

赤霉酸对枯草杆菌 α -淀粉酶形成的作用

汤玉玮 黄懿德 黎锡扬 华雪增 金慧君

(上海植物生理研究所)

摘 要

在枯草杆菌细胞的培养基中加入赤霉酸,可以显著地促进 α -淀粉酶的形成. 环式磷酸腺苷¹⁾和三磷酸腺苷能够模拟赤霉酸促进 α -淀粉酶合成的作用. 我们还观察了葡萄糖对 α -淀粉酶产生的影响. 当细菌在含有谷氨酸的培养基中生长时,加入葡萄糖能使 α -淀粉酶的合成受到抑制. 葡萄糖对 α -淀粉酶形成的抑制作用可以被赤霉酸所消除. 此外,在有赤霉酸存在时,枯草杆菌 α -淀粉酶的合成受到放线菌素 D 的抑制. 赤霉酸对 α -淀粉酶合成的作用可能是在转录水平上受到环式磷酸腺苷的调节.

谷类种子在萌发和幼苗发育过程中,糊粉层细胞在胚的因子影响下合成和分泌几种水解酶,如 α -淀粉酶、蛋白质水解酶等. 这些酶水解胚乳的贮藏物质. 然后水解产物运输到生长区域为胚的发育所利用. 早在十九世纪, Haberlandt^[1] 和 Brown 等人^[2]曾报道胚和胚乳协同使胚乳中碳水化合物和蛋白质水解. 这个现象为后来的实验所证实. Yomo^[3] 发现与胚分离的大麦胚乳的 α -淀粉酶活力不活跃. 但是当它与离体的胚一起保温时,它们可以产生 α -淀粉酶活力. Yomo^[4] 也宣称纯化了的胚抽提物,可能含有赤霉素,能够使离体的大麦胚乳产生 α -淀粉酶活性. Yomo^[5] 和 Paleg^[6] 分别发现赤霉素产生同样的效应. 后来 Jones 等人^[7]在未成熟的大麦穗中鉴定出赤霉素,但只测出赤霉酸,因此确立了胚和胚乳之间激素的关系.

那么,这个激素的作用原理是什么? 赤霉酸究竟是控制细胞核中转录作用,还是控制细胞质中蛋白质合成的翻译作用呢? Galsky 等^[8]证明环式磷酸腺苷促进大麦糊粉层中 α -淀粉酶的合成. Duffus 等人^[9]报道环式磷酸腺苷刺激为赤霉酸所控制的大麦胚乳切片中的 α -淀粉酶的释放,并且认为环式磷酸腺苷是赤霉酸的刺激作用和 α -淀粉酶释放之间可能的中间调节物. 然而 Kessler 等人^[10]则认为环式磷酸腺苷诱导脱氧核糖核酸合成,从而导致赤霉酸的合成,然后刺激 α -淀粉酶的产生.

为了研究赤霉酸——诱导 α -淀粉酶合成的作用原理,我们用枯草杆菌为实验材料,进行了初步研究.

一、材料与方 法

细菌 从上海市郊土壤中分离出的枯草杆菌作为实验材料. 原菌在琼脂斜面生长培

本文 1973 年 7 月 16 日收到.

1) 本文中环式磷酸腺苷为环式 3', 5'-磷酸腺苷的缩写.

养,培养基含有下列成分:马铃薯 20%,葡萄糖 2%, CaCO_3 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%,琼脂 2% pH 7.

细菌培养 合成培养基含下列成分:每升水中 2 克 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 克 KH_2PO_4 , 3.5 克 K_2HPO_4 , 0.2 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 作为种子菌液培养,在 500 毫升三角瓶内盛有 30 毫升合成培养基,1 毫升的 20% 葡萄糖和 1 毫升的 5% 蛋白胨,细菌在 37℃ 下生长 15 小时. 然后,将 3 毫升种子菌液移入盛有 30 毫升合成培养基和 1 毫升 10% 的谷氨酸的 500 毫升三角瓶内,在 37℃ 下培养 5 小时. 为得到均一的实验材料,将上述几瓶培养物合并,然后再分成几瓶,进行不同的处理.

