

生物固氮研究的重大进展和 当前研究的“热点”

中国科学院生物科学与技术局*

一、生物固氮研究的意义和战略目标

所谓生物固氮,是指自然界中一些微生物和蓝藻将大气中的氮转化成铵的过程。目前能固氮的生物,细菌有 35 属,藻类有 21 属,大约 300 多种。

研究生物固氮,在基础理论和实际应用上都有重大意义。大家知道,氮素是组成生命的基本元素之一。很多生物分子,特别是编码基因的脱氧核糖核酸及其转录产物核糖核酸和转译产物蛋白质都含有氮元素。氮素又是植物生长的主要肥料,地球上植物所需大部分的氮肥是通过生物固氮途径获得的。据统计,每年固定空气中氮素 15000 多万吨,生物固氮约占 70%。

自然界的氮素处在一个无限反复循环的过程,氮素通过生物固氮作用被植物吸取后,植物再被动物利用。植物、动物死亡后,其尸体则被微生物分解,释放出氮气,又归还到大气。在这种氮素循环总过程中,生物固氮起着重要作用。

生物固氮原理是通过生物体内一种固氮酶的催化作用,将氮变成了铵。与目前化工生产的合成铵比较,生物固氮具有很大优越性。化工生产合成铵只能在高温高压下进行,需要大量的技术设备,一般转化率仅为 2%—20%。生物固氮却是在常温常压下进行,而且其效率比高温高压高上千百倍。如果人类能够化学模拟固氮酶的作用原理,人工合成模拟化合物,在温和条件下合成铵,将对氮肥工业和其他化学工业产生深远影响。

生物体功能的表达都是与遗传相关,即是由基因决定。当然,固氮生物的固氮酶也是由其基因决定和表达。特别是豆科植物根瘤内的根瘤菌能与豆科植物共生固氮,这是生物界长期进化形成的巧夺天工的结果。随着分子遗传学、基因工程以及其他生物工程技术的建立和发展,人们试图把固氮基因或固氮生物的特征转移到粮食作物上,使其能产生固氮酶,象豆科植物一样自行固氮。如果粮食植物自行固氮成功,则将大大推动绿色革命的进程,满足人类对粮食的极大需要。

由上所述,生物固氮研究有两个战略目标:第一,将固氮基因和其他相关基因或固氮生物引入非豆科植物,特别是农作物,实行自我供氮;第二,化学模拟固氮酶的作用原理,实现温和条件下的合成铵生产。在这两个战略目标中,固氮生物化学是一个纽带,它既为固氮生物工程成功与否提供了鉴定手段,又是化学模拟的信息来源。

生物固氮研究的深入和战略目标的实现,充分体现了生物化学、分子遗传学、微生物学、化学,甚至生物物理学等学科密切联系和交叉的必要性,因而必将带动和开拓有关前沿领域的发展。

* 本文在撰写过程中,宋鸿遇、荆玉祥、梁寅初先生作了大量工作,并得到卢嘉锡先生的指导。

二、国外生物固氮研究的状况

生物固氮研究已有很长的历史。1888 年,德国科学家发现了豆科根瘤中的固氮生物,迄今已有 100 年了。直到本世纪 60 年代末固氮生物化学研究的突破,解决了固氮酶的分离、钝化、体外重组活性测定以及方法学的一些问题,才大大促进了生物固氮研究的发展。70 年代,一方面是化学家的参与,开始化学模拟固氮酶,发展了固氮化学;另一方面是建立和发展了固氮分子遗传学方法。现在国际上生物固氮研究已有了庞大的队伍,特别是美、德、英、法、意、澳等国研究力量最强。由于生物固氮研究的重要性,近 20 年来,几乎一直是上述国家的重要研究项目。美国 1985 年制定的有关农业发展的基础生物科学规划、西欧的“尤里卡”计划以及日本 1986 年制定的“国际前沿基础研究系统”和“人类前沿研究领域科学计划”中,都有生物固氮研究的内容。近年来,荷兰、新西兰、印度等国家也加快了研究步伐。通过世界各国科学家的不断努力,已使生物固氮研究取得了不少重大的进展,现分述如下:

