

# 电子供体及受体对棕色固氮菌抗氨阻遏能力的影响\*

黄河清<sup>1,3</sup> 孙耀东<sup>1</sup> 林庆梅<sup>2</sup> 唐 华<sup>1</sup> 翟文景<sup>1</sup>

(厦门大学生物学系<sup>1</sup> 环境科学研究中心<sup>2</sup> 固体表面物理化学国家重点实验室<sup>3</sup> 厦门 361005)

**摘要:** 电子供体连二亚硫酸钠、甲基紫精及电子受体亚甲蓝均能强烈抑制棕色固氮菌表达固氮活性, 并引起该菌的抗氨阻遏能力减弱。适当提高氧压, 能提高菌体的固氮活性近15%, 但过高的氧分压反而抑制菌体的固氮活性。此外, 提高氢分压能降低棕色固氮菌菌体内的还原电位, 从而达到提高菌体抗氨阻遏能力的效果。

**关键词:** 棕色固氮菌, 抗氨阻遏, 内环境电位, 固氮活性

中图分类号: Q617 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 04-0055-06

## EFFECT OF ELECTRON DONOR AND ACCEPTOR ON CAPACITIES OF AMMONIA-RESISTANT FROM *AZOTOBACTER VINELANDII*

HUANG He-Qing<sup>1,3</sup> SUN Yao-Dong<sup>1</sup> LIN Qing-Mei<sup>2</sup> TANG Hua<sup>1</sup> ZHAI Wen-Jing<sup>1</sup>

(Department of Biology<sup>1</sup>, Research Center of Environment Science<sup>2</sup>, State Key Lab. for Phys. Chem. of Solid Surface and Department of Chemistry<sup>3</sup>, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** Electronic donors dithionite as well as methyl viologen and its receptor methylene blue strongly inhibited activity of nitrogen fixation that *Azotobacter vinelandii* expressed, which caused capacity of ammonia-resistant weaken greatly. About 15% of total activity from the whole cell were risen by increasing suitable oxygen atmosphere. Opposite, the activity was inhibited by increasing over concentration of O<sub>2</sub> further. The reduction potential in the inside environment from *Azotobacter vinelandii* whole cell shifted to negative by increasing hydrogen pressure, which resulted in its capacity of ammonia-resistant rose.

**Key word:** *Azotobacter vinelandii*, Ammonia-resistant, Potential of inside environment, Activity of nitrogen fixation

近几十年来, 有关理化因子和铍盐等外环境因素影响固氮菌表达固氮活性的研究已有大量的研究并有详细报道<sup>[1-5]</sup>, 其中部分比较一致的观点认为; (1) 外加 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 盐 (氯化铵) 能迅速终止固氮基因 (*nif*) 的转录, 抑制固氮菌表达固氮活性。(2) 固氮微生物对氮的摄取量的高低受细胞膜电势的调控。(3) 把 *nifA* 基因质粒转移到固氮菌中能构建成具有抗氨阻遏特性的菌株。

本文侧重研究电子供体及受体对棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*, AV) 表达抗氨阻遏能力 (非遗传性) 的影响, 其研究目的是想了解 AV 细胞内固氮酶表达固氮活性所需的最佳氧化还原电位, 它为进一步探讨固氮酶催化还原成氨的机理提供新的研究

\* 福建省自然科学基金资助项目 (No. 96006)

收稿日期: 2000-01-10, 修回日期: 2000-09-08

思路和技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与菌体培养

AV-OP 菌株引自于美国威斯康星大学固氮研究中心。菌体发酵采用改良的 Burk 无氮培养基培养, 对数生长期或根据实验所需时间收集 AV 菌体。

### 1.2 方法

**1.2.1 气体及菌体蛋白分析:** 用 Folin 酚法测定 AV 菌体蛋白浓度 (测定波长为 650 nm)。

标准蛋白选用纯度为 98% 的牛血清白蛋白。反应体系中的含氧量、氢量及反应瓶中的恒定气压控制均用气相色谱仪 (热导池检测器, 层析分析柱内装有 5A 分子筛, 测定温度 25℃) 监测。

