

# 几种固氮蓝藻的固氮酶活性及其某些特性\*

中国科学院水生生物研究所第五室生化、遗传组\*\*

## 提 要

对三种固氮蓝藻：固氮鱼腥藻（水生 686）、柱孢鱼腥藻和鱼腥藻 7120 的整细胞及无细胞抽提液的固氮酶活性，进行了比较研究。水生 686 的整细胞酶活虽然不低（51.9 毫米乙烯峰高/光密度/30 分），仅次于柱孢鱼腥藻，但其无细胞抽提液的酶活却最低。这可能与它含有大量藻胶有关。研究了  $Mn^{++}$ 、 $Fe^{++}$  对蓝藻固氮酶的作用，以及测定其在不同酶浓度下的反应动力学表明：柱孢鱼腥藻中不存在象深红螺菌中所看到的那种激活因子。用甲苯-乙醇溶液处理藻细胞，对固氮酶作原位测定，探索了它的氧损伤及氧保护机理。

自 1966 年采用乙炔还原为乙烯的方法可在色谱仪上测定固氮生物的固氮能力之后，各种固氮生物的固氮作用得到了广泛的研究。在固氮蓝藻方面，先后用柱孢鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*)<sup>[1,2,3,7,8]</sup>、织线藻 (*Plectonema boryanum*)<sup>[2]</sup>、胶球藻 (*Gloeo caps* LB795)<sup>[4]</sup>、一种鱼腥藻新种 (*Anabaena* sp. 7120)<sup>[6]</sup> 固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica*) 水生 686<sup>[1]</sup> 等为材料，测定了它们的整细胞和无细胞抽提液的酶活性，及其固氮酶的一些特性。

为了获得一种具有较高固氮能力的藻种，以作酶学研究上的需要，我们比较了柱孢鱼腥藻、7120 和水生 686 的固氮能力（表 1）。在差不多相同的条件下，以我们历次所做测定结果比较看来，其无细胞抽提液的酶活，以毫微克分子乙烯/毫克蛋白/分表示，则柱孢鱼腥藻最高，平均比活为 5.5 nm 乙烯/mg 蛋白/分；7120 次之，为 3.46，水生 686 最低，为 0.13。但就整细胞的酶活而言，以毫米乙烯峰高/光密度/分表示，则柱孢鱼腥藻最高，平均为 83.4 mm 乙烯峰高/OD/30 分，686 次之，为 51.9，7120 最低，为 16.4。

在固氮生物中，其无细胞抽提液的酶活力一般与整细胞的活力相适应。但在水生 686 之中，其整细胞酶活虽然较高，可是，其细胞经过超声破碎之后，活性却大量丧失，甚至难于检测。对于这个问题，我们曾经作过一些试验和推测。除了此酶本身可能具有的特点——对氧特别敏感之外，大量的藻胶存在，也可能是个重要原因。水生 686 无细胞抽提液的蛋白浓度，只及其余两种的三分之一。蛋白浓度的难以提高，是因为水生 686 有大量藻胶，虽经强化培养（缺氮、厌氧、强光照），也难除去。低的酶蛋白浓度易受环境因素影响，这对测定它的活性是很不利的。胶多的小单枝藻，我们没有测到它的无细胞抽提液的固氮酶活性；而胶球藻的酶活之低（0.6 nmC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg 蛋白/分）<sup>[4]</sup>，只及柱孢鱼腥藻比活（4.23 nmC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg. 蛋白/分）<sup>[3]</sup> 的 1/7，亦与其胶多不无关系。

