

生物固氮译文集

第二集

6-53

科学出版社

内 容 简 介

本书选译了近几年来国外有关固氮生物化学和化学固氮的评论性文章,以及几种固氮微生物固氮酶的分离、提纯、性质、结构与功能方面的研究报告,共 20 篇。

可供有关科研人员 and 高等院校师生参考。

生 物 固 氮 译 文 集

第 二 集

沈阳林业土壤研究所《生物固氮译文集》翻译小组译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1975 年 4 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1975 年 4 月第一次印刷 印张: 11 1/8

印数: 0001—2,950 字数: 255,000

统一书号: 13031·288

本社书号: 450·13—10

定 价: 1.20 元

译 者 的 话

生物固氮是生物科学研究的一个重要问题,日益受到各国的重视。近年来,国际上固氮生物化学研究进展迅速。无产阶级文化大革命和批林批孔运动以来,我国的化学模拟生物固氮研究,在毛主席的革命路线指引下,蓬勃兴起,发展很快。在固氮生物化学的研究方面,目前,不仅已将固氮酶的钼铁蛋白和铁蛋白两个组份分离提纯成均一的制剂,而且获得了钼铁蛋白结晶。

为了加快我国化学模拟生物固氮研究工作的进展,我们遵照伟大领袖毛主席关于“**洋为中用**”的教导,翻译了近年来国外有关固氮生物化学研究的一些文献资料,供同志们参考。

由于我们水平有限,在译文中定有不妥之处,希望读者提出批评指正。

一九七四年 四月

目 录

藻类的固氮.....	渡边 笃 (1)
生物固氮.....	R. W. F. Hardy, R. C. Burns (4)
生物固氮.....	J. R. Postgate (23)
固氮作用(着重生物化学).....	H. Dalton, L. E. Mortenson (29)
巴氏梭菌固氮系的二个组分, 钼铁氧还蛋白和氮铁氧还蛋白的提纯、金属组成和性质.....	L. E. Mortenson, J. A. Morris, D. Y. Jeng (62)
棕色固氮菌固氮酶的区分与保藏.....	M. Kelly, R. V. Klucas, R. H. Burris (68)
固氮菌固氮的电子传递系统 I. 氮黄素作为一种电子载体.....	J. R. Benemann, D. C. Yoch, R. C. Valentine, D. I. Arnon (71)
固氮菌固氮酶的冷不稳定组分的提纯.....	E. Moustafa (77)
巴氏梭菌固氮酶络合物成分的提纯和性质.....	J.-P. Vandecasteele, R. H. Burris (80)
棕色固氮菌固氮酶系组分的某些性质.....	Н. П. Львов, [В. И. Любимов], Б. Э. Кириштейн, М. К. Вейнова, В. Л. Ганелин, Н. С. Сергеев (88)
巴氏梭菌固氮酶的一个组分, 铁钼蛋白的提纯及其某些性质.....	H. Dalton, J. A. Morris, M. A. Ward, L. E. Mortenson (91)
一种热稳定性铁氧还蛋白, 解酒石酸梭菌的铁氧还蛋白的一级结构.....	M. Tanaka, M. Haniu, G. Matsueda, K. T. Yasunobu, R. H. Himes, J. M. Akagi, E. M. Barnes, T. Devanathan (99)
用葡聚糖上的凝胶过滤法分离固氮酶成分和它的四级结构.....	Г. И. Слепко, А. М. Узенская, В. Р. Линде, Л. А. Левченко (112)
棕色固氮菌固氮酶组分结构与功能的研究.....	Л. А. Сырцова, Л. А. Левченко, Е. Н. Фролов, Г. И. Лихтенштейн, Т. Н. Писарская, Л. В. Воробьев, В. А. Громогласова (117)
蓝绿藻与光合细菌固氮酶组分的互补功能.....	R. V. Smith, A. Telfer, M. C. W Evans (125)
固氮酶催化的反应.....	J. C. Hwang, R. H. Burris (127)
巴氏梭菌 W5 固氮酶的结构与功能.....	W. G. Zumft, W. C. Cretney, T. C. Huang, L. E. Mortenson, G. Palmer (136)

棕色固氮菌固氮络合物组分 I 中钼肽的分离和性质.....	
.....В. Л. Ганелин, Н. П. Львов, Н. С. Сергеев, Г. Л. Шапошников (140)	
肺炎克氏杆菌的固氮酶组分蛋白的提纯及性质.....	
..... R. R. Eady, B. E. Smith, K. A. Cook, J. R. Postgate (142)	
巴氏梭菌W5和棕色固氮菌 OP 的固氮酶和固氮酶组分的电子顺磁共振	
..... W. H. Orme-Johnson, W. D. Hamilton, T. L. Jones, M.-Y. W. Tso, R. H. Burris, V. K. Shah, W. J. Brill (167)	

藻 类 的 固 氮

——提出结晶的铁氧还蛋白——

渡边 笃

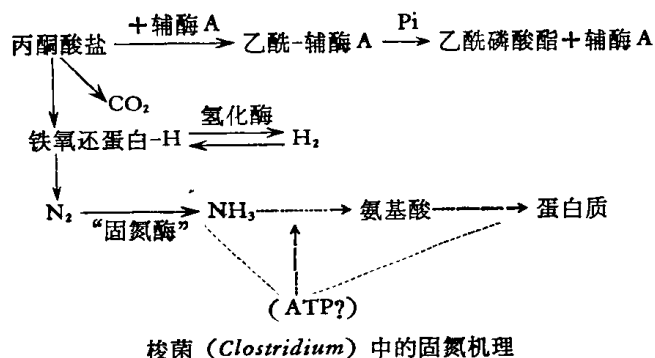
藻类的种类很多,既有海藻,也有淡水藻,还有象绿藻那样的微细藻,但它们之中没有一种能固定游离的氮。藻类中有固定能力的只有蓝藻。

蓝藻保持有藻类最原始的性状,即无核,它是用自身分裂的方式进行繁殖的,故又名分裂藻,把分裂菌(细菌)合起来,统称为分裂植物。所以,除蓝藻外有固氮能力的生物主要是细菌,固氮是分裂植物常有的一个特征。