**1.2.2 AV 菌体抗氢阻遏的能力分析:** 根据实验要求, 分别均匀取出 3mL 菌液, 加到含有不同氢量和 1 mL 底物 (乙炔) 的 24mL 血清反应瓶中。菌体的固氮活性用气相色谱仪测定 (氢火焰检测器)。定量分析所需的乙烯标准物纯度为 99.8%, 固氮酶活性定量分析选用校正因子法。此外, 按作者<sup>[4]</sup>的方法配制不同剂量的聚乙二醇 (PEG), 并按上述方法测定 PEG 影响 AV 菌体的固氮活性。AV 菌体的耗氢量用蔡氏比色法测定。

**1.2.3 不同氢电位对 AV 菌体固氮活性及抗氢阻遏能力的影响:** AV 是一种需氧微生物。但由于 AV 胞内有一种氧保护蛋白, 它能起维持或控制菌体内细胞始终处于微氧环境的作用。因而, 外加过量的氢或其它氧化还原剂均能通过浓度扩散方式进入细胞内后, 并在较短时间内能使菌体细胞内形成不同的电位, 其电位不受微量氧浓度的影响。鉴于上述 AV 菌体内具有微量氧的内环境生理特性, 并参考 Lanne 等构建 AV 菌体的跨膜电位技术<sup>[1]</sup>及根据 Coremans<sup>[6]</sup>提出不同 H<sub>2</sub> 分压在吸氢酶反应体系中所形成的不同还原电位计算式, 即可得出在不同氢分压下 AV 菌体内的氢电位, 其结果见表 1。AV 菌体的固氮活性测定按 1.2.2 所述的方法进行。

表 1 在氢气及空气混合气中棕色固氮菌细胞内所形成的氢还原电位

H <sub>2</sub> /Air (atm)	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.40
标准氢电极电位 E (NHE) (mV)	-385	-397	-406	-412	-415	-419	-421	-425

**1.2.4 不同电子供体及受体对 AV 菌体固氮活性的影响:** 收集发酵菌液 100mL (固氮酶已经合成), 用定量移液管分别均匀取出 3mL 菌液, 并加入到事先配制有相同 (或不同) 氢量、1.0 mL 底物 (乙炔) 以及不同量电子供体 (受体) 于 24mL 血清反应瓶中, 均匀混合。菌体的固氮活性测定参考 1.2.2 方法。

**1.2.5 菌体胞内含有电子供体及受体的定性分析:** 取 3.0mL 菌液和 120μL 电子受体 (亚甲蓝, MB) 或供体 (甲基紫精, MV) 均匀混合并恒温 (30℃) 振荡 (120r/min) 1h。反应后, 迅速取出混合物, 离心 (1X4000g/min), 弃上清液, 并用 Tris-HCl (pH 7.25) / 0.25 mol/L NaCl 溶解菌体。此时, 溶有菌体的缓冲液呈淡黄色, 在可见光谱区中无特征吸收峰。然后, 再次将该样品放入恒温振荡器中振荡 30min 或直接破碎, 其胞

内游离的氧化或还原剂会逐渐从细胞内释放到介质中,其释放量可用常规分光光度法直接定性及定量分析。

## 2 结果

### 2.1 电子供体对 AV 菌体表达固氮活性的影响

图 1 表示不同氢电位对 AV 表达固氮活性的影响。根据表 1 和图 1 结果分析可知,随着反应瓶中的氢分压递增,扩散到菌体内的氢分压也随之增高,结果引起了菌体内的还原电位逐渐降低,促使菌体所表达的固氮活性提高了 27%。然而,当菌体内的氢电位位于  $-419 \text{ mV}$  ( $0.25 \text{ atm H}_2$ ) 至  $-425 \text{ mV}$  ( $0.40 \text{ atm H}_2$ ) 之间,此时菌体的固氮活性并没有随菌体内的氢电位负移而再次增加,反而略有降低。

