

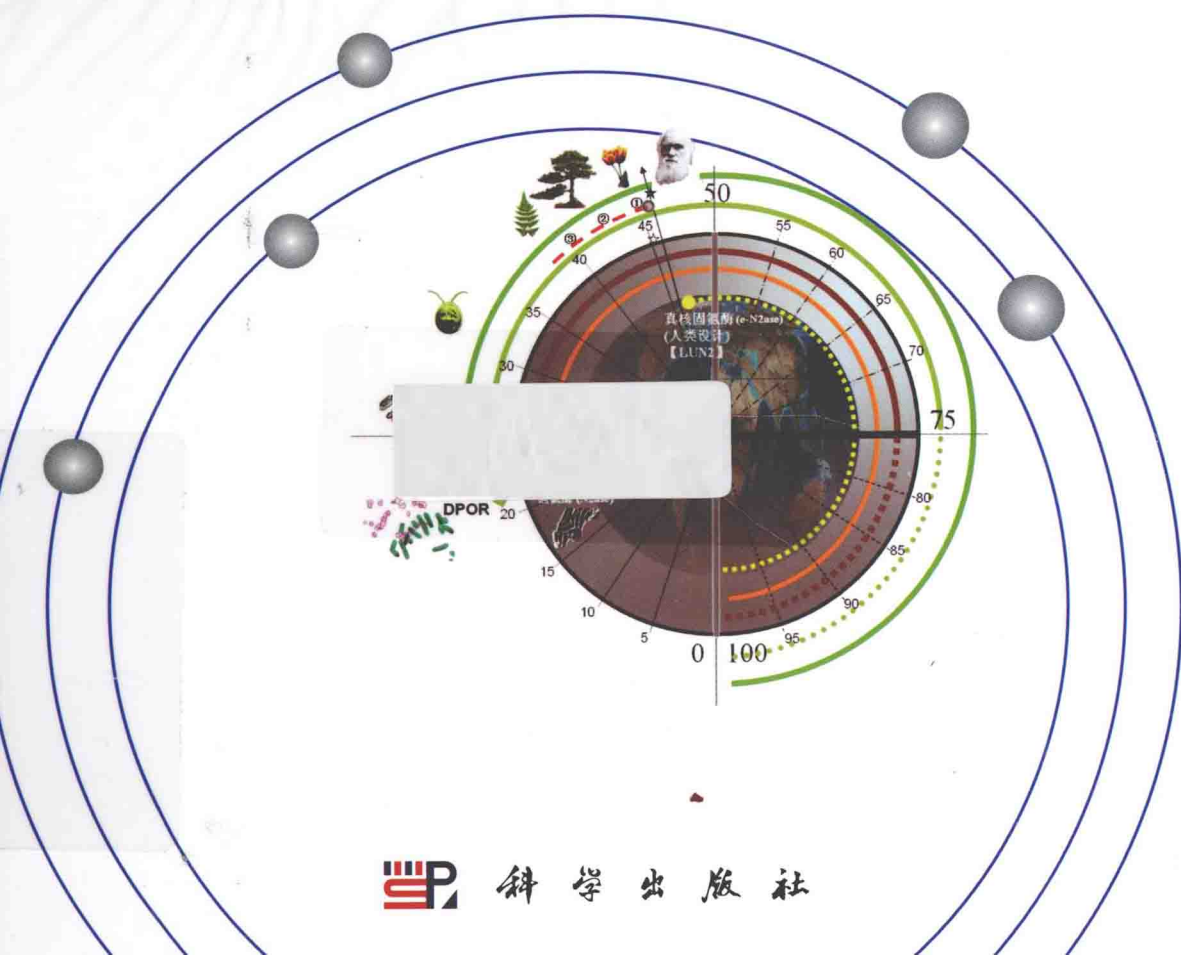
THE EARTH IS A CLOCK:

