

硝态氮对黄瓜子叶谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶活性的影响

王云华, 王志强, 张楚富*, 周忠新, 马敬坤, 欧吉权

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘 要: 在硝态氮存在或缺乏的条件下, 测定了黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 种子萌发和子叶发育过程中子叶可溶性蛋白质含量以及谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸脱氢酶(NAD(H)-GDH)活性的变化。在子叶发育初期, 无论外源氮存在与否, 每对子叶可溶性蛋白质含量和 GS、NADH-GDH、NAD⁺-GDH 活性随发育上升。在外源氮存在下, 第 4 d 后, 可溶性蛋白质含量虽有所下降, 但基本保持恒定; 第 6 d 后, GS 和 NADH-GDH 活性逐渐降低, NAD⁺-GDH 却相反增高。但在无外源氮条件下, 于第 4 d 后, 可溶性蛋白质水平以及 GS、NADH-GDH 和 NAD⁺-GDH 活性都逐渐降低。在子叶发育的整个过程中, 外源氮对 GS 和 NAD⁺-GDH 活性有促进作用, 尤其是在子叶发育的后期对 NAD⁺-GDH 活性的促进更为明显。

关键词: 谷氨酰胺合成酶; 谷氨酸脱氢酶; 硝态氮; 黄瓜子叶; 发育

中图分类号: Q946.5; S642.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0534-05

Effect of Nitrate Nitrogen on Activities of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase during Development of Cucumber Cotyledon

WANG Yun-Hua, WANG Zhi-Qiang, ZHANG Chu-Fu*, ZHOU Zhong-Xin,
MA Jing-Kun, OU Ji-Quan

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The content of the soluble protein and the activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase were determined in the development of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon at the presence or absence of nitrate. In the early days of the development, the level of the protein and the activities of GS, NADH-GDH, and NAD⁺-GDH in each pair of cotyledons increased whether exogenous nitrogen was existent or not. After 4 days, the level of the protein was constant roughly, though it was declined little at the presence of the exogenous nitrogen. The activities of GS and NADH-GDH fell gradually, but NAD⁺-GDH was raised markedly. At the absence of the exogenous nitrogen, the levels of the protein, GS, NADH-GDH, and NAD⁺-GDH decreased gradually at the same stage. In the whole course of the development, the activities of GS and NAD⁺-GDH increased by exogenous nitrogen, and NAD⁺-GDH activity was promoted remarkably in the late stage of the development particularly.

Key words: Glutamine synthetase; Glutamate dehydrogenase; Nitrate; Cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon; Development

谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS, EC 6.3.1.2)是高等植物氮同化的关键酶,在植物氮代谢中起着重要作用^[1]。GS 催化谷氨酸酰胺化生成谷氨酰胺,这一反应需要 ATP 和二价金属离子

收稿日期:2004-02-23,修回日期:2004-05-26。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270130)。

作者简介:王云华(1980—),男,硕士研究生,从事植物生化和分子生物学研究。

* 通讯作者(E-mail: cfzhang@whu.edu.cn)。

参与。该酶与谷氨酸合酶(GOGAT)构成的循环是高等植物氮同化的主要途径^[1]。GS存在多种同工酶,它们分别由不同的核基因编码^[2]。根据GS同工酶在组织和亚细胞中的定位,可分为胞液型GS(GS1)和叶绿体/质体型GS(GS2),它们在植物体内起着非重叠的作用^[3]。GS同工酶在不同发育阶段的时空表达受到许多因素,诸如氮素的类型、光质、碳代谢物以及逆境等的影响^[4,5]。

NAD(H)-谷氨酸脱氢酶[NAD(H)-glutamate dehydrogenase, NAD(H)-GDH, EC 1.4.1.2]催化一对可逆反应: α -酮戊二酸加氨生成谷氨酸和谷氨酸脱氨生成 α -酮戊二酸^[6]。曾有人认为GDH是同化氮的初始酶,但是因为其对氨的高 K_m ,故该酶在氮同化中的作用颇有争议。最近则认为GDH可能只限制在谷氨酸的代谢中起作用^[7]。氨的初始同化发生在GS/GOGAT循环中,它承担着无机氮转化成有机氮的主要作用^[8]。GDH的脱氨反应在于使谷氨酸脱氨产生 α -酮戊二酸,向三羧酸循环提供碳骨架;在高氨、逆境以及碳骨架受限制时,它的脱氨作用保证为三羧酸提供充足的碳骨架^[9,10]。