酶形成的刺激作用 刺激 α -淀粉酶的合成的实验,是在零时加有不同浓度的赤霉酸或其他化学作用物,在 37℃ 下进行的. 实验进行期间,对照和处理的细菌生长没有差异. 在一定时间间隔取样,吸取 4 毫升培养液离心,上清液用作酶活力测定.

酶活力的测定 利用糖的还原基产生颜色反应,用比色法来测定 α -淀粉酶对淀粉的水解作用. 下面所描述的方法,是经过修改的二硝基水杨酸法^[11]. 反应系统含有 1 毫升酶液,1 毫升 0.5% 可溶性淀粉溶液,0.2 毫升的 10 微克分子 $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 1.5 毫升的 0.05 克分子磷酸缓冲液(pH 7.0). 在 37℃ 保温 30 分钟,加入 0.3 毫升的 10% 三氯醋酸溶液停止酶促反应. 吸取 1 毫升反应混合液到试管中,该管内含 2 毫升二硝基水杨酸的碱性溶液和 1 毫升水. 将试管放入沸水中 5 分钟,然后在自来水中冷却,在 520 毫微米下测定吸收数值. 用葡萄糖作标准曲线,将吸收读数换算成葡萄糖的微克数. 酶活力单位定为在上述条件下产生 10 微克葡萄糖的酶量.

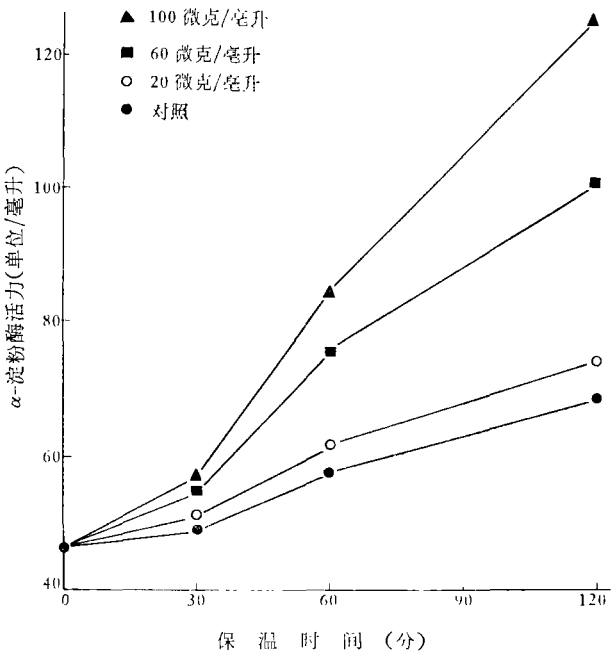


图 1 赤霉酸对枯草杆菌中 α -淀粉酶合成的作用
(细菌在合成培养基和谷氨酸中培养 5 小时,然后在零时与不同浓度的赤霉酸保温,在处理开始后 30, 60 和 120 分钟测定 α -淀粉酶活力)

二、结果和讨论

1. 赤霉酸对 α -淀粉酶合成的刺激作用

图 1 表明 α -淀粉酶的产生随着赤霉酸浓度的增加而提高. 加入赤霉酸后,经过 30 分钟的延滞期,酶的合成从 30 到 120 分钟直线上升. 在本实验中发现,刺激枯草杆菌 α -淀粉酶所需赤霉酸的有效浓度,较高于文献 [12] 所报道的大麦糊粉层细胞中诱导 α -淀粉酶所需的赤霉酸浓度. 并发现促进细菌生长所用的激素浓度可以抑制高等植物的生长^[13]. 为刺激细菌生长和酶合成所需生长调节物的相对高的浓度,可能与它的透性有关.