蓝藻的种类很多,有一千余种,其中有固定能力的不过二十多种。这些蓝藻的固氮能力和细菌相比是非常低的,那是因为蓝藻的发育速度慢。把固氮蓝藻小单歧藻(*Tolypothrix tenuis*)及眉藻(*Calothrix brevissima*)放在100毫升的无氮培养液(K_2HPO_4 0.3克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2克, $CaCl_2$ 0.05克, $FeCl_3$ 微量, Na_2MoO_4 微量,葡萄糖2克,水1000毫升)中,在日光照射下,培养30天,固定氮的量是9.6毫克及5.2毫克。但如果从无氮培养液中除去葡萄糖,固氮量约降低三分之一。

关于以蓝藻为原料的固氮机理的研究,和细菌相比,现在是太少了。原因之一是蓝藻的发育慢。近年来,由于无细胞提出物制备方法的进步,打开了固氮机理研究的新局面。在1959年, Schneider 等人从柱孢鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)、苔念珠藻(*Nostoc muscorum*)、壳状眉藻(*Calothrix parietina*)、棘疣胶刺藻(*Gloeotrichia echinulata*)及薄氏鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus*)等五种蓝藻中,得到了有固氮能力的无细胞样品。例如,用超声波处理藻体数分钟,由破碎的样品经区分离心得到的样品,证明了有固氮能力。蓝藻在暗处几乎不能固氮,已知在固氮过程中必须有光,最近 Fogg 等人(1954年),由于把柱孢鱼腥藻的无细胞样品离心,从而得到了保持叶绿素及胡萝卜素的光合成活性很强的区分,认为这个区分具有最强的固氮能力。这大概是由光化学生成的某些还原物质及由于光化学磷酸化效应生成的ATP,可能不是使氮还原。但是关于蓝藻固氮机理的详细情况尚不十分明了。

在细菌方面,关于固氮机理的研究,最近甚为发展。Mortenson 等人对于巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*), Barris 等人对于红色红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*), Nicholas 等人对于棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)证明由无细胞提出物固氮都获得成功,特别是 Mortenson 等人经分离巴氏梭菌得到了“固氮酶”及含铁低电位蛋白的铁氧还蛋白,固氮机理的详细情况正在被认识。于是,氢从作为氢供给体的丙酮酸首先移向铁氧还蛋白,其本身在辅酶A的存在下,变成为 CO_2 和乙酰-辅酶A。生成的还原型铁氧还蛋白(铁氧还蛋白-H),由“固氮酶”的媒触作用,把氢供给 N_2 生成 NH_3 。如用图表示固氮机理,则如下图:



蓝藻的固氮机理,基本上不知道是否也和梭菌 (*Clostridium*) 的相类似。最近,由于铁氧还蛋白以结晶形式从蓝藻中被提取出来,铁氧还蛋白在蓝藻固氮中的作用,跟上述的光化学磷酸化反应和光化学还原反应的关系,我想将成为今后有趣的研究课题。

其次,是关于固氮蓝藻的应用问题。由印度开始,在缅甸、泰国那样的南方各地,水田中几乎不施肥,多数年年获得丰收。在1939年,De从印度的孟加拉地方的水田中分离培养了有固氮能力的蓝藻念珠藻(*Nostoc*),我想这是在水田中补充氮分的一个原因吧。1944年,盐入等,在日光下,在灌了水的水田土壤中繁殖蓝藻,发现比在暗处作对照的含氮量增高。还有奥田等,调查了日本各地的水田土壤,并分为四种类型进行报道:自然固氮蓝藻良好发育的土壤;由接种而发育的土壤;加入石灰等开始生长的土壤及几乎不生长的土壤。渡边等对于从缅甸、泰国、菲律宾、加里曼丹等南方各地得到的六百多种样品,进行了关于固氮蓝藻分布的调查,经分离得到十多种固氮蓝藻。其中,用纯培养可以得到加里曼丹产的固氮能力最大的蓝藻小单歧藻,用这个蓝藻,在农林省的援助下,由十几名助手,从1952年起五年中在各地进行了田间试验。其结果如下表:

固氮蓝藻小单歧藻的接种效果

试 验 地	实 验 者	稻 增 收 率 (%)				
		27 年	28 年	29 年	30 年	31 年
福冈农场	荻原	-4	17	56	44	11
埼玉农场	西垣等	2	15	30		
鸟取大学	细田等	8	20	18		
四国农场	平野	5	11	15	20	23
关东东山农场	城下等	0	3	11		
北陆农场	小西等	5	2	8		
爱知农场	藤堂	4	6	3		8
千叶农场	佐藤	-1	10	2	10	8
和歌山农场	田中	-1	-2	-7	4	3
全试验地平均		2.0	8.0	15.1	19.5	10.5

从表中可以看出,蓝藻的接种效果,因地点不同而有显著的差异。但如果看看全试验地的平均情况,即第一年为2.0%,第二年为8.0%,第三年为15.1%,第四年为19.5%,第五年为10.5%,可见在第四年前肥效有逐年上升的趋势。至于这个原因,现正在进行各种探讨。

这项研究在国外也正在进行,例如在1955年,Allen在美国用柱孢鱼腥藻,得到正的

结果。中国科学院水生研究所,用固氮蓝藻“水生”636号,获得了稻粒数增产20%、重量增产24%的效果,把这个蓝藻命名为“万年肥”。同时在印度,也发表了十多篇论文,举其中一例:1963年,Rao等用固氮蓝藻管链藻 (*Aulosira fertilissima*),获得了稻子增产267%,大米增产328%的效果。印度有碱性土壤的地方很多,由于气温高而不能施肥,所以对于蓝藻的固氮有十分理想的条件。就这点来看,将来蓝藻作为生物肥料而被实际应用,我想印度是最快的。

[译自化学と生物, 3(7): 21—22, 1965.]