图 2 结果表明了控制在  $-406 \text{ mV}$  (由  $10\% \text{ H}_2:90\%$  空气构成) 的还原电位下,不同  $\text{NH}_4^+$  浓度影响 AV 菌体表达固氮活性的变化趋势。从图 2 结果分析可得出两种变化趋势:(1) 当固氮反应体系中的  $\text{NH}_4^+$  浓度变化范围处于在  $0 \sim 0.6 \text{ mmol/L}$  之间, AV ( $\text{H}_2$ ) 菌体所表达的固氮活性比 AV 菌体所表达的固氮活性高,即前者(图 2A)的抗氮阻遏能力比后者强(图 2B)。(2) 当反应体系中的  $\text{NH}_4^+$  浓度处于  $0.6 \sim 1.0 \text{ mmol/L}$  之间,其所获得固氮活性及抗氮阻遏能力的变化趋势(图 2B)与图 2A 所获的结果正好相反。因而可知,当 AV 细胞内处于过低还原电位时,其电位直接影响 AV 表达固氮活性,并削弱该菌体的抗氮阻遏能力。

生物电子供体 MV 的中点电位分别为  $E_{\text{MVH}_2} = -640 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{MVH}} = -416 \text{ mV}$ 。图 3 结果表明,不同 MV 浓度对 AV 表达固氮活性的影响,从图 3A 结果分析可知,

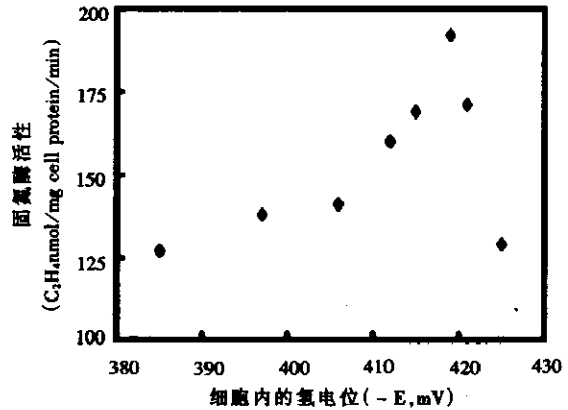


图 1 不同的氢电位对棕色固氮菌整体细胞的固氮酶活性的影响

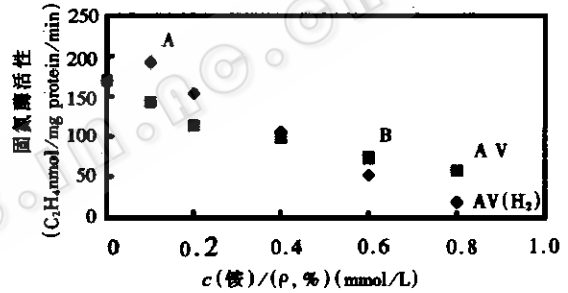


图 2 在控制  $-405 \text{ mV}$  ( $10\% \text{ H}_2:90\%$  空气) 电位下不同的铵浓度对棕色固氮菌固氮酶活性的影响

A  $\text{NH}_4^+$  浓度变化范围自在于在  $0 \sim 0.6 \text{ mmol/L}$  之间,  
B  $\text{NH}_4^+$  浓度变化范围处于在  $0.6 \sim 1.0 \text{ mmol/L}$  之间,  
AV 未加  $\text{H}_2$ , AV( $\text{H}_2$ ) 加  $\text{H}_2$

