

快生型大豆根瘤菌的渗透调节*

杨苏声 曾 蔚 李季伦

(北京农业大学微生物专业,北京 100094)

弗雷德中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) RT19 是快生型大豆根瘤菌。该菌株在不同浓度 NaCl 条件下,其细胞内的游离谷氨酸和钾离子含量随盐浓度的提高而急剧增加。在无盐和低浓度 NaCl 条件下,测不出细胞内有游离苏氨酸,但在较高浓度盐存在时,其含量也随着盐浓度的提高而递增。

RT19 在对数生长后期,突然加入 NaCl,使其培养液中的 NaCl 的最终浓度达到 300 mmol/L,定时取样测定细胞内氨基酸含量,发现 5 分钟后谷氨酸含量急剧上升,比不加盐的对照高出 5 倍,而且在 3 小时内保持不变。苏氨酸也出现类似情况。

测定了 RT19 及其转化子 RTt19 和 RTt50 的谷氨酸脱氢酶 (GDH)、谷氨酰胺合成酶 (GS) 和谷氨酸合成酶 (GOGAT) 在盐压下的活性,发现在 300 mmol/L NaCl 或 300 mmol/L KCl 存在时, GDH 酶活性稍为下降或不变,而 GS 和 GOGAT 酶活性则显著提高。

关键词 快生型大豆根瘤菌;渗透调节;谷氨酸

快生型大豆根瘤菌能耐盐,在高盐条件下,其细胞内的谷氨酸水平急剧增加^[1,2]。在苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*)^[3]、*Rhizobium* sp. WR1001^[4] 和 *Rhizobium* sp. UMKL20^[5] 也有类似的现象。Botsford^[6] 以 *R. meliloti* 102f34 为材料,证实除 NaCl 外,在由 KCl、蔗糖和聚乙二醇所引起的高渗条件下,细胞内同样可以积累大量谷氨酸。

在耐盐的根瘤菌细胞内,其钾离子的含量随 NaCl 浓度的提高而急剧增加,并与谷氨酸的含量同步增长^[6]。

Measures^[7] 认为,细胞内游离谷氨酸含量的迅速增加是由于谷氨酸脱氢酶 (GDH) 活性的变化所致。但是,WR1001 菌株^[4]和 UMKL20 菌株^[5]在高渗条件下, GDH 酶的活性很低和没有提高。相反,在高盐胁迫下,UMKL 20 的谷氨酸合成酶 (GOGAT) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性却大幅度提高,说明 GOGAT 酶和 GS 酶是在高盐浓度下谷氨酸合成的重要途径。然而, Botsford^[6] 发现,苜蓿根瘤菌在渗透压下产生过量的谷氨酸是由于其他氨基酸的降解和 α -酮戊二酸的转氨基作用所致,而与 GOGAT 酶无关。

本文主要研究 *S. fredii* RT19 在一系列 NaCl 浓度下细胞内氨基酸和钾离子的变化,研究该菌及其转化子在高渗条件下 GDH、GOGAT 和 GS 酶活性的变化,进行全面的观察与分析,以了解它们的渗透调节机制。

本文于1991年11月24日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

S. fredii RT19 在基本培养基能耐 800mmol/L NaCl, RTt19 和 RTt50 是 RT19 的 DNA 转化到 USDA110 细胞所获得的转化子^[2]。

(二) 培养基

YMA 培养基^[3], 用于活化菌种。

基本培养基^[4]以 MM 表示, 根据实验需要加入各种化合物, pH 调至 7.0, 0.55 kg/cm² 灭菌 20 分钟。

(三) 细胞内游离氨基酸含量的测定

方法见参考文献 [5]。

(四) 细胞内钾离子的测定

按文献 [5] 进行。

(五) 酶活性的测定

GDH 酶和 GOGAT 酶活性分析采用 Prusiner 等描述的方法^[5], GS 酶活性分析方法见文献 [10]。在许多根瘤菌菌株中, 所含的 GS 酶含有 GSI 和 GSII, GSI 是热稳定型的 (50℃, 15 分钟), 而 GSII 是热不稳定的, 它们的分离方法按文献 [11] 进行。