黄瓜是葫芦科双子叶植物,在种子萌发过程中,种子以及子叶的贮藏蛋白质降解,产生铵离子、氨基酸。铵离子被同化成新的氨基酸,为新生组织的发育提供营养物质。随着子叶的发育和绿化,它从单纯的贮存器官转变成有光合作用能力的器官。碳素和氮素的来源从单纯的依靠贮存的营养物质,转成至少部分依赖于自身的合成和外界的供给。根吸收的外源氮和子叶同化的碳素起着越来越重要的作用。在这个过程中,子叶内与此过程相关的酶必定要有一个大的变化来适应这个过程。笔者旨在研究黄瓜种子萌发和子叶发育过程中GS、NADH-GDH和NAD⁺-GDSH等酶的活性变化、蛋白质水平变化以及这些酶活性变化与外源氮同化的关系。

1 材料和方法

植物材料培养 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)种子唐优一号由种子站购买。种子先用0.1% HgCl₂溶液浸泡消毒10 min,然后用蒸馏水漂洗干净,于30℃浸种24 h后散播在双层滤纸上催芽24 h,注意保持湿润。然后移植到盛有用pH6.5的营养液浸润过的沙子的搪瓷盘中继续培养,搪瓷盘规格为40 cm×30 cm×3 cm。每隔1 d补充适量的营养液,

其间用蒸馏水保持湿润。营养液含有13.33 mmol/L KNO₃(无氮组为13.33 mmol/L KCl),4 mmol/L CaCl₂,2.66 mmol/L NaH₂PO₄,2 mmol/L MgSO₄,0.8 mmol/L H₃BO₃,0.98 mmol/L CaCl₂,0.15 μmol/L ZnSO₄,1.32 μmol/L CuSO₄,35.7 μmol/L FeCl₃,8.9 μmol/L MnCl₂。白炽灯下培养,光照强度为120 μmol·m⁻²·s⁻¹,昼/夜温度为29~32℃/20~23℃。分别于播种后的第1 d(即浸种后第3 d,此时子叶部分出土)、第2 d(此时子叶已完全出土)各取材1次。以后每隔1 d取材1次。总发育天数从开始浸种计算。

酶液的制备 按文献[11]介绍的方法从子叶中提取酶液,每克鲜重材料加入3 mL提取缓冲液。

可溶性蛋白的测定 按Bradford的方法^[12]测定可溶性蛋白质含量。总蛋白量以每对子叶中所含的蛋白的毫克(mg)数计算。

GS活性的测定 按Zhang等的方法进行^[11]。一个GS活性单位定义为每分钟于37℃催化1 μmol的 γ -谷氨酰异羟肟酸(γ -glutamylhydroxamate)的产生所需要的酶量。总GS活性计算以每对子叶每小时催化产生的 γ -谷氨酰异羟肟酸微摩尔(μmol)数表示。

NAD(H)-GDH活性的测定 按照Loulakakis和Roubelakis-Angelakis的方法进行^[13]。以每分钟于30℃氧化或还原1 μmol的辅酶(NADH或NAD⁺)定义为一个酶活性单位。总活性计算以每对子叶每小时氧化或还原辅酶的微摩尔(μmol)数表示。

每个取样时间段选择生长一致的子叶2~4 g,测定每克(g)鲜重材料的各项指标(包括子叶数),然后按每对子叶计算各项指标。所有实验至少重复3次。

2 结果

2.1 子叶发育过程中可溶性蛋白水平的变化

在子叶发育初期,无论在有氮或无氮条件下,每对子叶的可溶性蛋白质含量随发育天数的增加而明显上升,于第4 d达到最高(图1)。自第6 d后,有氮条件下的蛋白质水平虽有降低,但总体保持相对稳定,只是在第14 d后又有所下降;但是无氮条件下的子叶蛋白质含量则随发育进程而逐步下降,至第14 d,只相当于有氮条件下同时间的蛋白质水平的39.3%。

