

盐激条件下快生大豆根瘤菌的渗透调节*

李 红 杨苏声

(北京农业大学微生物学系 北京 100094)

摘 要 快生大豆根瘤菌 (*Rhizobium fredii*) RT19 在基本培养基中能耐 800 mmol/L NaCl。该菌株在对数生长期后期, 突然加入高浓度 NaCl, 使其培养液中的 NaCl 最终浓度为 1000 mmol/L。5 分钟后, 细胞内谷氨酸的含量便急剧增加, 而且脯氨酸也大量积累。50 分钟后, 它们的含量分别达到未受盐激的 (对照) 4 倍和 3.8 倍。在盐激条件下, RT19 的谷氨酰胺合成酶 (GS) 和谷氨酸合成酶 (GOGAT) 的活性比对照明显提高。其中 GS 活性的提高主要是由 GS I 引起的, GS I 变化不大。将这两种酶直接暴露于 1000 mmol/L NaCl, 50 分钟后, 酶活性降至原来的 70%, 并未完全失活。聚丙烯酰胺凝胶双向电泳的分析表明, 若干蛋白质在盐激后消失, 而且发现两种蛋白质是新合成的, 其分子量和等电点 (MW/pI) 分别为 110 kD/4.3 和 76 kD/6.5。

关键词 盐激, 快生大豆根瘤菌, 渗透调节

近年来, 人们对细菌渗透调节的研究日益重视。对于那些遗传背景比较清楚的细菌如大肠杆菌等的研究, 已经深入到基因水平。但对根瘤菌的研究仍停留在渗透调节的生理反应和渗透调节物质方面, 如 K^+ 、谷氨酸、甘氨酸甜菜碱及与其有关酶系的研究^[1-6]。

目前, 蛋白质电泳技术也广泛地应用于细菌渗透调节的研究领域。Clark^[7]利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶双向电泳技术研究渗透胁迫对大肠杆菌蛋白质成分的影响, 发现 3 种蛋白质以相当高的速率合成。Apte^[8]利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对固氮的鱼腥蓝细菌的两个菌株进行了耐盐性研究, 发现在盐压条件下, 有一部分蛋白质的合成明显增加, 有些蛋白质的合成被阻遏, 还发现几种新合成的盐胁迫蛋白。他们还研究了鱼腥蓝细菌 L-31 受热激、盐胁迫和渗透胁迫后蛋白质的变化情况, 发现盐胁迫与渗透胁迫是相似的, 有 4 种蛋白只在热激条件下才产生, 还有 4 种蛋白在每种胁迫下都能产生, 说明了胁迫蛋白的合成具有共同性和特殊性^[9]。

本实验采用盐激方法研究 RT19 细胞内游离氨基酸和蛋白质的变化情况, 了解快生大豆根瘤菌在高盐胁迫下的渗透机理。

1 材料和方法

1.1 菌株

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 9 月 11 日收到。

快生大豆根瘤菌 RT19 分离自天津盐碱地, 在基本培养基能耐 800 mmol/L NaCl。

1.2 培养基

YMA 培养基^[10]。

基本培养基^[1], 以 MM 表示。

1.3 细胞内游离氨基酸含量的测定

方法见参考文献 [5]。

1.4 酶活性的测定

GS 活性分析采用 Shapiro 描述的方法^[11]。在很多根瘤菌菌株中, GS 含有 GS I 和 GS II 两种, 它们的分离方法见文献[12]。GOGAT 活性分析采用 Gonzalez 的方法^[13]。

1.5 蛋白质电泳

1.5.1 蛋白质样品的制备: RT19 培养到对数生长后期, 加入高浓度 NaCl, 使其最终浓度为 1000 mmol/L, 继续培养到 5 分钟及 50 分钟取样, 分别在 4℃ 下, 以 4000 r/min (5000×g) 离心 15 分钟, 收集菌体。用冷的 10 mmol/L Tris-HCl 洗涤菌体, 然后用超声波破碎。在 0℃ 下, 以 10000 r/min (9000×g) 离心 30 分钟, 取上清液, 备用。

1.5.2 可溶性蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶双向电泳: 采用微型双向电泳技术^[14]。第一向电泳 (等电聚焦) 在长 4 cm、内径为 0.5 mm 的毛细管中进行。第二向电泳 (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 是在长 5 cm、宽 3.5 cm 和厚 0.5 mm 的胶板上进行。银染色方法见文献[15]。