生物固氮*

R. W. F. Hardy, R. C. Burns

绪 论

生物固氮就是由活生物体把氮还原为氨。这个反应从工业上的化学固氮所得到的帮助很少。生物固氮对维持生物圈中生命必需的固定氮素的稳定状态负着重要的责任。大家知道,维持氮的这种状态是蛋白质合成中的限制因素。由于世界上蛋白供应量不足的不断增长^[1],因此,在这一领域中特别强调对这一具有方向性的任务进行研究的迫切性。

和自然界中其它大多数基本反应不同,虽然氮的固定不是主要类型生物体的特性,但却几乎意外地广泛分布在微生物和植物-微生物共生体之间,它们除了具有还原氮的能力外,很少有共同之处。对这个还原反应起作用的酶系称为固氮酶(N_2ase)。我们定义 N_2ase 是一种多蛋白络合物,它们含有非血红素铁,不稳定硫化物和钼,并且催化:(a)不仅氮(N_2)的而且氧化亚氮(N_2O)、叠氮化物(N_3^-)、炔、氢氰酸(HCN)、其它腈和异腈的络合化和还原;(b) H_2 的释放;(c) ATP 相伴的水解。

同光合作用和氧化磷酸化这类有关的范围相对比,氮的固定在历史上引起的注意较少。由于难以获得适当的离体系统,因此以往的研究人员都局限于活体研究。除了威斯康辛大学仍继续探索(从 Fred 开始经 Wilson 与 Burris 扩展)外,只有极少数实验室参加了已成为这一领域近几年戏剧性进展之基础的那些生物学资料辛勤积累的工作(表1)。探索一种可重复的、可解释的并且不难检验的无细胞固氮系,以 Carnahan 等人^[2,3]的工作于1960年而告结束。他们借助于丙酮酸盐证明厌气菌巴氏梭菌的提出物固氮,这为以后许多的离体固氮工作奠定了基础。

在这篇述评中,我们企图把来自这些离体研究的资料整理成为一幅综合性的固氮酶图景,这就能够洞察固氮反应的机理和它与无机模型及氮络合物的关系,以便了解生化固氮知识的当前情况。现在已经可能按一个普通的固氮酶作用机理的独特性和显著的底物变通性,来考虑固氮酶反应。

最近关于固氮生物化学方面的述评包括 Carnahan 与 Castle^[4], Nicholas^[5], Mortenson^[6,7], Burris^[8,9], King^[10], Hardy 与 Knight^[11] 以及 Hardy 与 Jackson^[12] 的评述, Burns 与 Hardy^[13] 正在编辑中的专著。固氮生物学方面的述评有 Raggio 与 Raggio^[14], Jordan^[15], Fogg 与 Stewart^[16], Stewart^[17], Bond^[18] 的述评以及 Stewart^[19] 的一本书。Wilson^[20] 述评了固氮的历史发展情况。

* 1. 本评述调查的参考文献到1967年10月15日为止。

2. 使用的略语符号为: Fd (铁氧还蛋白), Fld (黄素氧还蛋白), N_2ase (固氮酶), DEAE (二乙基氨基乙基酯), CM (羧甲基), TPN⁺ (菸酰胺腺嘌呤二核苷酸), S^{2-} (不稳定硫化物), FMN (黄素单核苷酸), DNase (脱氧核糖核酸酶), RNase (核糖核酸酶), LHb (豆血红蛋白), tris (三羟甲基氨基甲烷), Mo-Fe 蛋白与 Fe 蛋白(固氮酶的钼铁蛋白和铁蛋白), MV (甲基紫精)。

表 1 离体固氮的最近进展情况

可重复的无细胞系	试验方法	新的电子载体	电子活化与传递
巴氏梭菌 ^[2,3] 蓝绿藻 ^[21,22] 多粘杆菌 ^[23,24] 棕色固氮菌 ^[25,26] <i>Klebsiella rubiacerarum</i> ^[27] 香杨梅根瘤 ^[28,29] 红色红螺菌 ^[26,30] 肺炎克氏杆菌 ^[31] 大豆根瘤浆 ^[32-34] 圆褐固氮菌 ^[35] 去黄弧菌 ^[36] 大豆与 ser. 根瘤类菌体 ^[37,38]	Conway 微量扩散法 ^[39] N_2 ^[40,41] 测压法 ^[42] C_2H_2 还原为 C_2H_4 后 的气相色谱分析法和 H_2 火焰电离法 ^[43-45]	铁氧还蛋白 分离 ^[46] 在厌氧代谢中的作用 ^[7,47] 结晶 ^[48] 在光合成中的作用 ^[48] 氧化还原势 ^[48] 组成 ^[49,50] 在固氮中的作用 ^[51,52] 结构假设 ^[53,54] 氨基酸顺序 ^[55-57] 初步 X 射线分析 ^[58] Fe 的置换 ^[59,60] 黄素氧还蛋白 分离 结晶 代替 Fd 的功能 组成 FMN 辅基 氧化还原势 ^[61-63]	丙酮酸盐作为底物 ^[2,3] 指出对能量的需要 ^[64] 丙酮酸盐的作用的确定 ^[42,51,65] 用 ATP 与 Fd 还原酶系代替丙酮酸盐 用 $Na_2S_2O_4$ 代替 Fd 系 ^[26,66,67] “需还原剂的 ATP 酶” ^[42,67-69] “需 ATP 的氢释放” ^[26,66,67,70] ATP/2e 的化学计量 ^[69,71,72,74] 从 ATP 消耗的 Pi 量 ^[69] 与可还原底物、产物或竞争性抑制剂无 关的电子活化 ^[43,69,73] 固氮酶需要 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白两种 组分 ^[72,75]
固氮酶组分	可还原的底物	无机模型	N_2 络合物
从下述菌种提出钼铁蛋白和铁蛋白: 巴氏梭菌 ^[71,75] 棕色固氮菌 ^[72] 多粘杆菌 ^[114]	N_2O ^[73] HCN ^[43,73,81] N_3^- ^[43,73,76] C_2H_2 ^[43,77,80] CH_3NC ^[81,82] 腈与乙炔的类似物 ^[82] 需 N_2 的 HD 合成 ^[83]	对 Vol'pin 与 Shur 固 N_2 系的桥式氢化钛学说 ^[84-87] 固氮酶的芳基二酰亚胺类似物 ^[88]	$[(NH_3)_5Ru(N_2)](BF_4)_2$ ^[89,90] $(N_2)RuCl_2(THF)_x$ ^[90] $(Ph_3P)_2(N_2)IrCl$ ^[92,93] $(N_2)Os(H_2O)_xCl_2$ ^[94] $(Ph_3P)_2(N_2)RhCl$ ^[95] $[(Ph_3P)_3Co(N_2)]$ ^[96,97] $[(Ph_3P)_3Co(N_2)H]$ ^[98] $Ni(N_2)$ (化学吸附的) ^[99] $B_{10}H_8(N_2)_2$ ^[100] $(PhN_2)BF_4$ ^[88] $(N_2)Mn$ 络合物 ^[101] $PhSN_2^+$ ^[102]

