

文章编号: 1004-0374(2013)01-0113-06

固氮分子机理及固氮基因转移研究进展

马贵兴, 井申荣*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650504)

摘要: 生物固氮在自然界生态系统氮循环中发挥重要作用, 也在农林业生产中具有重大的潜在应用价值。固氮是一个多基因调节, 多种相关分子参与的过程。为了阐明固氮中各基因的作用以及相关分子过程, 科学家进行了长期的研究, 以期最终能够使现有不能固氮的作物获得固氮能力。对近几年固氮中相关分子研究进行总结, 希望获得对固氮分子机理的及固氮基因转移研究进展的总体认识。

关键词: 固氮; 分子机理; 固氮转移

中图分类号: Q939.9; Q78; S154.3 **文献标志码:** A

Research advances in molecular mechanism of nitrogen fixation and gene transformation

MA Gui-Xing, JING Shen-Rong*

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, China)

Abstract: Biological nitrogen fixation not only plays an important role in the nitrogen cycle, but also has significant potential value in agroforestry production. Nitrogen fixation is a process of multiple-gene regulation and involves a variety of related molecules. In order to clarify the role of each gene and related molecular processes in nitrogen fixation, make non-nitrogen fixing crops getting the ability of nitrogen fixation, scientists had many long-term studies. This review is intended to summarize the molecular mechanism of nitrogen fixation, to help obtaining the overall understanding in the molecular mechanism of nitrogen fixation and nitrogen fixation gene transformation.

Key words: nitrogen fixation; molecular mechanism; nitrogen fixation transformation

自然界存在着一类微生物, 能够将氮气转化为生物可利用的氨, 称之为固氮微生物。在人类农业生产活动中, 为了增加粮食产量, 大量施用氮肥。这些氮肥往往是在高温、高压下, 通过催化剂的作用, 由 H_2 与 N_2 反应合成。该反应需要消耗大量的能量, 也会对环境造成污染。此外, 长期使用无机氮肥也对农田土质造成了一定的负面影响, 大量使用化学肥料也会对水源等造成污染。

为了解决这些问题, 许多研究者将目光转向了自然界存在的固氮机制——生物固氮。但是生物固氮只存在于微生物和可与固氮微生物共生的豆科植物等中, 而作为人类粮食主要来源的禾本科作物如水稻、小麦、玉米等却普遍没有固氮能力。科学家为了将固氮微生物的固氮能力转移到禾本科作

物, 或改善现有可固氮豆科作物等的固氮能力, 对固氮微生物的固氮机制及其与豆科植物的相互作用等方面进行了大量的研究。

1 固氮酶及固氮反应

1.1 固氮酶

固氮过程中最重要的是固氮酶^[1]。经典的固氮酶是钼铁固氮酶, 研究者还发现有不依赖钼的钒铁固氮酶和铁铁固氮酶及在热自养链霉菌 (*Streptomyces thermoautotrophicus*) 中的一种对氧不敏感的固氮酶系统^[2]。在钒铁固氮酶系统和铁铁固氮酶系统中是由钒原子或铁原子将钼原子取代, 一般认为是由于

收稿日期: 2012-07-30; 修回日期: 2012-09-10

*通信作者: E-mail: jingshenrong@163.com

环境中钼含量较低时的一种替代性固氮酶系统。大部分固氮微生物采用的是第一套也就是钼铁固氮酶系统，其固氮能力也较其他系统为高，对于该固氮酶系统的研究也较为深入。

固氮酶是由固氮基因 *nif* 编码的，根据来源不同，通常 *nif* 位于细菌染色体或质粒上，不同物种的固氮酶基因有着较高的同源性^[3]，并在自然界中有着广泛的分布^[4]。在钼铁固氮酶系统中，该基因为 *nifK*、*nifD*、*nifH* (或合称 *nifHDK*) 等，编码的钼

