

生物科学参考资料

第十二集

科学出版社

53
2

生物科学参考书目



内 容 提 要

本书共收集了 17 篇文章。主要内容有：生物固氮、抗体结合位置、阿片受体及其体内类似物、核糖体的中子散射研究、DNA 的复制、癌免疫学等等。可供生物学、医学和农业工作者参考。

生物科学参考资料 第十二集

*

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

*

1979 年 9 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1979 年 9 月第一次印刷 印张：9 1/2

印数：0001—7,630 字数：219,000

统一书号：13031·1108

本社书号：1558·13—6

定价：1.20 元

目 录

生物固氮	1
抗体的结合位置	16
阿片受体和体内的类阿片物	28
核糖体的中子散射研究	47
新的快速 RNA 凝胶序列分析法	60
关于染色质亚单位	66
DNA 复制问题的新鼓舞	72
DNA 的插入和基因结构	82
关于 DNA 重组的几个问题	86
在哺乳动物之间用染色体转移基因的技术	98
基因组为什么不共凝	102
癌免疫学	108
细胞培养对肿瘤促进剂研究的新进展	127
植物肿瘤诱导的分子学基础	129
微量金属在内分泌中的作用	131
睡眠的神经机制	140
血管紧张素的中枢性血管加压作用	146

生 物 固 氮

W. J. Brill

仅有少数细菌和简单的藻类具备一种细胞装置，能将空气中的氮“固定”成氨。它们是这种有限的农业资源的主要供给者。

A. L. Lavoisier 曾经把氮叫作“azote”，意思是“没有生命”，因为它不同于空气中的另一主要成份——氧，它不能维持生命有机体的代谢。这个名称结果是一个反语。氮是蛋白质的主要成份，我们现在知道，所有生命形式都需要大量的氮。的确，氮是植物和动物生长最普通的限制因子，如果不能满足农业对氮的需要，则有酿成人类饥饿的可能。

氮既是一个丰富的元素(约占地球大气的 80%)，又是一个缺乏的营养资源。这个自相矛盾的事实是不难解释的：空气中的氮是惰性气体，以致绝大多数有机体都不能利用它。只有当它被“固定”，或者与某些其他元素，如氢或氧，结合在一起时，氮才能进入生物体系。现在可以靠工业方法进行固定作用，用氢和大气中的氮生产出氨。氨以及由氮制

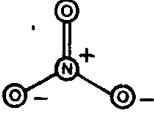
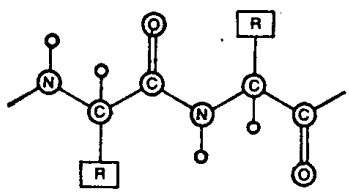
物质	分子式	结构
分子态氮	N_2	
硝酸离子	NO_3^-	
氨	NH_3	
肽 (蛋白质的基本结构)	$-NH-CH(R)-C(=O)-$	

图1 “固氮”是将丰富的、但属惰性的分子气体 N_2 转变为生活有机体能利用的化合物。生物固氮以及哈伯 (Haber) 法工业生产的最初产品都是氨。在土壤里和化肥中常见的另一固定的氮是硝酸盐。进入生物体系的氮，大部份制成蛋白质，它是由各种氨基酸以 C-N 键连接成的大分子。

得的其他化学肥料的生产,已经成为一个巨大的工业,但是大部分固定的氮还是来源于生物。

自然界只有几个细菌属有固氮能力。(在这些细菌中还包括几种蓝绿藻,现在将这族微生物归类在细菌里,称为蓝细菌。)虽然有些高等生物靠与固氮细菌共生,间接地参与固氮作用,但高等生物本身,都不具备固氮能力。最著名的共生关系是豆科植物与根瘤菌的共生,还有其他的固氮细菌与另外的寄主植物共生。土壤与水中还有许多自生固氮菌。少数菌能行光合作用;有些需要氧;另外一些则仅能在缺氧的条件下生长。所有这些菌具有一个共同的固氮机制,和工业生产一样,最初的产物是氨。它们也都具备一个独特的酶——固氮酶。我们正在揭示固氮酶的结构,研究它是怎样起作用的,以及如何控制它,并了解有哪些特征,用以区分具有固氮酶的有机体。这些知识非常重要,因为它涉及世界范围的生活水平。在过去几年里,肥料的价格急剧性地增长,影响了一些发达国家的食品价格,也限制了一些不发达国家的食物供应。如果能够了解细菌固氮活性,并加以改进,最终将它们转给其他生物,包括谷类作物,其结果将会减少对于氮肥的依赖性。

氮 的 化 学

大气氮素是两个原子的气体,也就是说,它的分子是由两个原子组成的,以 N_2 来表示。分子态氮是惰性的,因为连接两个原子的化学键强而且稳定。它是三价键,要破坏它,必须供给大量的能。

工业固氮所需要的能,是由地下燃料供给的。二十世纪初期, F. Haber 和 K. Bosch 所制定的方法,是在高温高压下,用含铁的催化剂,将大气中的氮与氢结合在一起,其产品是氨 (NH_3)。氨本身就是一种有效肥料,它也能转变为其他有用的氮化合物,如尿素和硝酸盐。

哈伯 (Haber) 法所需的氢是从天然气或石油中提取的,所以这种氮肥的价格主要与燃料的价格紧密相关。

在土壤里,从工业肥料,或者从自然界中得到的固定氮素,被植物根吸收,最终用于合成生物分子,其最大的份量进入蛋白质结构。蛋白质分子对生活细胞的新陈代谢负重大责任。蛋白质由氨基酸组成。氨基酸至少含有一个氮原子。一个典型的蛋白质可以由几百个氨基酸单位组成,其决定性的结构元件是肽键,它把一个氨基酸和另一个氨基酸连接起来。这个键将一个氨基酸的氮原子与另一个氨基酸的碳原子连接在一起。

