

冰核细菌表达冰核蛋白特性的研究*

陈庆森 阎亚丽 王素英 刘剑虹 庞广昌

(天津商学院生物技术与蛋白资源研究室 天津 300400)

摘要: 选用 10025A 和 QF-95-F19 两株分离自杨树的冰核活性细菌, 探讨了两株菌不同生长阶段与它们冰核活性表达的特性。实验结果显示, 冰核活性细菌在 MPDA 培养液中表达冰核蛋白的特性及活性与细菌浓度、菌龄以及培养的环境条件相关, 两株菌在表达冰核活性时对培养基的营养组分没有表现出特殊的要求, 同时还进一步阐明了不同生长温度冰核活性细菌对冰核蛋白表达的影响。

关键词: 冰核活性细菌, 冰核蛋白, 培养物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0421-04

STUDY ON EXPRESSION OF ICE NUCLEI PROTEIN FOR ICE NUCLEATION ACTIVE BACTERIA

CHEN Qing-Sen YAN Ya-Li WANG Su-Ying LIU Jian-Hong PANG Guang-Chang

(Research Laboratory of Biotechnology and Protein Resources, Tianjin Commerce University, Tianjin 300400)

Abstract: The two strains (10025A (*Erwinia herbicola*) and QF-95-F19 (*Pseudomonas syringae*)) with ice nucleation active (INA) bacteria isolated from the Northern Poplars are sampled for research in this paper, and their different growth phase and the expression of the ice nuclei active protein are probed. The experiment demonstrates that the characteristic and activity expressed by the ice nuclei active bacteria growing in MPDA medium are associated with its bacteria cell concentration, bacteria age and the culture environment condition, and also testifies that the two strains INA bacteria have not special requirement for the nutrition condition in this medium during the expression of ice nuclei active proteins. At the same time, The influences of the different growth temperatures on the ice nuclei proteins expressed by INA bacteria are given a further illustration.

Key words: Ice nuclei active (INA) bacteria, Ice nucleation protein, Culture

自 70 年代具冰核活性 (Ice Nuclei Active (INA)) 的细菌发现以来, 人们研究认识到这类细菌是诱发和加重植物霜冻的重要因素, 又对这些细菌的生态学、INA 细菌的分布、产冰核的能力等方面进行了广泛深入地研究^[1-5]。目前, INA 细菌在实践方面, 如: 人工降雪、人工降雨 (Cloud seeding)^[1,4]、生物杀虫、冷冻食品^[3]和诊断学的实践等方面已得到一定的发展和运用。因此, 具生成冰核活性的细菌以及冰核蛋白的

研究迅速地发展, 将展现出诱人的广泛的应用前景, 成为人们所注目的新领域。

国外在冰核活性细菌的鉴定、生理特性及营养要求、*ina* 基因的序列分析和克隆等方面均作了较为广泛的研究^[4-6]。Lindow 等人报道了

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770580)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770580)

收稿日期: 1999-05-17, 修回日期: 1999-09-09

具有冰核活性的细菌在某种培养物上产生冰核的数目和细菌细胞个数的比率是随着培养温度、生长培养基的构成、培养物的菌龄和基因型而变化的; Pooley 和 Brown 也注意到了冰核细菌培养在 20~24℃、含有甘油的营养琼脂上可诱导冰核细菌对冰核蛋白的表达。孙福在等人对国内大部分地区植物上冰核活性细菌的资源进行了较为深入地调查研究, 确定了 3 个属和 17 个种或致病变种。对冰核细菌与植物霜冻间的关系^[7]; 影响 INA 细菌生成冰核活性的因素以及应用技术研究等方面进行了报道^[8]。而在国内有关冰核菌的培养特性和生理因素对 *ina* 基因的表达的影响以及冰核菌生成蛋白复合体在细胞中的组装的规律, 尚未见报道。本文通过对冰核活性细菌培养物的生长特性的研究, 建立 INA 细菌在不同生长阶段对冰核蛋白表达的程度和频率间的关系, 以及获取最大量冰核蛋白的条件和方法, 以利于更深入地对冰核细菌和冰核蛋白的理论研究和今后在农业、医疗和食品工业的应用奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用菌种为: 10025A 是草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*); QF-95-F19 是丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*), 菌种来自中国林业科学研究院森林保护研究所, 分离自东北的杨树上。10025A 和 QF-95-F19 分别培养在 MPDA 培养基 (该培养基是在原 PDA 基础上的改进^[8]) 的斜面上。在液体培养的过程中, 使用液体 MPDA 培养基于旋转式振荡培养器上制备液体培养物, 该培养物用于冰核菌的冰核活性的测定和分析。

1.2 实验方法

1.2.1 冰核细菌的生长曲线的细胞浓度的测定: 冰核细菌的生长曲线测定: 采用常规 (OD_{600nm}) 方法操作^[9]。细胞浓度的测定: 活菌计数在 MPDA 平板上采用倾注法测定^[9]。