铁固氮酶由两个组分组成，即钼铁蛋白 (MoFe 蛋白) 和铁蛋白 (Fe 蛋白，或称铁氧还蛋白)^[5]。其中 MoFe 蛋白是 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体，相对分子质量一般为 $2.20 \times 10^5 \sim 2.45 \times 10^5$ ，Fe 蛋白是 γ_2 二聚体，相对分子质量约为 6.5×10^4 。两种组分中单独的任何个并没有固氮酶活性，只有结合在一起才能发挥固氮酶的作用。一般认为固氮酶催化的反应可以书写为如下的形式： $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$ 。钼铁固氮酶模式见图 1^[6]。

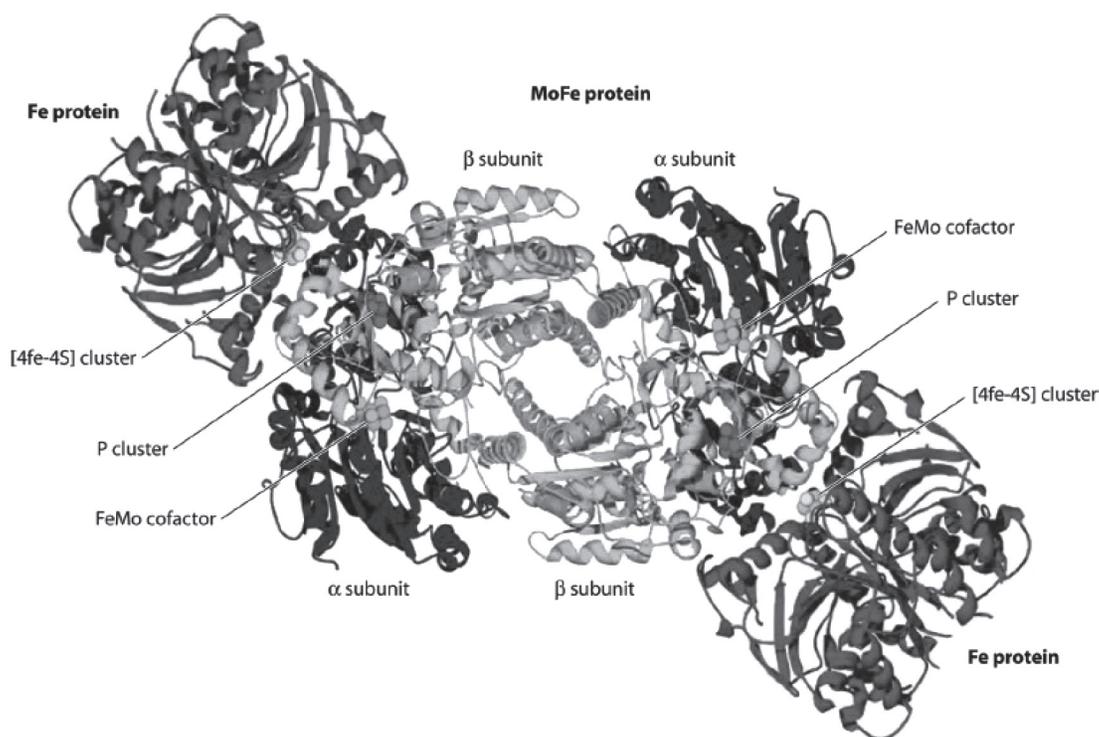


图1 钼铁固氮酶模式图^[6]

1.2 固氮反应的电子传递

为了实现最终的固氮转移和人工模拟生物固氮，固氮酶结构及固氮反应的电子传递长期以来是固氮研究的重要方面。

生物固氮是一个耗能过程，必须有 ATP 的参与。在固氮酶的钼铁蛋白组分中有两个含有金属原子的活性中心，即 M-簇 (FeMo-辅基) 和 P-簇。其中 FeMo-辅基被认为是与 N_2 络合的活性中心，而 P-簇则在催化固氮反应中参与电子传递过程^[7-8]。根据文献^[9-10] 提出的固氮酶催化模型和随后得到的 X 射线衍射电子密度图，M-簇是由 MoS_3Fe_3 和 FeS_3Fe_3 这两个具有缺口的类立方烷型簇合物通过三个非蛋白配体桥联而成^[11]。FeMo-辅基的化学结构见图 2^[12]。