2 结果

2.1 盐激条件下细胞内游离氨基酸含量的测定

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 77.43 nmol · mg 蛋白⁻¹, 占氨基酸总量 12.4%; 脯氨酸的含量为 38.62 nmol · mg 蛋白⁻¹, 占氨基酸总量 6.18%。当 RT19 受 1000 mmol/L NaCl 冲击 5 分钟后, 细胞内谷氨酸和脯氨酸的含量都急剧上升, 分别是未受到盐激 (对照) 的 2.5 倍及 2.4 倍, 前者占氨基酸总量 30.2%, 后者占 14.48%。当受到 1000 mmol/L NaCl 冲击 50 分钟后, 细胞内谷氨酸和脯氨酸的含量分别为其对照的 4 倍及 3.8 倍, 二者各占氨基酸总量的 35.86% 和 17.34%。此外, 胱氨酸的含量在受到盐激后也有明显上升的趋势, 而亮氨酸、异亮氨酸和酪氨酸等在受到盐激后, 含量急剧降低, 以至测不出来 (表 1)。

2.2 盐激条件下 GS 和 GOGAT 活性的测定

RT19 在不含 NaCl 的基本培养基中生长时, 其 GS 活性为 691.72 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹。当受到 1000 mmol/L NaCl 冲击 5 分钟和 50 分钟后, GS 活性分别上升为 933.11 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹ 和 908.68 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹。如果在酶的粗提液中直接用 1000 mmol/L NaCl 处理 5 分钟, 酶活性降至 567.56 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹, 50 分钟时降至 470.01 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹。从表 2 还可看出, GS 在高盐冲击下, 其活性发生变化的部分为 GS II, 而 GS I 则无多大变化。

表 1 盐激对 RT19 菌株细胞内游离氨基酸组成的影响

Table 1 Effect of salt shock on the intercellular free amino acid composition of strain RT19

| 氨基酸 Amino acid | 氨基酸浓度 Amino acid concentration (nmol · mg protein ⁻¹) | | |
|-----------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| | MM | MM+1000 nmol/L NaCl (5min) | MM+1000 nmol/L NaCl (50min) |
| 天门冬氨酸 Asp | 27.23 | 65.75 | 64.64 |
| 苏氨酸 Thr | 23.31 | 43.03 | N. D. |
| 丝氨酸 Ser | 21.15 | 24.40 | 23.31 |
| 谷氨酸 Glu | 77.43 | 195.25 | 308.04 |
| 脯氨酸 Pro | 38.62 | 93.58 | 148.96 |
| 甘氨酸 Gly | 33.31 | 41.00 | 48.95 |
| 丙氨酸 Ala | 215.21 | 80.61 | 114.57 |
| 胱氨酸 Cys | 22.93 | 33.87 | 90.99 |
| 缬氨酸 Val | 28.47 | N. D. | 20.92 |
| 蛋氨酸 Met | 24.21 | 58.45 | 32.84 |
| 亮氨酸 Leu | 46.61 | N. D. | N. D. |
| 异亮氨酸 Ile | 16.95 | N. D. | N. D. |
| 酪氨酸 Tyr | 7.67 | N. D. | N. D. |
| 苯丙氨酸 Phe | N. D. | N. D. | N. D. |
| 赖氨酸 Lys | 17.11 | 10.53 | 6.59 |
| 组氨酸 His | N. D. | N. D. | N. D. |
| 精氨酸 Arg | N. D. | N. D. | N. D. |
| 色氨酸 Trp | N. D. | N. D. | N. D. |
| 游离氨基酸总含量 Total free amino acid | 624.42 | 646.47 | 858.81 |
| 谷氨酸所占百分比例 % as glutamate | 12.40 | 30.20 | 35.86 |
| 脯氨酸所占百分比例 % as proline | 6.18 | 14.48 | 17.34 |

N. D. = Not detected

表 2 盐激对 RT19 菌株 GS 活性的影响*

Table 2 Effect of salt shock on GS activities in strain RT19

| 处 理 Treatment | | GS I activity | GS II activity | GS activity |
|---|-------|------------------|-------------------|----------------|
| MM | | 170.27 | 521.45 | 691.72 |
| MM+1000 mmol/L NaCl (5min) | | 177.87 | 755.24 | 933.11 |
| MM+1000 mmol/L NaCl (50min) | | 163.56 | 745.12 | 908.68 |
| 酶的粗提液 Cell extracts + 1000 mmol/L NaCl | 5min | 164.06 | 403.5 | 567.56 |
| | 50min | 133.02 | 336.99 | 470.01 |

* (1) 酶活性单位为 nmol · mg 蛋白⁻¹ · min⁻¹, 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 · mg protein⁻¹ · min⁻¹.

