状态可能是启动固氮酶铁蛋白修饰的信号之一。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 菌株, 由北京农业大学提供^[12]。

(二) 培养基

斜面培养基采用营养肉汁培养基, 其成分为 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl , 0.3% 酵母浸出液, pH 为 7.0。液体培养基采用乳酸钠、谷氨酸钠液体培养基^[13]。

(三) 培养条件

在 250ml 或 50ml 三角瓶中, 含培养液 60ml 或 20ml, 32℃, 100r/min。接种量 1%, 培养 24 小时, OD_{480} 达到 4.0。

(四) 整体菌固氮活性分析

取 5ml 菌液, 放入 25ml 三角瓶内, 加血清塞, 注入 2ml 乙炔气, 30℃ 水浴振荡培养, 定时取样。用气相色谱仪测定乙炔含量。用标准乙烯法定量。固氮酶活性为 $n \text{ mole } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(五) 电泳

为了分析固氮酶铁蛋白的瞬间状态, 迅速取样是一重要手段^[6]。吸取 5ml 菌液, 迅速用玻璃纤维滤纸 Whatman GF/C (直径 4.25cm, Millipore 公司, Bedford, Mass) 过滤, 立即把滤纸投入液氮, 迅速冻结的滤纸, 在 100℃ SDS 样品缓冲液中加热三分钟以裂解菌体。菌体裂解液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫转渍 Western blotting 鉴定。SDS 聚丙烯酰胺电泳按 Kanenote 和 Ludden 修改的方法^[13]。丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的比例为 30:0.175, 低交联剂含量是为了获得较好的铁蛋白亚单位分辨率。样品在间隔胶的电压为 150V, 样品进入分离胶后的电压为 220V。

(六) 免疫转渍

按本实验室改进的 Hawkes 法进行^[14]。转渍用干板式转渍槽, 电流 80mA。用抗 *A. vinelandii* 固氮酶铁蛋白抗体为第一抗体。用偶联过氧化物酶的羊抗兔 IgG 抗体为第二抗体。显色剂用二氨基联苯胺 (DAB, Sigma 公司产品)。

(七) 溶氧值及呼吸强度测定

用美国 Yellow spring 公司的 YS 15331 氧电极, 在自制测试器中测定溶液氧压值及菌体的呼吸强度。

结 果 和 讨 论

(一) 不同溶氧压 (DOT) 对固氮酶活性的影响

取在好气条件下培养 24 小时的菌液 20ml, 放入 50ml 的密闭测试器中, 分别注入不同量纯氧, 同时注入乙炔, 10 分钟后测定固氮活性及 DOT。结果表明, 在谷氨酸为氮源的液体培养基中, OD_{480} 为 4.0 的菌液, 最适 DOT 为 0.2kPa。当 DOT 增至 1.6kPa 时, 固氮活性完全被抑制(表 1)。这个数值与 Hartmann 用 *A. brasilense* 在无氮液体培养液中测定值一致^[10]。

表 1 溶氧压对固氮螺菌 (*A. brasilense*) Yu 62 固氮酶活性的影响

Table 1 Effect of dissolved oxygen tension on N_2 ase activity in *A. brasilense* Yu62

溶 氧 压 Dissolved oxygen tension	固氮酶活性($n \text{ mols } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) N_2 ase activity
0.6%(0.12kPa)	246.3
0.8%(0.16kPa)	356.1
1.0%(0.20kPa)	451.1
4.0%(0.80kPa)	196.5
8.0%(1.60kPa)	0.0

(二) 厌氧条件下对固氮酶活性的抑制作用

培养 24 小时的菌体, 在好气液体培养

基中表现出较高的固氮酶活性。30 分钟后, 反应瓶用纯氮气冲洗 2 分钟, 加乙炔气, 40 分钟后测活性, 这时的固氮酶活性几乎完全被抑制。60 分钟时, 菌液重新暴露空气, 固氮酶活性迅速恢复到最初水平。