在催化过程中，氮气分子与 M-簇结合，电子由 Fe 蛋白传递给 MoFe 蛋白的 P-簇，然后通过 P-簇再将电子传递给 M-簇，进而完成 N_2 的还原。在该反应过程中，MgATP 结合到 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白上，通过水解释放能量，驱动该催化反应的进行，此外，MgATP 与 Fe 蛋白的结合也可以改变其构象及电势，促进 Fe 蛋白与 MoFe 蛋白的结合^[13]，也有利于反应的进行。

2 固氮基因调节

常见的钼铁固氮酶是一种氧敏感酶，即在氧气存在的情况下会导致其酶活性的丧失。除此之外，还有许多物质都会造成固氮酶的活性下降，如 H_2 、CO、

较多的种类和多样性^[24],而且近年来也不断有新的共生固氮菌被发现^[25-26],这些对于扩大共生固氮菌的研究范围有着积极的意义。除豆科植物与根瘤菌之间能够通过共生固氮外,已发现 *Frankia* 菌能够与多种非豆科植物(主要为木本双子叶植物)共生^[27-29],形成根瘤进行固氮,并具有较广的分布和较宽的宿主种类^[30]。因其共生的为非豆科植物,引起许多研究者的关注,试图在相关研究中获得突破,使其能够与禾本科作物共生,形成根瘤进行固氮。

近来的研究显示,与根瘤菌相似,*Frankia* 菌也需要经过一系列的分子应答才能与宿主植物形成根瘤,但是其与根瘤菌的根瘤形成有诸多相异之处。迄今为止,尚未发现 *nod* 基因在 *Frankia* 菌中的存在。其耐氧保护机制也与根瘤菌不同,在根瘤菌中主要依赖于豆科植物合成的豆血红蛋白,而在 *Frankia* 菌中大量存在藿烷类(hopanoid)物质,可能与其耐氧保护有关。此外,其在侵染植物时 *Frankia* 菌需要水解细胞壁,进入植物体内形成根瘤。在早期感染中渗透因子(diffusible factors, DFs)发挥着较为关键的作用^[31]。这些都与根瘤菌表现出了明显的不同。在一些情况下, *Frankia* 菌只是定植于植物根部,而不形成根瘤,说明 *Frankia* 菌与其宿主共生方式有着多样性。而另有研究显示,与豆科植物与根瘤

菌之间相互作用类似, *Frankia* 菌也受到植物根部沁出物质的调节^[32]。这些研究为更好了解生物固氮的多样性,为固氮转移提供借鉴,也在农业生产中有了一定的应用。

4 固氮转移研究

4.1 固氮转移研究思路

固氮的最终目的是通过生物技术使不具有固氮功能的作物获得固氮能力。根据现有对固氮过程的了解,主要思路有如下几个^[18]:一是转移固氮基因到作物中,通过遗传改造使其获得自主固氮能力,该方法被认为是最有价值和应用前景的途径;二是通过化学或其他方法诱导植物结瘤,使植物与根瘤菌或 *Frankia* 菌共生,获得固氮能力;三是转移固氮基因到现有植物的共生菌中,使其共生菌获得固氮能力,进而与植物共生,提供氮素。为了实现禾本科作物的固氮,许多研究者做出了大量的努力。