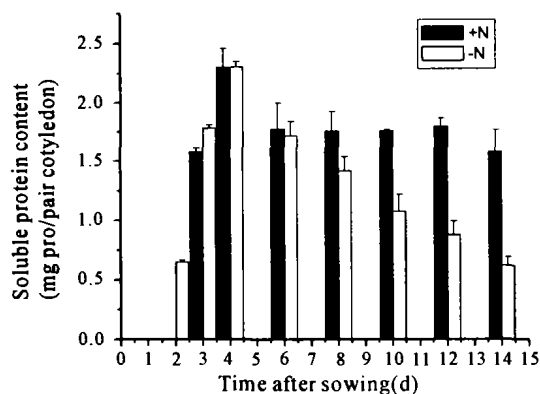


图 1 不同发育阶段每对子叶可溶性蛋白水平的变化
Fig. 1 The change of the soluble protein in each pair of cotyledons at the different development stages

2.2 子叶发育过程中 GS 活性的变化

在子叶部分出土时(即浸种开始后第 3 d),无论培养介质中是否有氮,两者的活性基本相同(图 2)。但随着发育的进程,GS 活性逐步升高,于第 6 d 达到最高,但两者升高的幅度不同,分别相当于第 2 d 的 24.4 倍和 17.7 倍。与可溶性蛋白水平相比,其活性的升高稍显滞后。其后随着发育进程而下降。有氮和无氮条件下的变化趋势相同,但有氮条件下的活性相对较高。当发育至第 14 d 时,两者的 GS 活性分别相当于最高活性的 72.5% 和 57.9%。可见外源氮的存在对 GS 活性的变化有着明显的影响。

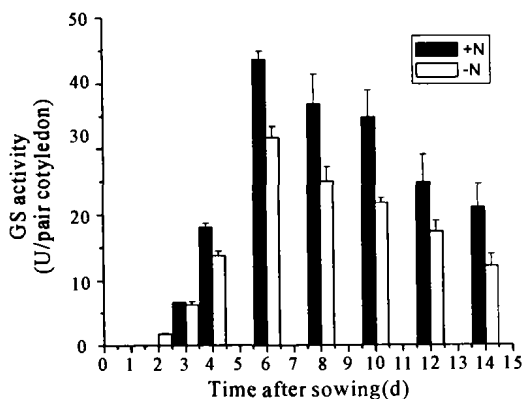


图 2 不同发育阶段每对子叶 GS 活性的变化
Fig. 2 The change of GS activity in each pair of cotyledons at the different development stages

2.3 子叶发育过程中 NADH-GDH 的变化

在子叶发育的前期,无论是在有氮或是在无氮下,随着子叶的发育,NADH-GDH 的活性逐步升高,只是无氮下的活性略高于有氮的活性(图 3)。第 6 d 的活性达到最高。在有氮的条件下,子叶中 NADH-GDH 的活性基本保持不变;但在无氮条件下,其活性则逐步下降。

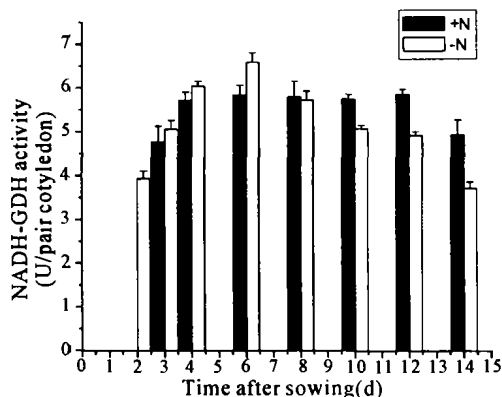


图 3 不同发育阶段每对子叶 NADH-GDH 活性的变化
Fig. 3 The change of NADH-GDH in each pair of cotyledons at the different development stages