植物和动物的排泄物及死亡组织进入土壤,其中的固定氮又回到土壤里,在土壤中,大部份氮可重新循环。蛋白质降解成氨基酸,进一步分解成氨或硝酸盐。这些物质又能被活根重新吸收。然而与植物根相竞争的有腐败细菌、反硝化细菌,它们能将固定的氮分解成分子态氮,返回至大气,而完成氮的循环。由于它们的活动,土壤中贮存的氮素必须不断地得到补充。在农业生产中,每次收获农作物时,含在作物中的氮素被拿走,使土壤中的固定氮大大的消耗掉。

靠无机过程每年有小量固定氮加入生物圈,例如汽车引擎、闪电、火山爆发形成的硝酸。比较大量的是哈伯法生产的氨,大约占全世界固定氮总量的四分之一。其余的则是细菌固定的氮,估计每年可达一亿五千万吨。

豆 科 植 物

早在固氮细菌或固氮作用被发现以前数世纪，固氮菌的活动就已为人类所利用。农

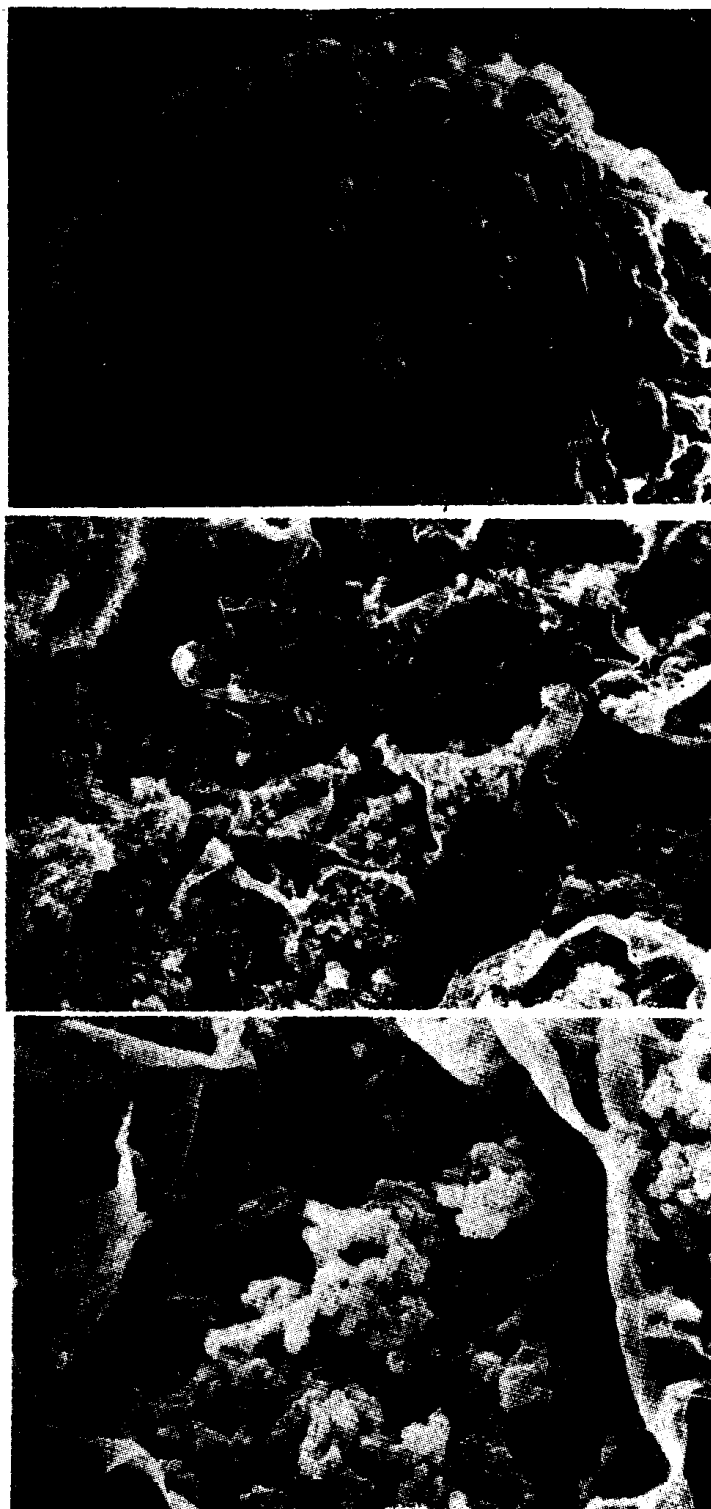


图2 由充满固氮细菌的植物细胞所组成的大豆根瘤。这套扫描电子显微镜图片，是由威斯康星大学作者实验室摄制的，从中可以看到逐级放大的单一根瘤。上图是一个小根瘤的多砾表面。中间的图片，根瘤已切开，暴露出其内部。在下图中，内部表面的一个小区被放大，可以看到大量的细菌正从一个破裂的植物细胞里溢出，这种细菌是大豆根瘤菌（*Rhizobium japonicum*）。它专门与大豆共生。豆科的其他植物藏有另外的根瘤菌种。豆科植物与根瘤菌共生，固定的氮占全部生物固氮的40%，实际上这里所指的仅是栽培植物固定的。

民有长期种植豆科植物——如大豆、花生、苜蓿、蚕豆、豌豆、三叶草——的经验。这些作物能恢复土壤肥力。现在知道,这种效应是由根瘤菌的固氮作用所引起的,它们在豆科植物上形成根瘤。栽培豆科作物可使用商品根瘤菌剂,以保证土壤中含有适当的细菌。豆科作物常与非豆科作物轮作,用这种方法,一季豆科作物生产的含氮物质,可作下一季谷类作物的肥料。不过为了得到最高的谷物产量,仍需施用化肥,但可减少它的用量。

根瘤菌通过根毛(一种专为吸收用的根表细胞)而进入豆科植物的根。根毛细胞壁内凹,而形成一个侵入线,其中包含很多正繁殖着的根瘤菌细胞。大部份侵染是失败的,但有少数能生长至根毛的基部,同时由于反复的内凹过程,而进入根的皮层细胞。最终,这侵染线的顶端破裂,将细菌释放到皮层细胞中,然后由这些细胞发展成球状膨大物,即一个根瘤。根瘤里包含着膨大的植物细胞,其中大多数装填着细菌。细菌产生的氨,与植物光合作用形成的含碳化合物结合成氨基酸,然后再合成植物蛋白质。