(一) 固氮酶学

1. 固氮酶

如前所述,将氮分子变成氨是通过固氮酶催化进行的。固氮酶十分复杂,由两个组分组成。一个叫铁钼蛋白,另一个叫铁蛋白。铁钼蛋白在固氮作用中起络合氮分子(N_2)的作用;铁蛋白则起传递电子的作用,将生物体中电子供体的电子传递到铁钼蛋白,使氮分子获得电子被还原成氨。所以固氮过程中必须要有这两个组分同时参与,才有固氮活性。

近年来从铁钼组分中分离到了一种因子,叫铁钼共因子($FeMoCo$),并研究了其结构,被称为是固氮酶的活性中心。铁钼共因子的生物构成研究取得了重要进展,发现高柠檬酸及其衍生物是铁钼共因子的一个组成部分,首次证明高柠檬酸在原核生物中的生物学活性,并在体外合成铁钼共因子方面向前迈进了一步,为化学模拟固氮酶提供了依据。

随着固氮酶学研究的深入,其复杂性便显得越来越充分。除了通常的含金属钼的铁钼蛋白之外,还发现了含金属钒的铁钒蛋白组分,并分离出铁钒共因子。更令人惊奇的是还发现了第三套固氮酶系统。铁钒蛋白是在缺钼含钒的培养条件下产生的。这第三套固氮酶却是在既无钼又无钒的培养条件下产生的。这三者中,就其结构而言前二者有很大的相似性,但催化活性有相当大的差别。第三套固氮酶活性较低,对其认识还有待深入。

2. 固氮酶反应的其它特征

(1) 固氮酶催化多个底物还原。氮分子(N_2)是固氮酶作用的底物,将其还原成为铵产物。除此之外,还有乙炔、氰、迭氮、甲基异腈等,都可以作为固氮酶作用的底物,各自被还原成相应的产物。

(2) 不同固氮生物固氮酶组分的互补性。至今从 20—30 种固氮生物中分离到固氮酶组分。实验证明,一种固氮生物固氮酶组分—铁钼蛋白可以和另一种固氮酶组分—铁蛋白组合在一起,产生酶活性反应。由此说明,虽然是不同的固氮生物,但它们的固氮结构有相似性。

(3) 固氮酶反应对氧的敏感性。用化工法合成铵的铁催化剂对氧很敏感,所以催化剂要放在一个密闭无氧的合成塔内才能合成铵。固氮酶也是如此,遇氧就失去其活性。嫌氧生长

的固氮生物,固氮酶存在遇氧失活问题,然而对大多数需氧固氮生物,则体内还具有避免固氮酶遇氧失活的保护系统。在豆科植物的共生固氮根瘤中有一种豆血红蛋白,犹如动物和人的血红蛋白一样,能结合根瘤内的氧,从而造成固氮根瘤(又称拟菌体)周围的无氧(严格说是低氧分压)条件,以利于固氮作用。

(4) 固氮酶的铵关闭效应。当固氮生物环境中有铵或其他氮化物存在时,固氮酶活性被抑制,其铁蛋白组分被修饰(核糖化),从而使固氮酶失活。当去除铵或氮化物,则铁蛋白组分分解核糖化,从而恢复固氮酶活性。

(5) 固氮酶反应需要能量(ATP)。ATP 是固氮酶反应需要的能量形式。它结合在铁蛋白组分,降低其氧还电位。当铁蛋白把电子传递到铁钼蛋白时,ATP 同时水解成 ADP,提供了能量。不同固氮生物固氮酶反应所需的 ATP 能量不同。与此同时,固氮酶反应还有放氢作用,又浪费了部分能量。

