

金合欢根瘤菌的几种酶活特性

靖元孝 莫照穆 程双奇

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 金合欢根瘤菌 *Rhizobium* sp. (*Acacia farnesiana*) 的氧化酶、过氧化氢酶、脲酶、青霉素酶和 β -半乳糖苷酶均呈阳性。经过酶活性定量测定表明金合欢根瘤菌有葡萄糖酸-6-磷酸脱氢酶(6PGD)和 β -半乳糖苷酶的酶活性, 而慢生型大豆根瘤菌未测到上述两种酶活性。根据聚丙烯酰胺凝胶电泳酯酶图谱, 6株金合欢根瘤菌可分成两群: 菌株 AF1、AF2 和 AF3 的酯酶图谱中有 A 带, AF4、AF5 和 AF6 的酯酶图谱中没有 A 带。

关键词 金合欢根瘤菌; 6PGD; β -半乳糖苷酶; 酯酶图谱

国外曾对金合欢根瘤菌 *Rhizobium* sp. (*A. farnesiana*) 的共生特性、培养特性、碳源利用及石蕊牛奶反应等方面作了初步的研究^[1]。但对金合欢根瘤菌的葡萄糖酸-6-磷酸脱氢酶(6PGD)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)和 β -半乳糖苷酶的定量测定及酯酶分析等方面研究尚未见报道。我们在对本地区分离的几株金合欢根瘤菌自生和共生的某些特性研究基础上, 又对金合欢根瘤菌及大豆快、慢生型根瘤菌的几种酶的酶学特性进行了研究。并比较了金合欢根瘤菌各菌株间及与大豆快、慢生型根瘤菌之间在酶学方面的异同, 从而探求不同根瘤菌在生长速度、营养物质利用等生理生化特性方面存在差异的原因。

材料和方法

(一) 实验菌株

1. 快生型根瘤菌: 6株金合欢根瘤菌 *Rhizobium* sp. (*A. farnesiana*): AF1、AF2、

AF3、AF4、AF5、AF6 和一株大豆根瘤菌 (*Rhizobium fredii*) USDA191, 均由本实验室提供。

2. 慢生型根瘤菌: 大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) PRC113-2 由中国科学院油料研究所赠送。

(二) 培养基

1. PA 培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.492g, 胰蛋白胨 4.0g, 水 1000ml, pH6.8。

2. TY 培养基: 酵母粉 2g, 胰蛋白胨 3g, 水 1000ml, 琼脂 18g, pH 6.8。

(三) 五种酶的酶活性定性测定

脲酶、氧化酶和过氧化氢酶的定性测定参见《一般细菌常用鉴定方法》^[2]。 β -半乳糖苷酶定性测定参见周德庆的方法^[3], 青霉素酶定性测定参见 Foley^[4]的方法。

(四) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、葡萄糖酸-6-磷酸脱氢酶(6PGD)和 β -半乳糖苷酶活性定量测定

1. G6PD、6PGD 的酶活性测定: 参考 Sadowsky^[5] 的方法进行。

酶粗提液制备: 接种根瘤菌到酵母膏-葡萄糖培养基中, 27℃ 摇床振荡培养 72 小时, 4℃, 6000g 离心 10 分钟收集菌体, 0.05mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 冲洗菌体两次, 并制成一定浓度的菌悬液。超声波处理 10 分钟破碎细胞, 4℃, 14000g 离心 30 分钟得酶粗提液, 于 -20℃ 保存备用。

反应液总体积为 3ml。包括: pH8.5 0.2mol/L Tris 缓冲液 0.5ml, 0.1mol/L 氯化镁溶液 0.3ml, 辅酶 II 溶液(每毫升溶液含辅酶 II 4.0 mg) 0.3ml, 重蒸水 1.7ml, 0.1mol/L 葡萄糖酸钠-6-磷酸 (或葡萄糖-6-磷酸) 0.1ml, 酶溶液 0.1ml。另设三种对照处理:

① 以重蒸水代替上述底物葡萄糖酸钠-6-磷酸(或葡萄糖-6-磷酸) 作为空白对照; ②同时加快、慢生型根瘤菌酶溶液到上述反应体系中; ③上述反应液中加入还原型辅酶 II, 并去掉底物葡萄糖酸钠-6-磷酸 (或葡萄糖-6-磷酸)。蛋白质含量测定用 Lowry^[6] 的方法进行。