作为“侵入线”这名词,包含着这样的意思,即根瘤菌侵入豆科作物,类似一个病害的过程,但这是一个与植物合作的过程。如果植物能促使根瘤菌的入侵,这对植物是很有利的,但是排除所有其他细菌的侵入,其中有些可能是病原菌或寄生菌。这种差别待遇可通过化学标记体系来完成,靠这些标记物,植物和细菌可以互相辨认。

每种豆科植物与一个专一的根瘤菌种共生,例如:在大豆上形成根瘤的细菌,不会侵染苜蓿。负责这种专一性的辨认机制的第一个因素,于1974年被明尼苏达大学的 B. B. Bohlool 和 E. L. Schmidt 所发现。他们从大豆上验明了一个能与大豆根瘤菌(*Rhizobium japonicum*) (这种细菌能侵染大豆)的细胞相结合的蛋白质,而这种蛋白质不能与其他的根瘤菌种结合。佛罗里达大学的 F. B. Dazzo 和 D. H. Hubbell 接着发现另外一个蛋白质,似乎对三叶草和侵染三叶草根的三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii*)也具有同样的关系。他们把这种蛋白质叫三叶草素(trifoliin)。

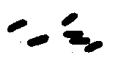
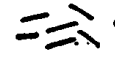
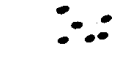
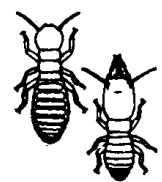
Dazzo 在威斯康星大学的固氮研究中心继续他的工作,他最近指出:在三叶草根毛表面,开始侵染的部位,发现了三叶草素。他进一步指出:三叶草素与正在侵染的三叶草根瘤菌表面的多糖结合,而不与其他根瘤菌种的表面多糖结合。

从这些实验得出一个似乎有理的假说:三叶草素在细菌和植物之间起连接作用。利用标记的抗体分子进一步研究,指出了关于三叶草素连接植物根和细菌表面的部位。很明显,这两个连接部位在抗原方面是相似的,也就是说,他们对相同的抗体分子都有亲和力。虽然这种相似性的意义目前尚不了解,但功能类似的现象是知道的。例如:有些病原菌的表面,在结构上和哺乳动物细胞的表面相似。寄主能正常地清除入侵微生物,但由于这种模仿作用有时可能被蒙骗。

非根瘤菌固氮

豆科植物与根瘤菌的共生是生物固氮的最高度发展,也是最使人迷惑的体系,但它不是唯一的体系。例如:赤杨树(在美国西北部很普遍的一种坚硬的木材品种)的根瘤里就囊包着固氮菌,这些菌不像豆科植物的根瘤菌。另一种共生体包括一种小的水生羊齿植物和一种既能行光合作用又能固氮的蓝细菌。蓝细菌占驻羊齿植物叶子的孔隙,提供营养使这种羊齿植物能在缺乏固定氮的水里繁殖。越南农民利用了这种水藻的能力,让满

江红生长在用水淹没的水稻田里。这种羊齿植物也可能生长在池塘里,收集起来可当作含氮丰富的肥料。

自 生 细 菌					
固 氮 生 物	 AZOTOBACTER VINELANDII	 CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM	 KLEBSIELLA PNEUMONIAE	 RHODOSPIRILLUM RUBRUM	 CITROBACTER FREUNDII
共 生 生 物	无	无	各 种 各 样 的	无	 白 蚁
天然栖息地	通气的土壤	不 通 气 的 土 壤	通气和不通气的 土壤; 水; 也和 植物与人共生	污水池表面 (一种光合细菌)	白 蚁 肠 道

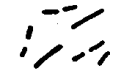
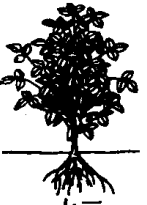
共 生 细 菌					
非 豆 科			豆 科		
 FRANKIA ALNI	 NOSTOC MUSCORUM	 ANABAENA AZOLLAE	 RHIZOBIUM JAPONICUM	 RHIZOBIUM TRIFOLI	 RHIZOBIUM MELILOTI
 赤 杨	 GUNNERA MACROPHYLLA (热带野草)	 满江红 (水生羊齿)	 大 豆	 三 叶 草	 苜 蓿
赤 杨 的 根 瘤	在茎里 一种蓝细菌	在叶子的 气孔里 一种蓝细菌	大 豆 根 瘤 里	三 叶 草 根 瘤 里	苜 蓿 根瘤里

图3 固氮生物包括几个属的细菌和蓝细菌,或蓝绿藻。这些是最简单的,可能也是最原始的生物,明显的特征是没有细胞核。固氮生物中有自生型的,有些与高等植物和动物共生才兴旺的;少数具有两种生活方式。生活在嫌气条件下的细菌遇氧不能存活;好气菌则需要氧才生长。

巴西农业研究所的 J. Dobereiner 发现了另外一种明显的共生关系,虽然可能是个较疏散的关系。她发现一种固氮细菌与一定的热带草的根生长在一起。例如:马唐草(*Digitaria*)支持一种能够固氮的螺菌(*Spirillum lipoferum*)的生长,这种细菌并不形成特殊的结构,如根瘤,它只简单地生长在根的表面。值得注意的是,很多重要的谷类作物,包括小麦和玉米,从遗传学看都是从热带杂草衍生而来的。

一个更有趣的发现是: Dobereiner 的一个同事曾观察到:生长在缺氮的地里的玉米植株中间,有几棵玉米比其余的长得高些。把这几棵特殊的玉米挖了出来, Dobereiner 发现 *Spirillum lipoferum* 与玉米根联合在一起。这种发现有潜在的重要意义,因为可以设想,如果细菌-根的联合能实际建立起来的话,那么,玉米就可以生长在没有肥料的地里。接着,在另外一些实验室里进行了试验,想接种 *Spirillum lipoferum* 以增加玉米产量,但