A Natural History of Biological Nitrogen
Fixation and the Planetary Future

地球是钟：固氮篇

程奇 著

Qi Cheng



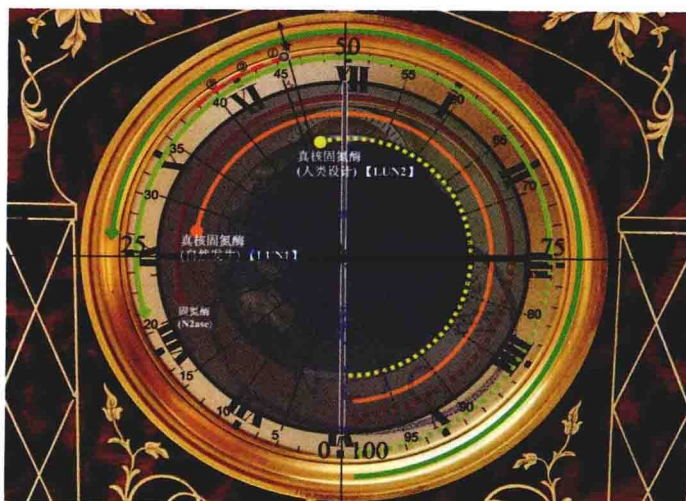
科学出版社

地球是钟：固氮篇

THE EARTH IS A CLOCK: A Natural History of
Biological Nitrogen Fixation and the Planetary Future

程 奇 著

Qi Cheng



宇宙万物皆有起止，从而可以丈量，
生命在适
多数生物
人类则同时学会了努力用思维去透视，
达到视线所未能及处，
从而在宇宙中平添一种极高的境界。

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书特色体现在：对普通或专业读者来讲既有科普的广义性又有专业的准确性。作者从追寻已知固氮酶、固氮菌的起源入手，较通俗地讲述了地球上生物进化的历程与生物固氮的关系，并自然地联系到传统固氮酶与光合作用相关酶的起源和发展的关系；从比较生物学的角度，揭示了蛋白质类催化酶的进化趋势；从学术上引导读者确立了全新的生物世界发展观，积极地提出大力推进生物固氮工程化研究和探索的必要性和可能性，同时又辩证地看待了生物工程的发展前景。本书还首次引进了“地球钟”及其可能的进一步数字化的概念，并以“广义”的视角大胆提出“真核固氮酶”在整个地球演变过程中存在或出现的可能性。

本书适合于各大院校和研究机构的科研人员、研究生及对生命科学有兴趣的大众读者阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

地球是钟：固氮篇/程奇著. —北京：科学出版社，2013.11

ISBN 978-7-03-038773-8

I. ①地… II. ①程… III. ①生物固氮-研究 IV. ①Q945.13

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 235593 号

责任编辑：李秀伟 白 雪/责任校对：胡小洁

责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年11月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2013年11月第一次印刷 印张：15 1/4

字数：220 000

定价：108.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

序

半个多世纪以来，生物固氮研究一直是我国生命科学领域的重大命题之一，在不同时期都绽放着夺目的光芒。

生物固氮在农业生产中具有十分重要的作用。我们中华民族的祖先早在几千年前就认识到了“轮作”对于改良土壤的重要性。直到19世纪末人类发现豆科植物固氮的“本质”以后，对生物固氮的研究才真正发展成为一门科学。我国科研人员在以卢嘉锡、陈华葵、沈善炯等为代表的老一辈科学家的带领下，从20世纪30年代起就开展了卓有成效的研究工作，特别是在根瘤菌资源的收集和利用、固氮酶的结构解析和模型建立等方面取得了一系列重要成果，使我国的生物固氮研究在国际上占有了一席之地。

自改革开放以来，我国新老科学家迎来“科学的春天”，生物固氮领域也取得了新的成绩，培养了大批年轻的科学家。我在1996年第一次访问英国 John Innes 研究中心期间，认识了本书作者程奇，当时他还在世界著名固氮学者 Ray Dixon 教授的指导下攻读博士学位，并担任那里的学生会主席；第二次见到他的时候，是2003年我应邀带团访问剑桥大学植物系，当时在那里工作的程奇博士参与了一些座谈交流。自2010年程奇博士回到中国农业科学院工作以来，除了专注于自己的多个专业项目研究之外，他还致力于广泛的国际交流活动，积极筹备了“中剑约中心（中国农业科学院/中国科学院-剑桥大学-约翰英纳斯国际中心）”。