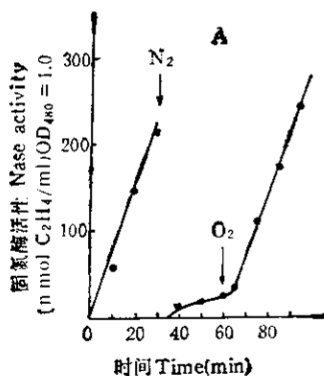


图 1 固氮螺菌 (*A. brasilense*) Yu62 的固氮酶活性的厌氧关闭

A. 整体细胞固氮酶活性。1. 10—30 分钟为好气条件下的固氮酶活性; 2. 40—60 分钟为冲氮后厌氧条件下的固氮酶活性; 3. 60—90 分钟为重新恢复到好气条件下时的固氮酶活性。

B. 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的细胞粗提物的免疫转渍图*。1. 在空气中培养; 2. 充氮后 40 分钟; 3. 重新见氧后 30 分钟的细胞粗提物

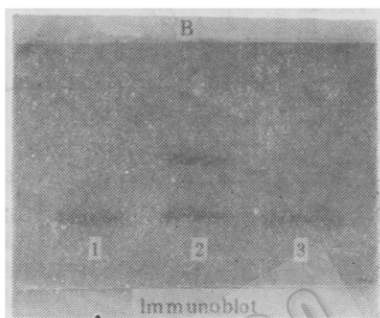


Fig. 1 The anaerobic switch-off of N_2 ase activity in *A. brasilense* Yu62

A. Whole cell N_2 ase activity 1. The curve from 10 to 30 min shows N_2 ase activity of cells in air; 2. The curve from 30 to 60 min shows N_2 ase activity after flushing with pure N_2 in anaerobic condition; 3. The curve from 60 to 90 min shows N_2 ase activity after recovering to air.

B. Immunoblots of crude extract from *A. brasilense* separated by SDS-PAGE with antiserum against dinitrogenase of *Azotobacter vinelandii*

1. Crude extract from aerobic cells;
2. Crude extract from cells flushed with N_2 for 40 min;
3. Crude extract from cells returned to air for 30 min

(三) 呼吸抑制剂对固氮酶活性的抑制作用

将呼吸抑制剂 KCN 加入到菌液中 (最终浓度为 $90 \mu\text{mol/L}$), 菌液内溶氧量迅速上升, 表明菌体耗氧量迅速降低, 呼吸作用被抑制。此时的固氮酶活性迅速的完全被抑制, 但在完全被抑制前, 有一明显的延滞期, 这表明固氮酶失活是一个酶促过程。Western blotting 实验证明, 呼吸抑制剂 KCN 对固氮酶活性的抑制是由于铁蛋白被修饰。在 Western blotting 图谱上出现第 2 条染色带 (图 2)。

Western blotting 实验表明, 固氮酶活性的这种可逆变化, 是由于铁蛋白可逆地修饰或去修饰的结果。在免疫转渍图的铁蛋白位置上, 出现 1 条和 2 条带交替的变化 (图 1)。

(四) 谷氨酰胺合成酶抑制剂 Methionine-DL-Sulfoximine (MSX) 对固氮酶活性厌氧关闭的影响

在好气培养的菌液中, 加入 NH_4^+ (最终浓度为 2mmol/L) 后, 固氮酶活性迅速被抑制。Western blotting 实验表明, 这是由于铁蛋白被修饰的结果。加谷氨酰胺合成酶的竞争性抑制剂 MSX (最终浓度为 5mmol/L), 则除去了 NH_4^+ 对固氮酶活性

