

荧光定量 PCR 分析土壤杆菌及其 *ntrC* 突变株对氮源的应答反应

路敬, 吴剑荣*, 于丽珺, 詹晓北

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 热凝胶是土壤杆菌在环境氮源限制时产生的水不溶性多糖,其合成与氮源代谢调控相关,但其机理还不清楚。作者使用荧光定量 PCR 的方法比较了土壤杆菌野生菌株和其 *ntrC* 突变株在氮源充足和限制条件下氮源代谢相关基因和碳代谢相关基因的转录水平差异,探索了土壤杆菌对氮源限制环境的应答机制及氮源调控蛋白 NtrC 和热凝胶合成之间的关系。结果表明土壤杆菌在环境氮源限制时,*ntrB*,*glnA*,*glnB*,*nifR* 等 4 种氮代谢相关基因和 *exoC*,*exoN*,*crd*,*cisY*,*ndk*,*glmU* 等 6 种碳代谢基因的相对转录水平都有不同程度的提高,表明当环境氮源缺乏时土壤杆菌调整细胞整体代谢(包括氮源吸收代谢、碳代谢、能量合成等),同时使碳代谢流进入热凝胶合成途径用于能量储存。NtrC 蛋白参与调控热凝胶合成,而且热凝胶合成过程相关酶的调控,除了存在转录水平调控外,还可能还存在翻译水平的调控。*ntrC* 突变株的热凝胶合成能力相对于野生菌显著降低,且热凝胶合成基因 *crd* 在氮源缺乏时的相对转录水平较野生菌株高,推测 NtrC 蛋白并非 *crd* 基因的转录因子。

关键词: *ntrC* 突变株; 荧光定量 PCR; 土壤杆菌; 氮源代谢调节

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)12—1282—07

Application of Real-Time PCR to Study the Responses of *Agrobacterium sp.* and the Mutant *ntrC* to Nitrogen Availability

LU Jing, WU Jian-rong*, YU Li-jun, ZHAN Xiao-bei

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Curdlan is water-insoluble polysaccharides from *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 after cell growth has ceased due to nitrogen exhaustion. The involvement of nitrogen regulatory systems in curdlan production is not surprising, but the mechanism is not known. To explore homeostatic responses to N limitation and the relationships between nitrogen regulation protein NtrC and curdlan synthesis, differences of expression level between *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 and the *ntrC*

收稿日期: 2011-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20806034)。

* 通信作者: 吴剑荣(1976—),男,福建永安人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物代谢工程方面的研究。

E-mail: kinowu76@163.com

mutant under nitrogen sufficient and nitrogen limitation were correlated by real-time PCR. For *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 wild type, four nitrogen metabolism-associated genes (*ntrB*, *glnA*, *glnB*, *nifR*) and six carbon metabolism-associated genes (*exoC*, *exoN*, *crd*, *cisY*, *ndk*, *glmU*) relative expression level were improved differently under nitrogen limitation. The results indicated that *Agrobacterium sp.* regulated the whole cellular metabolism (nitrogen assimilation, carbon metabolism and energy metabolism etc.) and channeled the carbon flux into curdian synthesis for energy storage under adverse condition. NtrC protein was involved in regulating curdian production, and curdian synthesis-associated enzymes were regulated at not only transcriptional level but also translational level. Curdian synthesis capacity of the *ntrC* mutant decreased severely while relative expression level of the *crd* gene increased as compared to the wild type under nitrogen-limited conditions. It is speculated that the NtrC protein may not be transcription factor of the *crd* gene.