4.2 固氮转移研究进展

在诱导结瘤方面,Al-mallah等^[33]研究显示,利用水解酶处理水稻根细胞壁后,根瘤菌可侵染并与水稻形成根瘤。该研究也为禾本科植物诱导结瘤方面提供了新的思路,但由于植株需要水解酶处理,其实用性较差。共生固氮菌也可以通过植株表皮伤口进入植物体内,形成具有固氮活性的根瘤^[34],此发现提示研究者可通过新的方法诱导非豆科植物结瘤。除细胞分裂素对根瘤菌诱导形成根瘤有着重要的作用外^[35],国内外研究表明,添加人工合成的植物激素如2,4-D等可以诱导促进烟草^[36]和水稻^[37]根部产生根瘤状结构,并具有一定的固氮活性。其他植物激素可能也具有类似的作用^[38],但是诱导产生的根瘤样组织存在着固氮活性较低的问题。诱导结瘤的进一步研究也需根瘤菌与宿主植物相互作用的更为深入的研究作为理论支持。

在改造植物共生菌方面,有研究者将 *Frankia* 菌和 *Streptomyces* 菌的原生质体融合,形成的融合子具有两种菌的特征,并且具有较为稳定的结瘤固氮能力^[39]。而我国也有研究者进行了类似的研究^[40],为探索原生质体融合改造菌株,从而获得能够与植物共生并具有固氮能力的新型菌株提供了借鉴。由于植物共生菌也属于原核生物,通过基因工程技术将固氮基因转移到植物共生菌也就具有一定的可行性。此外,有研究显示丛枝菌根菌(*Arbuscular mycorrhiza*)在与植物共生过程中的Myc因子与Nod因子有着相似的结构,而该菌与70%~90%的陆生

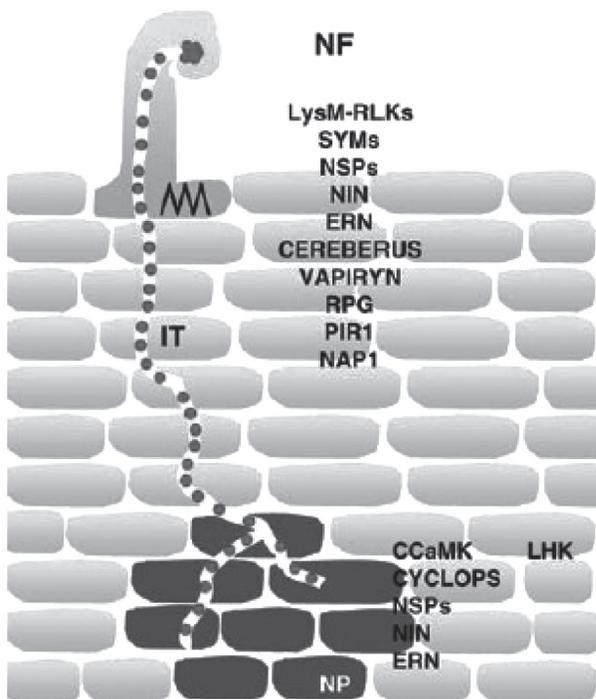


图3 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)侵染过程示意图^[19]

植物有共生关系^[41]。该发现或许能够为固氮转移提供新的思路, 对于扩展固氮菌的宿主范围具有一定意义。

较早的研究试图通过转基因技术将固氮酶基因直接转入真核细胞如酵母菌中, 虽然固氮酶基因能够在酵母中保持遗传稳定性, 但是由于真核、原核基因结构及表达系统的差异以及固氮酶的氧敏感性, 这种方法并不能使酵母获得固氮能力。通过发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogines*) 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefacines*) 转染, 研究者已能够通过转基因技术将 *Frankia* 菌基因转入木麻黄并形成根瘤, 经测定具有一定的固氮酶活性^[42-43]。这说明该转基因体系在转移 *Frankia* 菌固氮基因有潜在应用价值, 为利用该方法研究固氮基因转移开展了有益的尝试, 但是转移固氮基因到植物内需要转移固氮酶及相关调控基因^[18], 难度较大, 这可能也是这方面进展较少的原因。