程奇博士从事生物固氮研究工作已有多多年，有很多自己独到的见解。在此书中，他通过通俗易懂、图文并茂的手法，为广大读者介绍了生物固氮和光合作用的一些基础知识、研究背景以及进化历程，并提出一些十分鲜明的新观点和新理论，构思新颖而独特。

在我国建设创新型国家进入攻坚期，特别是在我国农业科技创新

日新月异的新形势下，希望并相信这样一本科学读物能成为生物固氮领域的一朵奇葩，也希望这一类的科学读物能层出不穷，争奇斗艳，百家争鸣。



中国科学院院士
美国科学院外籍院士
2012年12月12日

前言

对人类而言，生物固氮和光合作用可能是生命科学中两个永恒的话题。在不断深入研究的同时，科学家们一直没有放弃将其彻底工程化利用的梦想。几十年来，人们虽然在诸多机理方面对生物固氮的认知有不少突破，但是在工程化提高其效率和应用范围方面仍举步维艰。这也正是多年来为什么人们总想问固氮搞得到底怎样了、为什么还没有大的突破的原因。达到老百姓能看得到的“突破”这一天到底还有多远？我认为首先要相信科学，这一天总会到来！

21 世纪的到来已经让世界看到了一个崛起的中国。在新世纪、新局面下，中国的崛起体现在方方面面，中国在生命科学领域取得的进步也是让世界刮目相看的。我感受到这是一个新的“火红的年代”，也将是一个创造人间奇迹的新时代。借着这样的东风，相信和希望对生物固氮的进一步深入和创新性的研究，能为这个“突破”的梦想早日实现奠定新的基础。

我自热衷这项研究以来一直孜孜以求多知，直至自己想写些东西，希望在某些方面有读者与我共鸣，哪怕只有少数。我也一直惶恐才学疏浅，相形见绌；更惶恐一知半解，贻笑大方。然而，我又相信科学是需要追梦者的，也是永远属于追梦者的。我这样鼓励他人，也这样勉励自己。因此我下定了决心，要去抛砖引玉，抛此山的“砖”，引他山的“玉”。很希望对读者，特别是青年人有所启发。



2012 年 10 月 1 日

剑桥大学，英国

Preface

Biological nitrogen fixation has been employed by mankind since old civilization several thousand years ago, legumes have been found useful for maintaining the soil fertility if other crops do rotations with them. More than a hundred years ago, scientific researches on this biological process led to the discovery of soil bacteria rhizobia which are the major contributors in legume symbiosis. Further characterization of catalysts (nitrogenases) from various bacterial nitrogen fixers has been carried out extensively during the past half century, and the results were exciting, complicated and promising for future agricultural prosperity.

Our current societies are facing common crisis and challenges that are largely due to heavy burden of food supply demanded by increasing population. Therefore basic scientific researches have been urged to speed up; one example is to try hard on engineering non-legume crops to adapt capability to fix atmospheric nitrogen so that farmers will be able to harvest without or less input of chemical fertilizers. Several approaches have been proposed, designed and carried out globally in the past two decades, it may continue for another two decades until we see a real success one way or another. On the other hand, science is always tending to satisfy people to understand and foreseeing the enticing nature during the course of one's research journey. Great surprise and discovery are always accompanied with curiosity and prepared mind.

Qi Cheng

2012/10/1

University of Cambridge, UK

缩略语表 (Abbreviations)

ADP: adenosine 5'-diphosphate

Amp: ampicillin

anf: alternative nitrogenase system nitrogen fixation gene

AP: ammonium persulphate

ATP: adenosine 5'-triphosphate

Av: *Azotobacter vinelandii*

bp: base pair

BSA: bovine serum albumin

CaMV 35S: Cauliflower mosaic virus 35S promoter

Cb: carbenicillin

Cp: *Clostridium pasteurianum*

CTP: cytidine 5'-triphosphate

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphate

DO: dissolved oxygen

DPOR: dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase (light-independent protochlorophyllide reductase)

