

固氮蓝藻与棕色固氮菌固氮酶组分的交叉互补功能*

中国科学院水生生物研究所第五室生化、遗传组**

提 要

本文报告了藻菌之间固氮酶组分的交叉互补试验。初步结果证明：固氮蓝藻 (*Anabaena azorica* 水生 686) 的钼铁蛋白与棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 的铁蛋白之间存在着明显的互补功能。但这种蓝藻的铁蛋白在非细胞形态下很不稳定，易于失活。本实验为不同生理类型和不同进化程度的固氮生物之间固氮酶组分的交叉互补研究提供了新的资料。

迄今为止，从各种固氮生物的固氮酶中都至少已分离出两种蛋白组分，这两种组分单独存在无活性，重组时则呈现固氮酶活性。由于各种生物的固氮酶性质显出一系列的相似性，因而观察不同生理类型的生物固氮酶组分之间能否交叉互补，对于固氮酶的结构与功能的研究是很有意义的。此外，从系统发生观点来看，针对不同进化程度的固氮生物进行这方面的观察，也有助于评价固氮酶的功能进化。

固氮蓝藻与棕色固氮菌在生理和进化上大不相同，是具有代表性的两种固氮生物。过去有些工作者^[1,2,3,6]虽曾报道过不同来源固氮酶组分的交叉互补反应，但所用材料多数是细菌，涉及到蓝藻的不多。Smith & Evans^[9]，Eady & Postgate^[4]只分别报道过柱孢鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 与绿假单胞菌 (*Chloropseudomonas thyliticum*)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 和肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 固氮酶组分的互补关系。对固氮鱼腥藻与棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 之间的互补反应尚未有人报道。

前几年，我们在分离固氮鱼腥藻 (*Anabaena azorica* 水生 686) 固氮酶的工作过程中发现，虽然其整体细胞的固氮活力较高，但细胞一旦破碎，活力便迅速丧失。很难获得稳定的无细胞酶活。比较了不同的破碎方法并加入各种保护剂，终未得到令人满意的结果。究竟是两种组分都失活还是其中一个组分失活，抑或其他因子限制了固氮酶的功能？这个问题促使我们进行了蓝藻与棕色固氮菌固氮酶之间的交叉互补实验。

材 料 与 方 法

棕色固氮菌酶组分以常规的 DEAE-纤维素柱层析法分离（均经二次柱）。为了提高纯度，有时还将铁蛋白经第三次柱层析。

* 本工作的初步结果曾于 1975 年在化学模拟生物固氮学术讨论会上报告。

** 参加工作人员有：何振荣、林惠民、王业勤、李辛夫、何家苑、戴玲芬、杜代贤、谭渝云、黎尚豪。

所用固氮鱼腥藻(水生 686, 下同)系本室分离保存的藻种,按常规方法培养。

离心收集蓝藻培养物,用 0.025M HEPES 缓冲液 (pH7.4) 洗涤,离心(藻胶多时,在缓冲液中加入 0.01M $MgCl_2$ 去胶)。藻细胞悬浮于 1—2 倍体积的预先用 Ar 饱和的 HEPES 缓冲液中,并继续通 Ar 1 小时以上 (Ar 纯度为 99.99%, 并通过活化铜纯化)。加入一定量的 $Na_2S_2O_4$ (连二亚硫酸钠)后,在厌氧装置中加电磁搅拌,用 250W 超声击碎器破碎细胞 6—8 分钟。以无氧操作将击碎液转入密闭的离心管中离心 ($42,000 \times g$ /分) 15 分钟。得蓝色上清液,备用。

固氮鱼腥藻粗提取液的 DEAE-纤维素柱层析: DEAE-11 柱用含有 $Na_2S_2O_4$ (0.3mg/ml) 的 HEPES 缓冲液平衡还原,然后将藻上清液与一定量的 DEAE 纤维素混合上柱。相继以 0.04M $MgCl_2$, 0.28 MNaCl, 0.6M NaCl (均溶于 pH7.4、0.025M HEPES 缓冲液中,预先用 Ar 饱和,并加 $Na_2S_2O_4$ 0.2mg/ml) 洗柱。将流出物分别厌氧收集。

HEPES 是自制的。以乙炔还原法测定酶活力。Folin 法测定蛋白浓度。

结果与讨论

经过二次或三次 DEAE-纤维素柱层析的棕色固氮菌铁蛋白 (AvII) 单独反应时所呈现的乙炔还原活力已很弱,有时可达到加入 TCA 的预杀酶的水平。聚丙烯酰胺凝胶电泳检查纯度在 90% 以上。其钼铁蛋白 (AvI) 单独反应无活性。两个组分重组有活性。

