

旋扭山绿豆根瘤菌 MXDI₆ 菌株氢酶诱导表达

姚小文 陈兆平 程双奇 莫熙穆

(华南师范大学生物学系生物固氮研究中心, 广州 510631)

摘要 在自生异养条件下, 旋扭山绿豆根瘤菌 MXDI₆ 菌株的氢酶诱导表达受气相、pH 值、镍等因子影响; 氢酶表达的最适氧浓度为 4%, 最适氢浓度为 15%, 二氧化碳没有明显影响; 氢酶表达的 pH 值以 5.0—6.0 为宜; 0.5 μmol/L NiCl₂ 明显促进吸氢活性, 但镍浓度大于 1 μmol/L 则抑制吸氢活性。

关键词 旋扭山绿豆; 根瘤菌; 自生异养条件; 氢酶表达; 吸氢活性

EXPRESSION OF HYDROGENASE SYSTEM IN STRAIN MXDI₆ OF RHIZOBIUM (*DESMODIUM INTORTUM*)

Yao Xiaowen Chen Zhaoping Cheng Shuangqi Mo Ximu

(Center for Biological Nitrogen Fixation Research, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract The capacity of inducing a H₂-uptake hydrogenase under free-living heterotrophic condition was examined in strain MXDI₆ of Rhizobium of *Desmodium intortum*, and the effect of some factors such as gas phase, pH values and nickel on the expression of hydrogenase in strain MXDI₆ has been investigated. It has been found that: (1) The optimum concentration of O₂ and H₂ for hydrogenase expression of strain MXDI₆ are 4% and 15% respectively, while carbon dioxide has no obvious effect. (2) Favourable pH values for expression of hydrogenase of strain MXDI₆ are 5.0—6.0. (3) The H₂-uptake activities in strain MXDI₆ are enhanced markedly by adding a lower concentration (<1 μmol/L) of NiCl₂, whereas it is inhibited by a higher concentration (>1 μmol/L) of NiCl₂. When NiCl₂ concentration is 0.5 μmol/L, the H₂-uptake activities are increased to 3.4 times.

Key words *Desmodium intortum*; Rhizobium; Free-living heterotrophic condition; Expression of hydrogenase; H₂-uptake activity

根瘤菌体内的固氮酶在固氮过程中伴随着放氢, 这是一种能量的浪费^[1,2]。有些根瘤菌体内存在着吸氢酶, 能氧化由固氮酶催化所放出的氢, 从而提高了共生固氮效率和植物的产量^[3,4]。

在自生条件下, 根瘤菌吸氢酶活性的表达受多种因子调控^[5]。氢诱导慢生型根瘤菌^[6-8]氢酶的形成; 低氧有利于大豆根瘤菌^[9]氢酶诱导表达; 镍明显促进大豆^[10]和花生根瘤菌^[11]的吸氢活性; pH 值对紫云英根瘤菌^[12]的氢酶表达有调节作用。

旋扭山绿豆是本中心从澳大利亚引种的优良热带豆科牧草,在广东的推广种植已收到良好的社会和经济效益。本文旨在探讨在自生异养条件下旋扭山绿豆根瘤菌MXDI₆菌株表达氢酶活性的最佳条件,为进一步研究其吸氢酶与固氮酶之间的关系,提高固氮效率提供参考。

1 材料和方法

菌株与培养基 旋扭山绿豆 (*Desmodium intortum*) 根瘤菌RhizobiumMXDI₆菌株由本研究中心提供。菌株保存用常用的酵母-甘露醇培养基(YMA)。菌株扩大培养以YM培养基(YMA减去琼脂)^[13]。吸氢培养基(HUM)采用Maier等^[14]的方法,但以28 mg L⁻¹柠檬酸铁代替Fe-EDTA。

菌体培养 菌体以YMA斜面保存。进行液相培养时,挑取一接种环的菌体,接种于20ml YM培养基中,于28℃往复振荡培养4-5 d。

液相诱导 取1ml YM培养的菌液,接入20ml HUM培养基中,于28℃往复振荡培养4-5 d后,把三角瓶换上翻口橡皮塞,根据实验需要注入不同浓度的H₂、O₂、CO₂气体,诱导培养4-5 d,然后离心收集菌体,并用0.05mol/L pH6.8内含1 mmol/L MgSO₄的磷酸缓冲液悬浮。