Keywords: the *ntrC* mutant, real-time PCR, *Agrobacterium sp.*, nitrogen regulation mechanism

热凝胶又称热凝多糖,是一种新型微生物胞外多糖,主要由土壤杆菌或粪产碱杆菌发酵产生,因其具有凝胶强度高、热成型后不可逆、无色、无味和保水力强等特性,已在食品、化工、烟草、农业、医药等领域都有广泛应用。在土壤杆菌 ATCC 31749 中,热凝胶是在氮源受限、细胞停止生长后才开始合成的,其发酵过程为非偶联型发酵^[1]。这种胞外多糖的合成可能是菌体对氮源缺乏环境所作出的应答,使碳源物质转化为多糖进行能量存储,但是氮源对热凝胶合成的调控机理目前还未研究清楚。

NtrB-NtrC 细菌中典型的双组分信号系统,它对环境中氮源含量变化做出响应,调节细胞生理代谢。当环境氮源限制时,应答调控蛋白 NtrC 被组氨酸激酶 NtrB 磷酸化而处于活化状态,继而激活相关启动子和基因的转录。相关报道表明 *ntrB* 和 *ntrC* 基因可能参与调控热凝胶的合成,因为其编码的 NtrB 和 NtrC 蛋白是细菌中普遍存在的氮源调控系统的重要组成部分^[2]。作者所在实验室已经构建的土壤杆菌 ATCC 31749 的 *ntrB* 和 *ntrC* 缺陷株的热凝胶合成能力大大降低,蛋白质组学分析表明, *ntrC* 突变株相对野生菌株有 43 个菌体蛋白质的表达水平发生显著变化,其中 N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸脱氢酶和核苷二磷酸激酶与氮源代谢和热凝胶合成有关。作者拟进一步通过比较土壤杆菌 ATCC 31749 和其 *ntrC* 突变株在氮源耗尽前后氮调控相关基因和碳代谢相关基因的相对转录水平差异,进一步探索氮源调控蛋白 NtrC 和热凝胶合成之间的关系。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 土壤杆菌 ATCC 31749 及其 *ntrC* 突变株 ($\Delta ntrC$): 作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (组分 g/L) 葡萄糖 40, 酵母粉 5, 琼脂粉 25, CaCO₃ 10; pH 7.0~7.2。

1.2.2 种子培养基 (组分 g/L) 葡萄糖 20, 酵母粉 10, KH₂PO₄ 1.74, MgSO₄ 0.56; pH 7.0~7.2。

1.2.3 摇瓶发酵培养基 (组分 g/L) 葡萄糖 50, 酵母粉 1, KH₂PO₄ 2.7, K₂HPO₄ 1.7, MgSO₄ 0.5, NH₄Cl 1.1, CaCO₃ 5; 无机盐体积分数 1%, pH 7.0~7.2。

1.2.4 无机盐浓缩液 称取 FeCl₃, MnCl₂, NaCl, CaCl₂ 各 1 g, 加入去离子水溶解并定容至 1 L, 放置 4 °C 保藏。

1.3 试剂

Trizol 试剂, 氯仿, DEPC H₂O, 无水乙醇, 异丙醇, AMV First Strand cDNA 合成试剂盒, SybrGreen qPCR Master Mix 染料: 均为分析级。

1.4 培养方法

1.4.1 土壤杆菌 ATCC 31749 种子培养 将一环活化好的斜面种子接入装有种子培养基 100 mL 的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 18 h。

1.4.2 $\Delta ntrC$ 种子培养 将一环活化好的斜面种子接入装有种子培养基 100 mL 的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 20 h。

1.4.3 摇瓶发酵培养 一级种子以 5% 的体积分数接入含 100 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶中, 30

℃, 200 r/min 摇床培养。

1.4.4 取样时间 分别在土壤杆菌 ATCC 31749 和 ΔnrC 发酵液中 NH_4Cl 的质量浓度为 0.6 g/L (氮充足) 和 0 g/L (氮限制) 时取样, 提取 RNA, 荧光定量 PCR。

1.5 发酵液中 NH_4Cl 质量浓度测定

水杨酸钠-次氯酸钠分光光度法^[9]。

1.6 RNA 提取

取 1 mL 菌液, 置 1.5 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 10 s, 弃上清液, 用双蒸水清洗沉淀, 10 000 r/min 离心, 弃上清液, 加入 1 mL Trizol 充分混匀, 室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 静置 3 min。4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 冰上静置 20~30 min。4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加入 1 mL 75%乙醇, 洗涤沉淀。4 ℃、7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。室温放置晾干或超净台中吹干 5 min 左右, 加入适量的 Rnase-free H_2O 溶解。4 个样品提取 RNA 后, 进行电泳检测, 结果见图 1。