(二) 固氮酶的化学模拟

自从 60 年代末到 70 年代初,对固氮酶的性质刚了解到其组分含有钼、铁硫元素时,就引起化学家们注意,开始探讨酶的活性中心结构,并着手化学模拟研究。最初是合成分子氮金属络合物和单核或双核的钼-半脱铵酸模拟体系,但它们都未能对分子氮得到活化作出令人信服的解释,更未能对固氮酶底物的多样性作出满意回答。

70 年代中期化学模拟固氮酶结构与功能研究进入了新的阶段。我国卢嘉锡、蔡起瑞和唐敖庆先生根据固氮酶研究提供的信息、络合催化原理和化学键理论首先分解提出有钼铁硫结构参数的网兜状混合原子簇(福州模型)和立方烷型混合原子簇(厦门模型)等结构的固氮酶活性中心模型。这两个模型的推出,不仅把我国固氮酶化学模拟研究推向国际前沿,而且结束了固氮酶活性中是单核还是双核的猜测。随后国际上其它实验室也提供了与我们大同小异的钼-铁-硫原子簇模型。

70 年代后期从固氮酶铁钼蛋白组分分离到铁钼共因子,与缺该因子的铁钼蛋白组分和铁蛋白组分体外重组,结果表现了固氮酶的活性反应,因此这种铁钼共因子被认为是固氮酶的活性中心。它恰好是由钼-铁-硫元素组成。这方面的工作证实了上述我国提出的模型的科学性,同时又使化学模拟研究推向新的阶段,这就是将合成的模拟物与缺铁钼共因子的酶的生化研究紧密结合。但是至今还没有得到模拟物与缺铁钼共因子酶重组后的活性。看来对酶的活性中心的结构及其周围的配位环境等问题还没有完全了解,还有待于它的突破以推动化学模拟研究的进展。

(三) 固氮分子遗传学

1. 固氮基因

从固氮酶及其反应特征,可见生物固氮系统非常复杂,反映出其基因(称固氮基因)也很复杂。研究固氮基因最初从克氏肺炎杆菌开始。这种细菌与大肠杆菌亲缘关系相近,具有后者的很多特点,因而成为研究固氮基因的突破口。

迄今为止发现克氏杆菌固氮基因有 19 到 21 个,总长度有 2.4 万个脱氧核糖核酸碱基对,并且已经完成其全部顺序化排列的测定。这些基因连锁在一起,组成七个操纵子,其中有两个

操纵子的转录方向相反。在这些固氮基因中有三个为固氮酶的结构基因、八个固氮酶加工(包括铁钼辅因子合成)基因,二个电子传递基因、二个调节基因以及还不明性质的基因等等。在细微的结构研究上可能还会有新的发现。

关于固氮酶的结构基因,已经证明有 19 种以上的固氮生物(包括革蓝氏阴性、阳性细菌,放线菌和蓝绿藻在内)在核苷酸的排列顺序上相同或大致相似。

调节基因相当于一个开关,打开了其他的有关基因就开始工作,关闭了就停止工作。固氮酶的氧敏感和铵阻碍效应,实际上就是调节基因作用的结果。

近年来除了对克氏杆菌的固氮基因及其调节作用有了详尽的研究外,对其它的自生固氮生物,如棕色固氮菌、圆褐固氮菌等等的固氮基因研究也有了突飞猛进的进展,例如铁钼蛋白和第三固氮酶及其基因就是首先在这两种固氮生物中发现的。

2. 豆科植物根瘤内有一种根瘤细菌,具有固氮作用。确切地说,这种固氮作用称共生固氮。豆科植物共生固氮是根瘤菌和宿主植物两者相互作用和协调的结果。前者将固定的氮供给宿主植物合成氨基酸和蛋白质,后者将光合作用的部分产物输送到根瘤,提供能量,给根瘤菌自行固氮。经过比较,在所有固氮生物中,根瘤共生固氮效率比较高,最有经济价值,但又是最为复杂的生物固氮形式。