DRAG: dinitrogenase reductase activating glycohydrolase

DRAT: dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetra-acetic acid

EPR: electron paramagnetic resonance

EPSPS: enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

EtOH: ethanol

Fe protein: iron protein of molybdenum nitrogenase

- FeMoco: iron molybdenum cofactor of molybdenum nitrogenase
 FeVco: iron vanadium cofactor of vanadium nitrogenase
 GTP: guanosine 5'-triphosphate
 GUS: β -glucuronidase
 H: hour
 IHF: integration host factor
 IPTG: isopropyl β -thiogalactopyranoside
 Kan: kanamycin
 kb: kilobase pair
 kDa: kilodalton
 Kp: *Klebsiella pneumoniae*
 LB: Luria agar (broth)
 LPOR: light-operative protochlorophyllide oxidoreductase (light-dependent protochlorophyllide reductase)
 LUN: light-utilizing nitrogenase
 MgATP: magnesium adenosine 5'-triphosphate
 Min: minute
 MoFe protein: molybdenum iron protein of molybdenum nitrogenase
 MOPS: 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid
 Mp: *Marchantia polymorpha*
 MUG: 4-methyl umbelliferyl β -glucuronide
 NADP: β -nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate
nif: molybdenum nitrogenase nitrogen fixation gene
 OD: optical density
 ORF: open reading frame
 Pchl_{id}: protochlorophyllide
 PCR: polymerase chain reaction
 PEG: polyethylene glycol
 plastome: plastid genome
 PS I : photosynthesis system I

- PS II : photosynthesis system II
RNA: ribonucleic acid
SDS: sodium dodecyl sulphate
Spc: spectinomycin
Str: streptomycin
TAE: tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer
TBE: tris-borate/EDTA electrophoresis buffer
TEMED: *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine
Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane
TTP: thymidine 5'-triphosphate
UAS: upstream activator sequence
uidA: GUS gene
vnf: vanadium nitrogenase nitrogen fixation gene

目 录

序

前言

Preface

缩略语表 (Abbreviations)

微生物世界的生日

1 固氮考古	3
1.1 了解我们的宇宙和星球	4
1.1.1 地球	5
1.1.2 地质	6
1.1.3 地貌	7
1.1.4 氧气：生物的双刃剑	9
1.1.5 钼是大功臣	10
1.2 生命的起源	12
1.2.1 生命起源的化学进化过程	12
1.2.2 石猴的演说	14
1.3 生物进化	15
1.3.1 地球上早期生命的形态与特性	16
1.3.2 生物进化思想	17
1.3.3 遗传进化理论中的一些概念	19
1.3.4 生物的发展	22
1.4 人类的进化及其对环境的影响	23
1.4.1 人类的进化	23
1.4.2 人类活动对环境的影响	26
1.5 固氮菌的起源与进化	31

1.5.1 固氮作用的基本条件	32
1.5.2 固氮菌的种类	32
1.5.3 固氮菌的分类	39
1.5.4 固氮菌的进化	47

固氮之钟

2 固氮酶及相关研究进展	51
2.1 固氮酶的结构	51
2.1.1 固氮酶的 <i>nif</i> 基因簇	51
2.1.2 固氮酶的装配复杂性及其作用和调控机制	63
2.1.3 固氮酶铁钼辅因子的生物合成	67
2.2 固氮与固氮酶相关研究进展	70
2.2.1 根瘤菌与豆科植物的共生固氮模式	71
2.2.2 固氮结瘤与花的发育相关蛋白质的研究	72
2.2.3 固氮与光合作用中一些相关酶蛋白的研究	72
2.2.4 在非豆科植物中直接转入固氮基因的努力	72
2.2.5 非传统固氮酶的出现及一些预测性研究	77
2.3 固氮酶研究进展及存在问题	79