2. β-半乳糖苷酶活性测定: 酶液基本按上法获得, 只改用含 0.5%(W/V) 乳糖的 TY 液体培养基。

反应液总体积为 4.8ml。包括: ① 2.7ml 酶反应缓冲液, 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0), 10⁻³mol/L MgSO₄·7H₂O, 2 × 10⁻⁴mol/L MnSO₄·H₂O。② 1.8ml 底物溶液, 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0), 1.3 × 10⁻²mol/L 邻-硝基

苯酚-β-D-半乳糖苷。③ 0.3ml 酶粗提液。以不加底物为对照, 用 721 分光光度计测定邻-硝基酚的出现 (420nm)。

(五) 酯酶同工酶垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳

酯酶溶液的制备见 6PGD 酶活性测定部分。凝胶按胡能书等^[7]的方法制备, 然后用微量进样器吸取 50μl 样品小心加到点样槽内, 上、下槽分别加足电泳缓冲液, 上槽加 1 滴 0.01% 溴酚蓝作前沿指示剂。连接电源, 开始电压为 200V, 10 分钟后调至 280V, 待溴酚蓝液移至离板下端约 1cm 处停止电泳, 剥下凝胶染色观察。

结 果

(一) 五种酶的酶学特性

金合欢根瘤菌的五种酶的酶学特性测定(表 1), 表 1 结果表明金合欢根瘤菌的过氧化氢酶、氧化酶、脲酶和青霉素酶均表现为阳性, 与 Sadowsky^[5] 测得的快生型大豆根瘤菌结果相同。此外金合欢根瘤菌 β-半乳糖苷酶呈阳性, 而慢生型大豆根瘤菌 PRC113-2 表现为阴性。

(二) 6PGD、G6PD 和 β-半乳糖苷酶的酶活性

表 2 结果表明, G6PD 为快、慢生型根瘤菌共有, 但其活性在慢生型中很低。而 6PGD 和 β-半乳糖苷酶均为快生型根瘤菌特有, 这与 Martinez-de Drets^[8]、Sadowsky^[5] 和 Yelton^[9] 所测根瘤菌结果一致。为了进一步证实慢生型

表 1 金合欢根瘤菌五种酶的酶学特性

根瘤菌 \ 酶	AF1 - AF6						USDA 191	PRC 113-2
	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6		
β-半乳糖苷酶	+	+	+	+	+	+	+	-
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+
脲酶	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+
青霉素酶	+	+	+	+	+	+	+	+

“+” 阳性 “-” 阴性

表2 6PGD、G6PD 和 β -半乳糖苷酶的酶活性

菌株	酶	G6PD (nmol NADPH/ min·mg 蛋白)	6PGD (nmol NADPH/ min·mg 蛋白)	β -半乳糖苷酶 (μ mol 邻-硝基酚/ min·mg 蛋白)
AF1		270	79	356
AF2		255	85	378
AF3		267	68	381
AF4		258	93	253
AF5		195	72	212
AF6		304	75	179
USDA 191		315	80	175
PRC 113-2		26	0	0

根瘤菌不含有 6PGD 的抑制剂,将慢生型根瘤菌 PRC113-2 酶液分别与其它各快生型菌株酶液混合,结果各菌株的 6PGD 酶活性不变。另外在加有还原型辅酶 II 而去掉底物葡萄糖酸钠-6-磷酸(或葡萄糖-6-磷酸)的反应系统中未发现 NADPH 被酶液氧化。

(三) 酯酶图谱

根瘤菌酯酶同工酶分析结果(图1)表明,6株金合欢根瘤菌可分成两群:AF1、AF2和AF3类群,AF4、AF5和AF6类群。其中AF1、AF2和AF3类群在酯酶图谱上有A带,而AF4、AF5和AF6类群无A带。这种分群结果同我们曾按6株金合欢根瘤菌的菌落形态、碳源利用和石蕊牛奶反应等生理生化特性所进行的分群结果完全一致^[10]。此外,菌株PRC113-2在酯酶图谱上也出现两条酶带。