2.4 子叶发育过程中 NAD⁺-GDH 的变化

在有氮和无氮条件下,子叶的 NAD⁺-GDH 活性在不同发育阶段的变化趋势明显不同。在有氮条件下,随着子叶生长天数的增高,NAD⁺-GDH 活性逐渐增高,而且从第 8 d 后,其活性增长的幅度明显提高(图 4)。第 14 d 的活性是第 3 d 的 3.3 倍。然而,在无氮条件下,前期 NAD⁺-GDH 活性逐步升高,第 4 d 达到最高;随着发育的进行,其活性降低,于第 14 d,其活性只相当于同期有氮条件下的 27%。表明外源氮的加入对其活性有着很显著的促进作用。

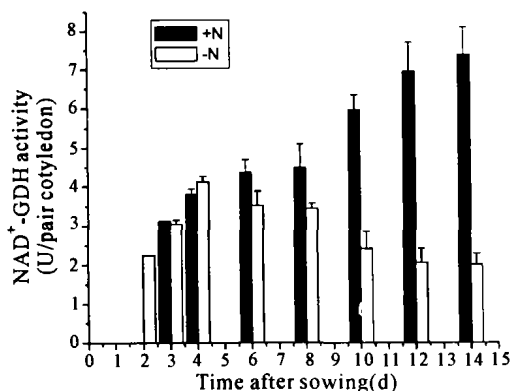


图 4 不同发育阶段每对子叶 NAD⁺-GDH 活性的变化
Fig. 4 The change of NAD⁺-GDH in each pair of cotyledons at the different development stages

3 讨论

在黄瓜种子萌发初期,每对子叶的 GS 活性是比较低的,但随着发育的进行,于第 6 d,即子叶完全伸展时,达到最大值,然后随着发育天数逐渐下降。在向日葵种子萌发和子叶发育初期阶段同样观察到 GS 活性由低到高的变化^[14]。在菜豆中也有类似的变化趋势^[15]。硝酸盐对 GS 活性有一定的促进作用。

这与芥菜子叶发育观察到的硝酸盐促进 GS 活性的现象是一致的^[16]。

与 GS 活性变化趋势不同, NAD(H)-GDH 在黄瓜子叶发育过程中都维持较高的活性,尤其是在有氮条件下和发育的后期, NAD⁺-GDH 活性显著升高。在多种高等植物种子萌发过程中, 都观察到 GDH 的活性升高^[17]。但是, GDH 在氨同化中的作用仍然是有争议的。在玉米中, GDH 缺失突变体的标记和抑制剂研究表明: GDH 不催化其加氮方向的反应^[18]; 也有实验表明 GDH 活性不但受高氮的诱导, 而且 Gulati 和 Robin 发现, 衰老、暗处理、盐胁迫或重金属中毒都会导致 GDH 活性的升高^[9,10]。在这些情况下, GS 的活性都是降低的。因此, 推测 GDH 可能作为 GS 在不利情况下活性降低的一种补偿。在这种情况下, GDH 依赖于 NADH 的还原氨基化反应是对 GS/GOGAT 氨同化途径的补充。我们观察到在外源氮存在下, NADH-GDH 在黄瓜子叶发育的后期仍维持较高的水平也许就属于这样的情况。

尽管 GDH 在氨同化中的作用存在不同的看法, 但是其催化脱氮反应的重要性越来越受到人们的肯定, 认为其主要作用在于催化谷氨酸脱氨产生 2-酮戊二酸, 向三羧酸循环提供碳骨架。GDH 很可能在植物 C/N 比例较低的时候, 催化脱氮方向的反应, 使氨基酸脱氨基, 产生碳骨架。例如在萌发的种子和衰老的叶片中即存在这样的作用^[5]。在我们的实验中, 在无外源氮的条件下, 在发育的前期, 储存糖和储存蛋白降解, 碳素和氮素输出, 为新生蛋白质合成提供碳架和氮源。在这一阶段表现出 GS 活性和可溶性蛋白水平的升高; 当子叶开始光合作用后, 碳素水平升高, 而氮素却处于不足状态, 子叶可溶性蛋白水平下降反映了这种变化。