结果是各种各样的。这种联合的性质仍在研究中。

有些能固氮的细菌生长在白蚁和船蛆里面，它们是比较不一般的共生关系。人们早就知道，这些靠吃木头生存的害虫中，含有分泌消化纤维素的酶的微生物。现在清楚了，他们也从另一些微生物群体得到饮食的帮助。木材缺乏生物氮，生活在白蚁和船蛆肠道里的细菌给它们提供从大气中得到的氮。



图4 大豆根有很多球状瘤子，它们是由于根瘤菌侵染形成的。在这种共生联合中，植物给细菌提供碳水化合物，反过来细菌给植物提供固定的氮。豆科植物也保护细菌免于暴露给氧，氧能永久性地使固氮酶变性，固氮酶在固氮作用中是关键性的酶。



图5 根瘤菌通过根外围的细胞，根毛，进行侵染。在这张由威斯康星大学 F. B. Dazzo 摄制的显微照片中，很多细菌粘附在一个根毛上。此外，细菌已经通过一个侵入线，伸长至整个根毛的一个长管，进入了细胞。这侵入线是由细胞壁内凹而形成的；最后细菌从侵入线释放，进至根的皮层细胞而导致根瘤的发展。

除专一性共生者外，也有很多生物，当独立生活时能固氮。例如：很多蓝细菌当自由

生活在池塘表面时，能固定大气中的氮。在很多情况下，这些蓝绿藻会构成一个麻烦事：从死亡的藻细胞释放出有机氮，促进水草的生长，形成一个所谓营养过剩（eutrophication）。另一方面，这种藻可加以栽培，并收作肥料或饲料。

也有能固氮的自生细菌，包括梭菌属（*Clostridium*）的一些种，它们是嫌气细菌；有氧时不能生长。另外，有克氏杆菌属（*Klebsiella*），有氧、无氧均能生长，它们能自由生长，也能与植物和动物共生。最后是固氮菌属（*Azotobacter*），它们是好气菌，这个属名来源于Lavoisier对氮素的命名。这些自生固氮菌对供应全球性的固定氮的贡献可能还是次要的，



图6 豆科植物与固氮细菌的专性关系是用三叶草根瘤菌（*Rhizobium trifolii*）结合在三叶草根毛上说明的。荧光染料首先与细菌荚膜的多糖连接起来，然后这种标记的多糖与三叶草根培育在一起。三叶草根毛上的荧光指明：荚膜多糖已经优先地与根毛结合在一起了。类似的实验表明：其他的根瘤菌种的多糖分子不与三叶草的根结合，三叶草根瘤菌也不与其他的豆科植物根相结合。

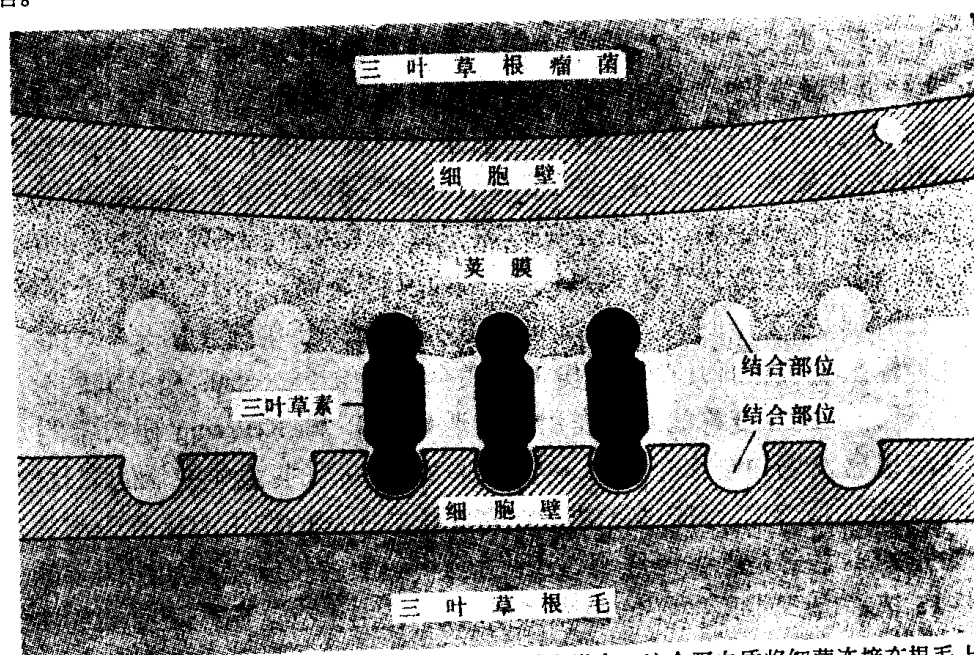


图7 豆科植物对根瘤菌的认定似乎是靠一个蛋白质作媒介，这个蛋白质将细菌连接在根毛上。三叶草的这种蛋白质叫做三叶草素。在植物细胞壁和细菌荚膜上三叶草素的连接部位有抗原关系；推测它们在结构上也是相似的。这个惊人发现的一个说明是：细菌的连接部位是通过模仿植物而发展起来的；这种摹拟有助于打破植物对外来生物入侵的防卫。

它们对研究固氮作用的贡献才是十分巨大的。因为要避开共生固氮的复杂性, 自生细菌就成为研究生物固氮最受欢迎的生物。

固 氮 酶

固氮作用的全部化学反应, 无论是在哈伯法中, 或者是在生活细胞里, 都是一样的。首先, N_2 分子的三价键必须被破坏; 然后三个氢原子必须连接到每个氮原子上。在哈伯法中, 氢是气体分子提供的; 在大多数固氮细菌中, 氢是从有机分子, 如葡萄糖 (光合作用的主要碳水化合物产品) 中提取的。氢原子从葡萄糖转移至氮, 要经过一系列中间分子。实质上, 只是电子被活跃地传递: 细胞的液体介质是一个质子、或氢核的海洋, 这些东西随时提供自由电子的补充。在两个物质之间的电子传递叫作氧化还原反应; 授出电子的被氧化, 得到电子的被还原。在固氮作用中, 葡萄糖被氧化, 氮被还原。当然, 这两个分子并不是直接地相互作用, 连接他们的途径是复杂的, 它的某些环节尚未完全搞清楚。