(1) 根瘤菌的感染和结瘤固氮

根瘤菌在土壤中是一种杆状腐生细菌,通常没有固氮作用,但一旦侵入到豆科植物根内形成根瘤菌后,就具有固氮作用。

根瘤菌对豆科植物的感染是通过根毛区聚集,然后以极性方式附着在根毛上。根毛接受到信息后其壁内陷,并逐步向根毛内部延深,形成侵入线,直达根的皮层细胞并大量繁殖。根瘤菌分泌的激素刺激被浸染的细胞分裂,在局部区域形成了凸起的根瘤,这时根瘤内的细菌由于形状的改变,被称为拟菌体,具有固氮作用。

需要指出的是根瘤对豆科植物的侵染和结瘤具有一定的专一性。例如大豆根瘤只对大豆的根侵染和结瘤,苜蓿根瘤菌只对苜蓿侵染和结瘤。但有的根瘤菌也表现了广宿主范围,如豇豆根瘤菌可以既可使豇豆,也可使菜豆、羽扇豆结瘤。

(2) 根瘤菌的结瘤和固氮基因

根瘤菌有快速生长型和慢速生长型之分。一般来说,快速生长型根瘤菌(如苜蓿、豌豆根瘤菌等)的结瘤固氮基因位于质粒(染色体外的 DNA)上,慢速生长型根瘤菌(如大豆、豇豆根瘤菌等)的则位于染色体上。

目前研究发现有两种结瘤基因:一种叫共同的结瘤基因,另一种叫宿主专一性结瘤基因。前者为所有根瘤菌所共有,与根瘤的早期发育,如根毛的卷曲、侵入线形成等有关;后者则与不同的根瘤菌识别专一的宿主有关。现在所发现的共同结瘤基因和宿主专一结瘤基因数目因研究的根瘤不同而异。广宿主范围的根瘤菌有多套的宿主专一性基因分别对应于所选择的宿主。

共同结瘤基因的表达和调节充分体现了根瘤菌与植物的相互关系。在共同结瘤基因中有一种叫 *nodD* 的调节基因,其产物可以激活其它结瘤基因表达,但是有的 *nodD* 基因产物事先与植物产生的类黄酮化合物结合,才能向其它结瘤基因发出信号。进一步的研究表明,*nodD* 产物与 DNA 形成复合物的,在根瘤形成中起调节作用。

根瘤菌的固氮基因都表现有与克氏杆菌相似的固氮酶结构基因,也有类似的电子传递基

因和调节基因。

(3) 根瘤菌的胞外粘多糖和其基因在结瘤中的作用

根瘤菌体表的粘多糖有脂多糖和外多糖之分,在根瘤形成中起不同作用。外多糖是一种信号分子,它与豆科植物根毛上的识别蛋白(又称植物凝集素)产生凝集作用,参与侵入线形成。脂多糖则与根瘤发育的后期阶段有关,使根瘤菌分化成拟菌体。分子遗传学实验指出,产生外多糖的基因很复杂:一种是在根瘤菌的大质粒上,另一种则在染色体上。基因的数目及其表达和调控作用也十分复杂。

(4) 豆科植物参与有效固氮的基因结瘤素及其基因

豆科植物共生固氮必须有植物的产物参与,这些产物通称结瘤素。现知结瘤素有 20 种左右,其中研究较多的是豆血红蛋白、拟菌体周围膜蛋白、谷酰胺合成酶和蔗糖合成酶。对这些结瘤素的基因及其表达也有不同程度的研究,其中豆血红蛋白基因及其表达和调节的研究比较深入。

豆血红蛋白的功能和动物的血红蛋白、肌红蛋白一样,起运输氧的作用,保证根瘤内的拟菌体呼吸作用,同时又降低其周围的氧分压,利于固氮酶嫌氧的固氮作用。根瘤内如没有豆血红蛋白,就没有固氮作用。有功能的豆血红蛋白也充分体现了细菌与植物的依赖关系。豆血红蛋白的辅基血红素由根瘤菌合成,蛋白部分则由植物合成,其基因也分别由根瘤菌和植物编码。目前对于豆血红蛋白基因表达研究致力于其 5' 端调节区的顺式元件(即 DNA 链的不同区域)和反式因子(即细胞核中的某种蛋白)的相互作用,了解其表达的时空专一性。