5 展望

为了实现非豆科尤其是禾本科植物的固氮, 从发现生物固氮开始, 许多研究者付出了大量的努力, 并取得了许多重要的成果。由于固氮酶特殊的理化性质和固氮中复杂的分子机制, 固氮研究也还面临着许多问题和挑战。现已基本阐明固氮酶、固氮电子传递和相关基因调控的机制; 但根瘤菌与宿主间相互作用还有很多不甚明确的地方, 尤其是在 *Frankia* 菌方面, 由于其较高的固氮活性和较宽的宿主范围, 可能是禾本科植物固氮研究的突破点。有报道显示, *Frankia* 菌在非豆科植物诱导结瘤获得成功, 但是诱导后的根瘤样组织固氮能力较弱, 也存在着生产应用操作性不强的问题。在转移固氮基因到非豆科植物共生菌方面, 虽取得了一定的成果, 但尚未有商业化的非豆科植物共生固氮菌菌剂的报道。此外, 对于基因工程菌投放到自然环境中可能带来的问题也需要进一步的研究。直接转移固氮基因到非豆科植物中被认为是遗传性稳定、应用操作性较强的一种方案, 但是固氮酶的氧敏感性问题尚未解决, 作为原核基因, 其在真核系统中的表达也存在着许多难题, 因此, 在这方面进展较为缓慢。基于理论研究的成果, 如共生固氮中分子调节方面, 研究者已经成功诱导了非豆科植物结瘤固氮, 但是, 距离最终实现禾本科作物的自生固氮还有一定的距离。基因工程技术的广泛深入应用和固氮分子机理的研究为最终实现该目的提供了理论和技术

支持, 相信在不远的将来禾本科作物的自生固氮一定能够实现。

[参 考 文 献]

- [1] Burgess BK, Lowe DJ. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev*, 1996, 96(7): 2983-3012
- [2] Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1997, 272(42): 26627-33
- [3] Fani R, Gallo R, Lió P. Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the nifD, nifK, nifE, and nifN genes. *J Mol Evol*, 2000, 51(1): 1-11
- [4] Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, et al. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 162
- [5] Rees DC, Akif Tezcan F, Haynes CA, et al. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos Transact A: Math Phys Eng Sci*, 2005, 363(1829): 971-84
- [6] Bothe H, Schmitz O, Yates MG, et al. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(4): 529-51
- [7] Zhao Y, Bian SM, Zhou HN, et al. Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(7): 745-55
- [8] Hoffman BM, Dean DR, Seefeldt LC. Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Acc Chem Res*, 2009, 42(5): 609-19
- [9] Wilson PE, Nyborg AC, Watt GD. Duplication and extension of the Thorneley and Lowekinetimodel for *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase catalysis using a MA THEMA TICA software platform. *Biophys Chem*, 2001, 91(3): 281-304
- [10] Kim J, Woo D, Rees DC. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. *Biochemistry*, 1993, 32(28): 7104-15
- [11] Einsle O, Tezcan FA, Andrade SL, et al. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor. *Science*, 2002, 297(5587): 1696-700
- [12] Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 2009, 460(7257): 839-47
- [13] Burgmayer JN, Stiefel EI. Molybdenum enzymes, cofactors, and systems: The chemical uniqueness of molybdenum. *J Chem Educ*, 1985, 62(11): 943
- [14] Seefeldt LC, Rasche ME, Ensign SA. Carbonyl sulfide and carbon dioxide as new substrates, and carbon disulfide as a new inhibitor of nitrogenase. *Biochemistry*, 1995, 34(16): 5382-9
- [15] 徐晔, 张金池, 王广林, 等. 固氮酶的研究进展. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 61-4
- [16] Lee H, Sung SB, Kim HB, et al. Sequence analysis and expression patterns of two nifA genes from *Frankia*