固氮鱼腥藻的无细胞提取液 (AaCE) 在十次用乙炔还原法测定酶活力的试验中,只有一次呈现很微弱的活力,其余九次全未检出活性。但是与菌铁蛋白组合后,正反应则始终存在,其乙炔还原活力比菌铁蛋白单独存在时高约 2—3 倍,个别的可高出 10 倍。而且菌铁蛋白中污染的钼铁蛋白越少,加藻提取液后活性增加的倍数越多,反之则不甚显著 (表 1)。这些结果表明,菌铁蛋白或者对藻提取液有激活作用,或者与藻钼铁蛋白有互补功能。我们认为后者道理较为充分。

为了证实这个分析,我们对藻提取液进行了 DEAE-纤维素柱的分级层析。首先确定具有互补能力的分离物的洗出位置。洗脱过程出现三个相应的蛋白峰 (即 0.04M $MgCl_2$ 洗脱峰, 0.28M NaCl 洗脱峰, 0.6M NaCl 洗脱峰)。将这些不同洗脱位置的分离物与菌铁蛋白分别组合,结果发现互补活力最大的洗脱位置是在 0.28M NaCl 洗脱一个柱体积处出现的。0.04M $MgCl_2$ 洗脱的最后部分也有互补功能,而 0.6M NaCl 洗出物与菌没有互补作用。鉴于不同来源的固氮酶在 DEAE-纤维素柱上层析行为的相似性,0.28M NaCl 洗出物应含有固氮酶的钼铁蛋白组分。

然后用藻的 0.28M NaCl 洗出物对菌铁蛋白进行初步的滴定试验。固定菌铁蛋白量,改变藻钼铁蛋白量 (不使过量),则互补活性随着藻钼铁蛋白量的增加而提高。反之,固定藻钼铁蛋白量,改变菌铁蛋白量 (不使过量),活性也随着菌铁蛋白量的增加而提高 (表 2)。

以上结果为我们提供了初步的实验依据,证明棕色固氮菌的铁蛋白与固氮鱼腥藻的钼铁蛋白是可以互补的,固氮鱼腥藻粗提取液的失活可能是由于铁蛋白失活,从而丧失了酶的固氮功能。对比起来,柱孢鱼腥藻的钼铁蛋白组分在非细胞形态下是较为稳定的。

我们也进行了另一种组合——菌钼铁蛋白与藻铁蛋白的互补,结果未检出活性。但由于分离之前的藻提取液也不表现活性,因此对于这样一种互补关系是否具有固氮功能的问题,显然是无法判断的。

实验中发现,在相同条件下,细菌本身两个酶组分的重组活性总是高于异源组合(表 2),与 Dahlen 等^[4]在细菌方面的观察相一致,意味着不同来源的固氮酶之间互补反应是局限性的。或者进一步说,异源组分之间的亲和性比同源组分之间要低得多。表 1 列出的十次藻菌组合实验中,唯一呈现负反应的一项恰是藻提取液呈现活性的一次,也许这不是偶然的,它暗示同源酶组分在与异源酶组分的竞争中排斥了异源互补功能。

从 Detroy 等及 Kelly 的很多实验结果看来^[2,3,5,6],因生理类型的异同,有些固氮生物酶组分之间可以交叉互补(例如多粘芽孢杆菌和肺炎克氏杆菌),有些彼此不能交叉互补(例如棕色固氮菌和巴氏梭菌),而有些只限于一种组分可以互补。我们认为除了生理上的原因外,还可能与进化程度有关。Smith 等^[9]的实验发现,柱孢鱼腥藻的钼铁蛋白与绿色假单胞菌的铁蛋白之间的互补是正反应,而反过来是负的,反映出蓝藻的铁蛋白在藻菌之间没有共同性,即蓝藻的铁蛋白在功能上可能有了更高层次的特化。在另一方面,有资料表明,不同来源的钼铁蛋白则有较大的共同性。例如不同来源的钼共因子(Mo cofactor)可以活化棕色固氮菌突变种没有活性的组分 I^[8],钼铁蛋白可以与硝酸还原酶组分装配产生有活力的硝酸还原酶^[7]。这表明,钼铁蛋白在进化上有一定的保守性或保留了它的共同性。