结 果

(一) 细胞内游离氨基酸含量的分析

RT19 生长在不含 NaCl 的基本培养基中, 其细胞内谷氨酸的含量为 20.15nmol/mg 蛋白, 占氨基酸总量 19%。当该菌分别生长在含有 100、200、300、400、500 和 600mmol/L NaCl 的基本培养基时, 细胞内谷氨酸的含量随着盐浓度的提高而分别比对照增加 1.7、3.4、7.9、9.2、12.3 和 12.6 倍, 呈现正相关比例。在 600mmol/L NaCl 条件下, 细胞内谷氨酸的含量为 255.98nmol/mg 蛋白, 占总氨基酸含量的 84.7%。此外, 细胞内苏氨酸在不含 NaCl 和 100mmol/L NaCl 时, 测不出含量, 但在 200—500mmol NaCl 条件下, 也随着 NaCl 浓度的提高而增加积累, 到 600mmol/L NaCl 浓度时含量开始下降(表 1)。

(二) 细胞内钾离子的积累

RT19 在不同浓度 NaCl 条件下, 细胞内钾离子的积累是随着外界渗透压的提高而增加的。在 600mmol/L NaCl 存在时, 细胞内钾离子的浓度比不含 NaCl 时增加 2 倍(图 1)。

(三) 细胞内游离谷氨酸在盐压突然增加时所产生的变化

RT19 在基本培养基中培养到对数生长后期, 加入 5mol/L NaCl, 使培养液的最终盐浓度达到 300mmol/L, 继续摇瓶培养, 分别在 5、20、50、110 和 170 分钟取样, 测定细胞内

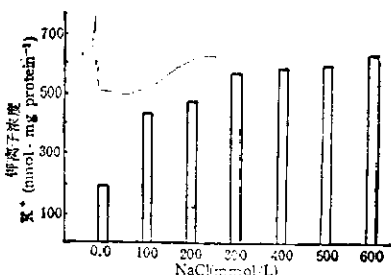


图 1 不同 NaCl 浓度对 RT19 细胞内钾离子含量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of sodium chloride on the accumulation of intracellular K⁺ in strain RT19

表 1 不同 NaCl 浓度对 RT19 菌株细胞内游离氨基酸组成的影响

Table 1 Effect of different concentrations of sodium chloride on the intracellular free amino acid composition of strain RT19

氨基酸 Amino acid	氨基酸浓度 Amino acid concentration (nmol·mg protein ⁻¹)						
	0mmol/L NaCl	100mmol/L NaCl	200mmol/L NaCl	300mmol/L NaCl	400mmol/L NaCl	500mmol/L NaCl	600mmol/L NaCl
谷氨酸 Glu	20.15	36.88	71.60	160.38	186.47	250.48	255.98
苏氨酸 Thr	N. D.	N. D.	12.52	18.80	19.90	31.21	18.31
丝氨酸 Ser	18.54	6.69	5.38	8.45	N. D.	7.58	N. D.
甘氨酸 Gly	7.59	N. D.	N. D.	4.46	N. D.	N. D.	N. D.
丙氨酸 Ala	16.00	14.04	35.85	54.71	35.27	13.75	N. D.
半胱氨酸 Cys	10.06	13.95	13.34	8.12	11.75	12.44	8.07
缬氨酸 Val	10.09	5.84	6.47	13.11	15.34	8.06	7.09
蛋氨酸 Met	9.79	7.31	9.58	4.05	N. D.	N. D.	N. D.
酪氨酸 Tyr	6.61	13.64	11.79	4.50	N. D.	6.17	6.77
赖氨酸 Lys	8.51	12.26	8.90	6.02	7.58	4.09	3.94
游离氨基酸总 含量 Total free amino acid	107.34	110.61	177.63	282.60	276.31	333.78	302.16
谷氨酸所占百 分比例 % as gluta- mate	18.77	33.34	40.42	56.75	67.48	75.04	84.72

N.D. = Not detected

氨基酸含量的变化。5 分钟后细胞内谷氨酸含量就急剧上升,比不加 NaCl 的对照高出 5 倍,而且在 170 分钟内容氨酸的高含量保持不变。细胞内苏氨酸在不加 NaCl 时测不出含量,但在 5 分钟后其含量突增至 36.89nmol/mg 蛋白,20 分钟时达到 46.32nmol/mg 蛋白,到 110 分钟后才逐渐下降(表 2)。

表 2 RT19 菌株在 300mmol/L NaCl 突然加入后细胞内游离氨基酸含量的变化

Table 2 The change of intracellular glutamate levels when NaCl was added suddenly to culture to a final concentration of 300mmol/L in strain RT19

氨基酸 Amino acid	氨基酸浓度 Amino acid concentration (nmol·mg protein ⁻¹)					
	0	5min	20min	50min	110min	170min
谷氨酸 Glu	19.04	116.12	170.23	188.43	163.03	205.89
苏氨酸 Thr	N.D.	36.89	46.32	45.37	23.54	7.92