氢酶活性测定 取4 ml细胞悬浮液装入24 ml的血清瓶中,加塞注入氢、氧等气体,用气相层析仪检测一段时间内的吸氢量,计算氢酶活性。(不同条件下菌体的诱导培养均经3次试验,每次试验设4个重复,结果取平均值。)

菌体蛋白测定用Lowry等^[15]方法。

2 结果与分析

2.1 自生异养条件下MXDI₆的氢酶诱导表达

在HUM培养基中,配以10% H₂, 10% O₂, 80% N₂的气相条件,诱导MXDI₆的氢酶表达,可观察到其氢酶表达进程如图1。

2.2 气相对MXDI₆氢酶表达的影响

2.2.1 氧对氢酶诱导表达的影响

在HUM培养基中,恒定10%的氢浓度,观察不同氧浓度对氢酶诱导的影响,图2结果表明:氧浓度低于2%时,氢酶活性较低;增大氧浓度氢酶活性迅速增加,至4%时达最大值;若继续增大氧浓度则明显抑制氢酶表达,7%时,氢酶活性比最大值约下降85%。

2.2.2 氢对氢酶诱导表达的影响

在HUM培养基中,控制3%的氧浓度,可观察到分子氢对MXDI₆氢酶诱导的影响(图3);无氢时,氢酶不表达;氢酶活性随外加分子氢增加而明显提高,氢浓度达15%时,氢酶活性达到最高值,继续提高氢浓度至25%,氢酶活性基本保持恒定。

2.2.3 二氧化碳对氢酶诱导表达的影响

在含有3% O₂, 10% H₂的诱导气相中配以不同浓度的CO₂诱导氢酶,结果(表1)表明CO₂对MXDI₆氢酶表达没有明显影响。这与花生^[8]、大豆^[6]根瘤菌的情况相似。

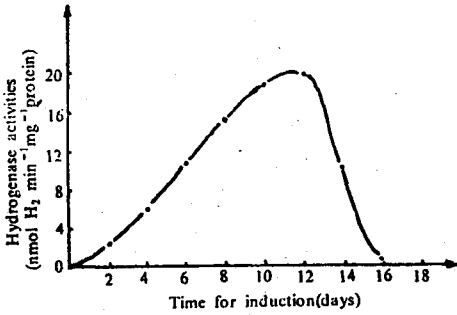


图 1 MXDI₆ 菌株的氢酶诱导表达

Fig. 1 The time course of expression of hydrogenase in strain MXDI₆

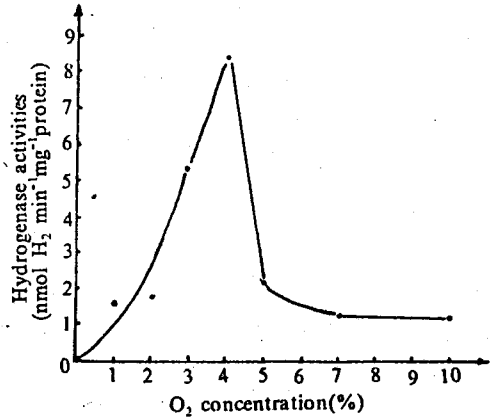


图 2 氧对 MXDI₆ 氢酶诱导表达的影响

Fig. 2 Effect of O₂ on hydrogenase expression of strain MXDI₆

表 1 二氧化碳对 MXDI₆ 吸氢活性的影响

Table 1 Effect of CO₂ on H₂-uptake activities of strain MXDI₆

气相成份 Composition of the gas phase	吸氢活性 Hydrogenase activities (nmol H ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
3%O ₂ +10%H ₂ +87%N ₂	12.10
3%O ₂ +10%H ₂ +85%N ₂ +2%CO ₂	12.98
3%O ₂ +10%H ₂ +82%N ₂ +5%CO ₂	13.50
3%O ₂ +10%H ₂ +77%N ₂ +10%CO ₂	11.27