在各种处理的对照实验中,省略底物(C₂H₂)或活性需要物(ATP,肌激酶)的样品都没有检出活性或只有极少活性。但在氧敏感试验中情况完全不同。把藻提取液与藻组分 I 曝气 10 分钟,然后与菌铁蛋白组合,在八次试验中有六次结果其活性不是降低而是高于不作任何处理的正常互补活性(表 1, 2)。其出现率达 75%。考虑到这种实验结果有相当高的重现性,这种异常现象的出现不是偶然的,可能意味着实验材料含有干扰性的污染物质。如已熟知,在固氮酶组分的滴定试验中,通常会观察到过量的酶组分 I 对重组活性的抑制作用。对这种现象的解释不尽一致。Vandecasteele 和 Burris 以巴氏梭菌为材料对此进行过专门研究^[10]。他们发现,与固氮作用造成对照的是,ATP 水解作用不被过量的酶组分 I 所抑制。另外,如果将钼铁蛋白充分纯化,去除氢化酶,抑制现象就不再出现。根据这些结果,他们认为抑制现象是由污染的氢化酶(hydrogenase)的竞争引起的。在我们的试验中,所用的材料是藻的粗提取液和纯度不够高的藻钼铁蛋白,看来也难免有氢化酶的污染。由于氢化酶的氧敏感性比钼铁蛋白高得多,在 10 分钟的曝气处理后,它无疑会比钼铁蛋白的失活比例大得多。这意味着降低或解除了抑制作用,从而造成互补活性增高的现象。

对于这种现象的另一个可能的解释是:不充分的曝气处理使藻的钼铁蛋白发生了一定的构形变化,使之更有利于同菌铁蛋白相匹配。

然而若要最终弄清它的真象,还必须作更多的试验。其中应包括同源重组的曝气处理试验,多种固氮生物酶组分曝气处理后的互补试验,以及不同的曝气时间等等。特别应该采用高度纯化的酶组分作为实验材料。为了对藻菌固氮酶组分的互补功能作出准确的定量说明,高纯度的材料也是必不可少的。

表1 藻粗提取液与

实验	AaCE			AvII			AaCE+AvII	
	蛋白量 (mg)	峰高 (mm)	比活	蛋白量 (mg)	峰高 (mm)	比活	峰高 (mm)	比活
1	1.74	0	0	0.72	83	1.24	268	4.00
2	2.65	0	0	1.30	314	2.60	594	4.91
3	2.80	0	0	0.55	26	0.51	268	5.24
4	2.80	0	0	0.55	47	0.61	167	2.18
5	1.40	0	0	1.20	0	0	15.5	0.09
6	1.60	82.5	0.37	2.10	150.5	0.51	97.5	0.33
7	1.96	0	0	1.35	430	2.28	824	4.37
8		0	0	2.05	1030	3.60	1430	5.00
9		0	0	1.25	120	0.69	180	1.03
10		0	0	3.30	47	0.10	63	0.14

注: 1.比活以毫微克分子乙烯/mg 蛋白/分表示; 2.以上各项峰高均已减去空白值; 3.在组合时,藻提取液——棕色固氮菌钼铁蛋白, AvII——棕色固氮菌铁蛋白, ATP——三磷酸腺苷 CK——肌激酶。

表2 藻钼铁蛋白与

实验	AvII			AvII+AaI*		AvI+
	蛋白量 (mg/ml)	峰高 (mm)	比活	峰高 (mm)	比活	峰高 (mm)
1	0.55	47	0.61	62.8	0.82	
2	1.35	430	2.28	734	3.90	
3	1.35	430	2.28	294	1.56	
4	2.05	1030	3.60	1530	5.35	
5	2.05	1030	3.60	1410	4.93	
6	0.90	0	0	22	0.18	48
7	3.30	47	0.10	123	0.27	
8	3.30	25	0.05	59	0.13	
9	1.36	88	0.46	460	2.42	7600
10	1.36	88	0.46	154	0.81	320
11	1.27	588	3.32	774	4.37	
12	1.46	660	3.24	910	4.47	1520
13		1720		3180		
14		1720		3660		