无细胞系

由于没有认识到固氮酶对 ATP 的需要,因而使证明离体固氮的早期企图遭到许多挫折^[103]。活体研究和理论探讨没有提供这一需要的线索,早期梭菌或蓝绿藻的离体系统也没有提供过。McNary 与 Burris^[64] 所观测到的葡萄糖-己糖激酶抑制梭菌提取物中的固

氮作用暗示了对 ATP 的需要。这在 1964 年被 Hardy 与 D'Eustachio^[51,65,104] 和 Mortenson^[42] 肯定和独立地证明并利用,他们都用 ATP 发生器和适当的还原剂代替丙酮酸盐。因此,这些研究人员除了看到丙酮酸盐氧化的电子供体作用外,并且认识到,磷酸裂解反应中释放的能量也是固氮所必需的,它通过细菌提取物中的辅助酶作用以 ATP 的形式到达 N_2ase 。

这一重要发现的一个直接结果就是 Bulen, Burns 与 LeComte^[25] 证明需氧生物棕色固氮菌制备物的固氮作用。后来利用这一生物进行的工作^[26] 结果导致亚硫酸氢盐作为极为普遍应用的一种 N_2ase 还原剂^[24,30,31,35,38]。棕色固氮菌所采用的方法补充了巴氏梭菌所发展的方法,形成把无细胞固 N_2 的研究扩展到广泛种类的固 N_2 系统的基础(表 1)。固氮研究中最普遍地使用巴氏梭菌与棕色固氮菌的提取物;目前,接近这项研究的其它流行的试验系统只有大豆根瘤系统。Bergersen^[32-34] 与 Sloger 和 Silver^[28,29] 用瘤浆取得的最初成果,由 Koch, Evans 与 Russell^[37,38] 借助于无细胞根瘤制剂的最新重要进展进行了改进,他们通过应用新的灵敏的乙炔测定^[43-45] 和用聚乙烯吡咯烷酮排除抑制性的酚化合物,获得了活性根瘤制剂。

由于缺乏重复性或者单纯缺乏兴趣,早期研究报告中似乎有希望的一些系统显然未被开发。它们包括 Arnon 等人^[105] 关于 *Chromatium* 制备物边缘固氮的一篇报道和 Nicholas 等人^[40,106-108] 关于棕色固氮菌提出物的多篇报告。红色红螺菌在产生可重复的制备物方面特别顽抗。Schneider 等人^[21] 利用对巴氏梭菌成功的方法证明了红色红螺菌制备物的固氮作用,以后 Bulen, Burns 与 LeComte^[26] 又成功地把对固氮菌发展的方法应用于红色红螺菌制备物;不过,这两种情况在重复工作中都遇到困难^[9,109]。Burns 与 Bulen^[30] 后来的操作方法比较可以重复^[111],但即使用这个方法后来也没有观察到起初报道过的高度一致性^[110,111]。

辅 助 蛋 白

铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白 细菌铁氧还蛋白(Fd)与黄素氧还蛋白(Fld)是可互相交换的电子传递蛋白,它们的形成和功能与固 N_2 相联系。其所以称为细菌铁氧还蛋白是由于它的含 Fe 成分、氧化还原功能和来源之故。我们不认为其它非血红素铁蛋白是铁氧还蛋白^[11]。黄素氧还蛋白因它含黄素和代替 Fd 的性能故这样称呼。这两种蛋白都是在 Du pont 中心研究部进行固 N_2 研究过程中发现的。在 1962 年, Mortenson, Valentine 与 Carnahan^[46] 报道了从巴氏梭菌固 N_2 提取物中分离出细菌 Fd。最近总结了 Mortenson, Hardy 与 Valentine 对这项工作的贡献^[11,12]。四年之后, Knight, D'Eustachio 与 Hardy^[61] 报道了从生长在正常水平 5% 铁上的同一细菌固氮提取物中分离出 Fld。

在厌氧细菌的电子传递中,细菌 Fd 起中枢作用^[7,47]。它通过磷酸裂解反应从丙酮酸盐接收电子并还原各种酶,包括 N_2ase 、TPN⁺ 还原酶以及氢化酶。细菌 Fd 还能偶联电子传递到高等植物光合系统中的 TPN⁺ 还原酶。黄素氧还蛋白在所有上述反应中以 30 至 170% 的等克分子效率代替离体的细菌 Fd。Knight 与 Hardy^[62,63] 推论生长在低铁培养基上的活细胞中, Fld 代替 Fd。

细菌 Fd 与 Fld 是已知把电子供给 N_2ase 的唯一的天然电子载体^[51,52,62](不过它们每一个都既不是 N_2ase 整体的一部分,也不限于固 N_2 细菌)。因此, Fd 与 Fld 都存在于生长在

N_2 或 NH_3 上的梭菌细胞提取物中。反之,只有 N_2 上生长的细胞才含有 N_2ase 。细菌 Fd 只在厌氧生物中被发现,而在需氧的、兼性或共生固 N_2 生物的固 N_2 提取物中却没有发现过。在提取物中,甲基紫精(MV)可以代替铁氧还蛋白与 Fld^[51]。来自 H_2 , KBH_4 或丙酮酸盐的电子被 Fd, Fld 或 MV 偶联于梭菌 N_2ase ,梭菌氢化酶-Fd 的制备物能把 H_2 偶联于需氧生物棕色固氮菌的 N_2ase ^[25]。尚无事实表明在这些载体与 N_2ase 之间是否存在中间产物。特殊的电子传递部分如 Fd 的 Fe—S 基团并不是必需的。在缺 Fd 与 Fld 的生物中,未鉴定的 N_2ase 的电子供体可能不同,这反映特定生物体的天然代谢方式。