2. 环式磷酸腺苷对枯草杆菌 α -淀粉酶合成的调节作用

Perlman 和 Pastan^[14] 曾经报道环式磷酸腺苷刺激 β -半乳糖苷酶合成的作用. 最近证明

这个核苷酸能够模拟赤霉酸所起的诱导大麦胚乳淀粉酶、蛋白质水解酶、酸性磷酸酯酶及三磷酸腺苷水解酶的作用^[8,15-17]。此外, Poillard^[18] 证明在大麦糊粉层组织中, 赤霉酸刺激 C¹⁴-腺嘌呤掺入到环式磷酸腺苷。为确定环式磷酸腺苷是否刺激 α -淀粉酶形成, 当细菌在合成培养基和谷氨酸中培养 5 个小时后, 在培养基中加入环式磷酸腺苷, 结果 (见表 1) 表明环式磷酸腺苷能提高枯草杆菌 α -淀粉酶合成的速率。

表 1 环式磷酸腺苷对枯草杆菌 α -淀粉酶合成的作用*

保 温 时 间 (分)	对 照 (单位/毫升)	环 式 磷 酸 腺 苷	
		2.64 $\times 10^{-3}$ 克分子 (单位/毫升)	5.28 $\times 10^{-3}$ 克分子 (单位/毫升)
120	59.0	60.6	63.6
180	66.6	72.8	75.6

* 细菌在合成培养基和谷氨酸中生长 5 小时, 然后与两种浓度的环式磷酸腺苷保温。在处理开始后 120 和 180 分钟测定 α -淀粉酶活力(单位/毫升)。

3. 三磷酸腺苷对 α -淀粉酶形成的作用

Varner^[19] 和 Kessler 等人^[10] 证明, 10^{-3} 克分子二硝基苯酚完全抑制糊粉层细胞里由赤霉酸和环式磷酸腺苷所刺激形成的淀粉酶, 并推断糊粉层组织中 α -淀粉酶合成需要氧化磷酸化过程所产生的能量。因此想测定三磷酸腺苷对枯草杆菌 α -淀粉酶形成是否有刺激作用。

表 2 表明浓度为 10^{-3} 克分子的三磷酸腺苷能促进 α -淀粉酶形成。在 90—120 分钟保温期间, 刺激 α -淀粉酶形成比对照增加 27—25%。在低浓度 (10^{-5} 克分子) 条件下, α -淀粉酶合成比对照没有显著的增加。这说明在合成 α -淀粉酶时可能需要有充足的能量供应。Pastan 和 Perlman^[20] 曾报道, 大肠杆菌含有腺苷环化酶, 它转化三磷酸腺苷成环式磷酸腺苷。此外, Wood 等人^[21] 发现, 在腺苷环化酶作用下, 外源三磷酸腺苷被转化成环式磷酸腺苷。因此可以推测, 在枯草杆菌细胞内腺苷环化酶作用下, 三磷酸腺苷转化成环式磷酸腺苷, 然后由环式磷酸腺苷促进 α -淀粉酶的合成。

表 2 三磷酸腺苷对枯草杆菌 α -淀粉酶合成的作用*

处	理	保 温 时 间 (分)	
		90	120
		单位/毫升	单位/毫升
对	照	65.6	70.8
三 磷 酸 腺 苷	10^{-5} 克分子	68.0	70.6
	10^{-4} 克分子	68.0	73.6
	10^{-3} 克分子	83.4	89.2

* 细菌在合成培养基和谷氨酸生长 5 小时, 然后在零时与各种浓度的三磷酸腺苷保温。在处理开始后 90 和 120 分钟测定 α -淀粉酶活力(单位/毫升)。

4. 赤霉酸对枯草杆菌 α -淀粉酶合成的葡萄糖效应的影响

当葡萄糖加入培养基中, 细胞中 β -半乳糖苷酶及其他各种分解代谢酶类的合成就受到阻抑^[22], 这个现象称为葡萄糖效应^[23]或代谢的阻抑作用^[24]。用枯草杆菌试验也观察到葡萄糖对 α -淀粉酶形成的抑制。表 3 说明, 当细菌生长在含有谷氨酸的培养基中加入葡萄糖, 导致 α -淀

表3 葡萄糖对枯草杆菌 α -淀粉酶合成的作用*

葡萄糖浓度 (微克/毫升)	保温时间 (分)		
	60	90	120
	抑制%	抑制%	抑制%
6	15	0	0
20	31	21	12
40	36	39	27