\* 本项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。

\*\* 参加工作的人员有：林惠民、何振荣、戴玲芬、王业勤、何家琬、李辛夫、杜代贤、谭渝云、张甬元、黎尚豪。

1) 中国科学院水生生物研究所第五室固氮原理组（1975 年工作手稿）。

表 1 几种固氮蓝藻整细胞及无细胞抽提液的固氮活性

材料	试验号	整细胞活性 (nmC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /OD/分)	无细胞抽提液比活 (nmC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg蛋白/分)	蛋白量 (mg/ml)	离心速度 (×g/分)
柱孢鱼腥藻	77-7-16	104.6	1.3	10	40,000×g/30
	77-9-12	51.2	4.6	9.5	40,000×g/30
	77-7-17	152.	13.5	6.5	40,000×g/30
	77-7-19	—	8.45	8.4	40,000×g/30
	77-7-29	—	3.77	6.4	40,000×g/15
	77-11-24	69	1.68	4.6	40,000×g/20
	77-11-17	40	5.89	6.3	40,000×g/30
	77-12-2	—	4.28	6.1	40,000×g/20
	平均	83.4	5.5	7.2	
7120	77-5-31	1.6	0.9	6.6	40,000×g/60
	77-6-2	5.6	0.15	7.4	40,000×g/60
	77-6-23	4.2	6.02	4.0	40,000×g/60
	平均	16.4	3.46	6.0	
686	6 次结果平均	51.9	0.13	2.37	30,000×g/30

整细胞活性、无细胞抽提液制备及固氮酶活性测定、蛋白量测定及 6 次结果的平均数，均参考水生所固氮原理组 1975 年工作手稿。

Ludden 等在深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中看到 Mn<sup>++</sup> 和较高浓度的 Mg<sup>++</sup> 对其固氮酶活性的促进作用，并认为在抽提液中存在一种对铁蛋白的激活因子<sup>[5]</sup>。我们在探索蓝藻固氮酶失活原因中，也曾用增加 Mn<sup>++</sup> 和 Fe<sup>++</sup> 的方法，以及用测定酶反应动力学方法，看其是否也存有这样一个激活因子。获得的结果表明，无论是以柱孢鱼腥藻为材料，还是以 7120 为材料，均未见到有明显的激活作用（表 2）。而以酶反应速度对酶浓度作图，也大致成正比直线关系（图 1）。如此看来，在光合固氮菌深红螺菌中看到的激活因子，在固氮蓝藻中似乎并不存在。

表 2 Mn<sup>++</sup>、Fe<sup>++</sup> 对蓝藻固氮酶的作用

材料	固氮活性 (nmC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> 峰高)				
	无细胞抽提液	加 Fe <sup>++</sup>	加 Mn <sup>++</sup>	加 Fe <sup>++</sup> + Mn <sup>++</sup>	加 TCA
柱孢鱼腥藻	410	700	630		14
	2,250		2,420		
	2,790		1,290		12
	45	40	17		
	45	33	16		14
7120	146	155	142	48	15
	35	57	37	41	20
	760	140	200		12

测定条件同表 1 注，但 MgCl<sub>2</sub> 浓度为 25 μM；

Fe<sup>++</sup>: 0.01M FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 加入量为 0.1ml；

Mn<sup>++</sup>: 0.1M MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 加入量为 0.05ml；