细菌 Fd 与 Fld 除了与固 N_2 有关外,还有着功能上的和化学的特性。细菌 Fd 的下述特点:在厌氧代谢中的作用,取代机能相似但化学上不同的称为植物 Fd 的蛋白的能力;含有几乎等当量的 Fe、半胱氨酸和不稳定硫化物(S^{2-});被称为非血红铁蛋白的一组蛋白的成员;与工业采用相联系的易于分离以及低分子量刺激了如在表 1 中所列举的有成效的化学和物理研究^[11,117,120]。几种铁氧还蛋白的氨基酸排列顺序已被阐明,就 Fe—S 络合物来说,Blomstrom 等人提出了它的一种结构^[53,54]。X 射线研究还没有完善^[58]。这个结构对 N_2ase 是有意义的,因为似乎 N_2ase 也含有 Fe 与 S^{2-} 。由于 Fld 是已经知道的最小的黄素蛋白,并可大量地分离和结晶,因此它在黄素蛋白化学研究中必将极为有用,并且在黄素氧还蛋白合成上铁水平的差异的影响,对铁氧还蛋白在控制中提供了一个引人注目的问题^[63]。这样,研究固 N_2 作用不仅能洞察对 N_2ase 的天然电子供给,而且也增加了我们对其它领域的了解和进行研究的可能。

顺磁蛋白 1962 年,在棕色固氮菌的还原提取物中于 $g = 1.94$ 和 $g = 1.97$ 处,以及在巴氏梭菌的还原提取物中于 $g = 1.94$ 处,都观察到了电子顺磁共振谱(EPR)。Nicholas 等人^[121,122] 把 $g = 1.94$ 处的共振归因于还原型非血红铁蛋白,把 $g = 1.97$ 处的共振归因于 Mo^{5+} 。 N_2 减少了 $g = 1.97$ 处的共振幅度,但不被 He 减少。虽然后来有几个实验室进行了观察,但对 N_2ase 在其现有纯度状态下没有报道过 $g = 1.94$ 或 $g = 1.97$ 处的 EPR 共振。Shethna 等人^[123,124] 从棕色固氮菌分离出非血红铁蛋白,在 $g = 1.94$ 处给予一个共振讯号。Hardy 等人^[125] 从巴氏梭菌分离到一种相似的蛋白。固氮菌蛋白含有非血红铁和 S^{2-} ,在氧化态中于 280, 331, 420, 458 与 545 毫微米处有最大吸收,分子量为 25000 到 35000。梭菌蛋白每个分子大约有一个原子 Fe 和 S^{2-} ,氧化态中在 275, 333, 425 与 463 毫微米处有最大吸收,在 550 毫微米处有一平顶,还原态中在 $g = 1.93, 1.95$ 与 2.00 处有 EPR 讯号,分子量为 24000。虽然生长在 N_2 上的细胞的粗提取物一致含有二至三倍于在 NH_3 上生长的细胞粗提取物的共振讯号,但尚未得出直接地或间接地把这个蛋白与固氮作用关联的证据^[125]。这些蛋白不是 N_2ase 的铁蛋白。

豆血红素 豆科植物固 N_2 根瘤含有豆血红素(LHb),但在非豆科植物中 LHb 的存在尚未确定,在细菌中没有发现豆血红素^[18]。从大豆根瘤中豆血红素被分离结晶为两种蛋白,分子量为 15400 和 16800。已经报道过它的氨基酸组成和与 O_2 的结合^[126-132]。豆血红素位于类菌体(根瘤细胞中侵染细菌的多形形状)的外边。最近 Bergersen 与 Turner^[34] 以及 Koch, Evans 与 Russell^[37,38] 证明关于 N_2ase 定位在类菌体内部和固 N_2 作用的不需要添加 LHb 确凿地否定了 LHb 是 N_2ase 整体的一部分。然而,由于 LHb 只存在于具有固 N_2 活性的豆科根瘤中,因此表明 LHb 在豆科根瘤固 N_2 中仍起一个必需的但辅助性的作用。剩下的推定的作用包括把氮或氧传递给类菌体,或者通过作为氧的清除者的作用

防止氧的抑制^[9]。

固氮酶的描述

目前可以得到的大多数无细胞固氮酶制备物,只对巴氏梭菌与棕色固氮菌才完成了部分提纯和确定特性。希望技术上的进一步改善,将提供为确定特性所必需的均一制备物。

在 Mortenson 与 Bulen 及合作者的报告中,对固氮酶的性质作了最充分的描述^[71,72,75,109]。鉴于两类固氮酶的活性相似,所以这些精制的酶的性质也毫不意外地表现出明显的相似性。两类制备物都是冷不稳定的^[72,113],至少有两种蛋白的对氧敏感的酸性络合物是所有已知的固氮酶活性所必需的。一种蛋白含非血红铁、 S^{2-} 与钼,具有推定为 100000 至 120000 的分子量;另一种蛋白当其补充部分不存在时不稳定,它含非血红铁与 S^{2-} ,具有推定为 40000 至 60000 的分子量。从其它来源得到的 N_2ase 性质的有限资料支持这些酶将发现显示出上述性质的可能性。因此,所有来源的 N_2ase 全被 O_2 失活(见抑制剂项目),红色红螺菌的 N_2ase 是冷不稳定的^[30],非血红铁蛋白与大豆根瘤制备物的 N_2ase 活性有关^[38],多粘杆菌 N_2ase 被部分地区分为两个组分^[114]。

类似的精制技术一般可应用于固氮菌与梭菌提取物。精制用的热处理是一个例外,这一操作方法只对固氮菌^[35,69,70]和多粘杆菌^[114]才有效。Bulen 及合作者^[72,109]的方案提供了固氮菌 N_2ase 最高纯度的制备物:由离心部分地精制了的制备物用硫酸鱼精肼处理两次,一次除掉核酸,然后沉淀出 N_2ase ;在酶以磷酸纤维素处理使之溶解后,用凝胶过滤(P-200)色谱术进一步精制酶。在这些处理的过程中似乎不发生 N_2ase 的分段区分,但后来在 DEAE 纤维素上的厌氧色谱法用 NaCl 作逐步洗脱便产生了上面叙述的固氮酶的两个组分。Mortenson 最近的精制法^[112]是最初用 DNase 与 RNase 培育梭菌粗提取物,然后进行对固氮菌叙述过的硫酸鱼精肼和磷酸纤维素处理。后一种试剂代替了 Mortenson^[75]以前使用的羧甲基纤维素以除掉硫酸鱼精肼。与固氮菌制备物相反,这些制备物被葡聚糖(Sephadex) G-100 的色谱法分离成两个组分。Mortenson^[75]原先用以证实 N_2ase 两个组分性质的 DEAE 纤维素分段区分技术未被利用。Winter^[74]的一项新手续提供了梭菌固氮酶的一种快速的初步精制,它包括用 Sephadex G-25 的色谱法,用链霉素除去核酸以及用冷丙酮或乙醇沉淀 N_2ase 。显然,停止使用磷酸凝胶^[115]作为一种 N_2ase 吸收剂有利于上面已经述及的方法。尚未确定膨润土上吸收的有效性^[116]。