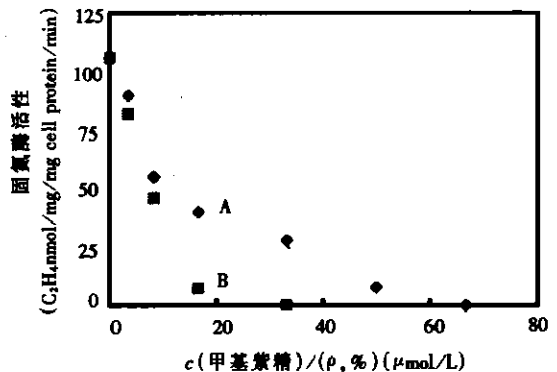


图 3 甲基紫精对棕色固氮菌整体细胞的固氮酶活性的影响

A 未加  $\text{NH}_4^+$ , B 在  $1 \text{ mmol/L NH}_4^+$  条件下

随着反应体系中的 MV 浓度递增, 由于浓度扩散作用, 使菌体内 MV 浓度随之递增, 其结果引起固氮活性迅速下降。当反应体系中的 MV 浓度高达  $65\mu\text{mol/L}$  时, AV 菌体就完全失去固氮活性。图 3B 结果指出: 在含有  $1\text{mmol/L NH}_4^+$  的培养基中, 由于  $\text{NH}_4^+$  和 MV 产生了双重抑制 AV 菌体表达固氮活性的作用, 因而使 MV 浓度仅达到  $35\mu\text{mol/L}$  时就能完全抑制 AV 菌体的固氮活性。

虽然低电位  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ( $E_{1/2} = -640\text{ mV}$ ) 是体外固氮酶进行固氮反应时所需的高效电子供体, 但我们的实验结果却表明,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  是 AV 菌体表达固氮活性的强抑制剂, 即使加入很微量的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  也能使 AV 菌体在极短的时间内完全丧失固氮活性及抗氮阻遏的能力。

### 2.2 电子受体对 AV 菌体表达抗氮阻遏能力的影响

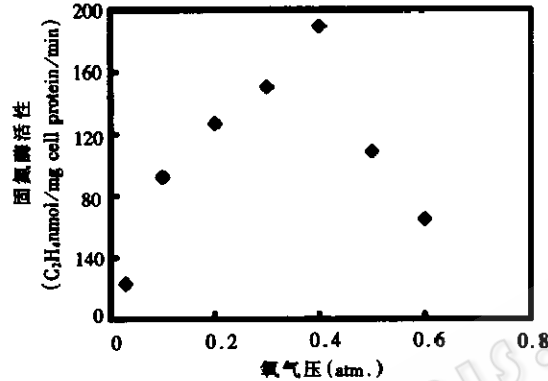


图 4 不同的氧气压对棕色固氮菌整体细胞的固氮酶活性影响

在多数好氧型微生物培养过程中, 氧气被作为电子受体的同时, 还能提高菌体的呼吸率, 从而影响菌体某些生理特性的变化。图 4 结果指出: 在  $0.02 \sim 0.21$  氧分压 (空气中的氧分压) 范围内, AV 菌体表达的固氮活性随着反应体系中的氧分压递增而相对应的增加, 其最高活性可达到  $120\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg cell protein}/\text{min}$ 。随着氧分压从  $0.21\text{atm}$  递增到  $0.40\text{atm}$  时, AV 菌体的固氮活性也随之再次提高, 其最大活性提高到  $200\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg cell protein}/\text{min}$ 。此时, 如果再继续递增氧分压到  $0.60\text{atm}$ , 此时菌体的固氮活性不仅无法继续递增, 反而下降到  $70\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg cell protein}/\text{min}$ 。

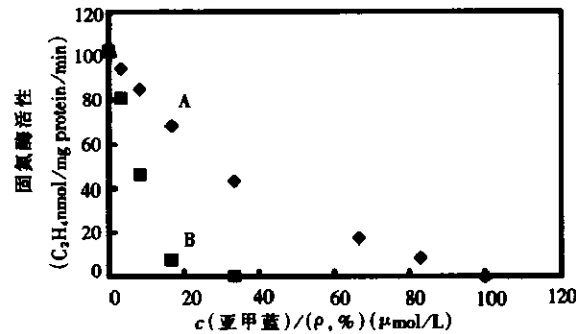


图 5 不同浓度的亚甲蓝对棕色固氮菌整体细胞的固氮酶活性的影响

A 未加  $\text{NH}_4^+$ , B 在  $1\text{mmol/L NH}_4^+$  条件下

$\text{NH}_4^+$  加速 MB 抑制 AV 菌体表达固氮活性的速率, 当培养基中的 MB 的浓度递增到  $35\mu\text{mol/L}$  时, AV 菌体也完全丧失去表达固氮活性的能力。