1.7 反转录

使用 AMV First Strand cDNA 合成试剂盒对提取的 RNA 进行反转录: 将模板 RNA 与随机引物加入到 RNase-free 管中, 70 ℃温育 5 min, 然后置于冰上骤冷 2 min, 离心数秒将管壁上的液体集于管底, 取上述变性退火后反应液 11 μL , 分别加 4 μL RT Buffer, 2 μL dNTPS (10 mmol/L), 2 μL RT 酶 (10 U/ μL) 和 1 μL RNase Inhibitor (20 U/ μL) 后振荡混匀, 按

30 ℃反应 10 min, 42 ℃反应 60 min, 75 ℃反应 15 min 在 PCR 仪上进行反转录反应。



M: Marker; 1: 野生菌株, 氮充足; 2: *AnnC*, 氮充足; 3: 野生菌株, 氮限制; 4: *AnnC*, 氮限制

图 1 样品的 RNA 电泳结果

Fig1 Electrophoretogram of extracted RNA from the sample

1.8 荧光定量 PCR

样品的待测基因相对转录水平用 SybrGreen-荧光定量 PCR 在 96 孔板上进行分析, 以 16sRNA 作为内参, 所用引物见表 1。荧光定量 PCR 的反应混合液 (总体积 25 μL) 成分: 12.5 μL SybrGreen qPCR Master Mix 染料, 0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 F, 0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 R, 9.5 μL 双蒸水和 2 μL 模板 cDNA。PCR 循环条件为: 95 ℃预变性 2 min, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 40 s 进行 40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 所用基因功能及引物序列

Tab.1 Genes function and primer sequences for real time PCR

基因	编码蛋白质	上游引物	下游引物	片段长度/bp
<i>nrB</i>	Two component sensor kinase	GGGTCCCITCCGATCTTCTG	GTGTTCTGGCTGTCCGATT	140
<i>nifR</i>	Nitrogen regulation protein	TCGCCGTTGAACATTACGAG	GAGCGGAACGGTCGAGATAC	102
<i>glnA</i>	Glutamine synthase	CCTACGCTTCTGTTGGGTATC	CGAGGACCAGGTAGGGATTG	123
<i>glnB</i>	P protein	GCCGAGCAGAGTACGTTGTG	GGTACGGATGCGGATGACTT	173
<i>exoC</i>	Phosphoglucomutase(PGM)	GATGCCCTGGTTCTTGTCTGA	GCCCCACGACTATGAGGAAG	175
<i>exoN</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	CTCCATATCCGAACGCATCA	CTGAAAAGCAGCCGTTCCAC	116
<i>crd</i>	putative curdlan synthase	TGAAGCTCGGCCTGTCTATCT	TGGTAATGGGTACAGCGGTCA	120
<i>glmU</i>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	CAGTTCCTTTTCCGGTGCAT	TAGCAACGTGAAGGGCGAAT	100
<i>cisY</i>	citrate synthase	GACGAAGTATGGGTCGAAAG	CAGAAGACGATGTACGAAGTGC	108
<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase(NDPK)	ACGCAACCAAGCGTAATCTC	GAAGGGACGCTCTTTGTGAA	140

每个样品进行 3 次平行测定,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[4]对目的基因做相对定量分析。每个样品相关基因转录水平的变化以野生菌株在氮源充足时(NH_4Cl 的质量浓度为 0.6 g/L)的基因转录水平的相对量来表示。