N.D. = Not detected

(四) 谷氨酸合成酶系与耐盐性的关系

测定 RT19 及其转化子 RTt19、RTt50 在不加盐和加有 NaCl、KCl 条件下 GDH、GOGAT 和 GS 酶的活性。

RT19、RTt19 及 RTt50 的 GDH 酶以 NAD 为辅酶才具有活性, GOGAT 酶以 NADP 为辅酶才具有活性。在 300mmol/L NaCl 或 300mmol/L KCl 存在时, GDH 酶活

表 3 高盐浓度对 RT19、RTt19 和 RTt50 菌株 GDH 酶和 GOGAT 酶活性的影响

Table 3 Effect of high concentration of salt on GDH and GOGAT activities in strain RT19, RTt19 and RTt50

菌株 Strain	培养基 Medium	GDH		GOGAT	
		NADH	NADPH	NADH	NADPH
RT19	MM	1.76	N.D.	N.D.	1.06
	MM + 300mmol/L NaCl	1.54	N.D.	N.D.	12.39
	MM + 300mmol/L KCl	0.73	N.D.	N.D.	9.95
RTt19	MM	1.45	N.D.	N.D.	2.23
	MM + 300mmol/L NaCl	1.60	N.D.	N.D.	15.69
	MM + 300mmol/L KCl	3.08	N.D.	N.D.	12.00
RTt50	MM	3.95	N.D.	N.D.	4.62
	MM + 300mmol/L NaCl	1.69	N.D.	N.D.	24.60
	MM + 300mmol/L KCl	1.45	N.D.	N.D.	23.19

注: (1) 酶活性单位为 nmol/分钟 mg 蛋白, 表示每分钟每毫克蛋白分解 NADH 或 NADPH 的量
Specific activity reported as nmol of NADH or NADPH oxidized/min·mg protein
(2) N.D. = 未测出(酶活性小于 1nmol/分钟 mg 蛋白)
N.D. = not detected (enzyme activity of less than 1nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹)

性没有什么变化或略有下降。但是, RT19 在不含盐的基本培养基中生长时, 其 GOGAT 酶的活性为 1.06nmol/mg 蛋白, 而在 300mmol/L NaCl 或 300mmol/L KCl 时活性分别为 12.39 或 9.95nmol/mg 蛋白, 分别比对照增加 11 和 8 倍。在 RTt19 和 RTt50 中, 也得到类似的结果(表 3)。

RT19、RTt19 和 RTt50 的 GS 酶包含 GSI 和 GSII 两种类型。如表 4 所示, 这些菌株在高浓度 NaCl 或 KCl 条件下, 其 GSII 活性无大变化, 而 GSI 活性都比不加盐的对照增加几倍。在 300mmol/L NaCl 或 300mmol/L KCl 存在时, RT19 的 GSI

表 4 高盐浓度对 RT19、RTt19 和 RTt50 菌株 GS 酶活性的影响

Table 4 Effect of high concentration of salt on GS activity in strain RT19, RTt19 and RTt50

菌株 Strain	培养基 Medium	GSI	GSII	GS
RT19	MM	96.62	667.82	764.44
	MM + 300mmol/L NaCl	575.47	564.88	1240.35
	MM + 300mmol/L KCl	591.23	607.01	1198.24
RTt19	MM	97.23	155.55	252.78
	MM + 300mmol/L NaCl	202.01	207.08	409.09
	MM + 300mmol/L KCl	212.04	173.21	385.25
RTt50	MM	79.40	222.09	261.49
	MM + 300mmol/L NaCl	788.40	208.00	996.42
	MM + 300mmol/L KCl	968.28	288.86	1257.14

注: (1) 酶活性单位为 nmol/分钟·mg 蛋白, 表示每分钟每毫克蛋白产生无机磷的量。
Specific activity reported as nmol of phosphorus product/min·mg protein.
(2) GSI 是热稳定型的, GSII 是热不稳定型的。
GSI is heat stable, whereas GSII is heat labile.