生物电子受体 MB 的中点电位为  $E_{\text{MB}} = +0.11\text{ mV (NHE)}$ 。图 5 表示不同 MB 浓度对 AV 表达固氮活性的影响。从图 5A 结果分析可知: 在固氮反应体系中, 随着培养基中的 MB 浓度递增, AV 菌体内 MB 浓度也随之递增, 因而使 AV 菌体内的氧化电位也逐步上升, 这一现象引起 AV 菌体所表达的固氮活性迅速下降, 当 MB 的浓度递增到  $100\mu\text{mol/L}$  时, AV 菌体就完全丧失去固氮活性。图 5B 结果表明, 在  $1\text{mmol/L NH}_4^+$  反应体系中,

### 2.3 聚乙二醇 (PEG) 影响 AV 菌体表达抗氮阻遏的能力

PEG 能修饰细胞膜上的蛋白质组份改变细胞的膜电位<sup>[5]</sup>, 并影响细胞膜吸收膜外离子的能。从而图 6 结果表明, PEG 也能抑制 AV 菌体的固氮活性, 其抑制强度与 PEG 分子量有关。当外加分子量为 20kD 的 PEG 浓度仅占于反应体系总体积的 9% 时, AV 菌体就完全失去固氮活性。而外加分子量为 6kD 的 PEG 占反应体系总体积 15% 时, AV 菌体仅仅失去原菌体固氮活性的 60%。因而可知, PEG 分子量越大抑制菌体的固氮活性程度就越强烈。

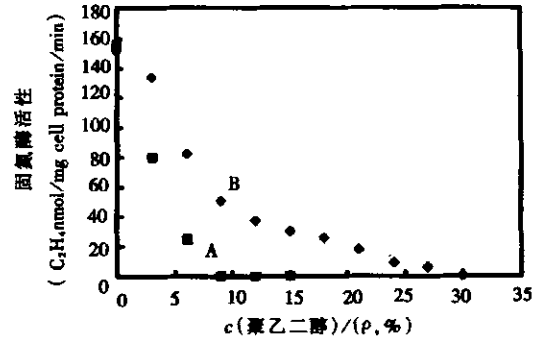


图 6 不同分子量的聚乙二醇对棕色固氮菌整体细胞的固氮酶活性

A PEG 分子量 20kD, B PEG 分子量 6kD

## 3 讨论

在体外, 固氮酶进行固氮反应时, 需要有强还原剂  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、ATP 及 ATP 再生系统, 其反应式<sup>[7]</sup>如下:



从反应式 (1) 分析可知, 在体外, 固氮酶进行固氮反应时需要低电位还原体系且消耗大量 ATP。可见, 高能量及强电子是固氮酶进行氮还原成氨的基础。适当地增加 AV 菌体内环境氢分压, 不仅仅只是降低菌体内的还原电位, 更重要的是作为氢能源被菌体所利用、从而提高菌体固氮活性及抗氮阻遏的能力 (图 1)。然而, 如细胞内环境所形成还原电位过低, AV 菌体就很可能失去利用氢能源的功能, 并选择其它新的电子传递途径, 因而造成固氮活性降低及菌体抗氮阻遏的能力减弱的现象 (图 1B)。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  和 MV 的中点电位比表 1 所示的氢电位低, 因而推测两者在 AV 菌体内形成的还原电位可能比氢分压所构成的电位更低, 尤其具有低电位电子供体特性的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  可能迅速地引起 AV 菌体内环境电位向负方向移动, 其移动的幅度大于 MV 及氢气所引起的移动幅度, 因而抑制固氮酶表达固氮活性强度最为强烈, 即使加入的量较微也能在短短几分钟内使 AV 菌体不可逆地丧失固氮活性。但是, 如果认为  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  不是通过改变菌体的内环境电位, 而是通过络合方式阻碍电子传递链传递电子给固氮酶或直接抑制固氮酶, 达到抑制固氮活性的效果, 那么上述的反应式 (1) 中所列出的体外固氮酶催化  $\text{N}_2$  转化  $\text{NH}_3$  的反应过程就不可能进行。因而作者比较倾向地认为  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  可能通过降低 AV 菌体内的还原电位方式抑制该菌体中的固氮酶表达正常的固氮活性。

