

Frankia 纯培养菌株氮代谢的研究

邹 铨 丁 鉴

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳)

利用膜过滤法将 *Frankia* 纯培养菌株 Cc01 和 Mg^{+} 的顶囊分离出来。并在顶囊悬液中加入一定量的 ATP 及 NADH, 发现顶囊能在固氮的同时将 NH_4^{+} 排到顶囊之外, 顶囊中没有测出最初同化 NH_4^{+} 的酶——谷酰胺合成酶 (GS) 活性, 游离氨基酸的总含量也比完整菌丝中少, 且 GLN (GLU) 含量也不如菌丝中的含量高。这些结果表明, 虽然固氮作用发生在顶囊中, 但 NH_4^{+} 的进一步同化则是在菌丝中进行的。

关键词 *Frankia*; 氮代谢

能与放线菌 *Frankia* 共生结瘤的植物在自然界氮素循环中起着非常重要的作用。对这类植物及其内生菌 *Frankia* 的研究已越来越引起各国学者的重视。研究结果已表明, 固氮酶存在于 *Frankia* 的特殊结构——顶囊中^[1]。顶囊胞壁的多层结构, 糖脂类型等可以保护固氮酶免受氧的损害^[2-4]。有人推测^[1], 在宿主根瘤中, 顶囊将固定的氮素分泌到宿主细胞中, 并由宿主细胞的谷氨酸脱氢酶 (GDH) 或谷

酰胺合成酶 (GS), 将 NH_4^{+} 同化成谷氨酸 (GLU) 和谷氨酰胺 (GLN) 进入有机联体中。但在纯培养条件下, 固定的氮素—— NH_4^{+} 的进一步同化在 *Frankia* 菌中的哪一部位进行, 尚未得出结论。作者对这一问题进行了探讨, 现报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

选用两株菌(表 1), 它们分别属于不

表 1 供试菌株及来源
Table 1 The strains used in the study

菌 株 Strain	宿主植物 Host plant	来 源 Origin
Cc01	细枝木麻黄 <i>Casuarina cunninghamiana</i>	中国广东 Guangdong China
Mg^{+}	香 杨 梅 <i>Myrica gale</i>	美 国 America

同的交叉感染群^[5], 亲缘关系较远。

(二) 培养条件

菌体用无氮 Bap 液体培养基^[6], 在 28℃ 下暗中静置培养。

(三) 顶囊分离

取培养 3—4 天的菌体(镜检, 选择顶囊量最多, 且孢子及孢子囊量最少时分离), 离心收集菌丝, 用玻璃匀浆器匀浆, 使

顶囊从菌丝上脱落下来。镜检, 待大部分顶囊脱离菌丝后, 用微孔膜滤器夹 20 层纱布过滤, 滤渣为菌丝, 滤液中主要是顶囊, 但也有少量碎菌丝。再用两层孔径为 5 μm 的滤膜过滤二次, 滤液中为碎菌丝, 将其弃除, 滤渣即为游离的顶囊。用 Bap 培养液

本文于 1990 年 11 月 7 日收到。

制成顶囊悬液,立即进行实验。

(四) 顶囊排 NH_4^+ 试验

取 1ml 顶囊悬液,用无氮 Bap 培养基离心洗涤 3 次。加 0.5ml 30 mmol/L ATP 及 0.5ml 1mmol/L NADH,再加 Bap 无氮培养液,制成总体积约为 4ml 的顶囊悬液。置于 20℃ 下,每隔一定时间离心。取 0.4ml 上清液,用纳氏试剂比色法^[7]测 NH_4^+ 含量,用加同量 ATP 和 NADH 的 Bap 培养液作对照,重复 3 次。每次取完上清液后,迅速混匀顶囊,使顶囊保持悬液状态。