* 用抗 *Azotobacter vinelandii* 固氮酶铁蛋白抗血清作为第一抗体 (图 1—3 同)。

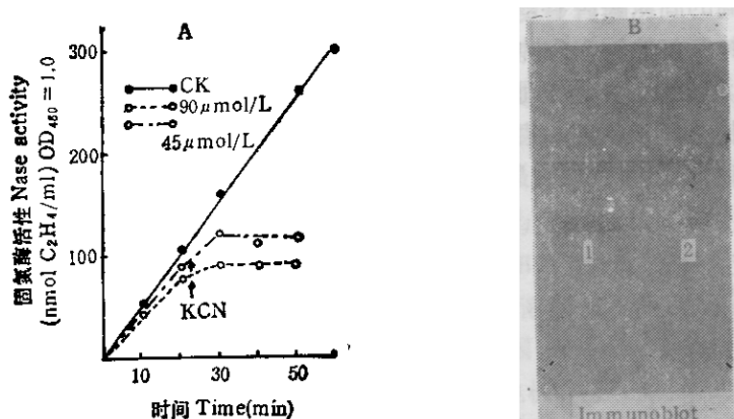


图2 KCN 对 *A. brasilense* Yu 62 固氮酶活性的影响(箭头表示加 KCN 的时间)

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粗提物的免疫转染图

1. 加 KCN 前细胞粗提物;

2. 加 KCN(90 μmol/L) 后 20 分钟时的细胞粗提物

Fig. 2 Effects of KCN on the N_2 ase activity in *A. brasilense* Yu 62 (a row shows the time adding KCN)

A. Whole cell N_2 ase activity

B. Immunoblots of crude extract from *A. brasilense* separated by SDS-PAGE with antiserum against

1. Crude extract from cells before adding KCN;

2. Crude extract from cells after adding KCN (90 μmol/L) for 20min

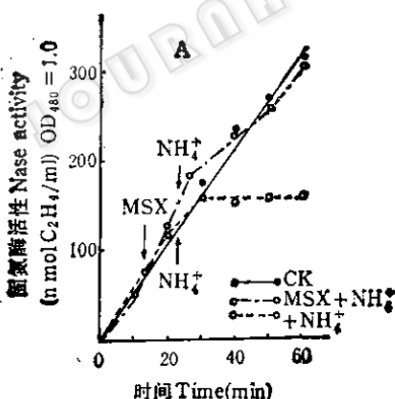


图3 NH_4^+ 和 MSX 对 *A. brasilense* Yu 62 固氮酶活性的影响

A. 整体细胞固氮酶活性(箭头表示加 NH_4^+ 和 MSX 的时间);

B. 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的粗提物的免疫转染图

1. 加 NH_4^+ 前; 2. 加 NH_4^+ 20 分钟后

Fig. 3 Effects of NH_4^+ and MSX on the N_2 ase activity in

A. brasilense Yu62

A. Whole cell N_2 ase activity (Row show the time adding NH_4^+ and MSX)

B. Immunoblots of crude extract from *A. brasilense* Yu62 separated by SDS-PAGE with antiserum against dinitrogenase reductase of *A. vinelandii*

1. Crude extract from cells before adding NH_4^+ ;

2. Crude extract from cells after adding NH_4^+ (final con. 2m mol/L) for 20min

的抑制作用(图3)。但 MSX 却不能除去厌氧和 KCN 对固氮酶活性的抑制作用(图4)。

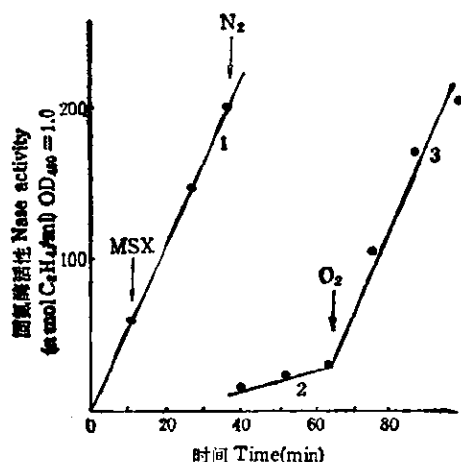


图4 MSX 对 *A. brasilense* Yu 62 固氮酶活性(整体细胞)厌氧关闭的影响

1. 在好气条件下的固氮酶活性(箭头表示加 MSX 的时间);
2. 充氮后在厌氧条件下的固氮酶活性;
3. 重新恢复到好气条件下的固氮酶活性

Fig. 4 Effects of MSX on the anaerobic switch-off of N_2ase activity in *A. brasilense* Yu62 (whole cell)