以上描述的手续提供了大约精制十倍的固氮酶制备物,比活性为每毫克固氮菌^[72,109]或梭菌^[112]蛋白每分钟还原 40 至 60 毫微克分子 N_2 ,比从其它来源提取的固氮酶高得多。虽然用分段区分过的制备物获得了更高的活性,但它们不能直接作比较,因为实验包括添加一种蛋白组分的限量到另一种不限数量的蛋白组分中,其条件与未分段区分系统不相类似。现有手续还没有把 N_2ase 的任一组分从它的互补组分或从混杂物质完全分离出来。一按达到的话,这类分离将容许进行从不同生物提取的组分定量和交叉相配,并取得有关各种来源的 N_2ase 之间类似性与差异性的有价值资料。在这个实验室的初步工作至多指明固氮菌与梭菌组分的最小交叉相配。

在固 N_2 研究中把命名标准化的企图没有得到普遍的成效。于是, Mortenson^[112]把梭菌 N_2ase 的高与低分子量蛋白分别称为钼铁氧还蛋白与氮铁氧还蛋白,而 Bulen 与 LeComte^[72]

则把固氮酶 N_2ase 的相应组分鉴定为酶 I 与酶 II。虽然 Fd 通常被用作 N_2ase 的还原剂, 但 Mortenson 的命名似乎不确切, 因为在 N_2ase 蛋白与 Fd 之间不存在共同的催化或结构联系。“铁氧还蛋白—钼铁氧还蛋白—氮铁氧还蛋白”反应系这一呆笨赘言恰好与酶 I 与酶 II 成鲜明对照, 但后一命名包含与所有通常观测不相一致的单一蛋白所引起的催化活性。因此, 我们支持简明描述的名称: N_2ase 的钼铁蛋白 (Mo-Fe 蛋白) 和铁蛋白 (Fe 蛋白)^[11,12]。使用这些术语将使今后固 N_2 文献中的混乱减到最小。

固氮酶反应

N_2 的活化无疑是 N_2ase 活性最有意义的生理状况, 但是对这一过程实际上一无所知。从最近对这种酶的研究所发现的东西, 是一强力的与变通性的氧化还原催化剂的概念, 它在整体反应中偶联 ATP 水解和电子传递, 称之为 N_2ase 反应, 如图 1 所示。借助于各种

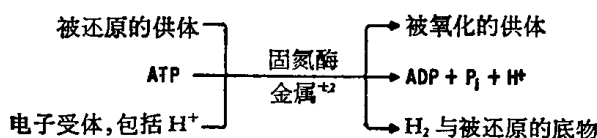


图 1 固氮酶催化的整体反应图解

实验方法, 利用从各种来源, 包括厌氧生物、需氧生物与共生体, 提取的 N_2ase 制备物, 在许多实验室中获得的资料提供了支持这一公式的证据。虽然公式的所有情节尚未利用每个系统予以证明, 但所有已报告的观测没有与这一公式不相符的。

还原剂、ATP、与二价金属正离子似乎是活性所必须的, 因为没有这些反应物的任何一种时, 观测不到指出的产物。反之, 添加的可还原底物不是酶活性所必须的, 它们也似乎不影响电子传递速率^[69]。加入的还原底物这一微不足道的作用, 可用在活化了的还原态 $N_2ase(X_{还原}^*$, 图 2) 的氧化中, 质子作为电子受体的明显能力来解释。这个能力是“需-ATP 的 H_2 释放”^[26,66,67,70] 与“需还原剂的 ATP 酶”^[42,67-69] 早先用于描述 N_2ase 活性的特殊状况的术语的基础。在添加的还原底物不存在时, $X_{还原}^*$ 便这样唯一地被氧化, 即使底物存在, 质子也成功地争夺由 $X_{还原}^*$ 取得的电子的一个实质部分。

ATP 固氮酶反应中 ATP 作用的研究仅提供了一种描述骨架, 在其内部最终必须确定 ATP 的作用机理。早期的工作确定, 当 ATP 通过保持低稳态水平的 ATP 和可忽略的稳态水平的 ADP 这样一种 ATP 发生系(如肌酸磷酸-肌酸激酶或乙酰磷酸-乙酰激酶)供给时, 固氮酶的功能最有效^[26,42,65,104]。底物水平的 ATP 产生抑制作用(见抑制剂项目)。Hardy 与 Knight^[69] 确定, ADP 与 P_i 是 ATP 的水解产物。Mortenson 用一个 ATP 发生系^[42], Burns^[110] 与 Hardy 及 Jackson^[12] 用底物三磷酸核甙, 并以 H_2 的释放或乙炔还原原来测定后, 发现固氮酶对 ATP 的专一性。ATP 的 K_m 大约是 3×10^{-4} 克分子浓度^[133]。

虽然采纳了 ATP 水解和电子传递是 N_2ase 活性相互依赖的两个状况, 但这一关系的数量表示还不一致。传递每对电子所水解的 ATP 的比率, 据报道, 它的数值位于 2 至 5 之间^[69,71,72,74,134], 最近的数值是 4 至 5。Winter^[74] 指出, pH 可能影响这个比率, 但与其他因素无关。这些比率由测定作为形成的氨或放出的氢或两者的电子传递和测定作为释放的 P_i 或水解的 ATP 发生器的 ATP 水解而得出。后一数值用在不加还原剂的对照反应混

和物中所观测到的数值来校正,而对照物中的水解完全是污染的 ATP 酶或 ADP 酶或两者一起所引起的。校正的正确性是可疑的,因为这些对照无效地刺激含有很低的稳定水平的 ADP,稳固上升水平的 P_i 和还原剂的氧化与还原两种状态的实验反应。在对照反应中探测到的这些变量对水解活性的作用尚未很好确定,不过用尿素生长细胞的提取物证明还原剂抑制的 ATP 酶可能是适当的^[69]。