(五) 顶囊固氮酶活性测定

取 0.5ml 顶囊悬液置于 6ml 小瓶中,加入 0.25ml 30mmol/L ATP 及 0.25ml 1mmol/L NADH,用反口塞塞紧,抽出 .ml 空气,注入 1ml 乙炔,100r/min 28℃ 摇床培养一定时间后,用 100 型气相色谱仪测生成的乙烯量,并换算成固氮酶比活。同时取培养 3—4 天的 *Frankia* 菌测固氮酶活性进行对比试验,并用 Bap 培养液作空白对照。

(六) 顶囊及完整菌丝蛋白含量测定

取上述测完固氮酶活性的顶囊及完整菌丝,加入 1mol/L NaOH,使 NaOH 的终浓度达 0.6mol/L。在 100℃ 水浴上煮沸 60 分钟(试管口加盖小漏斗以防止水分蒸发),消煮液用福林-酚法测蛋白含量^[8]。

(七) 菌丝及顶囊氨基酸含量测定

取顶囊或用无氮 Bap 培养基培养 3—4 天的 *Frankia* 菌,用生理盐水离心洗涤 3 次,制成悬液,冰浴超声波破碎(14mA, 5 分钟),顶囊破碎 10 分钟。取 1ml 破碎液置于蒸发皿中,加 1ml 左右 70% 乙醇以沉淀蛋白,在 60℃ 水浴上将乙醇蒸发掉,用 1ml 0.02mol/L HCl 溶液溶解干物质,10,000r/min 离心 15 分钟。上清液用日立 835 型氨基酸自动分析仪分析氨基

酸的组成及含量。取 1ml 上述破碎液,离心,上清液用福林-酚法测蛋白质含量。

(八) 与 NH_4^+ 代谢有关的酶活性测定

1. 菌丝及顶囊的 GS 活性测定: 取顶囊及匀浆后的完整菌丝,用 γ -谷氨酰基羧酸合成酶法测 GS 活性^[9]。

2. 菌丝 GDH 活性测定: 取培养 4—6 天的菌株,用 0.1mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液离心洗涤 3 次,加 5ml 左右的 Tris-HCl 缓冲液制成菌悬液。冰浴超声波破碎(14mA, 5 分钟),10,000r/min 冷冻离心 20 分钟,上清液为酶粗提取液,用 Duke 等的方法^[8]测 GDH 活性。

结 果

(一) 顶囊的分离

国外许多实验室是用蔗糖密度梯度离心法将顶囊从菌丝体中分离出来。本实验所用的膜过滤法也能获得较纯的顶囊(镜检观察,视野中均为顶囊)。菌株 Cc01 顶囊的亚显微结构至少有两层细胞壁,且中间有一层透明间隔区。顶囊的内部还有电子透明颗粒(图 1)。这与 Noridge 等(1986)报道的 Cpl1 顶囊的亚显微结构类似^[10]。

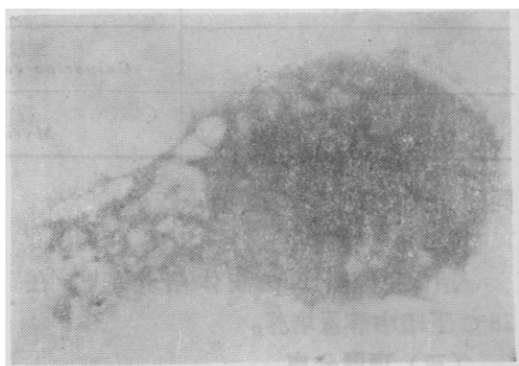


图 1 Cc01 顶囊的亚显微结构(20,000×)
Fig. 1 Supermicrostructure of the vesicle of strain Cc01

表 2 菌株 Cc01 和 Mg⁺ 及其顶囊的固氮酶活性
Table 2 N₂ase activity of strain Cc01 and Mg⁺, and their vesicles