(2) GS I 是热稳定型的, GS II 是热不稳定型的。

GS I is heat stable, whereas GS II is heat labile.

表 3 表明, RT19 在不含 NaCl 的基本培养基中生长时, 其 GOGAT 的活性为 $3.34 \text{ nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 但在 1000 mmol/L NaCl 处理 5 分钟和 50 分钟后, 酶活性分别为 $5.23 \text{ nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $4.43 \text{ nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。用 1000 mmol/L NaCl 直接处理酶的粗提液 5 分钟和 50 分钟, 则其酶活性分别降至 $3.11 \text{ nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $2.47 \text{ nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

表 3 盐激对 RT19 菌株 GOGAT 活性的影响*

Table 3 Effect of salt shock on GOGAT activities in strain RT19

| 处 理 Treatment | | GOGAT activity |
|---|-------|-------------------|
| MM | | 3.34 |
| MM+1000 mmol/L NaCl (5min) | | 5.23 |
| MM+1000 mmol/L NaCl (50min) | | 4.43 |
| 酶的粗提液 Cell extracts + 1000 mmol/L NaCl | 5min | 3.11 |
| | 50min | 2.47 |

* 酶活性单位为 $\text{nmol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 表示每分钟每毫克蛋白分解 NADPH 的量
Specific activity reported as $\text{nmol of NADPH oxidized} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.3 盐激条件下的蛋白质电泳图谱

采用微型电泳技术, 利用银染色法来观察 RT19 在盐激前后的蛋白质斑点的变化。经过重复试验, 发现 1000 mmol/L NaCl 冲击 50 分钟后, 在凝胶板上至少有 5 种蛋白质斑点消失, 其分子量和等电点 (MW/pI) 分别为: $41\text{kD}/4.4$, $36\text{kD}/4.0$, $26\text{kD}/4.9$, $22\text{kD}/5.4$, $19\text{kD}/4.2$ 。值得注意的是, 在盐激后新出现两个蛋白质斑点, 其分子量和等电点 (MW/pI) 分别为 $110\text{kD}/4.3$ 和 $76\text{kD}/6.5$, 称为盐激蛋白 (图版 I)。

3 讨论

耐盐的根瘤菌在盐胁迫下一般积累谷氨酸, 而不积累脯氨酸^[1-6]。本实验发现, 快生大豆根瘤菌 RT19 在高浓度 NaCl 冲击下, 不仅大量产生谷氨酸, 而且积累脯氨酸, 两者增长趋势几乎相同, 以这两种物质作为主要的渗透调节物质。同时, 还发现其他几种氨基酸的增减。这种现象说明, 在外界盐胁迫激烈变化的情况下, 细菌细胞内的氨基酸种类和含量发生较大变化, 渗透调节物质之间发生相互的转换和协调, 在巴西固氮螺菌中也存在类似的情况^[16]。

RT19 在盐胁迫下, 主要以 GS 和 GOGAT 酶系来合成谷氨酸。在 300 mmol/L NaCl 条件下, 细胞内的 GS I 活性急剧增加, 为不加盐条件下生长的对照菌株的 6 倍, GS I 变

化不大, 而且 GOGAT 活性是对照的 11 倍^[17]。RT19 在 1000 mmol/L NaCl 冲击下, GS 和 GOGAT 的活性虽有明显提高(表 2, 表 3), 但不如在 300 mmol/L NaCl 条件下增长显著, 可能是由于在高盐冲击下细胞内有部分谷氨酸转变为脯氨酸所致。而且, 在盐激条件下 GS 活性的提高是由 GS I 引起的, GS I 没有多大变化。这个结果与 RT19 在 300 mmol/L NaCl 条件下所发生的变化相反, 原因待查。将 1000 mmol/L NaCl 直接处理 GS 和 GOGAT 的粗提液 50 分钟, 这两种酶仍保持 70% 的活性, 说明它们对高盐胁迫具有耐受性。此结果与 Falkenberg^[18]的实验相似。