固氮作用弄不清的一点是能量的消耗。从降解葡萄糖或其他碳水化合物所得到的能量是以三磷酸腺苷 (ATP) 的形式提供的, ATP 是细胞的能量通用货币。一个分子氮转变为两分子氨, 需要 12—24 个分子 ATP。一部份能量必须用来破坏氮原子之间的稳定键, 但比普通分析所指出的需要量大得多, 效率低的解释是: 不是全部 ATP 都用去还原氮; 有些可能被牵扯到竞争的反应中去了。总之, 固氮作用对细胞来说, 都是消耗大量能量的, 正如在化学工业上要有高能一样。

在固氮途径中, 关键性的分子是固氮酶, 所有的固氮生物都含固氮酶。种与种之间的固氮酶在结构上不像有大差别。没有一个生物不具备固氮酶而能固氮的。

固氮酶包含两个蛋白质, 称为成份 I 和成份 II。成份 I 的分子量为 220,000, 由四个亚单位组成, 每个亚单位是氨基酸的单链, 此外, 成份 I 还含有 24 个铁原子和 2 个钼原子。成份 II 的分子量是 55,000, 由两个蛋白质亚单位组成并含有 4 个铁原子。

关于蛋白质和金属原子是如何排列装配成酶的, 所知还甚少。整个分子的结构最终可能用 X 光衍射分析的方法绘制出来。当前还少有直接的方法, 提供关于各种金属原子的化学环境的一些知识。在哈伯法中, 最有效的催化剂是过渡金属, 如铁和钼, 这也许不是一种巧合。在固氮酶中两个钼原子的作用是特别迷人的, 因为它们似乎是该酶活性中心的一部分。钼不是和成份 I 的大蛋白质相联结, 而是和一个小的辅因子相联结, 在威斯康星大学我的试验室工作的 V. K. Shah 已将这种辅因子纯化了出来。近代一个惊奇的发现, 是这种辅因子也含有几个和成份 I 相联合的铁原子。Shah 所分离的分子能够使缺少这种辅因子的细菌突变株的固氮作用重新活化。C. F. Kettering 研究室的 E. I. Stietel 曾指出, 在酶里已发现的全部金属中, 钼是唯一既能在高的、也能在低的氧化情况下, 传递两个电子和两个质子的, 可能这就是它在固氮酶中所起的作用。仅有少数其他的酶含有钼, 有趣的是其中之一是硝酸还原酶, 这是植物将硝酸转化成氨基酸所需要的酶。

过去 15 年来, 对于固氮生化知识的很大进展是由于有了两个很重要的实验技术。一个是乙炔还原分析, 1965 年威斯康星大学的 R. Schollhorn 和 R. H. Burris 以及澳大利亚 Murdoch 大学的 M. J. Dilworth 发现乙炔气抑制固氮酶活性, 以后的试验表明, 该酶能还原乙炔 (C_2H_2) 成另一气体——乙烯 (C_2H_4)。这样一来, 固氮酶的活性就可简单地测定

出来,将培养的生物与乙炔放在一起,然后用气相色谱仪测定乙烯的产生。早期测定固氮作用的方法涉及追踪氮的重同位素,或是测定生物体内氮素含量的增长,这都是些耗时间的方法。乙炔还原方法既快又相当准确。

另一个实验方法是发展了体外(即没有生活细胞)观察固氮作用的体系。能制备出不破坏固氮酶的细菌细胞提取物,通常是:该酶如不和它的细胞器连在一起是不起作用的。六十年代初期发现了:如果加入少量 ATP,并有强还原剂如连二亚硫酸钠时,能使无细胞的提取物固氮。由于有了这样的体外体系,固氮作用就变成比较容易操纵和测定的实验室方法了。

固氮酶的生物化学方面有什么进展? 综合一些人的最近发现来说明这方面的现状,这些人是威斯康星大学的 W. H. Orme-Johnson, Purdue 大学的 L. E. Mortenson, Sussex 大学的 B. E. Smith 及其同事们。他们指出在导致固氮的程序中,第一个事件是用固氮酶以外的一个电子-传递蛋白还原酶的成份 II, 这个还原了的成份 II 与 ATP 作用,然后去还原成份 I, 最后成份 I 还原分子氮, 最终形成氨。这个程序也可换另一个方式表达。成份 II 从传递蛋白首先得到一个电子;这电子然后传递给成份 I, 最后传给氮。在氮和氨之间没有发现中间物质,所以全部中间产物都必定是结合在固氮酶上。有事实确证这种直观的假设,即电子是靠铁和钼原子来传递的,但是确切的传递机制尚不了解。

固氮程序中最后的事件——氮的真正还原——是最有趣的,也是最难以理解的。在固氮酶的活性中心的结构确定以前,这个过程不可能详细了解。有一个假说,认为一个被结合的中间产物是二酰亚胺(其分子结构为 $\text{HN}=\text{NH}$), 换句话说,在氮原子之间的键被彻底破坏以前,至少有一个氢原子与每一个氮原子相结合。在这个过程与固氮酶还原

