

用比色法测定固氮酶活性方法的研究*

周鸿宾 贺玉成 王毅岩
杜大至 苏巧梅 袁长芳

(山西生物研究所,太原)

根据乙炔能被固氮酶还原成乙烯的原理,用气相色谱测定固氮酶活性已被广泛采用。1973年,La Rue T. A. 等曾发表了应用比色测定乙烯法测定固氮酶活性的方法^[1]。该方法根据还原的乙烯进一步氧化成甲醛,当加入乙酰丙酮和铵盐溶液时,基于 Hantzsch 反应形成了 3,5-二乙酰-1,4-二氢二甲基吡啶(DDL),渐渐显出黄色。在最适条件下 DDL 在 412nm 波长有一个最高吸收峰^[2]。在一定范围内光密度值与乙烯量成正比例。此方法十分灵敏,所以即使微量乙烯也可测出。

在实际工作中,我们对这一方法进行了反复的研究,对其中某些环节作了必要的改进,使其对固氮酶活性的测定更为灵敏、快速和准确,使用范围更为广泛。

材料与方 法

一、试剂配制(以下均用蒸馏水配制)

0.05M NaIO₄ 10.7g/L, 贮于棕色瓶中,塞紧瓶塞,只能用四周。

0.005M KMnO₄ 0.79g/L, 贮于棕色瓶中,塞紧瓶塞,通常在 1—2 天后形成少量沉淀,如有大量沉淀出现,则换用另一批号 KMnO₄。

4N H₂SO₄

4N NaAsO₂ 52g/100ml。

氧化剂溶液: 0.05M NaIO₄ 40ml, 0.005M KMnO₄ 5ml, 用 NaOH 调 pH 7.5, 加水至 100ml。

乙酰丙酮(2.5 间二酮)(AR)

Nash 试剂: 150g 醋酸铵, 3ml 醋酸, 2ml 乙酰丙酮,最后稀释至 1L。

二、操作步骤

吸取氧化剂溶液 1.5ml 入 10ml 链霉素瓶中,塞紧橡皮塞,用胶布密封。用注射器从瓶中抽出 2—3ml 空气,然后用注射器从乙炔还原的培养物中抽取等量的含有乙烯的气体注入瓶中,在室温条件下(20℃左右)剧烈振荡 25 分钟。起封后加入 0.25ml 4N NaAsO₂ 和 0.25ml 4N H₂SO₄ 以破坏过量的氧化剂。再加入 1ml Nash 试剂。1 小时后在 412nm 波长测其光密度(O. D.)。

三、标准曲线绘制

取氧化剂溶液 1.5ml 入 10ml 链霉素瓶中,密封。分别注入 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 μM 的标准乙烯(事先从瓶中抽出同体积的空气),剧烈振荡 25 分钟。以下操作同上述程序。以乙烯的浓度为横坐标,光密度为纵坐标,绘制标准曲线。乙烯浓度在 0.05—0.1 μM 范围内成线性关系。

四、固氮酶活性计算

在标准曲线上查出所测样品的乙烯含量,然后用下列公式计算其固氮酶活性。用还原后产生的乙烯量(nM)表示。

$$W = W \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000$$

式中 W 为样品所还原的乙烯总量(nM); W 为标准曲线上查出的链霉素瓶中乙烯的浓度

* 本工作是在杜竹铭教授指导下进行的。本所中心实验室周培根、莫海云、贺重同志承担气相色谱分析。

(μM); V_1 为样品反应容器的容积 (ml); V_2 为由样品容器所抽取的气体量 (ml)。

结果与讨论

一、氧化反应时间对测定结果的影响

原设计程序规定氧化振荡时间为 90 分钟, 但是最终显色极弱。其原因是乙烯被氧化成 DDL 后, 如不及时破坏过量的氧化剂, 生成物会进一步氧化, 使偏差变大。

经过多次试验, 取适当稀释的乙烯气体 1ml, 注入反应瓶中, 置振荡机或手摇 (每分钟 200 次左右, 使液体与气体充分接触), 反应不同时间, 结果如表 1。