2.3 不同 pH 值对 MXDI₆ 氢酶表达的影响

图 4 表明 MXDI₆ 的氢酶诱导表达对 pH 敏感, HUM 培养基 pH 5.0-6.0 有利于氢酶诱导。pH 5.5 时, 吸氢活性出现最大值, pH 值大于 6.0, 吸氢活性降低。

2.4 镍对 MXDI₆ 氢酶表达的影响

在 HUM 培养基中加入不同浓度的 NiCl₂, 结果 (图 5) 表明: 小于 1 μmol/L NiCl₂ 明显促进 MXDI₆ 的吸氧活性, 0.5 μmol/L 镍可使吸氢活性提高至 3.4 倍; 而大于 1 μmol/L 镍则抑制吸氢活性, 镍浓度为 10 μmol/L 时, 吸氢活性比不加镍约下降 75%。

3 讨论

从实验中发现, 旋扭山绿豆根瘤菌 MXDI₆ 氢酶表达的时间进程缓慢。一般情况下, 诱导 12 h 可观察到氢酶活性, 12 d 达到最大值, 然后逐渐减少直至消失, 全过程需 16 d。而紫云英、冬箭箬豌豆根瘤菌则分别需 4 d、5 d 左右^[12]。说明不同根瘤菌在氢酶表达的时间进程上存在着较大差异。