2 结果与分析

2.1 氮源代谢相关基因的转录水平差异

细菌主要通过“谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶(GS-GOGAT)”途径来吸收细胞外的氮源,在这个循环中,谷氨酸、谷氨酰胺和 α -酮戊二酸将根据细胞的需要进行动态的分配,保障细胞对氮营养的需求^[5]。细菌综合性氮源调控系统(*ntr*)由 4 种酶组成,分别是 *glnD* 基因编码的 UTase/UR,*glnB* 基因编码的 PII 蛋白和由组氨酸蛋白激酶 NtrB 和应答调控蛋白 NtrC 组成的双组份调控系统^[6]。*nifR* 基因编码的 NifR 蛋白是土壤杆菌重要的固氮酶^[7]。

对于野生菌株,当环境中氮源含量从充足转变到缺乏时,氮源代谢调控系统(*ntr*)的两个重要组成部分 NtrB 和 P 蛋白的编码基因 *ntrB* 和 *glnB* 的转录水平都显著提高,分别为 2.38 和 1.71 倍,见图 2。这表明氮源调控系统在应答环境氮源限制机制中起重要作用。而编码固氮酶的 *nifR* 基因和谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthase,简称 GS)的 *glnA* 基因转录水平也分别提高了 2.45 和 1.23 倍——说明土壤杆菌在氮源限制条件下,提高其氮源吸收途径相关酶的编码基因的转录水平,使其适应氮源缺乏环境。

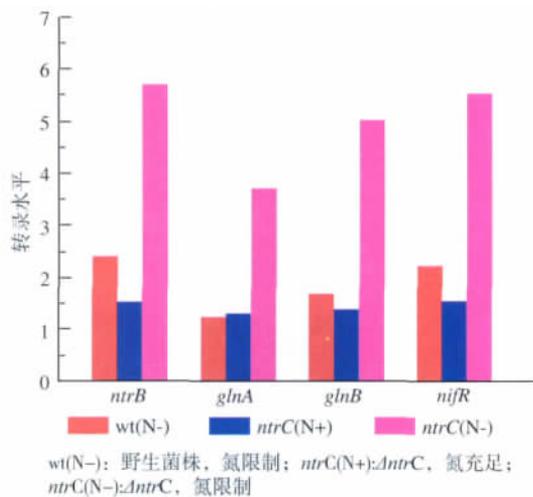


图 2 氮源代谢相关基因的转录水平差异

Fig.2 Relative expression level of nitrogen metabolism-associated genes

为了研究 NtrC 的功能,作者比较了 $\Delta ntrC$ 和野

生菌株相关基因相对转录水平。从图 2 可以看出, $\Delta ntrC$ 在氮源充足时,*ntrB*,*glnA*,*glnB* 和 *nifR* 等 4 种氮源代谢相关基因的转录水平都没有明显的变化。但是在氮源缺乏时,这 4 种基因的转录水平都有非常明显的提高,分别提高了 5.62,3.73,4.99 和 5.46 倍,远远高于野生菌株在环境氮源缺乏时的转录水平。其原因可能是 *ntrC* 基因被敲除后,菌体缺失了 NtrC 蛋白的氮源代谢调控能力,使得细菌在氮营养不足条件下,氮源代谢的相关基因大量表达而不受调控。

2.2 碳源代谢相关基因的转录水平差异

对于野生菌株,当环境中氮源含量从充足转变到缺乏时,热凝胶合成关键酶磷酸葡萄糖变位酶。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和热凝胶合成酶的编码基因 *exoC*,*exoN* 和 *crd* 的基因转录水平分别提高了 1.76,1.71 和 1.4 倍,见图 3。菌体针对氮营养缺乏调整细胞代谢,使碳代谢流进入热凝胶合成途径,存储能量。柠檬酸合酶的编码基因 *cisY* 的转录水平提高比较明显,提高了 2.2 倍,大量碳流进入 TCA 循环,为热凝胶合成提供能量。而核苷二磷酸激酶的编码基因 *ndk* 的转录水平提高了 1.48 倍,大量合成 UDP,可用于热凝胶合成前体 UDP-葡萄糖的合成。但 N-乙酰葡萄糖氨-1-磷酸尿苷酰转移酶的编码基因 *glmU* 也提高了 1.67 倍,此酶催化合成革兰氏阴性细菌细胞壁肽聚糖合成的前体物质,氮源缺乏时,*glmU* 仍然大量表达,但是此时菌体应该处于生长平衡状态,可能肽聚糖的合成是一个复杂的过程,还存在其他的调控途径,其机理还需进一步研究。