表 1 乙烯氧化时间的选择

时间 (分)	5	10	20	30	50	70	90
O. D. 值	0.030	0.063	0.128	0.143	0.095	0.058	0.040

由上表看出, 氧化时间选用 30 分钟较合适。

二、乙炔量对分析结果的影响

过量的乙炔会干扰氧化剂对乙烯的氧化反应。在原方法中作者指出: “如果乙炔在 0.3ml

以上就妨碍乙烯的测定”。我们在反应瓶中注入 2ml 标准乙烯, 然后分别注入不同量的乙炔, 振荡 25 分钟, 测得结果如表 2。

表 2 乙炔量对分析的影响

乙炔 (ml)	0.1	0.3	0.5	1	2	3
乙烯 (nM)	6580	9520	9240	6580	4340	4340

总的看来, 反应瓶中的乙炔量在 0.3—0.5ml 时, 实验是较准确的, 如超过 1ml 则明显干扰反应。

三、不同乙炔量对酶活性的影响

在固氮酶还原乙炔的过程中, 乙炔的用量必须适宜, 否则会使固氮酶的活性难以充分显示, 并影响到分析结果的准确性。乙炔量最好根据固氮菌或根瘤的酶活高低而定, 不能强求一律。我们选用我组分离的固氮菌 A_{21} 菌株, 接种在 18×180 mm 的试管斜面上, 密封, 注

表 3 不同乙炔量对固氮酶活性的影响

乙炔 (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0
乙烯 nM/斜面/小时	379.2	638.8	945	1125.8	1283.3	968.3

表 4 三种方法测定结果的比较

样品	固氮酶活方法	nM/斜面/小时(乙炔)				
		气相色谱	改进法	与气相色谱偏差	原法	与气相色谱偏差
A-1		1027	992	-35	1249	+222
A-2		980	887	-93	1634	+794
A-3		840	910	+50	1459	+619
B-1		887	1038	+70	1762	+875
B-2		840	957	+117	1762	+922
B-3		1050	1038	-12	1984	+934
C-1		934	1038	+104	1899	+875
C-3		1120	1044	-76	2859	+1739
SP ₂		105	82	-23	6	-99

人不同量的乙炔,培养一定时间后,抽取气样进行固氮酶活性测定,结果如表 3。

可见, A₂₂₁ 菌株的酶活测定中注入 3ml 乙炔较为适宜。

四、氧化剂浓度的选择

原方法配制的氧化剂难以存放,半天到一天即有沉淀产生,必须另行配制,使用很不方便。我们将原氧化剂稀释一倍,存放较长时间未有沉淀发生。而且对分析结果无明显的影响。

五、灵敏度实验

改进后的方法对乙烯的最小检测量为 $0.05\mu\text{M}$, 而原方法达到相同光密度的最小检测量为 $0.5\mu\text{M}$, 故改进后的方法较原方法灵敏度有显著提高。

六、效果比较

取不同稀释度的乙烯样品,分别用原方法,

改进后的方法和 GC-5A 气相色谱法进行测定,结果如表 4。

由表 4 可以看出改进方法测得的结果和气相色谱测得的结果基本一致,能更准确地反映固氮酶的活性。

结 语

综上所述,改进后的方法较原法灵敏度有显著提高。样品氧化时间由 90 分钟改为 30 分钟,准确度与气相色谱测得结果基本一致。所用氧化剂减少了一半。此方法由于设备简单,操作方便,不仅适用于室内分析,同时也适合于野外工作。可做整体植株测定,也可以作离体根瘤或菌体斜面固氮酶活性的测定,使用范围比较广泛。故此法是测定固氮酶活性的一种较好的方法。

参 考 文 献

- [1] La Rue T. A. and Kurz W. G., *Plant physiol* **51** (6) 1074—1075, 1973.
- [2] Nash B. T. *Eiochemical J.* **55**: 416—417, 1975.