1.2.2 冰核菌的冰核活性的测定: 为了实现冰核菌冰核活性的精确测定, 每一个培养时间的

冰核菌细胞悬液均采用 50mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 系列无菌稀释到一定的细胞浓度。然后, 采用 Vali 研制的方法^[10], 后由 Lindow 改进的小液滴冻结法^[11], 分别于低温浴槽中测定 -3℃ 和 -5℃ 时不同时间、一定细胞浓度的冰核活性, 计算出在该条件下的冻滴率 (%)。

2 结果与讨论

2.1 10025A 和 QF-95-F19 在 MPDA 培养基上生长特性与生冰核活性的关系

在 MPDA 培养液中于 32℃、185r/min 旋转式振荡培养器上培养 10025A 和 QF-95-F19, 按方法 1.2 监测两种冰核活性细菌的生长过程, 测定冰核前于 18℃ 下将培养物培养 1h, 然后将 10025A 和 QF-95-F19 的培养物分别稀释至 3.1×10^9 个/mL 和 4.7×10^8 个/mL, 再采用 Vali 研制的方法, 后由 Lindow 改进的小液滴冻结法分别测定了 -5℃ 时 30s 和 2min 的冰核活性和 -3℃、2min 时的冰核活性。获得了 10025A 和 QF-95-F19 两株菌对应于其生长曲线不同时间的菌浓度与表达冰核活性蛋白之间的相关性。结果见图 1 和图 2 所示。

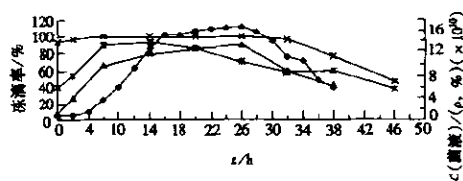


图1 10025A的生长特性与它们表达冰核蛋白的关系
—▲—冻滴率%(-5℃, 30s), —×—冻滴率%(-5℃, 2min),
—*—冻滴率%(-3℃, 2min), —◆—菌液浓度(×10⁹)

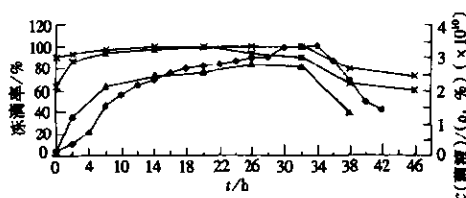


图2 QF-95-F19的生长特性与它们表达冰核蛋白的关系

—▲—冻滴率%(-5℃, 30s), —×—冻滴率%(-5℃, 2min),
—*—冻滴率%(-3℃, 2min), —◆—菌液浓度(×10⁹)

从 10025A 和 QF-95-F19 的生长曲线中可

以看出,在同样的培养基上菌种的生长特征有明显差异。10025A 在 MPDA 上的生长显示典型生长曲线特征,而 QF-95-F19 生长的对数期和稳定期其正负生长没有明显的动态平衡,这不仅说明该菌在 MPDA 上生长的特殊性,也说明该菌能够在常规细菌所要求的营养成份上生长,且容易实现生物量的积累,这对获取高活性的冰核蛋白具有应用意义。实验中发现了两株冰核活性细菌在 MPDA 培养液中能高表达冰核活性蛋白的现象,并阐明了两株冰核细菌在不同生长时期其冰核蛋白表达与细菌细胞浓度、菌龄和特定的环境要求的关系。从图 1、2 可见,在冰核细菌生长到对数期后期和稳定期后期之间为冰核蛋白的高表达时期,这与 Lindow 等人所报道的实验结果是一致的^[1]。按照 Yankofsky 等人定义冰核细菌产冰核能力强弱的分类方法^[5],从我们测定的两株冰核细菌的冰核活性可知,10025A 为 -3°C 表达最强冰核活性的菌株,而 QF-95-F19 则为 -5°C 强表达冰核活性的菌株,结果显示两株 INA 细菌均为 Typel(即 -2°C 到 -5°C)型。从测定不同时间内 INA 细菌表达冰核活性蛋白的能力可以看出,除了在培养特性及菌浓等方面,10025A 表达冰核活性的能力也好于 QF-95-F19;两菌株均表现出在稳定期后期的冰核活性最高。总之,阐明两株菌的生长周期、营养要求以及细胞生冰核蛋白的规律,对研究和利用冰核活性细菌具有重要的价值。另外,对该类型蛋白质的研究也是有重要价值的。

2.2 冰核细菌在不同温度条件下冰核蛋白表达的能力

冰核活性细菌在不同温度条件下对冰核活性蛋白的表达是一种重要的研究内容。实验将 10025A 和 QF-95-F19 于不同温度条件下培养 26h 后,将培养物的原菌液稀释至 10^{-5} 的浓度,分别测定它们相应温度条件下的冰核活性,再将温度为 24°C 、 32°C 的培养物转移到 18°C 的条件下培养 1h 后,测定它们温度转移后的冰核活性。实验结果见图 3 和图 4 所示。