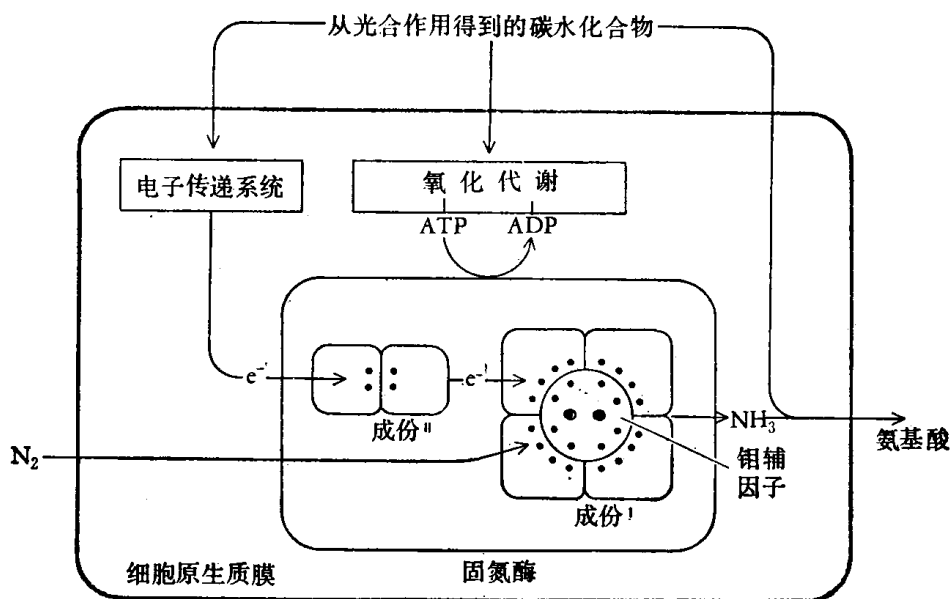


图8 固氮的生物化学涉及到从碳水化合物,如葡萄糖,将氢原子转移给氮。转移的部位是固氮酶,它是一个具有两个主要成份的复杂蛋白质。较小的成份 II, 有两个亚单位,并含有四个铁原子。较大的成份 I, 含有四个蛋白质分子和 24 个铁原子;也有一个含有两个钼原子的小辅因子。V. K. Shah 在作者的实验室中最近指出,这种辅因子也含有某些成分 I 的铁原子。为了转移氢原子,仅仅需要电子的活跃传递,质子、或氢核,能在细胞液体介质中自由寄存或收回。来自碳水化合物的电子,首先授予成份 II, 然后给成份 I, 在成份 I 那里,实际上将 N_2 还原成 NH_3 。两个成份作功都需要能量,以 ATP 的形式提供。虽然在光合细菌中,电子和 ATP 是从光合器官直接转移给固氮酶,而没有碳水化合物的中间阶段,但合成氨的机制在所有固氮菌种中都显然相同。

乙炔为乙烯的假设机制之间,有引人注目的对称性,但现在还很少事实来证实它或否定它。

竞争性反应

由于体外固氮酶体系的发展,使有可能发现这个酶在底物不存在时的特殊行为。当给固氮酶提供 ATP,但将它与氮隔离时,就产生氢气。显然在没有氮的情况下,电子传递给酶是能正常进行的:当电子到达酶的活性部位时,它们只是与质子重新结合。事实上,即使在正常大气中,一些电子和 ATP 似乎也会消耗于氢的形成。奥尔良大学的 K. Schubert 和 H. J. Evans 曾测定过大多数根瘤菌-豆科植物的共生体,要浪费掉大约一半到达固氮酶的电子。他们估计美国大豆作物一年产生的氢气所具有的能量,相当于3,000亿立方呎天然气的能量。如果能去掉这种寄生性的氢的产生,固氮率就能明显地提高。一个鼓舞人的发现是,至少有两个共生体——包括豇豆和赤杨树——在形成氢气时不损失电子。氢多半是在固氮酶的活性部位产生的,正像在其他生物体内一样,不过在氢逃离细胞以前进行了再循环。

抑制氢产生的另一可采取的方法是利用它,例如:栽培蓝绿藻的池塘,可将太阳能转化成固定的氮和游离的氢。主要的困难在于收集氢。

所有固氮酶系的一个特性,是酶的两个蛋白成份遇氧则变性。氧的毒害是不可逆的;即使将氧移走或者加入强还原剂,酶的活性也不能恢复。对氧的敏感性是研究固氮酶的生物学家烦恼的事,因为全部实验设备必须设计排除氧气。这似乎是对固氮生物的一个大挑战。的确那些生物已经采用了各种战略以保护它们的酶。

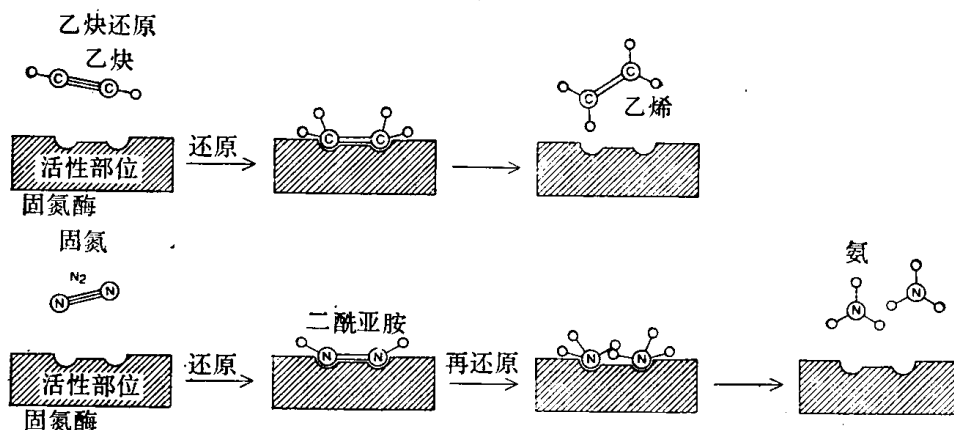


图9 氮固定的假定顺序。假设所有的中间产物都结合在固氮酶上。这顺序部份地以测定固氮酶活性的乙炔还原分析的假定机制为基础。氮不存在时,固氮酶将乙炔转化为乙烯;三价键被还原成两价键,加上了两个氢原子。分子氮在形状上和具有三价键方面都像乙炔,因此有理由假设固氮酶是以相同的方式作用于这两个分子。如果是这样的话,那么在固氮作用的中间化合物应该是二酰亚胺分子。当乙炔作为固氮酶的底物时,还原作用一步停止,释放出产物——乙烯。该酶作用于氮分子则明显不同:每一个氮原子被还原三次,获得三个电子,并变成一分子氨。正因为所提出的机制是假定的,所以这里所表示的固氮酶活性部位也是人为的;关于活性部位的确切结构知道得很少。无论是二酰亚胺或其他中间产物都没有测定出来。