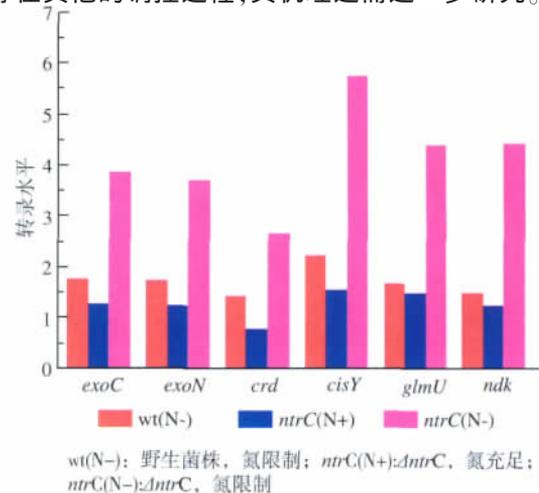


图 3 碳源代谢相关基因的转录水平差异

Fig.3 Relative expression level of carbon metabolism-associated genes

在氮源缺乏条件下, $\Delta ntrC$ 的所有测定的基因转录水平都提高很明显, 表明细胞内正常的代谢调控已经丧失。 *exoC*、*exoN* 基因转录水平分别提高了 3.84 和 3.68 倍, 说明碳流大量进入多糖合成途径, 虽然 $\Delta ntrC$ 产热凝胶的能力下降, 但产生了另外一种未知物质, 见表 2 和图 4, 以适应氮源缺乏的不利环境。 *crd* 基因也大量表达, 转录水平提高了 2.66 倍, 但是热凝胶合成水平很低, 推测原因可能是热凝胶合成相关酶的调控是一个复杂的过程, 除了存在转录水平调控外, 还可能还存在翻译水平的调控; 且结合文献报道推断 NtrC 蛋白并非 *crd* 基因的转录因子, 不是通过促进 *crd* 基因的转录来调控热凝胶的合成, 还存在其他的调控机制。柠檬酸合酶的编码基因 *cisY* 的转录水平提高非常明显, 提高了 5.73 倍。由此看出, $\Delta ntrC$ 在氮源缺乏时, 细胞代谢消耗了大量能量。 *ndk* 基因的转录水平也提高了 4.4 倍, N-乙酰葡糖氨-1-磷酸尿苷酰转移酶的编码基因 *glmU* 的转录水平则提高了 4.38 倍, 这与野生菌株氮源缺乏时的转录情况一致, 其机理还需进一步研究。总体上分析, $\Delta ntrC$ 在氮源缺乏环境下, 也同样失去了对碳源代谢相关基因转录的正常调控。

表 2 土壤杆菌野生菌株和 $\Delta ntrC$ 产热凝胶和未知多糖特性的比较

Tab.2 Comparison of curd and unknown polysaccharide production profiles between *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 wild type strain and $\Delta ntrC$

发酵培养基中初始 NH_4Cl 质量浓度/(g/L)	菌株	热凝胶产量/(g/L)	未知物产量/(g/L)
1.1	野生菌株 (wt)	11.9	0
	$\Delta ntrC$	0.98	5.5
4	野生菌株 (wt)	0	0
	$\Delta ntrC$	0	5.6

2.3 土壤杆菌野生菌株和 $\Delta ntrC$ 产热凝胶和未知物特性的比较

作者还对土壤杆菌野生菌株和 $\Delta ntrC$ 所产热凝胶和未知物特性进行了比较。从表 2 可以看出, *ntrC* 基因被敲除之后, 菌株的热凝胶合成能力大大降低, 仅为 0.98 g/L, 但是同时产生了另外一种水不溶性和碱不溶性未知物, 此物质为白色絮状, 比较粘稠, 产量为 5.5 g/L, 此物质可能作为储能物质, 用于菌体在氮源缺乏的不利环境中生存。