谷氨酰胺合成酶研究也开始深入。这种酶是所有生物氮代谢所必须的,没有它就会使生物铵中毒死亡,有它,则同化氨、合成氨基酸和蛋白质。豆科植物的谷氨酰胺合成酶分布在根、根瘤细胞和细菌三个地方,它们的形式有所不同。根和根瘤细胞的谷氨酰胺合成酶对拟菌体合成的铵进行同化吸收。最近的研究指出根瘤拟菌体的谷氨酰胺合成酶起特殊作用,它通过奇特方式控制植物对铵同化的调节作用。

(四) 非豆科植物固氮的可能性和固氮根瘤工程问题

这里所指的非豆科植物主要是粮食作物,固氮工程主要是结瘤固氮问题。前已述及,这是我们的战略目标之一,也是梦寐以求的愿望。由于共生固氮涉及细菌和植物基因之多和共同参与的表达和调节之复杂,给研究工作带来了复杂性和困难性,那么是否有这种可能性呢?回答应该是肯定的。

其实,在自然界有很多非豆科植物具有结瘤固氮能力,如桉木、木麻黄、杨梅、胡颓子、沙棘等,不过它们不是由根瘤菌引起,而是由一种固氮放线菌引起。对此,刚开始在分子遗传水平上研究其结瘤固氮过程和原理。根瘤菌在非豆科植物上结瘤固氮也有一例。1973 年在澳大利亚发现榆科的一种植物上有固氮根瘤,从中分离出豇豆根瘤菌。在人工可控条件下回接试验也获成功,固氮活性很强。观察根瘤,有侵入线结构;DNA 分子杂交证明有固氮基因,根瘤内有豆血红蛋白和其基因存在。与此同时,随着对于克氏肺炎杆菌固氮基因的精细结构分析和产物功能的了解,人们进行了真核生物的固氮工程尝试。1981 年美、法的两家试验室分别把 2.4 万碱基对克氏肺炎杆菌的固氮基因整合到真核生物酵母细胞,随酵母细胞的分裂固氮基因可以复制,但可惜没有基因产物。1984 年美国、以色列的两家实验室,将固氮酶结构基因中

的二个整合到酵母细胞,结果得到了基因产物—蛋白质多肽,说明整合的基因可以转录和翻译,但由于没有完整的结构基因和后加工基因,所以还不能固氮。

以上说明两个问题:一个是自然界有非豆科结瘤固氮,特别是根瘤菌在非豆科植物上结瘤固氮的例子;二是固氮遗传工程可以将原核生物的固氮基因整合到真核生物,但由于对固氮基因的表达和调节作用等基础研究还不够,战略设计还不够完善。

当前,国内外都在研究直接把根瘤菌放入农作物,在根上结瘤固氮,并得到一些令人鼓舞的现象。例如澳、意两国用苜蓿和三叶草根瘤菌的早期结瘤基因(根毛卷曲基因)使玉米和水稻的根毛卷曲。我国也开始了这方面的试验,把根瘤菌放到小麦、元麦、水稻根上结瘤,观察到根瘤菌在根瘤中的形态结构与豆科植物相似。尽管还未得到固氮活性,但起码能使根瘤菌和农作物建立紧密联系,在固氮根瘤工程问题上迈出了可喜的步骤。

应该相信,随着共生固氮分子遗传研究的深入,非豆科植物;特别是粮食作物的固氮根瘤工程问题会得到解决。

(五) 当前生物固氮研究的“热点”

1. 深入研究固氮酶作用机理

固氮酶学研究虽然非常深入,为化学模拟固氮酶功能提供了信息,但固氮酶立体化学、活性中心的结构和微环境仍不清楚。如果在钼铁蛋白、铁钼蛋白,或是所谓固氮酶第三系统及其共因子的晶体学的研究上有所前进,就会大大促进固氮酶化学模拟的进展。