对嫌气固氮菌来说,对氧不稳定的酶的问题是不足道的。对于这些生物,在任何情况

下,氧都是有害气体,它们只能生活在这样的一些环境中,如没有氧气的深土层。肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)只要有氨或硝酸盐存在,无论有氧或无氧它们都能生长。它们能在大气氮中生长,然而仅在没有氧的情况下才行;显然这种细菌缺少保护它的固氮酶免于失活的手段。

很多固氮蓝绿藻有专化的厚壁细胞,叫做异形细胞,其中含有固氮酶。可能是异形细胞把酶和大气氧分隔开。能在通气场合固氮的细菌,还发展了另外的保护手段。它们具有这样的酶,当氧一旦进入细胞,立即将它还原成水。

最迷人的氧障(Oxygen barrier)是在根瘤菌-豆科植物共生体中发现的。氧在进入细菌以前,就被连氧蛋白(Oxygen-binding protein)捕获了。这种连氧蛋白即豆血红蛋白,它是在根瘤中由植物组织合成的。它是植物界发现的唯一血红蛋白的形式,并且和比较熟悉的动物血红蛋白一样,和氧紧密结合,而当需要时又能将氧放出去。其结果是根瘤菌能适应一个有效的好气代谢,而仍保护固氮酶不受氧为害。这种安排可能是营共生生活的细菌主要好处之一。固氮酶对氧的不稳定性,加上它的活性又需要大量的能,这可能就是将固氮作用限制在少数生物种内的主要原因。

生物固氮过程需要大量的能,这说明一种吝啬的生物,除非生长所必需,它是不会固氮的。观察到的事实确是这样的:如果在细菌的环境中有固定氮素,氨的产生就受抑制。给豆科作物施(氮)肥,会减少根瘤的数目,因而减少根瘤菌的固氮量。

固氮酶的调节

细菌对环境固定氮素的敏感性暗示着固氮体系是受代谢控制的。控制的基础机制已被确定:固定的氮素阻止进一步固氮是由于停止了固氮酶的合成。和在很多其他生物体系中一样,控制是由于阻抑基因表现来实行的。对肺炎克氏杆菌的固氮酶的调节已进行过详细研究:在那个菌中,调节途径中的关键性分子是谷氨酰胺合成酶。

在某些细菌里,谷氨酰胺合成酶参与氮代谢的重要方面。它的主要作用是催化氨基酸合成的第一步,从固氮作用或者从其他来源得到的氨,首先靠与谷氨酸(一种氨基酸)作用生成另一种氨基酸(谷氨酰胺),而进入生化途径,这个反应是由谷氨酰胺合成酶催化的。然后靠谷氨酰胺转移氮分子至其他化合物上,而形成许多另外的氨基酸。麻省理工学院的 B. Magasanik 和他的同事们指出:在不固氮的细菌里,谷氨酰胺合成酶也调节着降解某些含氮底物的酶的合成。

谷氨酰胺合成酶本身靠氨基酸合成过程的一些最终产物的反馈抑制来调节。谷氨酰胺或其他氨基酸的浓度高时,会减低这种酶的活性,因而抑制多余的氨基酸的产生。对于调节固氮作用的一个似乎合理的连锁机制是容易想像的:由于活跃的谷氨酰胺合成酶的存在,可能加强了固氮作用,这就暗示着最终的含氮产物氨基酸的相对缺乏。另一方面,谷氨酰胺合成酶的失活,会抑制固氮作用,仅仅在氨基酸过剩时,这个酶才被钝化。

对于缺失编码谷氨酰胺合成酶的基因的肺炎克氏杆菌突变株的研究,似乎证实了这种假说。这些菌株不合成固氮酶,说明在这种生物里,谷氨酰胺合成酶在调节固氮酶的合成方面,必定起关键性的作用。然而一个酶怎样控制另一个酶的合成,尚不确切了解,再者,现已知道,肺炎克氏杆菌的调节机制是非常复杂的,在那里,钼和氧都影响固氮酶的