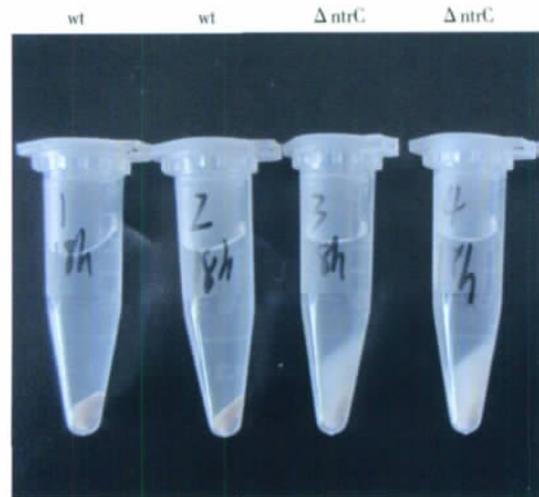


图 4 土壤杆菌野生菌株 (wt) 及 $\Delta ntrC$ 同体积发酵液离心沉淀
Fig.4 Precipitation of the same volume broth of *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 wild type and $\Delta ntrC$

当把发酵培养基中 NH_4Cl 的质量浓度提高到 4 g/L 时, $\Delta ntrC$ 没有产生热凝胶, 说明 *ntrC* 基因被敲除后, 并没有解除氮源的限制, 在高氮条件下无法产热凝胶, 但是 $\Delta ntrC$ 仍然产生了未知物质, 说明 NtrC 蛋白对此未知物的产生有抑制作用, 且其产生不受氮源的限制。

3 结语

作者分析了土壤杆菌 ATCC 31749 和其 *ntrC* 突变株 ($\Delta ntrC$) 在氮源充足和限制环境下, 部分关键基因相对转录水平变化, 进一步探索土壤杆菌对氮源限制环境的应答反应和氮源应答调控蛋白 NtrC 在热凝胶合成中的作用。

通过比较土壤杆菌野生菌株在氮源限制与充足时氮源代谢和碳源代谢相关基因的转录水平差异, 表明土壤杆菌在氮源限制环境下通过提高氮源代谢调控与吸收相关基因的转录, 对外界氮源缺乏的环境作出应答, 调整氮源的吸收, 同时也调控碳代谢流进入热凝胶合成途径以存储更多的能量来增强自身生存能力。其中 *ntrB*, *glnA*, *glnB*, *nifR* 等 4 种氮代谢相关基因和 *exoC*, *exoN*, *crd*, *cisY*, *ndk*, *glmU* 等 6 种碳代谢基因的相对转录水平都有不同程度的提高, 既调控氮源吸收, 又调控碳代谢流进入热凝胶合成以储存更多能力维持自身生存。另外一些研究报道也有类似结论。例如, Atkinson 等的研究表明, 大肠杆菌在外界氮源缺乏时胞内 NtrB 和 NtrC 的含量都有所增高^[8]。Kabir^[9]等发现, 大肠杆菌

在氮源缺乏时会增加其 *glnA* 基因的表达量。*Klebsiella pneumoniae* 固氮调节基因 *nifLA* 的增强子包含相邻的低亲和性 NtrC 蛋白结合位点,且仅在氮源缺乏产生高浓度的 NtrC-P 下才会被激活^[10]。Ilnoa^[11]等进行体外实验也发现,NtrC 蛋白质含量越高,其磷酸化程度也越高,与 *Sinorhizobium meliloti* 染色体上 *nodD3* 基因转录启动子相结合的能力越强。

