

巴西固氮螺菌的周质蛋白与宿主相关性的研究*

杨一平 毛先枝 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

摘要 本文报道用一种微量的方法研究从小麦、玉米、水稻、谷子等作物根系分离到的 30 株巴西固氮螺菌的周质蛋白。结果表明: 尽管经形态、生理生化等多项指标鉴定确认它们同属于 *Azospirillum brasilense* (巴西固氮螺菌), 但是来源于不同植物根表的菌株间的周质蛋白扫描图谱有明显的差异, 而来自同一种作物根表的菌株间的周质蛋白图谱却很相似。从而表明, 巴西固氮螺菌具有宿主特异性。

关键词 巴西固氮螺菌; 周质蛋白; 图谱; 宿主

从生态学的观点看, 自然界中存在三种生物固氮体系: 自生固氮体系, 如自生固氮菌; 共生固氮体系, 如根瘤菌和豆科植物之间的共生

结瘤固氮; 联合固氮体系, 如雀稗和雀稗固氮菌

• 国家自然科学基金资助项目。

之间的联合固氮体系。

在联合固氮体系中，雀稗和雀稗固氮菌的联合固氮研究进行的最早，发现它们之间存在专一性的联合^[1]。而联合固氮体系中，最重要的是固氮螺菌，它的地理分布最广，其宿主范围很广，除了禾本科植物外，还常出现在热带的一些牧草的根系上^[2]。这些固氮螺菌与宿主植物间联合固氮是否具有专一性的问题，就值得探讨。

我们采用一种微量的方法，即以氯仿抽提、又经 SDS-PAGE 及凝胶扫描的方法，研究了从小麦、玉米、水稻、谷子四种作物根表中分离到的30株固氮螺菌的菌体周质蛋白的组成，初步揭示了巴西固氮螺菌具有宿主特异性。本文报道了这方面工作的结果。

材料与方 法

(一) 供试菌株

选用本室从玉米、小麦、谷子及水稻四种作物根表分离到的、具有较高固氮活性的螺菌，经形态、生理生化等多项指标确认同属于巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 的菌株^[3]。

(二) 培养物的获得

将菌种分别接种到修改的 Nfb 培养基的斜面上^[4]，28℃ 培养 24—36 小时。转接到装有 1.5ml Nfb 液体培养基的试管中，28℃ 振荡培养 20 小时，将培养物倾入 Eppendorf 管中，以 6000r/min (约 4000 × g) 离心 5 分钟，收集菌体。

(三) 菌体周质蛋白的提取

将 15μl 氯仿加入 Eppendorf 管底的菌泥中，在涡旋混合器上混合几秒钟，室温下静置 15 分钟，再加入 100μl 冰冷的 0.1m mol Tris-HCl (pH 8.0)，稍混，以 12000r/min (约 8000 × g) 离心 10 分钟，取水相 100μl，用 Sedmak 和 Grossbers^[5] 法测定蛋白质浓度，用牛血清白标准曲线校准。将抽提液(即周质蛋白液)与上样缓冲液等量混合，煮沸 5 分钟即为样品液，供电泳分离用。

(四) 电泳

采用修改的 Laemmli 体系^[6]进行。浓缩胶浓度为 4%，分离胶浓度为 10%。胶板为 12.5 × 9.5 × 1.5mm³，以 7% 的琼脂糖凝胶封底。每板可上样 9—11 个，留一孔加入标准分子量的蛋白质液作对照，每孔上样量为 40μg 蛋白质/孔。电泳的初始电压为 60V，待样品进入浓缩胶后(约 15 分钟)即可调电压至 120V，稳压电泳至溴酚蓝带距胶底 1cm 左右，结束电泳(约 3.5 小时)。