活性都比对照高 5 倍, RTt19 的比对照高 1 倍, 而 RTt50 的则比对照高 9 倍左右。

讨 论

RT19 菌株与其他快生型大豆根瘤菌^[1,2]、苜蓿根瘤菌^[3]及其他耐盐的根瘤菌^[4,5]相似, 在高盐浓度下能在细胞内积累大量谷氨酸。本实验发现, 在不同浓度的 NaCl 条件下, RT19 细胞内除了谷氨酸和钾离子含量随着盐浓度的递增而逐渐提高外, 还发现在较高浓度的盐存在时, 苏氨酸含量也随着盐浓度的提高而增加。这个现象与 Botsford 用 *R. meliloti* 102f34 所做的类似实验的结果不同, 该实验并没有发现苏氨酸的积累和递增^[6]。由于 RT19 分离自盐碱地, 在含有 800mmol/L NaCl 的基本培养基中可以生长, 比其他根瘤菌的耐盐性都高, 因此, 该菌细胞在盐胁迫下, 除大量产生谷氨酸外, 还积累苏氨酸。

本实验采用“盐激”方法, 即在 RT19 的对数生长后期, 突然加入高浓度的 NaCl, 发现生长着的菌体对盐的反应非常迅速, 在 5 分钟就能积累比对照高出 5 倍的谷氨酸, 并产生大量苏氨酸。这个现象说明外界盐的胁迫可调节控制与谷氨酸和苏氨酸合成有关的酶系。这种调节机制有待进一步研究。

在 300mmol/L NaCl 或 300mmol/L KCl 条件下, RT19 及其转化子 RTt19 和 RTt50 的 GOGAT 酶、GS 酶的活性大幅度提高, 表明细胞内谷氨酸的大量积累主要与这两种酶有关。Hua^[4] 和 Yap^[5] 分别以生长在沙漠和热带的耐盐根瘤菌作为研究材料, 所取得的结果与本工作基本一致。但是, Botsford^[6] 报道, 当苜蓿根瘤菌生长在含有高盐的培养基时, 加入 GOGAT 酶的抑制剂甲硫氨酸砒, 并不影响其细胞内谷氨酸的产生。如果加入转氨基酶的抑制剂, 如氮丝氨酸和氨基氧乙酸, 则可抑制谷氨酸的积累。这个现象说明, 苜蓿根瘤菌在高盐浓度下细胞内谷氨酸的大量积累与 GOGAT 酶无关, 而是转氨基酶作用所造成的。该结果与快生型大豆根瘤菌在高渗透压下对谷氨酸的调控方式有显著的差异。

上述结果表明, 耐盐的根瘤菌在高盐浓度下, 虽然都能在细胞内积累大量谷氨酸, 但其谷氨酸合成的途径则不尽相同。

参 考 文 献

- [1] 杨苏声、李季伦: 北京农业大学学报, 14(2): 143—148, 1988.
- [2] 杨苏声、李季伦: 微生物学报, 29(2): 107—112, 1989.
- [3] Botsford, J. L.: *Arch. Microbiol.*, 137:124—127, 1984.
- [4] Hua, S. S. T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:135—140, 1982.
- [5] Yap, S. F. et al.: *Arch. Microbiol.*, 135:224—228, 1983.
- [6] Botsford, J. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(2):488—494, 1990.
- [7] Measures, J. C.: *Nature*, 257:398—400, 1975.
- [8] Vincent, M. J.: 根瘤菌实用研究手册 (上海植物生理研究所固氮室译) 第 3 页, 上海人民出版社, 1970年.
- [9] Prusiner, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2922—2926, 1972.
- [10] Shapiro, B. M. et al.: *Mesh. Enzymol.*, 17A:910—922, 1970.
- [11] Fuchs, R. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 144:648—688, 1950.

THE OSMOREGULATION OF *SINORHIZOBIUM FREDII*

Yang Susheng Zeng Jing Li Jilun

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

S. fredii RT19 is a fast-growing soybean rhizobium strain. In the presence of different concentrations of NaCl, intracellular levels of K⁺ and free glutamate were elevated rapidly with increasing the salt concentration. It is interesting that the threonine was not detected without NaCl or at low concentrations of NaCl, whereas its level was enhanced in response to increasing the NaCl concentration.

The intracellular glutamate levels increased immediately when salt was added suddenly to culture to a final concentration of 300mmol/L NaCl. The intracellular glutamate concentration became 6-fold of that in the control cells in 5 minutes, and remained almost the same for 3 hours. Similar changes were observed for threonine.

The activity of glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) of RT19 and its transformants RTt19 and RTt50 were assayed under salt stress. It was found that GS and GOGAT activities were stimulated significantly while GDH activity slightly decreased or unaffected by 300 mmol/L NaCl or 300 mmol/L KCl.

Key words Fast-growing soybean rhizobia; Osmoregulation; Glutamate