NtrC 蛋白在热凝胶合成中起重要作用。NtrC 蛋白是一种 DNA 结合蛋白,作为一种转录激活剂,可以与依赖 σ^{54} 因子的 RNA 聚合酶共同作用^[12],也可以激活第二个调节蛋白 Nac 蛋白,而 Nac 蛋白依赖 σ^{70} 因子刺激转录。这些调控蛋白介导应对氮源限制环境细胞所进行的自我平衡的应答^[13]。本研究中土壤杆菌的 *ntrC* 突变株热凝胶合成能力显著降低,但是同时合成了另外一种胞外未知物,且此物质的合成不受环境氮源限制。虽然热凝胶合成关键酶的编码基因转录水平都有所提高,但是热凝胶合成水平很低,说明 NtrC 蛋白参与调控热凝胶合成,而且热凝胶合成过程相关酶的调控,除了存在转录水平调控外,还存在翻译水平的调控。本研究虽不能确定 NtrC 蛋白参与调控热凝胶合成的具体机制,但是根据 Dombrecht^[14]等报道,土壤杆菌 31749 中 *crd* 基因不含有 σ^{54} 因子依赖的启动子保守区域,所以

排除活化的 NtrC 蛋白直接结合 *crd* 基因的启动子来激活 *crd* 的可能性,即 NtrC 蛋白并非 *crd* 基因的转录因子,不是通过促进 *crd* 基因的转录来调控热凝胶的合成,还存在其他的调控机制。有一些研究者对 NtrC 蛋白参与调控多糖和其他聚合物合成进行了相关研究。Ana 等^[15]研究表明,NtrC 蛋白是 *Pseudomonas putida* 中主要的氮调控蛋白,在氮源限制条件下,他们检测到与 PHA 和糖原(glycogen)等碳源储藏聚合物积累有关的基因表达水平上调。Lee 等^[16]将 *gmhd* 基因的启动子区域与 *luxAB* 构成转录融合片段,发现氮源代谢双调控组分 NtrBC 参与了细菌生物膜和胞外多糖的合成,并且进一步证明 NtrC 通过调控腺苷二磷酸-甘油-甘露庚糖-6-异构酶编码基因的转录从而调控菌体生物膜和胞外多糖的合成。能源储备物聚-3-羟基丁酸酯(Poly-3-Hydroxybutyrate,简称 PHB)的生物合成与热凝胶类似,营养限制是刺激 PHB 积累的必要因素。Sun 等^[17]实验证明,*ntrB* 和 *ntrC* 基因参与调控 *Azospirillum brasilense* Sp7 合成 PHB,并指出 *ntrB* 和 *ntrC* 基因的失活消除了氨对 PHB 合成的抑制作用,突变株能够在高浓度氨条件下积累 PHB,而本实验 *ntrC* 突变株并没有消除氨对热凝胶合成的抑制作用,在高氨浓度下不能积累热凝胶,NtrC 蛋白调控热凝胶合成的机理还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Phillips K R, Pik J, Lawford H G, et al. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 1983, 29: 1331-1338.
- [2] Merrick M J, Edwards R A. Nitrogen control in bacteria[J]. **FEMS Microbiology Review**, 1995, 59: 604-622.
- [3] Harwood J E, Huysen D J. Automated analysis of ammonia in water[J]. **Water Research**, 1970, 4: 695-704.
- [4] 唐水凯, 贾水义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨[J]. **生物技术**, 2008, 18(3): 89-91.
TANG Shui-kai, JIA Shui-yi. Discussion for data processing method of real-time PCR[J]. **Biotechnology**, 2008, 18(3): 89-91. (in Chinese)
- [5] Leigh J A, Dodsworth J A. Nitrogen regulation in bacteria and *Archaea*[J]. **Annual Review of Microbiology**, 2007, 61: 349-377.
- [6] Merrick M J, Edwards R A. Nitrogen control in bacteria[J]. **FEMS Microbiology Review**, 1995, 59: 604-622.
- [7] Hill S, Kennedy C, Kavanagh E, et al. Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*[J]. **Nature**, 1981, 290: 424-426.
- [8] Atkinson M R, Blauwkamp T A, Ninfa A J. Context-dependent functions of the PII and GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2002, 184: 5364-5375.
- [9] Shahinur Kabir I, Takehiro Sagara, Taku Oshima. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*[J]. **Microbiology**, 2004, 150: 2543-2553.
- [10] Wong P K, D Popham, J Keener, et al. In vitro transcription of the nitrogen fixation regulatory operon *nifLA* of *Klebsiella pneumoniae*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1987, 169: 2876-2880.