实验中观察到 10025A 和 QF-95-F19 冰核

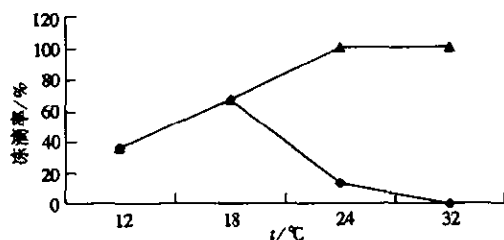


图3 不同温度条件下10025A冰核蛋白的表达特征

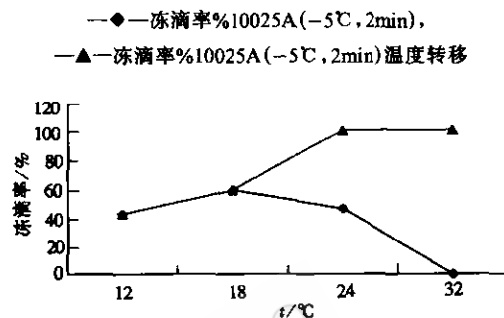


图4 不同温度条件下QF-95-F19冰核蛋白的表达特征

—◆—冻滴率%QF-95-F19 (-5°C , 2min),
—▲—冻滴率%QF-95-F19 (-5°C , 2min)温度转移

活性细菌在 12°C 和 18°C 、 185r/min 旋转式摇床上培养至 26h, 两株 INA 细菌均表现异常的沿壁生长的现象, 而形成菌团, 显示了这两种冰核活性细菌在极端或较低的温度条件下的生长状况与它的生理特征的要求是相关的; 又因在此温度条件下细菌生长缓慢, 使细菌浓度很低 (18°C 时 10025A 和 QF-95-F19 的菌浓分别为 2.2×10^{10} 个/mL、 2.5×10^9 个/mL), 则生冰核的能力也就很低的。另外, QF-95-F19 在 12°C 温度下 MPDA 培养液中形成较大的菌球, 说明该菌在低温条件下所表达的蛋白质可能具有特殊的结构。从图 3 和图 4 的实验结果表明 24°C 、 32°C 培养的两种类型的冰核活性细菌生长旺盛, 培养到 26h 其培养液的细胞浓度可分别达到 8.4×10^{10} 个/mL、 2.0×10^{11} 个/mL 和 1.4×10^{10} 个/mL、 3.5×10^{10} 个/mL, 在该温度下测定冰核活性基本上不表达冰核活性; 但经 18°C 诱导 1h 后, 则测定冰核活性细菌的冰核冻滴率达到 100%, 且冰核细菌的冰核蛋白活性的表达能力也达到最高。该结果不仅阐明了不同温度条件下冰核活性细菌对冰核活性蛋白的表达存在着显著差别, 也进一步证实了冰核活性细

菌的冰核活性蛋白的表达与温度条件是正相关,即低温是诱发 INA 细菌表达蛋白质并组装成特定结构的一个必要的条件。

2.3 讨论

实验对冰核活性细菌 10025A 和 QF-95-F19 在 MPDA 培养液中生长的情况进行了全面的考察。实验结果证实了(1)冰核活性细菌在不同的生长阶段与它们的冰核蛋白的表达以及冰核蛋白的活性之间的关系;(2)不同的温度条件下冰核活性细菌的冰核蛋白的表达是有差异的,证实了冰核活性蛋白的表达是与温度有关的;另外,本实验还建立了培养大量冰核活性细菌的培养条件和方法,以及冰核蛋白表达的必要条件。这些为更好地研究开发与利用冰核蛋白资源奠定了很好的基础。

致谢 本研究工作得到了中国林业科学研究院森林保护研究所曾大鹏研究员的大力支持和帮助,在此表示衷心地感谢!

参 考 文 献

- [1] Lindow S E, Arny D C, Upper C D. *Plant Physiol.* 1982, **70**:1084~1089.
- [2] Jung J A. *J Weather Modification*, 1990, **22**:153~157.
- [3] Arai S, Watanabe S. *Agric. Biol. Chem.* 1986, **50**:169~175.
- [4] Pooley L, Brown T A. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991, **77**:229~232.
- [5] Yankofsky S A, Nadler T N, Levin Z. *Curr. Microbiol.* 1983, **9**:263~268.
- [6] Obata H, Tokuyama T, Kawate S *et al.* *Agric. Biol. Chem.* 1990, **54**:2171~2174.
- [7] 孙福在,何礼远. *植物保护*, 1989, **15**(4):41~43.
- [8] 孙福在,朱 红,何礼远. *中国农业科学*, 1991, **24**(3):57~64.
- [9] 南开大学微生物学教研组《微生物学实验指导》, 1983, 58~62.
- [10] Vali G. *J. Atmos. Sci.*, 1971, **28**:402~409.
- [11] Lindow S E. *Phytopathology*, 1978, **68**:5213~5217.