2. 固氮酶结构的化学模拟

尽管固氮酶结构的化学模拟尚有难度,但目前随固氮酶学研究在向更高层次进展。国际固氮会议讨论的问题首先是化学固氮系统,说明把化学模拟始终是放在首要位置的。美、英、苏、联邦德国等都在紧密结合固氮酶研究,深入探讨化学模型和研制其合成。

3. 固氮酶蛋白质工程

蛋白质工程是在基因工程基础上建立的最新技术,目前已应用于固氮酶研究。由于不同固氮生物固氮酶结构及其基因的相似,已对基因的某些核苷酸,如半胱氨酸、组氨酸,谷氨酸(它们的位置都比较保守)分别用丝氨酸、门冬酰胺和谷氨酰胺取代(称基因的定位诱变),以观察固氮酶活性反应。至今已对铁钼蛋白组分取代了 30 个氨基酸,铁蛋白组分取代了 5 个氨基酸等等。深信采用这种定位诱变的方法,结合生化分析,会对固氮结构组分及其相关基因产物的功能得到深入阐明,对化学模拟提供更多信息。

4. 共生固氮基因表达和调节

根瘤菌处于内共生环境,其固氮基因、结瘤基因和其他基因表达和调节既受到本身的制约,也受到宿主植物的制约。宿主植物参与固氮作用的结瘤素基因表达和调节,同样受到双方的制约,这种制约的因子仍不清楚。

5. 扩大根瘤菌共生范围

根瘤菌对宿主有专一性,在对宿主专一性基因了解的基础上,如能用基因重组方法扩大宿主范围,特别是扩大到农作物上将是人们的最大愿望。

6. 固氮细菌的工程化菌株

有些固氮螺菌可以在小麦、玉米、高粱等植物的根上形成鬚根,固定的氮被植物吸收。光

合固氮细菌可以在水生环境下固氮。如能得到耐环境中氮化物的高效菌株, 将对农业增产具有潜力。

应该指出上述的研究“热点”基本上是关于一个纽带(固氮生化)和两个战略目标(化学模拟和非豆科结瘤固氮)进行的。

三、我院生物固氮的研究状况

70 年代初, 由于国际上生物固氮研究开始大发展, 我院植物研究所有关研究人员建议, 特别是通过跨学科的联系, 得到我国著名化学家卢嘉锡、唐敖庆和蔡启瑞先生的支持和参与。在院生物学部领导下, 1971 年夏召开了首次座谈会, 分析了我国生物固氮研究的概况。1972 年, 开始组织了跨学科、跨单位的“固氮协作组”。目前, 我国已形成了一支包括多学科、多层次的固氮研究队伍。自 1978 年以来, 我院应邀参加了历次国际固氮会议, 有数次在大会发言; 举行了 3 次中澳双边和 1 次中美双边固氮学术讨论会。

16 年来, 我院已形成了一支包括各分支学科在内的固氮研究队伍, 其中有造诣很深的老一代科学家, 培养了一批新的学术带头人和不少中青年科研骨干。有关各单位的研究条件不断得到改善, 并装备了一批初具规模的现代水平的实验室。各单位的工作也逐渐形成了自己的特色和优势, 在全国处在领先地位, 某些方面已达到国际先进水平, 为今后深入开展工作, 达到固氮研究的战略目标奠定了基础。同时, 我院生物固氮研究的发展也引起了国际生物固氮学界的关注, 1988 年联邦德国 Springer 出版公司特邀生化所洪国藩研究员撰写中国生物固氮研究专著 (Nitrogen fixation Research in China)。

经过近 20 年来的努力, 我院在生物固氮研究方面已取得了一些可喜的成果, 现分列于下:

(一) 固氮化学模拟研究

1. 提出了国际上有较大影响的固氮酶活性中心原子簇模型。
2. 在国际上首创一步法合成具有 $[\text{MoFeS}_4]$ 结构单元的主立方烷簇合物, 并研究了一系列 MoFeS 簇合物的结构及谱学性质, 初步形成了有一定理论意义的结构及性能关系的规律性见解。
3. 在国际上首先试验了合成的模型物与基因缺陷型固氮酶不全蛋白的组合活性。