样 品 Sample	Cc01 菌株 Cc01 strain	Cc01 顶囊 Cc01 vesicle	Mg ⁺ 菌株 Mg ⁺ strain	Mg ⁺ 顶囊 Mg ⁺ vesicle
固氮酶活性 (nmol C ₂ H ₄ /mg 蛋白·h) N ₂ ase activity	75.85	8.89	189.40	5.59
差异(倍) Difference (Time)	8.53		33.88	

表 3 顶囊排 NH₄⁺ 量
Table 3 Release of NH₄⁺ by the vesicles

菌 株 Strain	Cc01			Mg ⁺		
时间 (min) Time	5	15	30	5	30	90
悬液 NH ₄ ⁺ 量 (μg/ml) NH ₄ ⁺ content in the suspended solution	8.44	9.67	11.44	2.22	5.33	9.33
排 NH ₄ ⁺ 速率 (μg·ml ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) Rate of NH ₄ ⁺ releasing	0.377			0.294		

(二) 顶囊的固氮酶活性

Cc01 及 Mg⁺ 的顶囊都有固氮酶活性, 但比完整菌丝的固氮酶活性要低得多 (表 2)。这可能是由下列因素造成的: ① 顶囊与菌丝脱离, 使顶囊的能量供给及其它物质供给被阻断; ② 顶囊的分离是在有氧条件下进行的, 可能部分顶囊 (尤其从顶囊基部断裂下来的球形顶囊) 中的固氮酶受到氧的损害而失活。

(三) 顶囊排铵试验

随着时间的增加, 菌株 Cc01 和 Mg⁺ 的顶囊悬液中的 NH₄⁺ 量也略有增加 (表 3), 说明顶囊能将固定的氮素以 NH₄⁺ 的形式排到顶囊之外。顶囊排铵可有两个途径: ① 通过顶囊细胞膜将 NH₄⁺ 分泌到胞外; ② 直接通过断裂的“伤口”处将 NH₄⁺ 排到顶囊之外。

(四) 菌丝及顶囊氨基酸含量分析

菌株 Cc01 和 Mg⁺ 的完整菌丝和顶囊中均含有 10 多种不同的游离氨基酸 (表 4)。但完整菌丝中游离氨基酸的总量大大

高于顶囊, 且完整菌丝中 GLN (GLU) 的含量占绝对优势。而 Cc01 菌株的顶囊中 GLN (GLU) 和 Lys 含量同时占优势, 菌株 Mg⁺ 的顶囊中 Lys 是含量最高的游离氨基酸, GLN (GLU) 的含量则较少 (表 4)。这两株菌的顶囊中 NH₄⁺ 含量均较高。

(五) NH₄⁺ 代谢酶活性测定

在两株菌的完整菌丝中均没有测出 GDH 活性, 但有较高的 GS 活性 (表 5)。说明这两株菌用 GS 来进行 NH₄⁺ 的最初同化。顶囊中没有测出 GS 活性。

讨 论

Frankia 菌在其纯培养的大部分时期, 是以菌丝体的形态存在的, 菌丝体上有一种球形膨大的特殊结构——顶囊, 它通过顶囊柄与菌丝体相联系。现已经证明, 顶囊就是 *Frankia* 菌的固氮部位。本实验所用的菌株 Cc01 和 Mg⁺, 完整菌丝胞内 GLN (GLU) 的含量均较其它游离氨基酸高得多, 并且这两株菌均有较高

表 4 菌丝及顶囊的游离氨基酸含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)
Table 4 Free amino acids content in the hyphae and the vesicles
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)