注: 1.比活以毫微克分子乙烯/mg 蛋白/分表示; 2.以上各项峰高均已减去空白值; 3.在互补反应时,藻钼铁

菌铁蛋白的组合

增加倍数	AaCE+AvII(曝气)		AaCE(曝气)+AvII		AvI+ AaCE 活性	AaCE+ AvII- C ₂ H ₂ 活性	AaCE+ AvII- ATP 活性	AaCE+ AvII-CK 活性
	峰高 (mm)	比活	峰高 (mm)	比活				
3.23								
1.89					0			
10.30								
3.55	0	0						
	25	0.143	2.5	0.015		0		0.075
	32	0.11	181	0.62	0		0	
1.92	0	0	1214	6.44				
1.39	240	0.84	1580	5.52				
1.50			360	2.06				
1.34								

用量 1ml, 菌铁蛋白用量 0.5ml; 4. 反应时间为 20 分钟或 30 分钟。AaCE——固氮鱼腥藻无细胞抽提液, AvI

菌铁蛋白的互补活性

AvII	AvII(曝气)+AaI		AvII+AaI(曝气)		AvI+AaI 活性	所用的藻钼 铁蛋白浓度 (mg/ml)
比活	峰高 (mm)	比活	峰高 (mm)	比活		
						1.50
			484	2.57		1.50
					0	0.37
	0	0	1680	5.87		0.31
0.38						1.56
40.04						5.0
1.69						5.0
			588	3.32		4.2
7.46						4.2
						1.9
						4.0

蛋白与菌铁蛋白各用 0.5ml; 4. 反应时间为 30 分钟。——AaI 固氮鱼腥藻固氮酶的组分 I。其他代号同表 1。

参 考 文 献

- [1] Dahlen, J. V. Parejko, R. A. and P. W. Wilson, 1969. Complementary functioning of two components from nitrogenfixing bacteria. *J. Bacteriol.*, **98**:325—326.
- [2] Detroy, R. W. Witz, D. F. Parejko, R. A. and P. W. Wilson, 1967. Complementary functioning of two components required for the reduction of N_2 from four nitrogen-fixing bacteria. *Science*, **158**:526—527.
- [3] Detroy, R. W. Witz, D. F. Parejko, R. A. and P. W. Wilson, 1968. Reduction of N_2 by complementary functioning of two components from nitrogen fixing bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **61**: 537—541.
- [4] Eady, R. R. and J. R. Postgate, 1974. Nitrogenase. *Nature*, **249**(5460): 805—810.
- [5] Kelly, M., 1969. Some properties of purified nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **171**: 9—22.
- [6] Kelly, M., 1969. Comparisons and cross reaction of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*; *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus polymyxa*. *Biochem. Biophys., Acta*, **191**:527—540.
- [7] Lee, K. Y., Pan, S. S. Erickson, R. and A. Nason, 1974. Involvement of Molybdenum and iron in the *in vitro* Assembly of assimilatory nitrate reductase utilizing *Neurospora* mutant nit-1. *J. Biol. Chem.*, **249**(12):3941—3952.
- [8] Shah, V. K. and W. J. Brill, 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**(8):3249—3253.
- [9] Smith, R. V., Telfer, A. and M. C. W. Evans, 1971. Complementary functioning of nitrogenase components from a blue-green alga and a photosynthetic bacterium. *J. Bacteriol.*, **107**:574—575.
- [10] Vandecasteele, J. P. and R. H. Burris, 1970. Purification and properties of the constituents of the nitrogenase complex from *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.*, **101**:794—801.

COMPLEMENTARY FUNCTIONING OF NITROGENASES OF ANABAENA AZOTICA AND AZOTOBACTER VINELANDII

Biochemical and Genetic Section, Laboratory of Phycology,
Institute of Hydrobiology, Academia Sinica

Abstract

The complementary functioning of cross components of nitrogenases of the blue-green alga *Anabaena azotica* (HB 686) and of the strictly aerobic bacterium *Azotobacter vinelandii* was studied. Preliminary results showed that the addition of Fe-protein from *Azotobacter vinelandii* to the cell-free crude extract of *Anabaena azotica*, in which the nitrogenase activity is very low or even barely detectable, may promote the nitrogenase activity of the latter.

Component I (Mo-Fe-protein) of *A. azotica* when crossed with Component II (Fe-protein) of *A. vinelandii* gives a positive nitrogenase reaction, although the reciprocal cross does not. The Fe-protein of nitrogenase of *A. azotica* is highly labile and may become inactive even just after being separated. The cross reaction between the nitrogenase of blue-green alga and aerobic *Azotobacter* is reported here for the first time. This finding implies that the functions of the components of nitrogenases for different kinds of nitrogen-fixing organisms at various evolutionary levels may be quite similar.