(五) 染色

取下凝胶板，用去 SDS 缓冲液 (46ml 冰醋酸加 454ml 50% 的甲醇) 浸泡过夜，其间换缓冲液三次，直至去净 SDS。将胶板放入考马斯亮蓝 G-250 染液中 (100mg 考马斯亮蓝溶于 95% 乙醇中，加入 100ml 磷酸，定容到 1 升)，室温下染 30—60 分钟。即可在近无色的背景上看到清晰的蓝色蛋白质带^[7]。用岛津 300 型分光光度计对胶条扫描记录。扫描波长为 595nm，走纸速度为 1.88cm/min。

结 果

(一) 供试菌株的固氮活性 (表 1)

表 1 供试菌株及其固氮活性

宿主植物	菌株号	固氮活性 n · mol · C ₂ H ₄ /h · ml	宿主植物	菌株号	固氮活性 n · mol · C ₂ H ₄ /h · ml
玉 米	Ma 6	829.7	小 麦	W59-1	871.5
	Ma 201	377.7		W50-2	711.8
	Ma 231	598.2		W96-4	1041.9
	Ma 232	517.5		W251-4	1003.4
	Ma 233	250.8		W251-10	1144.9
	Ma 234	199.4		W259-4	804.0
	Ma 237	450.2		W261-5	797.6
	Ma 241	199.4		W261-10	1099.9
	Ma 242	521.0		W261-11	1183.5
	Ma 244	271.6		W261-12	1048.4
Ma 245	270.1				
谷 子	Mi 223	765.4	水 稻	R 38-4	101.0
	Mi 224	488.8		R 256-A	15.47
	Mi 225	694.7		R 256-B	51.8
	Mi 226	585.3			
	Mi 227	675.4			
	Mi 229	611.1			

(二) 标准分子量蛋白质(表 2)

表 2 标准分子量蛋白质

标准蛋白质	分子量
Bovine serum albumin (BSA)	66200
Hen egg white ovalbumin	42699
Bovine carbonic anhydrase	31000

(三) 四种作物根系的固氮螺菌周质蛋白图谱

从四种作物根系分离到的菌株,其周质蛋白的 SDS-PAGE 代表性扫描图谱见图 1。从图中可以看出,所有供试菌株都有两个分子量大小在 35000—46000 左右的周质蛋白亚基高峰。但不同作物上的菌株,它们的周质蛋白的亚基组成又有各自的特点:小麦和谷子上的菌均没有高分子量的蛋白亚基高峰,但小麦上的菌有较多分子量小于 35000 的小亚基峰;水稻和玉米上的菌,虽都有高分子量的周质蛋白亚基高峰,但水稻上的菌有分子量略低于 66000 的

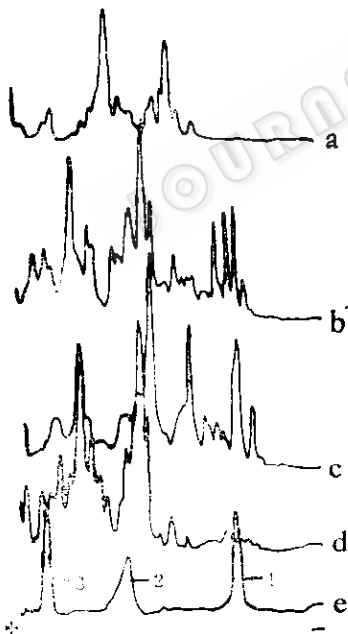


图 1 四种作物根系的固氮螺菌的周质蛋白凝胶电泳扫描代表性图谱

- a. 谷子 b. 水稻 c. 玉米 d. 小麦
e. 标准分子量蛋白质:
1. 牛清蛋白(66200) 2. 卵清蛋白(42699)
3. 碳酸酐酶(牛)(31000)