* 细菌在合成培养基和谷氨酸中生长5小时,然后保温,不加入葡萄糖的作对照。 α -淀粉酶合成的抑制作用百分数根据处理开始后60、90和120分钟的测定计算。

粉酶合成的阻抑。 α -淀粉酶形成的抑制作用,随着葡萄糖浓度增加而加强,并随着保温时间的增长而减弱。有趣的是,葡萄糖的抑制效应能够被赤霉素有效地消除。图2表示用枯草杆菌

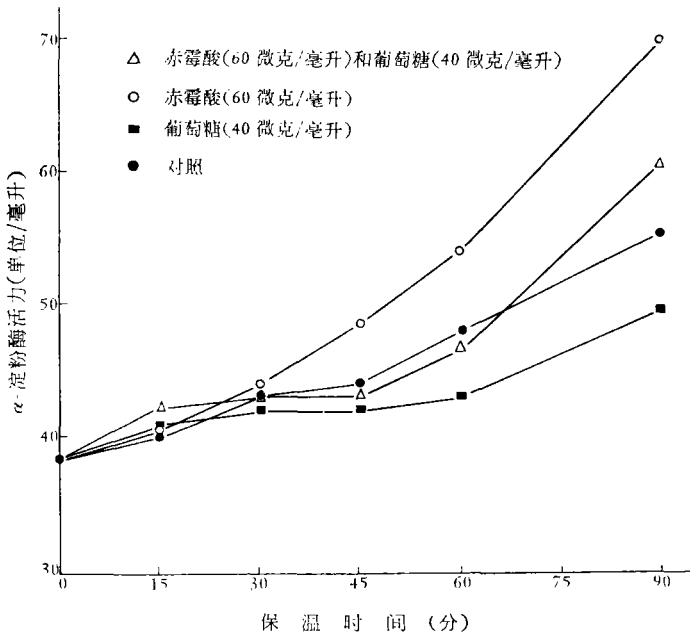


图2 赤霉素对枯草杆菌中 α -淀粉酶合成的葡萄糖抑制作用的影响
(细菌在合成培养基和谷氨酸中生长5小时,然后在零时与图中所列物质保温,在处理开始后15、30、45、60和90分钟测定 α -淀粉酶活力)

这个问题将是有意义的。在这方面研究方便的条件是有一些化合物可利用,最常用的化合物之一是放线菌素D,它以和脱氧核糖核酸相结合的方式,抑制依赖脱氧核糖核酸的核糖核酸的聚合作用。试验结果在表4中表明,在保温60和90分钟后,放线菌素D(0.1微克/毫升)能够抑制赤霉素对 α -淀粉酶合成促进作用的21—28%。增加放线菌素D的浓度, α -淀粉酶形成的抑制作用增强,但是也阻碍枯草杆菌的生长。Chrispeels和Varner^[12]曾报道,当这个抗菌素与赤霉素同时加入,需要高浓度的放线菌素D阻止大麦糊粉层 α -淀粉酶的形成。甚至每毫升100微克的放线菌素D仅抑制 α -淀粉酶合成的60%。Kessler和Kaplan^[10]得到类似的结果。相比之下,很明显,用来抑制大麦糊粉层 α -淀粉酶合成的放线菌素D的浓度,比用来抑制枯草杆菌中由赤霉素所刺激形成的 α -淀粉酶的浓度高500—1000倍。显然,放线菌素D抑制

试验的结果。在这个试验中,培养基零时分别加入葡萄糖、赤霉素、葡萄糖和赤霉素以及不加入任何物质作对照保温。发现在有赤霉素条件下枯草杆菌 α -淀粉酶形成比对照高。另一方面葡萄糖抑制酶的合成。赤霉素能完全地克服葡萄糖抑制作用。图2中表明保温90分钟后 α -淀粉酶合成仍受到葡萄糖的抑制。但是赤霉素不仅克服葡萄糖抑制作用,而且对 α -淀粉酶合成的速率产生12%的刺激作用。

5. 放线菌素D对由赤霉素所促进的 α -淀粉酶合成的作用

枯草杆菌 α -淀粉酶形成过程中,赤霉素是否在核酸和蛋白质合成的一定阶段中起作用,探

核糖核酸的合成,然后抑制枯草杆菌中 α -淀粉酶的合成.