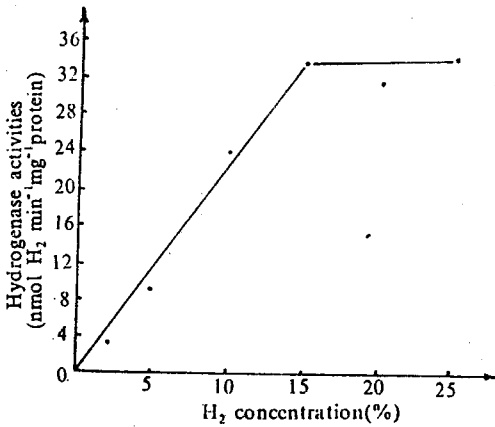


图 3 氢对 MXDI₆ 氢酶诱导表达的影响

Fig. 3 Effect of H₂ on hydrogenase expression of strain MXDI₆

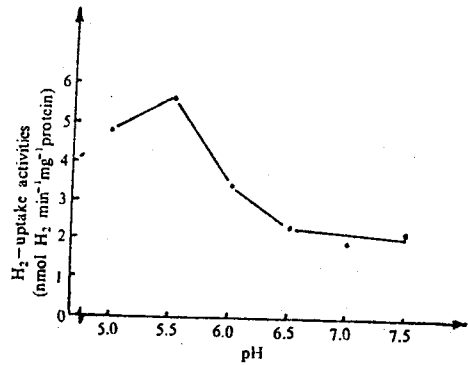


图 4 pH 值对 MXDI₆ 氢酶诱导表达的影响

Fig. 4 Effect of pH values on hydrogenase expression of strain MXDI₆

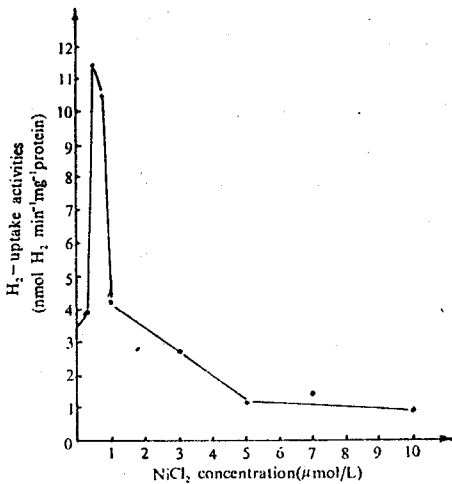


图 5 镍对 MXDI₆ 氢酶诱导表达的影响

Fig. 5 Effect of nickel on hydrogenase expression of strain MXDI₆

旋扭山绿豆根瘤菌 MXDI₆ 的氢酶表达依赖于氧的存在,这是因为 MXDI₆ 根瘤菌是好气的,其呼吸代谢需要氧,在没有其它电子受体存在的情况下,氧也是其氢酶的末端电子受体。但氧浓度过大, MXDI₆ 的氢酶表达受阻,这与异生长的大豆^[9]、紫云英^[7]、花生^[8]等根瘤菌的情况相似。根瘤菌氢酶诱导表达对氧的敏感程度不同, MXDI₆ 氢酶表达的最适氧浓度是 4%,与花生根瘤菌^[9]的 5%较接近,大豆根瘤菌仅 0.8%^[9]。高氧浓度使根瘤菌没有或表现较低的氢酶活性,并非氧破坏了氢酶,而是影响氢酶的合成。Berkum^[6]发现,当氧浓度近似于空气的氧浓度,大豆根瘤菌没有

吸氢活性,免疫分析表明氢酶蛋白不能合成。他就此提出了氧对氢酶表达阻遏作用的两种假说:(1)氧直接作用于氢酶基因;(2)氧可能作用于氢酶基因以外的某个因子,因而阻遏微需氧代谢的过程。

MXDI₆ 氢酶表达还依赖于氢的存在。氢对根瘤菌氢酶活性的调控是在基因水平上进行的。Berkum^[6]在大豆根瘤菌中证实氢诱导氢酶蛋白的合成。孙金华等^[7]发现氢对紫云英根瘤菌氢酶的诱导涉及蛋白的重新合成和装配,而不是氢激活预先形成的氢酶前体。但是氢酶的合成是需要分子氢本身,还是需要分子氢氧化后形成的某些代谢物,有待进一步研究。

一般认为,质子是吸氢反应的产物,因此可推测高 pH 值有利于吸氢。但本实验得出 MXDI₆ 的氢酶诱导表达的最适 pH 在 5.5 左右。我们认为,这可能是因为 pH 值对根瘤菌活细胞体氢酶表达除了与氢酶反应有关外,还涉及到菌体的生长以及菌体其它的生理生化特性等

因素所致。

加入一定浓度的微量元素镍明显促进 MXDI₆ 的吸氢活性, 是因为镍可能参与了氢酶蛋白的合成。Stults 等证明大豆根瘤菌的氢酶是一种含镍金属酶^[16], 他们认为, 镍除了是大豆根瘤菌吸氢酶的组分外, 还扮演着一个调节氢酶表达的角色^[10]。

参考文献

- 1 Schubert K R, Evans H J. Hydrogen evolution; a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc National Acad Sci USA, 1976, 73: 1207—1211
- 2 Simpson F B, Burris R H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. Science, 1984, 224: 1095—1097
- 3 Albrecht S L et al. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. Science, 1979, 203: 1255—1257
- 4 Pahwa K, Dogra R C. H₂-recycling system in mungbean *Rhizobium* in relation to N₂-fixation. Arch Microbiol, 1981, 129: 380—383
- 5 Evans H J et al. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia, Ann Rev Microbiol, 1987, 41: 335—361
- 6 Peter Ven Berkum. Expression of uptake hydrogenase and hydrogen oxidation during heterotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol, 1987, 169: 4565—4569
- 7 孙金华等. 紫云英根瘤菌 109 菌株氢酶诱导表达. 植物生理学报, 1986, 12: 370—378
- 8 吕荣富等. 花生根瘤菌 L8-3 菌株氢酶活性的表达及化能自养生长. 核农学报, 1989, 3: 151—155
- 9 Maier R J et al. Regulation of hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. J Bacteriol, 1979, 137: 824—829
- 10 Stults L W et al. Regulation of hydrogenase biosynthesis by nickel in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch Microbiol, 1986, 146: 280—283
- 11 许良村等. 镍对花生根瘤菌 (*Rhizobium arachis*) 氢酶活性的影响. 核农学报, 1988, 2: 73—78
- 12 孙金华等. 环境因子对根瘤菌吸氢活性表达的影响. 植物生理学报, 1987, 13: 316—324
- 13 Vincent J M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford. England. 1970
- 14 Maier R J et al. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75: 3258—3262
- 15 Lowry O H et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265—275
- 16 Stults L W et al. Nickel is a component of hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol, 1984, 159: 153—158