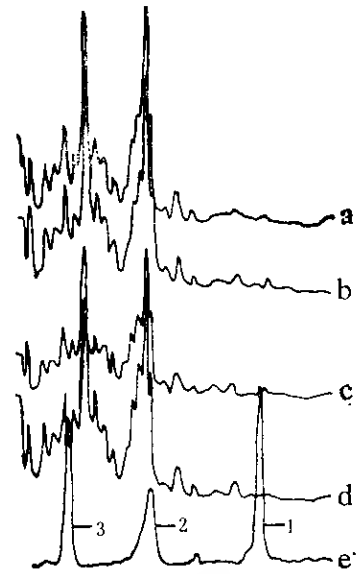


图 2 小麦根系固氮螺菌的周质蛋白凝胶电泳扫描图

- a. W261-5 b. W259-4 c. W261-12
d. W261-11 e. 标准分子量蛋白质:
1. 牛清蛋白(66200) 2. 卵清蛋白(42699)
3. 碳酸酐酶(牛)(31000)

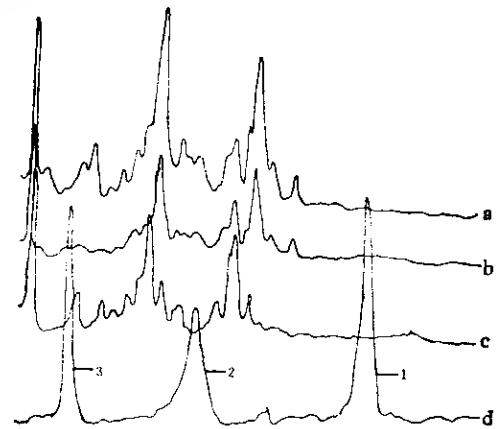


图 3 谷子根系固氮螺菌的周质蛋白凝胶电泳扫描图

- a. Mi226 b. Mi224 c. Mi223 d. 标准
分子量蛋白质: 1. 牛清蛋白(66200) 2. 卵
清蛋白(42699) 3. 碳酸酐酶(牛)(31000)

高峰,而玉米上的菌却没有明显高峰。

(四) 同一种作物根系的固氮螺菌周质蛋白图谱

来自同一种作物根系的螺菌,尽管其固氮

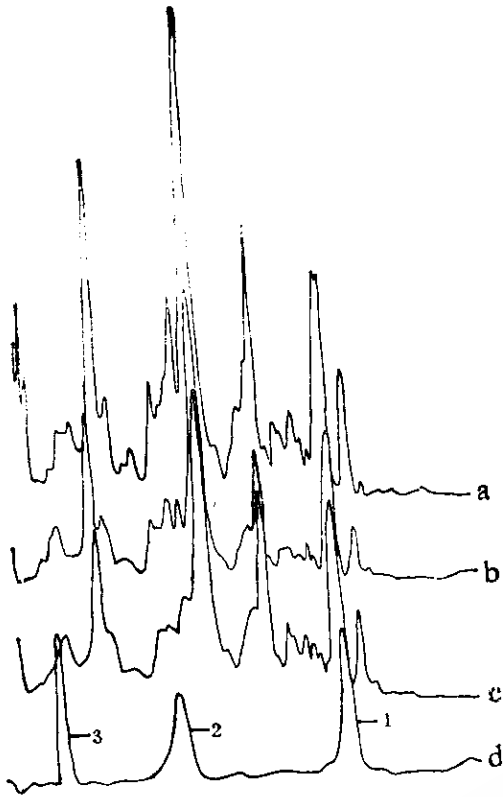


图4 玉米根系固氮螺菌周质蛋白电泳扫描图
a. Ma242 b. Ma244 c. Ma231 d. 标准分子
量蛋白质: 1.牛清蛋白(66200) 2.卵清
蛋白(42699) 3.碳酸酐酶(牛)(31000)

活性有差异(见表1),但它们的周质蛋白的SDS-pAGE扫描图谱却差异不大,甚至有的图谱完全相同(见图2,3,4,5)。

讨 论

在联合固氮的研究中,曾发现 *Azospirillum* sp. 在几种作物根系上的存活依赖土壤的pH,但更有赖于植物的选择性^[8],从小麦上分离的巴西螺菌不能在玉米根系上定居,通过测定一定土壤区域的固氮活性,证实一定的固氮细菌与某一特定的植物间的联合,能产生较高的固氮活性^[9]等。但是尚缺乏较为直观的指标说明 *Azospirillum* 属的菌与宿主植物之间具有明显的专一性。