(二) 固氮酶学研究

1. 70 年代初和国际上同期分离纯化了固氮酶两个组分, 并对铁钼蛋白组分获得了结晶, 为酶学研究奠定了基础。
2. 研究了固氮酶底物还原动力学, 根据解离常数和解离热, 首先推论和验证了铁钼蛋白组分络合乙炔(一种底物)的功能基本是咪唑基、巯基和铵基, 了解了使底物还原的活性中心的环境, 和当前固氮酶蛋白质工程研究中的基本的定点诱变的氨基酸变换基本一致。
3. 对固氮酶活性中金属原子簇的种类数量、氧化还原特性以及底物络合催化活性的功能基因及催化反应动力学作了比较研究。

4. 提取了基因缺陷型不全铁钼蛋白组分和该组分的铁钼共因子。
5. 分离鉴别了棕色固氮菌可溶性吸氢酶和两个膜结合态氢酶及参与分子氢再循环的两个天然电子载体。
6. 阐明了固氮酶活性铵敏感调节的谷氨酰胺合成酶的传感及其蛋白的别构双环调节机制。
7. 观察不同发育阶段的苜蓿和田菁根瘤内拟菌体的 ATP 酶的动态变化,首次用 ATP 酶的细胞化学观点阐明能量与固氮功能的关系,并得到国外类似研究的证实。
8. 发现并提纯了棕色固氮菌固氮酶防氧的保护蛋白;和国外同时发现了棕色固氮菌的细菌铁蛋白,并研究了其结构和固氮防氧的关系。

(三) 固氮分子遗传研究

1. 首次提出并被证实了克氏肺炎杆菌固氮基因组在染色体上排列的连续性;发现了固氮基因 *nifH* 上游靠近固氮基因 *nifH* 处有一个反向编砖顺序。
2. 证实铵和氧对固氮基因表达的阻碍作用是由于固氮调节基因 *nifA* 失活的结果。
3. 完成了含有粘多糖恢复基因 (PSR 基因) 的 DNA 片断顺序测定。
4. 阐明苜蓿根瘤菌 *nifA* 的激活不受氮调节 (*ntr*) 系统的调节。*nifA* 的失活影响根瘤的正常形成。
5. 发现了快生型根瘤菌共生固氮根瘤的形成由结瘤基因 (*nodD*) 产物与 DNA 直接作用的调节机制,并分离纯化了对结瘤起核心调节作用的核酸-蛋白复合体。
6. 发现了快生型豇豆根瘤菌染色体上 7 个 DNA 片段与编码胞外多糖的基因相关,其中 6 个片段处于连锁,位于 50kb 的 DNA 区段。
7. 对不同瘤龄的苜蓿根瘤豆血红蛋白基因的转录和转译作用进行了研究,发现豆血红蛋白基因在根瘤整个生命期间保持长时间活性,有别于脊椎动物珠蛋白基因受发育基因开关机制的调节。
8. 构建了苜蓿根瘤 cDNA 文库,获得苜蓿豆血红蛋白 cDNA 克隆。
9. 分离出一批有用的固氮材料和突变株。从 5 个属 32 种树木根瘤中分离到共生放线菌纯培养物;筛选分离到对多糖基因缺陷的紫云英根瘤菌突变株,并建立了几个固氮基因库。如中国快生型大豆根瘤菌基因库、苜蓿核根瘤菌基因库等。

同时,我们也应看到,就固氮研究的整体而言,我国与国际水平还有一定的差距。我们建议,要珍视 70 年代以来建立起的基础,并以前任院长卢嘉锡领导的这一重大课题继续作为重点深入研究下去,争取在理论和应用上能有重大突破。并力争到本世纪末,使我院的固氮研究在总体上接近世界先进水平,其中有的课题跻身于国际先进行列,与此同时为国家培养和输送高水平的研究人才,并为开拓固氮在农业上的应用提供理论依据和可行的途径。