讨 论

Vincent^[11]曾根据根瘤菌在YEM培养基上的生长速度和酸碱反应,将根瘤菌分成快生型和慢生型两大类群。快生型在YEM培养基上的代时为2—4小时,产酸;慢生型的代时在6小时以上,产碱。快生型对碳源的利用范围比慢生型广,而且能利用蔗糖、麦芽糖和乳糖等双糖,是区别于慢生型的一个特征。

Martinez-de Drets^[8]、Sadowsky^[5]、Yelton^[9]和本工作都发现6PGD为快生型根瘤菌所特有。我们知道6PGD是己糖磷酸途径中的关键酶,葡萄糖代谢有3种不同途径:糖酵解

(EMP)途径。己糖磷酸(HMP)途径和恩特纳-道德洛夫(ED)途径。HMP途径能产生合成嘌呤、嘧啶所必需的前体物质——核糖-5-

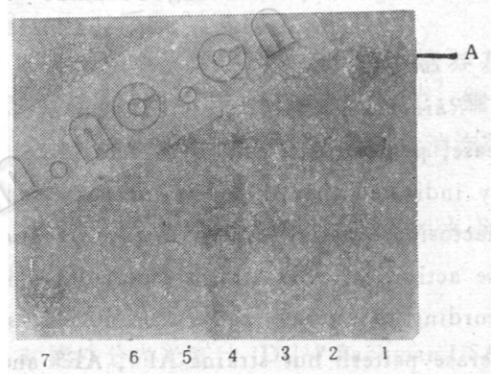


图1 根瘤菌酯酶图谱

“1、2、3、4、5、6、7”示菌株 AF1、AF2、AF3、AF4、AF5、AF6、PRC113-2
“A”示 AF1、AF2、AF3 上的 A 带

磷酸和赤藓糖-4-磷酸。快生型与慢生型根瘤菌都有 EMP 和 ED 途径,而 HMP 途径为快生型特有,这可能是导致快、慢生型根瘤菌在碳源利用和生长速度存在明显差异的一个原因。

本实验还表明 β -半乳糖苷酶为快生型根瘤菌所特有。 β -半乳糖苷酶定性测定方法简单,通过观察颜色的迅速变化就能判断有无此酶,整个过程只需1小时,因此可用此法来初步区别快、慢生型根瘤菌。这种方法同测定代时、酸碱反应及 6PGD 酶活性相比,有操作简单、见效快的特点。

参 考 文 献

1. Trinick M J: *J. Appl. Bacteriol.*, 49:39—53, 1980.
2. 中国科学院微生物研究所细菌分类组编: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978.
2. 周德庆主编: 微生物实验手册, 上海科学技术出版社, 1986.
4. Foley J M: *Nature*, 195:287—288, 1962.
5. Sadowsky M J et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33 (4): 716—722, 1983.
6. Lowry O H et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
7. 胡能书等编: 同功酶技术及其应用, 湖南科学技术出版社, 1985.
8. Martinez-de Drets, et al.: *J. Bacteriol.*, 109:467—470, 1972.
9. Yelton M M et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129:1537—1547, 1983.
10. 靖元孝等: 华南师范大学学报(自然科学版), 1: 82—88, 1991.
11. Vincent J M *Treatise on Dinitrogen Fixation*, John Wiley, New York. p277—366, 1977.

SEVERAL KINDS OF ENZYMATIC ACTIVITY CHARACTERISTICS OF *RHIZOBIUM* ISOLATED FROM *ACACIA FARNESIANA*

Jing Yuanxiao Mo Ximu Cheng Shuangqi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Rhizobium strains isolated from *Acacia farnesiana* were positive for oxidase, catalase, urease, penicillinase and β -galactosidase. The quantitative determination of enzymatic activity indicated that these strains possessed 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and β -galactosidase activities but *Bradyrhizobium japonicum* didn't possess 6PGD and β -galactosidase activities. Six strains isolated from *A. farnesiana* may be divided into two groups according to esterase pattern on PAGE: strains AF 1, AF2 and AF3 possessed A band on esterase pattern but strains AF4, AF5 and AF6 didn't.

Key words *Rhizobium* isolated from *Acacia farnesiana*; 6PGD; β -galactosidase; Esterase pattern