光合之钟

3 固氮比较生物学	85
3.1 谁是先行者：固氮与光合	85
3.2 固氮酶比较	90
3.3 固氮酶与 DPOR、LPOR 比较	92
3.3.1 固氮酶与 DPOR	92
3.3.2 DPOR 与 COR	94
3.3.3 DPOR 与 LPOR	95
3.3.4 固氮酶、DPOR 及 LPOR 的生物进化	99
3.4 固氮酶的科学预测	101

植物之钟

4 固氮酶转化工程	107
4.1 固氮酶基因的获得	107
4.2 细胞器的选择	108
4.3 转化方法——叶绿体转化技术	109
4.3.1 叶绿体基因组的特点	110
4.3.2 叶绿体的遗传转化	110

未来之钟

5 新世纪、新观念、新理论、新目标	123
5.1 与固氮酶相关的科学问题	123
5.1.1 与固氮酶相关的化学问题	123
5.1.2 与固氮酶相关的生物学问题	127
5.1.3 植物生长发育与能量的问题	130
5.2 几个潜在突破口的分析	132
5.2.1 自主固氮叶绿体-Nitroplastid	132
5.2.2 自主固氮线粒体	136
5.2.3 非豆科植物共生固氮	136
5.2.4 设计和探究“光能固氮酶”	139

参考文献	145
-------------------	-----

附录一 地球地质年代表	181
--------------------------	-----

附录二 微生物分类表	193
-------------------------	-----

附录三 植物分类表	202
------------------------	-----

附录四 国际固氮会议与固氮实验室	213
-------------------------------	-----

附录五 国际光合作用会议与叶绿体工程实验室	217
------------------------------------	-----

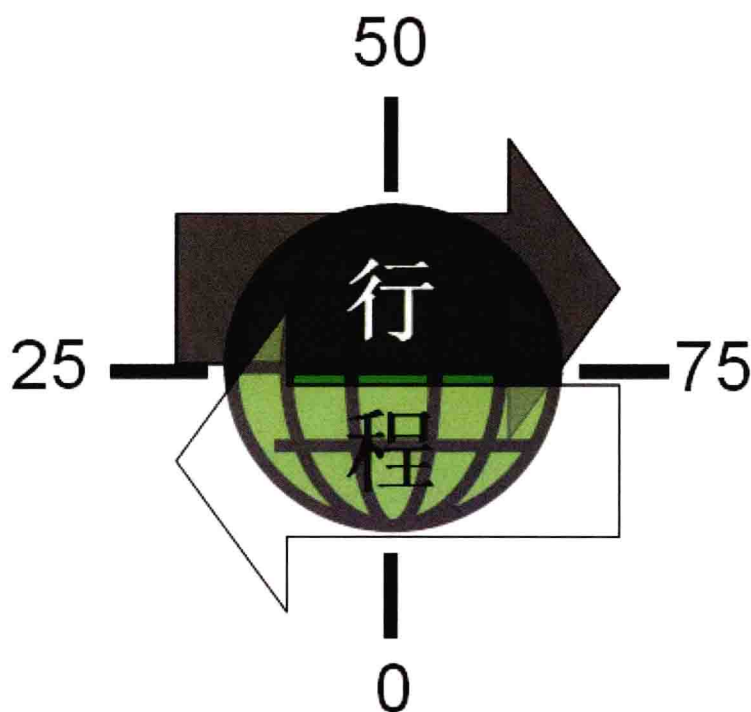
致谢 (Acknowledgements)	220
------------------------------------	-----

跋	221
----------------	-----

Postscript	222
-------------------------	-----

微生物世界的生日

The Birth of Microbial World



目前，普遍公认的地球年龄是 46 亿年左右，其正处于壮年期，因此 100 亿年大概是寿终正寝的“天数”，所以可能分为 25 亿、50 亿、75 亿、100 亿（岁）这样 4 个重要的“年龄段”。地球上真正的“生命行程”应该从微生物的诞生之日算起，至少是在 25 亿年前，或许更早，但总之应该落在地球的第一个“年龄段”。

1 固氮考古

凡事均有“古”可“考”，文明社会的“古”相对于我们今天所认知的自然界和宇宙来讲，只是短暂的一瞬间的事，只是狭义的“考古”。对于地球人而言，地球本身的“古”，值得我们好好地考一考，因为它关系到许多东西的来龙去脉，这也是更广义上的“考古”。