- EuIK1. *Aust J Plant Physiol*, 2000, 28(9): 939-49
- [17] Hill S, Austin S, Eydmann T, et al. *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(5): 2143-8
- [18] Alqueres SM, Oliveira JH, Nogueira EM, et al. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol*, 2010, 192(10): 835-41
- [19] Beatty PH, Good AG. Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science*, 2011, 333(6041): 416-7
- [20] Charpentier M, Oldroyd G. How close are we to nitrogen-fixing cereals?. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(5): 556-64
- [21] Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(1): 98-111
- [22] Takahashi K, Sugiyama A, Yazaki K. Involvement of auxin distribution in root nodule development of *Lotus japonicus*. *Planta*, 2011, 234(1): 73-81
- [23] Schnabel EL, Kassaw TK, Smith LS, et al. The ROOT DETERMINED NODULATION1 gene regulates nodule number in roots of *Medicago truncatula* and defines a highly conserved, uncharacterized plant gene family. *Plant Physiol*, 2011, 157(1): 328-40
- [24] Mhadhbi H, Chihaoui S, Mhamdi R, et al. A highly osmotolerant rhizobial strain confers a better tolerance of nitrogen fixation and enhances protective activities to nodules of *Phaseolus vulgaris* under drought stress. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(22): 4555-63
- [25] Hoque MS, Broadhurst LM, Thrall PH. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, 61(2): 299-309
- [26] Criminger JD, Hazen TH, Sobecky PA, et al. Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(18): 5959-61
- [27] Ardley JK, Parker MA, Meyer SED, et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are α proteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62(pt11): 2579-88
- [28] Persson T, Benson DR, Normand P, et al. Genome sequence of "Candidatus Frankia datisciae" Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. *J Bacteriol*, 2011, 193(24): 7017-8
- [29] Sprent JI. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol*, 2007, 174(1): 11-25
- [30] Markmann K, Parniske M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules?. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(2): 77-86
- [31] Bautista GH, Cruz HA, Nesme X, et al. Genomespecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp. *Syst Appl Microbiol*, 2011, 34(3): 200-6
- [32] Gabbarini LA, Wall LG. Diffusible factors from *Frankia* modify nodulation kinetics in *Discaria trinervis*, an intercellular root-infected actinorhizal symbiosis. *Funct Plant Biol*, 2010, 38(9): 662-70
- [33] Beauchemin NJ, Furnholm T, Lavenus J, et al. Casuarina root exudates alter the physiology, surface properties, and plant infectivity of *Frankia* sp. strain Cc13. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(2): 575-80
- [34] Al-mallah MK, Davey MR, Cocking EC. Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. *J Exp Bot*, 1989, 40(4): 473-8
- [35] Charpentier M, Oldroyd G. How close are we to nitrogen-fixing cereals?. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(5): 556-64
- [36] Heckmann AB, Sandal N, Bek AS, et al. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24(11): 1385-95
- [37] 陈今朝. 2,4-D诱导烟草结瘤和固氮的研究. *涪陵师范学院学报*, 2004, 20(05): 80-2
- [38] Ridge RW, Ride KM, Rolfe BG. Nodule-like structures induced on the roots of rice seedlings by addition of the synthetic auxin 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Aust J Plant Physiol*, 1993, 20(6): 705-17
- [39] Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, et al. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun*, 2010, 1(1): 1-12
- [40] Prakash RK, Cummings B. Creation of novel nitrogen-fixing actinomycetes by protoplast fusion of *Frankia* with streptomycetes. *Plant Mol Biol*, 1988, 10(3): 281-9
- [41] 王守刚, 王永岐, 沈阿林, 等. 利用细胞电融合技术选育固氮菌、磷钾菌的方法探讨. *河南农业科学*, 2004, (04): 43-5
- [42] Maillet F, Poinso V, Andre O, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 2011, 469(7328): 58-63
- [43] Diouf D, Gherbi H, Prin Y, et al. Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, 8(4): 532-7
- [44] Franche C, Diouf D, Le QV, et al. Genetic transformation of the actinorhizal tree *Alloccasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J*, 1997, 11(4): 897-904