- [11] Ilona D, Sara A, Ray D. The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1999, 179:491-499.
- [12] Reitzer L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*[J]. **Annual Review of Microbiology**, 2003, 57:155-176.
- [13] Muse W B, Bender R A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, 180:1166-1173.
- [14] Dombrecht B, Marchal K, Vanderleyden J, et al. Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely species of the *Rhizobiales*[J]. **Genome Biology**, 2002, 3:1-11.
- [15] Ana B, Herva's, Ine's Canosa, et al. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability[J]. **J Bacteriol**, 2008, 190(1):416-420.
- [16] Kim H S, Lee M A, Chun S J, et al. Role of NtrC in biofilm formation via controlling expression of the gene encoding an ADP-glycero-manno-heptose-6-epimerase pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*[J]. **Molecular Microbiology**, 2007, 63(2):559-574.
- [17] Sun J, Peng X, Jan VI, et al. The *ntrB* and *ntrC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7[J]. **Applied and Environment Microbiology**, 2000, 66:113-117.

科 技 信 息

我国建立转基因植物核酸量值溯源框架途径

日前,由中国计量科学研究院(以下简称中国计量院)牵头,联合8家单位研制完成的“十一五”科技支撑计划重点课题《转基因植物核酸量值溯源传递关键技术研究》通过专家鉴定验收。该课题通过自主研究,成功建立了转基因植物核酸测量的溯源途径,解决了国内长期以来无法实现转基因植物核酸准确测量和量值溯源的技术难题,使我国成为世界上首个建立转基因植物核酸量值溯源框架途径的国家。

该课题组针对目前存在的转基因植物及其产品转基因成分含量测量结果不可比和量值溯源体系缺失等关键技术问题展开研究,经过多年的技术积累和3年的联合实验攻关,建立了转基因植物核酸精确测量方法、计量标准和测量溯源途径,确定和实现溯源到国际基本单位。

据课题负责人、中国计量院医学与生物计量研究所副所长王晶介绍,该课题研究建立了超声波-同位素稀释质谱、电感耦合等离子体发射光谱和数字聚合酶链式反应等国际首创的新测量方法,从而实现了转基因核酸的高准确度定量测量,解决了目前国内外对转基因核酸定量测量可比性差和缺乏标准物质的关键难题。通过国际计量关键比对,该课题成果均取得很好成绩,证明了所建立的核酸定量测量方法及计量标准已达国际领先水平。

[信息来源]中国质量报.我国建立转基因植物核酸量值溯源框架途径 [EB/OL]. (2012-11-21). http://epaper.cqn.com.cn/html/2012-11/21/content_126960.htm.

科学家研制出快速检测农残的新型灵敏可视筛检卡

据 sciencedirect 数据库报道,Food Control 刊登了浙江大学研究的一项用于快速检测食品中农残的新工具-灵敏可视筛检卡。

这种新型灵敏可视筛检卡,可用于快速检测食品中的农药残留,其工作原理是:乙酰胆碱酯酶(AChE)催化水解吡啶乙酸酯而产生蓝绿色强度变化,农药通过抑制 AChE 活性而控制颜色。研究人员对检测卡的制备程序进行了优化,通过物理吸附法将 AChE 固定在尼龙薄膜上,固定温度设定在 4℃,固定时间为 30min,将固定化酶真空冷冻干燥 2min。将吡啶乙酸酯溶解在甲醇中,用磷酸盐缓冲液(pH7.5)稀释至 10mM,抑制时间和显色时间分别为 15min 和 10min。

在对水果汁和蔬菜中的农药残留进行实际检测后发现,该可视筛检卡具有高灵敏性。

[信息来源]Xishan Guo, Xueyin Zhang, Qiang Cai, Tao Shen, Songming Zhu, Developing a novel sensitive visual screening card for rapid detection of pesticide residues in food[J]. Food Control 2013, 30(1):15-23. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512004112>)