从不同的角度和形式看，“古”有多种“考”法，这里我们不妨先从进化角度，跟着固氮的话题，走入地球历史的深处。

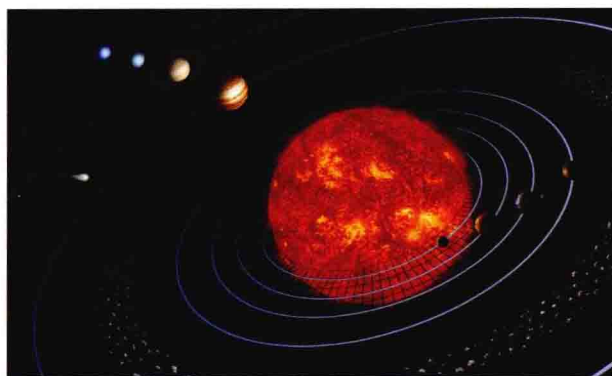
目前，普遍公认的地球年龄是 46 亿年左右，其正处于壮年期。大约在 38 亿年前，地壳逐步稳定，原始生命有机会得以形成。然而地球上真正的生命行程应该从单细胞微生物的诞生之日开始算起，至少在 25 亿年前，甚至更早。经过无数科学家的努力考证，一张较为完整的地球地质年代表已经展现在我们面前（附录一）。

人类的出现和活动对自然界其他物种的进化产生了积极或消极的影响。尤其是随着农业的发展，人类培育了很多高产、抗病、抗冷、抗倒伏等优良的作物品种，但是，人们同时也在某些方面影响了作物的进化行程。或许在很大程度上，近 20 亿年前，氧气的产生和积累使得原始古老的固氮酶在真核生物中的作用受到限制。然而，真核生物从低等到高等及对自然环境的适应似乎是进化的一般规律，这样的例子不胜枚举。在自然界中，“新”的酶不断出现代替其古老的祖先行使某种特定的功能，或许固氮酶也在遵循这样的规律（Cheng, 1998, 2008; Cheng et al., 2005a, 2005b）。

科学家普遍认为，固氮菌的出现是最为古老的生命活动事件之一。从对微生物的考证来看，大部分科学家认为固氮菌可能存在于古细菌与真细菌出现分支之前，即原始生命就开始能固氮了。然而，有许多细节仍然使科学家纠结着，也激发着人们探索自然的渴望和热情。人类总试图用犀利的“目光”把时光和岁月看得“水落石出”。

万事万物都是动态的，我们今天所见的一切事物，必然有它们的过去和未来。科学的力量是巨大的，想了解过去，就近乎于考古；要预测未来，也有科学可循，这便是人类伟大之处，也是人类活动的基础。下面，我同大家一起从一般物理、生物化学或比较生物学的角度探索固氮的古今和未来，拂去迷雾，了解固氮的来龙去脉。

1.1 了解我们的宇宙和星球



在浩瀚无边的宇宙中，有太多太多未知等着我们去探索；人类已经不屑于只在自己生存生活范围的这一小块活动了。宇宙是黑暗与美丽并存的，牵引着人类的好奇心，使人类开始对它蠢蠢欲动。但要想了解宇宙，首先要了解我们自己及我们赖以生存的环境。宇宙（Universe）是由空间、时间、物质和能量所构成的统一体，是一切空间和时间的综合。一般理解的宇宙指我们所存在的一个时空连续系统，包括其间的所有物质、能量和事件。理论物理学家研究发现，所谓无穷的宇宙其实是有边缘的，也是有始有终的。人类一直在寻找和确定构成这宇宙的基本物质和所谓“上帝粒子”——希格斯玻色子。其被认为是物质的质量之源，“上帝粒子”是1988年诺贝尔物理学奖获得者莱德曼对希格斯玻色子的别称。这种粒子是物理学家们从理论上假定存在的一种基本粒子，目前已成为整个粒子物理学界研究的中心，莱德曼更形象地将其称为“指挥着宇宙交响曲的粒子”。