TCA: 20% 三氯醋酸，加入量为 0.2ml。

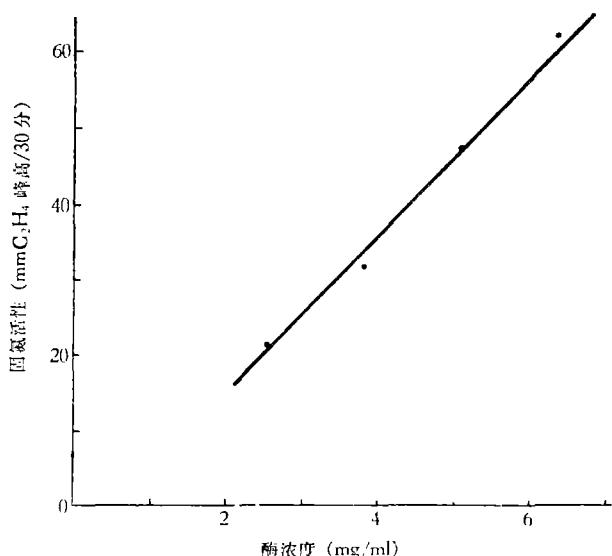


图1 酶浓度与反应速度的关系

固氮蓝藻的固氮酶,跟其他固氮生物一样,其反应的需要物都是一样的。它们对氧都很敏感,一般在10%的氧气中,5分钟就全部失活;在空气中振摇3分钟,也全部失活。用甲苯-乙醇处理藻细胞(7120)作原位测定,发现固氮蓝藻固氮酶对氧的敏感程度较小,曝在空气中振摇10分钟,仍有少量活性。此亦略可窥见固氮酶在细胞活体中对O<sub>2</sub>损伤的保护机能。

表3 蓝藻(7120)固氮酶的原位测定

处 理	比活 (nmC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg 干重/分)
反应液,完全	181
反应液,- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	25
反应液,完全,酶液曝氧10分钟	38
反应液,加TCA	6

测定方法:藻细胞用0.025M HEPES缓冲液洗一次,加入1%甲苯的乙醇溶液,在冰水中闭光振摇5分钟,除去甲苯乙醇液,以HEPES缓冲液稀释,藻细胞测酶活性。固氮活性测定方法同表1注。

### 参 考 文 献

- [1] Bothe, H., 1970. Photosynthetic nitrogen fixation by a cell-free extract of the blue alga *Anabaena cylindrica*. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, (put., 1971) **83**(9—10): 421—432.
- [2] Haystead, H. et al., 1970. Nitrogenase activity in extracts of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, **72**:235—243.
- [3] Haystead, H., and W. D. P. Stewart, 1972. Characteristic of the nitrogenase system of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Mikrobiol.*, **82**:325—336.
- [4] Gallon, J. R. et al., 1972. Characteristics of nitrogenase activating in broken cell preparation of the blue-green alga *Gloeocapsa* LB 795. *Can. J. Microbiol.*, **18**:327—332.
- [5] Ludden, P. W. and R. H. Burris, 1976. Activiting factor for the ironprotein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, **194**(4263): 424.
- [6] Peterson, R. B. and R. H. Burris, 1976. Properties of heterocysts isolated with colloidal silica. *Arch.*

- Microbiol.*, **108**:35.
- [7] Smith, R. V. and M. C. W. Evans, 1970. Soluble nitrogenase from *Anabaena cylindrica*. *Nature*, **225**: 1255.
- [8] Smith, R. V. et al., 1971. Complementary functioning of nitrogenase components from a blue-green alga and a photosynthetic bacterium. *J. Bacteriol.*, **105**(3): 913.

## THE NITROGENASE ACTIVITY AND CERTAIN PROPERTIES IN SEVERAL N<sub>2</sub>-FIXING BLUE-GREEN ALGAE

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

### Abstract

Three species of nitrogen-fixing blue-green algae, *Anabaena azotica* (HB 686), *Anabaena cylindrica* and *Anabaena* 7120, were studied with reference to nitrogenase activity in intact cells as well as in cell-free extracts. Although the nitrogenase activity of intact cells of HB 686 (51.9mmC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/O. D./30min.) was higher than *A.* 7120 (16.4mmC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/O. D./30min.), its activity in the crude extract was the lowest. This may be due to the abundance of mucilage sin the algal mass. The effects of Mn<sup>++</sup> and Fe<sup>++</sup> on the nitrogenase activity of these algae were studied also, and the reaction kinetics with different enzyme concentrations were estimated. The results obtained point out that in *A. cylindrica* there is a lack of activating cofactor, which has been demonstrated in *Rhodospirillum rubrum*. Besides, the filaments of *Anabaena* 7120 were treated with toluol-ethanol and their N<sub>2</sub>-fixing activity *in situ* was estimated in an attempt to find out the mechanism of protection from oxygen.