不同实验室都研究过 N_2ase 的催化磷酸盐交换反应的能力^[157]。最近 Bui 与 Mortenson^[135] 以及 Kennedy 与 Mortenson^[136] 报道,梭菌 Mo-Fe 蛋白对制备物中每个 Mo 原子结合一个 ^{14}C -ATP。当使用 γ - ^{32}P -ATP 时,Mo-Fe 蛋白不结合任何放射性。它催化 $^{32}P_i$ 到 ATP 中的交换。 ^{14}C -ADP 与 Mo-Fe 蛋白的结合也存在,Hardy 与 Knight^[11] 观察到一种由部分精制的不需要还原剂的固氮菌 N_2ase 的 ADP- P_i 的强交换。Purdue 派提出 ATP 可与 Mo-Fe 蛋白反应生成一种高纯中间物 (Mo-Fe 蛋白)~ADP。这样一种络合物与 Du Pont 派公式化的机理符合,即 ATP 功能的一个可能方面是 ATP 给予一个好的残留基团,如 ADP 或 P_i (见假定的机理项目)的能力。

还原剂 亚硫酸氢盐仍然是唯一已知的非生物还原剂,在底物量活动并直接与 N_2ase 偶联,不需要电子传递剂,细菌 Fd, Fld 或 MV (见辅助蛋白项目)。对所有试验过的 N_2ase ,包括固氮菌^[26,35]、红色红螺菌^[26,30]、大豆根瘤类菌体制备物^[37,38]及梭菌^[66,67]的固氮酶而论,它是一种有效的还原剂。Burns^[134]关于亚硫酸氢盐参与的固氮菌 N_2ase 反应的定量测定表明,为氧化每分子 Na_2SO_4 有两个氢原子当量被传递给 N_2ase 。尚未鉴定出亚硫酸氢盐的氧化产物。对固氮菌^[133]与大豆类菌体^[38]的 N_2ase 而言,亚硫酸氢盐的 Michaelis 常数分别约计为 9×10^{-3} 克分子浓度和 8×10^{-4} 克分子浓度。

目前还不能解释所观测到的还原剂对 N_2ase 的专一性。一个低氧化还原势可能是必须的:细菌 Fd、 $Na_2S_2O_4$ 与 MV 除低氧化还原势之外很少有共同之处^[48,137]: -0.42 伏或更低;可是,Fld 具有较高氧化还原势, -0.28 伏^[63],它是一有效供体,而许多其它还原剂则不是^[26,69]。考虑到 N_2ase 的电子活化反应,将来的结果可能排除这个需要。严密地了解有关专一性获得的因素必须等到其它天然供体的发现和性质描述,以及对 N_2ase 的电子接受部位的性质的刻划。

正离子 N_2ase 对二价金属正离子的需要由 Mg^{2+} 最有效地来满足,但其它正离子包括 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 与 Ni^{2+} 也起作用^[68,69,133]。它们的各种组合都不产生协同作用。抑制离子包括 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} ,也可能包括 Ca^{2+} 。对底物水平的 ATP,当活性正离子达到 ATP 浓度的一半时最为有效,这表明,正离子作为一个 ATP 络合物而起作用。不过尚未提出过关于二价正离子作用的直接证据。

pH 当 pH 值接近中性时固氮酶活性为最大,梭菌 N_2ase 最适值略低于 pH7^[3,66],而固氮菌的则略高^[26,138]。对各种可还原底物观测到相似的最适值^[149]。数量有限的可资应用的数据表明,有效的 pH 范围约为最适值上下 0.5pH 单位,极端时活性降至约 50%。许多缓冲剂,包括磷酸盐^[2,3],tris^[69]、卡可基盐^[67]以及最近的 N-Tris (羟甲基) 2-氨基乙烷磺酸^[138]被使用于 N_2ase 。由 ATP-发生系供给的固氮酶包含一自动缓冲系统,因为 ATP 水解时所放出的 H^+ 在 ADP 磷酸化中被利用,和对未缓冲的反应混合物观测到了最适活性^[70];然而一般包括低水平的缓冲液。当用底物水平的 ATP 来供给 N_2ase 时,反应混合物很快通过在 ATP 水解中放出的 H^+ 而变成酸性;Burns^[139] 曾利用 pH 的降低速率作为测

定 N_2ase 活性大小的一种根据。

动力学 适应于 N_2ase 活性的生物物理数据主要地包括 Michaelis 动力学数值和抑制剂常数(另外讨论)以及酶的活化能数值(Burns, Hardy 与 Jackson^[45,133,140])。 N_2ase 的阿雷尼厄斯标绘在 18 至 20° 区域内呈现有一断裂;在断裂处的上边和下边分别指出每克分子 12000 至 14000 卡和每克分子 39000 至 54000 卡的活化能,但阿雷尼厄斯标绘中弯曲的意义还不确定。在可还原底物不存在下测得的活化能同任何一种被试验过的底物,例如 N_2 、 N_3^- 、 C_2H_2 、 HCN 与 CH_2NC 存在时测得的一样,这表明,在可还原底物络合位置上出现的事件与决定活化能的因子无关。因此,固氮酶对 N_2 的活化似乎既不是唯一的,也不是限速的,它与假定的多相化学催化剂的限速活化不同^[141]。

与活体反应的关系 离体反应中有两个方面特别引起注意,它们似乎违背了普遍承认的细胞经济学原则,而且在活体反应中未予证实。这就是 ATP 利用的高速率或 H_2 的释放。在 N_2 被 H_2 或还原态细菌 Fd 还原为 NH_3 的相应热力学观点看来,固氮作用中对能量的需要是出乎意外的^[141]。还原每克分子 N_2 消耗大约 20 克分子 ATP 似乎特别过多,这个消耗量在正常的厌氧条件下表明按理论只利用所供给蔗糖的 10—30%。在离体制备物中,一定存在着不良偶联的可能性,但活体中的高速率仍然是一种明显的可能。 N_2ase 制备物的进一步研究,可能澄清离体与活体固氮之间这一明显的异常现象,并且一定需要就整体细胞进行更有决定性的研究,特别是关于能量代谢与生长中所利用的氮源间的关系。

所有已知的固氮生物体,除固氮菌外,都放出氢,但难以把这一过程与固氮酶明确地联系起来,因为在这些生物中存在有氢化酶^[142]。也许氢的释放与固氮酶之间最好的活体相互关系用离体大豆根瘤^[158]与光合细菌能观察到^[143]。对于后者, Gest, Ormerod 与 Ormerod^[144]曾提议在红色红螺菌中有一种连接到氮代谢的需能放氢活性。