1. N_2ase activity in aerobic condition, a row show the time adding MSX;
2. After flushing with pure nitrogen, the N_2ase activity in anaerobic conditions;
3. After recovering aerobic condition

上述结果表明: 固氮酶活性的厌氧关闭与呼吸抑制剂 KCN 所引起的固氮酶失活, 都是启动了固氮酶活化酶系统, 使固氮酶铁蛋白被修饰。KCN 是呼吸链末端氧化酶的抑制剂, 它阻止电子流由 $cyta_3$ 向氧传递, 从而不形成 ATP。由此推论, 细胞内的能量状态, 可能是一个重要的启动活化酶系统的信号。KCN 抑制呼吸作用亦使溶氧压上升。但 A. Hartmann 发现, 高溶氧压使固氮酶失活, 并不是由于共价修饰所引起。由此推论, KCN 引起的

N_2ase 失活, 并不是高溶氧压的作用。 NH_4^+ 引起的固氮酶活性关闭与厌氧引起的活性关闭, 同样都是固氮酶铁蛋白被修饰, 但作用的途径不同。 NH_4^+ 的调控与 GS 和 GS 的产物(谷氨酰胺)有关^[6,9], 而厌氧的调控途径与 GS 无关, GS 的竞争性抑制剂 MSX 不能除去厌氧和 KCN 引起的活性抑制。A. Hartmann 的结果也表明, 在固氮酶活性厌氧关闭的过程中, 细胞内谷氨酰胺库和 GS 活性都没有相应的变化。进一步对这两个调控系统进行深入的研究很有必要。

参 考 文 献

- [1] Ludden, P. W. et al.: *Science*, 194: 424—426, 1976.
- [2] Ludden, P. W. et al.: *Biochem. J.*, 175: 251—259, 1978.
- [3] Pope, M. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 82: 3173—3177, 1985.
- [4] Kanemoto, R. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 713—720, 1984.
- [5] Yoch, D. C. et al.: *J. Bacteriol.*, 151: 800—806, 1982.
- [6] Jiudi, Li et al.: *J. Bacteriol.*, 169: 231—237, 1987.
- [7] Ludden, P. W. et al.: *Biochem. J.*, 173: 1001—1003, 1978.
- [8] Nair, S. K. et al.: *Experimentia suppl.*, 49: 29—38, 1983.
- [9] Hartmann, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 165: 864—870, 1986.
- [10] Hartmann, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 169: 944—948, 1987.
- [11] Fu, H. A. et al.: Bothe/de Bruign/Newton (eds) *Nitrogen Fixation: Hundred years after*, p. 336, Gustav Fischer. Stuttgart. New York, 1988.
- [12] 杨浩彬等: 北京农业大学学报, 10: 321—329, 1984.
- [13] Pedrosa, F. O. et al.: *FEMS Microbiology Letters*, 23: 95—101, 1984.
- [14] Burris, R. H.: *Methods Enzymol.*, 24B: 415—431, 1972.
- [15] Hawkes R. et al.: *Anal. Biochem.*, 119: 142—431, 1972.

THE REGULATION OF NITROGENASE ACTIVITY BY OXYGEN IN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Yu 62

Wang Jiwen Li Yongxing

Hu Changzheng Li Jiudi

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

The condition of nitrogenase expression and the regulation of N_2 ase activity in liquid glutamate medium in air was described. The DOT effected on N_2 ase activity. An anaerobic condition in the incubator caused an inhibition of N_2 ase activity immediately and completely. By Western blotting experiment, the results demonstrated that the molecular basis of reversible inhibition of N_2 ase activity was covalent modification and demodification of the Fe protein of N_2 ase. The respiratory inhibitor KCN inhibited N_2 ase activity rapidly

and caused the covalent modification of the Fe protein of N_2 ase. GS inhibitor MSX could abolished the inhibition caused by an anaerobic condition and KCN. The energy state in cell may be a important signal for tagging the covalent modification system of the Fe protein.

Key words

Nitrogenase activity; Oxygen regulation;
Azospirillum brasilense