从图 3、图 4 结果分析可知; 氧化剂 MB 也是通过引起 AV 菌体内环境电位向正电位方向移动的方式来抑制电子传递链向固氮酶提供电子, 造成 AV 菌体表达较低固氮活性或失活现象 (图 2~图 4)。鉴于上述结果和推论; 作者认为 AV 菌体内电位高低与该菌表达固氮活性强弱有着密切联系, AV 菌体表达固氮活性的最佳电位很可能位于 -380 ~ -420mV 范围内 (图 1)。

迄今为止, 完整细胞膜电位的测定技术仍处于探索之中。常用的间接测定法有: 高

子法、pH值法、电导法及直接电位法<sup>[8,9]</sup>。早期的研究已肯定 $\text{NH}_4^+$ 是AV菌体表达固氮活性的强抑制剂,其抑制原因之一与电子传递链及细胞膜膜电位有关<sup>[2]</sup>。因而,同样也可推测;AV菌体表达低固氮活性的起因(图1~图6)是由于 $\text{NH}_4^+$ 、MV(离子法)、MB和PEG通过扩散方式进入AV菌体内(用分光光度法测定)形成不同的内环境电位,改变了细胞的膜电位,从而提高AV菌体吸收 $\text{NH}_4^+$ 的速率,增强 $\text{NH}_4^+$ 抑制菌体表达固氮活性及限制菌体内合理地利用电子传递途径及能量,最终导致AV菌体丧失固氮活性。

虽然AV菌是一种好氧型固氮菌,但该菌体内含有一种氧保护蛋白,因而使固氮酶在进行固氮反应时始终处于微氧环境,无法形成高氧化电位的内环境,避免固氮酶被氧化而失活。此时,如果反应系统处于低氧状态,AV菌体只能进行低呼吸率且表达较低的固氮活性。如果提高氧浓度及增加菌体的呼吸量,AV菌体就能表达较高的固氮活性(图4)。然而,一旦反应体系中的氧浓度超过0.4 atm(或加入氧化剂MB)时,此时氧保护蛋白难于及时处理胞内的过量氧,引起菌体内氧化电位上升,造成菌体内的固氮酶被氧化失活或所表达出较低的固氮活性。显然,AV细胞内的氧化还原电位高低与该菌体所表达的固氮活性及抗氧阻遏能力有着对应的关系。

针对上述的研究结果与推论,作者认为:通过改变外环境电位就能达到影响棕色固氮菌的内环境电位的目的,从而影响或完全抑制菌体表达正常的固氮活性。此外,还认为AV菌体适合固氮反应的内环境的氧化还原电位变化范围很窄,并不是越低越好。虽然 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、MV、MB均是固氮菌进行固氮反应过程中的强烈抑制剂,但其抑制机理仍需要进一步研究。此外,电子供体(或受体)所构成的外环境电位与菌体内的内环境电位是否一致或有差异也仍需要进一步验证。

### 参 考 文 献

- [1] Lann C, Krone W, Konings W, *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 1980, 103: 39~46.
- [2] Kluskist J, Haaker H. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157: 148~151.
- [3] 邱元盛,程锐彦,莫小真,等.水稻根际联合固氮.北京:农业出版社,1991,397~402.
- [4] Huang H Q, Lin Q M, Zhai W J, *et al.*, of *Prtein Chemistry*, 2000, 19: 669~676.
- [5] 黄河清,翟文景,林庆梅,等.生物技术,2000,10: 1~3.
- [6] Coremans J M C C, Van Gardern C J, Albracht S P. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1992, 1119: 148~156.
- [7] Simpson F B, Burreis A. *Science*, 1984, 224: 1095~1097.
- [8] Huang H Q, Xu L S, Zhang F Z, *et al.* *J. of Protein Chemistry*. 1998, 17: 45~52.
- [9] 黄河清,许良树,张凤章,等.厦门大学学报(自然科学版)中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>