固氮菌不释放可测出的氢可能是来源于该微生物内存在着异常的氢化酶作用的缘故^[145],它不同于固氮酶^[70,83,146],前者欣然利用氢但显然不释放氢。固氮酶与这个氢化酶之间的密切偶联阐明了整体细胞缺乏可观察到的放氢作用。

固氮酶释放氢,这似乎不是由于用亚硫酸氢盐作为电子供体的一种人工引起的,因为用还原态铁氧还蛋白也曾证实了这个反应^[71]。

抑 制 剂

新近的资料弄清楚了 N_2ase 活性的各个方面容许把文献中鉴定为抑制剂的一些化合物重新分类^[142]。在描述为 N_2 的竞争性抑制剂的为数众多的化合物中,有许多现已证明被 N_2ase 还原,我们恰当地把这些分类为底物^[11]。底物还原的真正的竞争性抑制剂被认为是与底物络合位置(Y,图 2)相互作用的,但不被 N_2ase 还原的那些化合物。它们包括 CO 、 H_2 ,可能还有 NO 。已详细地检验了 CO 与 H_2 的抑制作用,其作用的竞争性质已被很好的证明^[38,146-149],虽然在高磷酸盐水平下与 H_2 竞争抑制的明显偏差尚未恰当地解释^[147]。 CO 的 K_i 值是 4×10^{-7} 克分子浓度; H_2 的抑制作用的 K_i 值分布在 0.4×10^{-4} 克分子浓度至 4×10^{-4} 克分子浓度的范围内。其特点是,这些抑制剂与可还原底物一样,当用 ATP 水解速率测定时既不影响 H_2 的释放^[66,67,70],也不影响电子活化或 N_2ase 活性的传递情

况^[67,69] (见固氮酶反应项目)。

抑制剂的第二个更广泛的范畴包括那些影响电子活化或传递或两者的化合物；它们大概不作用于底物络合的位置。这类抑制剂为数众多，它们的作用方式尚未很好确定。它们由当附加的可还原底物不存在时对 ATP 水解或 H_2 释放的速率的作用来鉴定。尚未证实这类抑制剂的可逆性，并且尚不能作出酶抑制作用与酶钝化作用之间的明确差别。

第二类型抑制作用曾以许多金属络合剂进行观测，例如邻-菲罗啉与试钛灵^[69,109]，高水平 ATP^[3,26,42,64,65,68]，硫赶抑制剂^[69]，高离子强度的条件^[3,26,133] 以及某些二价正离子，包括 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} ^[133]，可能还有 Ca^{2+} ^[69]。ATP 抑制作用好象部分地归因于所产生的 ADP 的抑制作用^[26]，还似乎与游离二价正离子的有效性有关联^[133]。高水平电解质，包括缓冲剂的抑制作用似乎对所有的盐不是专一的；一个可能的例外是磷酸盐，一种特别的抑制性盐^[137,147]，它是 N_2ase 反应的产物，因而比其它盐类可能显示更复杂的抑制作用。

一氧化氮(NO)形成的抑制类型是不确知的。它的抑制作用是可逆的，并且它似乎竞争地作用于底物络合位置上，但对它的作用尚未进行广泛的研究^[147]。曾报道过 4.3×10^{-7} 克分子浓度的一个 K_i 值。同样，缺少关于 MV^[26,137]，铁氰化物^[76]，硫赶试剂^[69] 以及 O_2 的抑制作用的数据，这妨碍着这些试剂的分类化，虽然 O_2 抑制作用的明显的不可逆性提示了它使酶钝化。就某些瘤浆来说， N_2ase 活性对 O_2 的需要^[28,29,32-34,38] 可能和对通过氧化磷酸化产生的 ATP 的需要有关，而不反映 N_2ase 对 O_2 的直接需要。固氮菌固氮酶在粗制备物中不受 O_2 的作用，但在精制过程中出现 O_2 敏感性^[72]。

可预料一些化合物显示专一抑制作用，但并不抑制它们的包括铵^[3] 和氧化或光合磷酸化的非偶联化合物^[69]。

底物的变通性

Hardy 及同事^[11,12,82] 最近描述固氮酶为已知最变通的均一的还原催化剂。最近两年

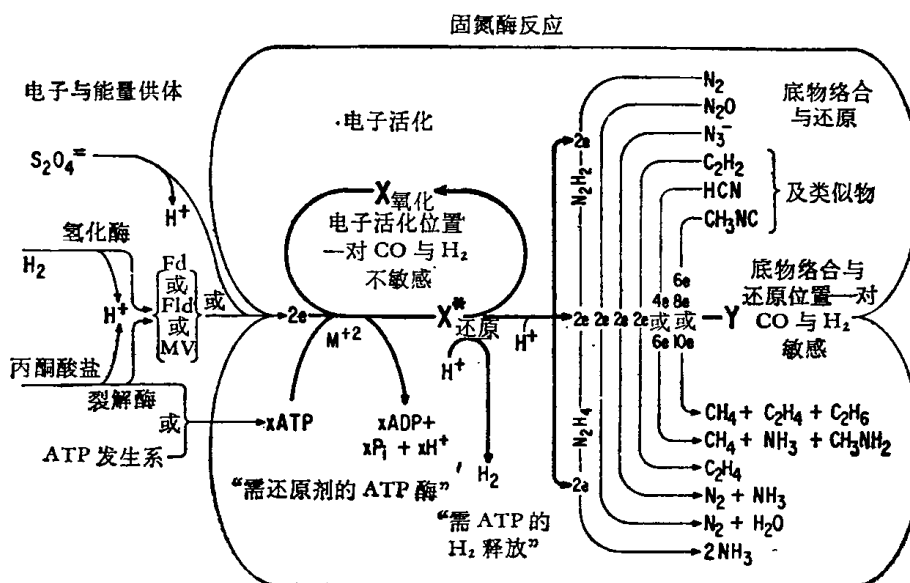


图 2 以电子活化两位置假说^[11,67] 为基础，固氮酶及其反应图解。

【注】 (1) 固氮酶= $Mo-Fe$ 及 Fe (2) 固氮酶的金属在 $X(Mo?)$ 与蛋白的活性络合物。 $Y(Fe?)$ 位置有功能作用。