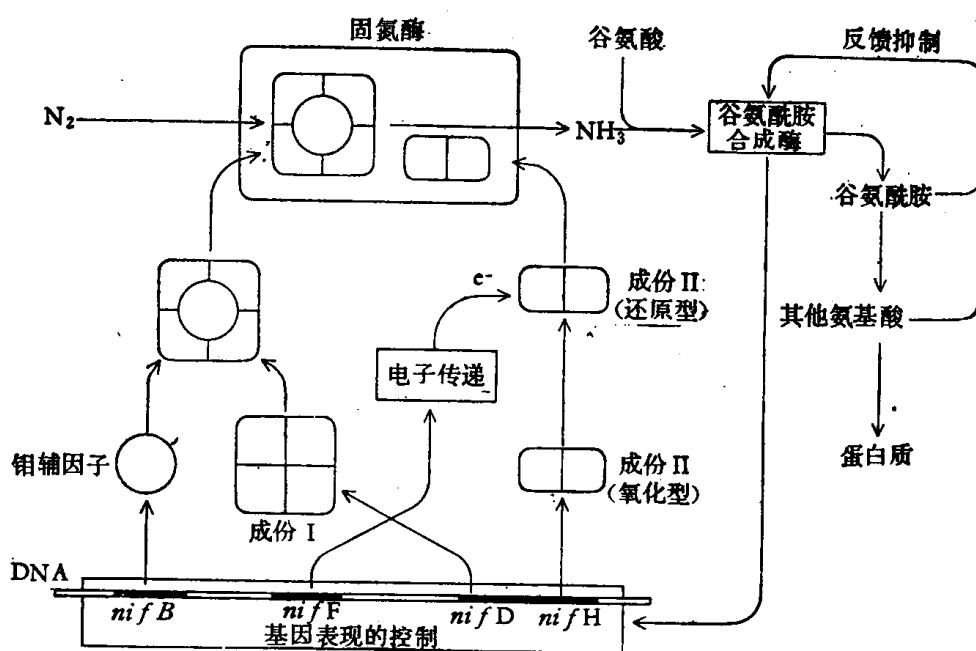


图 10 固氮作用的控制显然是靠某些基因的调节实现的，这些基因以 *nif* 来表示，它们编排着固氮酶的密码。调节分子是谷氨酰胺合成酶。由固氮作用所生成的氨，与谷氨酸结合成谷氨酰胺，此反应由谷氨酰胺合成酶催化。由谷氨酰胺再转化为其他氨基酸。高浓度的某些氨基酸抑制谷氨酰胺合成酶。因此这种酶的活性就是对细胞需要固定氮的一种衡量标准，这一发现在逻辑上证明，谷氨酰胺合成酶似乎仅是间接地靠转换 *nif* 基因的开关，来调节固氮速率。然而固氮控制的机制仍不完全了解。

合成。

用结构上类似谷氨酸的物质做实验，研究了其他自生菌固氮酶合成的调节作用。谷氨酸的类似物蛋氨酸亚硫酰亚胺（methionine sulfoximine）是涉及氨代谢酶系的一个强力抑制剂。一个含有氨的细菌培养基，通常会抑制固氮酶的合成。在我实验室工作的 J. K. Gordon 曾指出，在有蛋氨酸亚硫酰亚胺的情况下，氨却不阻碍固氮作用。当细菌生长在含有这种谷氨酸类似物的培养基里，它们会积累高浓度的固氮酶，并且甚至分泌出氨。在很多其他的细菌中（包括蓝细菌和其他光合细菌），也看到了同样反应。一致的结果证明：所有的细胞都是通过涉及同化氨的某些酶，或者通过这样一种酶的氨基酸的产物，来调节固氮酶的合成。

提高效率

虽然我们对生物固氮的了解还很不完全，但考虑提高它的性状并不是冒昧的事。现在已经有一些提高固氮作用的方法可以实践，对一些更重要的方法，至少已明白哪些方面必须研究和完成。

增加生物固氮产物的最明显的方法之一，是提高根瘤菌-豆科作物共生的效果。可能达到这目的最简单的途径是对植物和细菌两者的遗传学筛选，以确定这种联合最适宜于一个特殊的环境。乙炔还原分析的发展，使对植物固氮能力的迅速筛选已成为可能。

通过这样的技术，R. Maier 分离出大豆根瘤菌（*R. japonicum*）的一个突变株，经实验室分析，它比亲本能固定更多的氮。我们希望这个突变株在大田里也表现优越的性能。

引进一个新的根瘤菌至栽培地里常常是困难的,因为原来存在的细菌和他竞争。因此,在夏威夷大学的一块地上进行了栽培实验,那块地过去是没有大豆根瘤菌的,大豆用突变株及亲本菌株接种,初步看出突变株得到较大的产量。如果这个优越的菌株能适应较大的范围,但是与当地竞争的问题仍然存在。一个可能解决的办法,是将负责固氮力强的基因,引入已经在地里成功生长的菌株。

豆科寄主植物的活力和效率;对固氮量也有强烈影响。杜邦公司的 Ralph W. F. Hardy 等发现在栽培大豆的小块地里加 CO_2 气体,大大地提高了大豆的产量,估计是因为光合作用提高了碳水化物的生产。此外,发现固氮的速率提高了,并在植物生活史中维持固氮的时间也加长了。将 CO_2 通入农家田野里是不实际的,但是用培育光合效能高的植物,可以达到同样的目的。

另一种提高效能的途径,是选择这样的根瘤菌-豆科植物的联合,它们不因产生氢气而消耗光合作用的能。像我在前面提到的,已经知道了两种这样的植物:豇豆和赤杨。将这些植物里压制氢产生的什么机制转移至某些更需要的作物上去,也许是有可能的。

靠生物固定的氮,大约 40% 是由根瘤菌-豆科植物联合进行的,实质上这些氮是由栽培植物固定的。立即增进生物氮的最好前景,一定能在这些生物中找到。有一万多种豆科植物,其中仅约 10% 进行过结瘤检查,进行栽培的才不到五十种。这一科中的另一些种被农业采用也是很有可能的。

另一个增进氮的供应的方法,是操纵细菌中调节固氮作用的生化机制。例如:Gordon 已经分离出这样一个固氮菌突变株,在氮肥存在的情况下,它能继续固氮,甚至分泌出氨。这样的细菌可能培养在较便宜的有机碳的基质,如纸浆废水池里。如果有分泌氨的蓝绿藻的话,甚至有机碳都可以不用了,因为光合作用能提供碳水化合物。池子里的内容物可以收获起来当作肥料。

分泌氨的细菌也可能适应生活于植物根附近的土壤里,如小麦、玉米根际。或许一个人工的共生体可由选育植物品种而创造出来,这些品种根分泌富含碳的物质以供养细菌,细菌则加富土壤固定的氮素。

改变细菌的调节机制,甚至有益于豆科植物。如果能使根瘤菌种对氨的浓度不敏感,那么豆科作物就可以给土壤提供更多的固定氮,而不是耗尽已有的氮。

遗传学操纵

提高氮产量最有雄心壮志的计划,无疑是建立在遗传改造的基础上,特别是将基因从一个生物转移到另一个生物。至少肺炎克氏杆菌的真正涉及固氮作用的基因数目(*nif* 基因)已经在加利福尼亚大学 R. C. Valentine 的试验室和我们的试验室里绘制出来了。它们从集在细菌染色体很小的区域中。

Sussex 大学的 R. A. Dixon 和 J. R. Postgate 已经将肺炎克氏杆菌的固氮基因群转移至另一种细菌,大肠杆菌里。转移是这样完成的:首先把固氮基因掺入到一个质体上(质体是一小片染色体外的 DNA),然后将此质体引进大肠杆菌。大肠杆菌本来是不固氮的,由于加了质体而创造的菌系则能合成固氮酶,倘若它被保护免受氧毒害的话,这种新创的菌系就能够固氮。