氨基酸 Amino acid	Cc01		Mg ⁺	
	菌丝 Hyphae	顶囊 Vesicle	菌丝 Hyphae	顶囊 Vesicle
天门冬氨酸 ASP (ASN)				0.27
苏氨酸 THR	16.47	0.52	11.86	0.23
丝氨酸 SER			8.31	1.01
谷氨酸 GLU (GLN)	239.33	2.05	79.84	0.30
甘氨酸 GLY		0.26	3.95	0.66
丙氨酸 ALA	22.90	0.14	11.45	0.37
胱氨酸 CYS		0.99		0.43
缬氨酸 VAL	5.09		7.82	0.51
蛋氨酸 MET		0.50		0.42
异亮氨酸 ILE		0.21		0.35
亮氨酸 LEU				0.29
苯丙氨酸 PHE	4.91	0.71	9.52	0.61
赖氨酸 LYS	6.61	1.97	6.29	2.05
铵 NH ₄ ⁺	27.95	1.62	41.77	3.20
精氨酸 ARG	6.47		3.95	
氨基酸总量(不包括 NH ₄ ⁺) Total amino acids (not including NH ₄ ⁺)	301.78	7.35	142.99	7.50
GLU (GLN) (%)	79.31	27.89	55.84	3.60
LYS (%)	2.19	26.80	4.40	27.33
NH ₄ ⁺ 占总氮化物量(%) NH ₄ ⁺ in the total nitrogen content	8.48	18.06	22.61	29.91

表 5 *Frankia* 菌株的 GS 活性
Table 5 GS activity in the *Frankia* strains

菌株 Strain	Cc01			Mg ⁺		
GS 活性* GS activity	55.88	53.64	54.61	36.17	32.55	36.17
平均 Mean	54.68			34.96		

* GS 活性单位: $\text{nmol } \gamma\text{-谷氨酰基氧脲} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$
GS activity unit: $\gamma\text{-glutamylhydroxamate} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$

的 GS 活性。说明这两株菌将固定的氮素首先经由 GS 催化转化成 GLN, 进入有机联体, 再供菌体代谢。然而, 在这两株菌的顶囊中并没有测出 GS 活性, 顶囊能以 NH_4^+ 的形式将固定的氮素排出, 顶囊中游离氨基酸的含量很少, 且优势氨基酸组分也与完整菌不同, GLN (GLU) 含量并不占优势。这些结果表明, NH_4^+ 的进一步同化是在菌丝中进行的。顶囊固氮形成的 NH_4^+ 通过某种方式转移到菌丝中, 经由菌丝中的 GS 同化成 GLN, 再供菌体利用。顶囊通过什么方式将 NH_4^+ 转移到菌丝中, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Tjepkema, J. D. et al.: *Ann. Rev. Plant*

Physiol., **37**: 209—232, 1986.

- [2] Parsons, R. et al.: *Plant Physiol.*, **83**: 728—731, 1987.
- [3] Stewart, W. D. et al.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 497—536, 1980.
- [4] Tunlid, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 3399—3403, 1989.
- [5] 张道海等: 微生物学杂志, **9**(4): 106, 1989.
- [6] 黄雅丽等: 微生物学杂志, **9**(3): 29—33, 1989.
- [7] 中国科学院南京土壤研究所编: 土壤理化分析, 科学出版社, 北京, 第 81—84 页, 1983.
- [8] 北京大学生物系生物化学教研室编: 生物化学实验指导, 人民教育出版社, 北京, 第 73—75 页, 1982.
- [9] Farnden, K. J. F. et al.: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Bergersen, F. J. (Eds), John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 279—291, 1980.
- [10] Norridge, N. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **166**: 301—305, 1986.

STUDIES ON NITROGEN METABOLISM IN *FRANKIA* STRAINS

Zou Hua Ding Jian

(Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang)

Vesicles of strain Cc01 and Mg^{2+} were isolated using the methods of membrane filtration. Certain amount of ATP and NADH were put into the vesicle suspended solution. It was found that the vesicles be able to release NH_4^+ while fixing N_2 . There was no glutamin synthetase (GS) activity which catalize NH_4^+ assimilation in the vesicles of the two *Frankia* strains. The content of free amino acids were fewer and the content of

GLU (GLN) was not prominent in the vesicles. These results indicated that although nitrogen fixation occurred in the vesicles the site of ammonium assimilation otherwise inside the hyphae of the strains.

Key words

Frankia; Nitrogen metabolism