植物与固氮菌的界面是根际,联合固氮的双方生长需要氮源,又因呼吸作用耗氧,造成

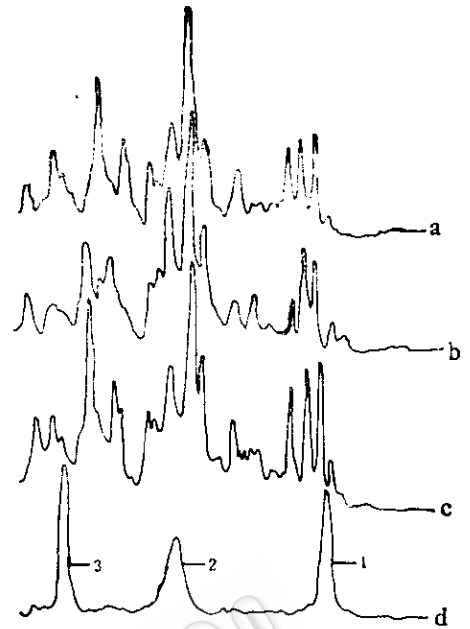


图5 水稻根系固氮螺菌周质蛋白凝胶电泳扫描图
a. R38-4 b. 256-B c. 256-A d. 标准分子
量蛋白质: 1.牛清蛋白(66200) 2.卵清
蛋白(42699) 3.碳酸酐酶(牛)(31000)

一个 PO_2 很低、氮源又缺乏的特殊生态环境,在根际联合固氮菌从植物根系分泌物获得营养和能源,在代谢过程中固氮酶固定分子态氮,解决自身氮源又为植物提供铵态氮源,促进植物生长。宿主植物与固氮螺菌间相互交换碳氮代谢产物,而形成联合固氮体系。Hamidi^[10]应用¹⁵N证实生脂螺菌在自生情况下不能固氮,但在联合共生下固氮活性较高。因此有研究者认为,联合固氮微生物是一种直接受植物影响的固氮细菌^[9]。宿主植物与其营联合共生固氮螺菌之间的相互关系应具有一定的生物化学基础。

我们采用这一微量方法,分析了四种作物根系分离到的30株巴西固氮螺菌的周质蛋白组成,发现同一作物根系的菌株,其周质蛋白凝胶电泳扫描图很相似,甚至完全相同;而来自不同宿主根系的菌株,它们的周质蛋白凝胶电泳扫描图却有明显差异。这可以解释为在长期的联合共生过程中,植物与细菌双方相互适应、相互影响,导致螺菌的周质蛋白因宿主的不同,呈现出特征性的组成。这一结果提示,巴西固氮

螺菌的胍甾蛋白组成与宿主植物间存在着相关性。

参 考 文 献

- [1] 王子芳: 微生物学通报, **9**(4): 176—181, 1982。
- [2] 王子芳等: 微生物学通报, **14**(4): 171—174, 1987。
- [3] 罗孝杨等: 微生物学报, **23**(1): 68—72, 1983。
- [4] Podroba F. O. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **119**: 547—551, 1980。
- [5] Sedmak, J. J. and S. E. Grossberg,: *Anal. Biochem.* **79**: 544—552, 1977。
- [6] Laemmli, U. K. and M. Favre,: *J. Mol. Biol.* **80**: 575—599, 1973。
- [7] Spector, T.: *Anal. Biochem.*, **88**: 142—146, 1978。
- [8] Okon, Y., A. Brecht, S. L., and Burris, R. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 85—88, 1977a。
- [9] Klucas, R. V., W. Pederesen, R. C. Shearman, and L. V. Wood.: In “Associative N₂-Fixation” ed. Peter B. Vose Alaides P. Rusche† CRC Press 119—129, 1981。
- [10] Hamidi, Y. A.: *FAO Soil Bull.* **49**: 90, 1982。