然而, 在有外源氮存在下, 在子叶发育的后期, GS 活性虽然降低, 但 NADH-GDH 保持较高水平, 这也许是可溶性蛋白水平仍维持较高水平的原因。NAD⁺-GDH 活性在整个发育阶段都在上升, 这既反映了子叶发育初期对碳骨架的需要, 又反映了发育后期随着子叶的衰老, 光合能力下降, 氮素在组织内的积累, C/N 比下降。Aubert 和 Melo-Oliveira 认为 GDH 可能只是当植物碳素受限时才显得特别重要^[19,20], Mifflin 等认为 GDH 催化可逆反应的两个方向不但在细胞和亚细胞间, 而且在时间和空间上是分开的^[5]。GDH 两种不同酶活性的变化也许反映出代谢上的需要。

参考文献:

- [1] Mifflin B J, Lea P J. Ammonia assimilation[A]. In: Mifflin B J ed. The Biochemistry of Plants. Vol. 5. Amino Acids and Their Derivatives[M]. New York: Academic Press, 1980. 169 - 202.
- [2] Tingey S V, Tsai F Y, Edwards J W, Walker E L, Coruzzi G M. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetases are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 9 651 - 9 657.
- [3] Edwards F L, Walker G M, Coruzzi G M. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3 459 - 3 463.
- [4] Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C, Melo-Oliveira R, Coruzzi G M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants[C]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47**: 569 - 593.
- [5] Mifflin B J, Habash D Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops[J]. *J Exp Bot*, 2002, **53**: 979 - 987.
- [6] El-Shora H M, Abo-Kassem E M. Kinetic characterization of glutamate dehydrogenase of marrow cotyledons[J]. *Plant Science*, 2001, **161**: 1 047 - 1 053.
- [7] Robinson S A, Slade A P, Fox G G, Phillips R, Ratcliffe R G, Stewart G R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism [J]. *Plant Physiol*, 1991, **95**: 509 - 516.
- [8] Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation [J]. *J Exp Bot*, 2002, **53**: 905 - 916.
- [9] Gulati A, Jaiwal P K. Effect of NaCl on nitrate reductitase, glutamate dehydrogenase and glutamate in *Vignaradiata* Calli[J]. *Bio Plant*, 1996, **38**: 177 - 183.
- [10] Robin S A, Slade A P, Fore G G, Phillips R, Radcliffe R G, Stewart G R. The role of GDH in plant nitrogen metabolism[J]. *Plant Physiol*, 1991, **95**: 509 - 516.
- [11] Zhang C F, Peng S B, Peng X X, Chave A Q, Bennett J. Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice (*Oryza sativa* L.) root[J]. *Plant Science*, 1997, **125**: 163 - 170.

- [12] Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [13] Loulakis K A, Roubelakis-Angelakis K A. Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. : Purification and characterization of the major leaf isoenzyme [J]. *J Exp Bot*, 1990, **41**: 1 223 – 1 230.
- [14] de la Haba P, Cabello P, Maldonado J M. Glutamine synthetase isoforms appearing in sunflower cotyledons during germination [J]. *Planta*, 1992, **186**: 577 – 581.
- [15] León E, de la Haba P, Maldonado J M. Changes in the levels of enzymes involved in ammonia assimilation during the development of *Phaseolus vulgaris* seedlings[J]. *Physiol Plant*, 1990, **80**:20 – 26.
- [16] Schmidt S, Möhr H. Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium [J]. *Planta*, 1989, **177**: 526 – 534.
- [17] Srivastava H S, Singh R P. Role and regulation of L-Glutamate dehydrogenase activity in higher plants [J]. *Phytochemistry*, 1987, **26**:597 – 610.
- [18] Magalhaes J R, Ju G C, Rich P J, Rhodes D. Kinetics of Nitrogen-15-labeled ammonium ion assimilation in *Zea mays*[J]. *Plant Physiol*, 1990, **94**: 647 – 656.
- [19] Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe R G, Roberts J K M. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by C-13 and P-31 nuclear magnetic resonance [J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**:37 – 45.
- [20] Melo-Oliveira R, Oliveira I C, Coruzzi G M. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, **93**: 4 718 – 4 723.