利用蛋白质双向电泳技术, 发现 RT19 对高盐冲击的反应是灵敏和迅速的。盐激后细胞内某些蛋白质的合成量减少, 甚至消失, 这些蛋白质也许对渗透压的调节不很重要, 而盐激蛋白的出现则可能对渗透调节具有重要作用。

综上所述, 快生大豆根瘤菌在盐激条件下, 不仅细胞内某些氨基酸大量积累, 另一些则减少, 而且体内的蛋白质也发生较大变化, 说明渗透调节是一个复杂的过程。

参 考 文 献

- [1] 杨苏声, 李季伦. 北京农业大学学报, 1988, 14 (2): 143—148.
- [2] 杨苏声, 李季伦. 微生物学报, 1989, 29 (2): 107—112.
- [3] Bostford J L. *Arch Microbiol*, 1984, 137: 124—127.
- [4] Hua S S, Tsai Y, Lichens G M, Noma A T. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44: 135—140.
- [5] Yap S F, Lim S T. *Arch Microbiol*, 1983, 135: 224—228.
- [6] Csonka L N, Hanson A D. *Annu Rev Microbiol*, 1991, 45: 569—606.
- [7] Clark D, Parker J. *FEMS Microbiol Lett*, 1984, 25: 81—83.
- [8] Apte S K, Bhagwat A A. *J. Bacteriol*, 1989, 171: 909—915.
- [9] Bhagwat A A, Apte S K. *J. Bacteriol*, 1989, 171: 5187—5189.
- [10] Vincent M J. 上海植物生理研究所固氮室译. 根瘤菌实用研究手册. 上海: 人民出版社, 1970. 3.
- [11] Shapiro B M, Stadtman E R. *Meth Enzymol*, 1970, 17A: 910—922.
- [12] Fuchs R L, Keister D L. *J. Bacteriol*, 1980, 144: 641—648.
- [13] Gonzalez R G, Bostford J L, Lewis T. *Can J Microbiol*, 1990, 36: 469—474.
- [14] Neukirchen R O, Schlosshauer B, Baars s et al. *J Biol Chem*, 1982, 257: 15229—15234.
- [15] Damerval C, Guilloux M L, Blaisonneau J et al. *Electrophoresis*, 1987, 8: 158—159.
- [16] Madkour M A, Smith L T, Smith G M. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 2876—2881.
- [17] 杨苏声, 曾静, 李季伦. 微生物学报, 1993, 33 (2): 86—91.
- [18] Falkenberg P, Ström A R. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1034: 253—259.

THE OSMOREGULATION OF *RHIZOBIUM* *FREDII* BY SALT SHOCK

Li Hong Yang Susheng

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

Abstract *Rhizobium fredii* RT19 can grow in the presence of 800 mmol/L NaCl in the minimal medium. The intracellular levels of glutamate and proline were found to be elevated rapidly when high concentration of salt was added abruptly to the medium to a final concentration of 1000 mmol/L NaCl for 5 minutes. Fifty minutes after the salt shock, the intracellular concentration of glutamate and proline became 4-fold and 3.8-fold of that in control cells, respectively. After salt shock, the activities of glutamine synthetase and glutamate synthase of RT19 were stimulated significantly in comparison with the control. In the case of GS, the activity of GS II was stimulated, but not GS I. When the cell extracts were exposed to 1000 mmol/L NaCl for 50 minutes, the activities of these enzymes were reduced and remained 70% of the control. The cell protein analysis by two-dimensional polyacrylamide gradient gel electrophoresis showed that some proteins were disappeared and two salt shock proteins were induced. One of these two proteins has a MW of 110kD and a pI of 4.3, and the other has a MW of 76kD and a pI of 6.5.

Key words Salt shock, Fast-growing rhizobia, Osmoregulation

图版说明

Explanation of plate

盐激前后 RT19 菌株蛋白质的双向电泳图谱比较

1. 对照; 2. 盐激 (1000 mmol/L NaCl) 50 分钟.

箭号指的是消失的蛋白, 箭头指的是盐激蛋白.

Two-dimensional gel protein patterns of strain RT19 with and without salt shock

1. Control; 2. Salt shock (1000 mmol/L NaCl) for 50 min. Arrows indicate the disappearance of proteins under salt shock, arrowheads show salt shock proteins.