表 4 放线菌素 D 对枯草杆菌中赤霉酸刺激的 α -淀粉酶合成的影响*

保 温 时 间 (分)	赤 霉 酸 (单位/毫升)	赤 霉 酸 + 放 线 菌 素 D (单位/毫升)	抑 制 作 用 (%)
60	60.0	47.4	21.0
90	73.0	52.6	28.0

* 细菌在合成培养基和谷氨酸中生长 5 小时. 然后在零时,在有或没有放线菌素 D (0.1 微克/毫升)下与赤霉酸 (60 微克/毫升)保温. 在处理开始后 60 和 90 分钟测定 α -淀粉酶活力(单位/毫升).

三、结 论

根据本文研究结果,可以认为赤霉酸和环式磷酸腺苷刺激枯草杆菌 α -淀粉酶的合成. 三磷酸腺苷有相类似的作用. 三磷酸腺苷的作用可能是由于赤霉酸增强腺苷环化酶^[25]转化成环式磷酸腺苷的类似物. 此外, Perlman 和 Pastan^[26] 证明环式磷酸腺苷在基因水平上参与 β -半乳糖苷酶的信使核糖核酸合成的调节作用. 因此, 赤霉酸对枯草杆菌 α -淀粉酶的合成的作用受到环式磷酸腺苷的调节. 为了肯定地确立赤霉酸促进枯草杆菌 α -淀粉酶产生的作用方式, 还需要进一步的实验工作.

参 考 文 献

[1] Haberlandt, G., 1890 *Ber. Deut. Botan. Ges.*, **8**, 40—48.
[2] Brown, H. T. & Escombe, F., 1898 *Proc. Roy. Soc. (London)*, **63**, 3—25.
[3] Yomo, J., 1958 *Hakko Kyokaishi*, **16**, 444—448.
[4] Yomo, J., 1960 *Ibid.*, **18**, 494—499.
[5] Yomo, J., 1960 *Ibid.*, **18**, 600—602.
[6] Paleg, L. G., 1960 *Plant Physiol.*, **35**, 902—906.
[7] Jones, D. F. et al., 1963 *Phytochemistry*, **2**, 307—314.
[8] Galsky, A. G. & Lippincott, J. A., 1969 *Plant & Cell Physiol.*, **10**, 607—620.
[9] Duffus, C. M. & Duffus J. H., 1969 *Experientia*, **25**, 581.
[10] Kessler, B. & Kaplan, B., 1972 *Plant Physiol.*, **27**, 424—431.
[11] Bernfeld, P., 1955 *Methods in Enzymology*, (Edited by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O.) pp. 149—158. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
[12] Chrispeels, M. J. & Varner, J. E., 1967 *Plant Physiol.*, **42**, 398—406.
[13] Thimann, K. V., 1937 *Amer. J. Bot.*, **24**, 407—412.
[14] Perlman, R. & Pastan, I., 1968 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 656—664.
[15] Nickells, M. W. et al., 1971 *Plant & Cell Physiol.*, **12**, 717—725.
[16] Earle, K. M. & Galsky, A. G., 1971 *Ibid.*, **12**, 727—732.
[17] Golbert, M. L. & Galsky, A. G., 1972 *Ibid.*, **13**, 867—873.
[18] Pollard, C. J., 1970 *Biochim. Biophys. Acta*, **201**, 511—512.
[19] Varner, J. E., 1964 *Plant Physiol.*, **39**, 413—415.
[20] Pastan, I. & Perlman, R., 1970 *Science*, **169**, 339—344.
[21] Wood, H. N. et al., 1972 *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 403—406.
[22] Monod, J., 1947 *Growth*, **11**, 223—289.
[23] Epps, H. M. R. & Gale, E. F., 1942 *Biochem. J.*, **36**, 619—623.
[24] McFall, E. & Mandelstam, J., 1963 *Biochem. J.*, **89**, 391—398.
[25] Alveraz, R., 1971 *Dist. Abst.*, 770—B.
[26] Perlman, R. L. & Pastan, I., 1968 *J. Biol. Chem.*, **243**, 5420—5427.