

没有成功的动物模型。目前开展幽门弯曲菌的微生物学研究对该课题停滞不前的状态无疑有推动作用。但至今这方面资料尚很少见。本文旨在初步探讨决定幽门弯曲菌胃粘液定植和生存的几个生态学因素,以便引起有关研究者的重视。

(一) 幽门弯曲菌的胃粘液定植

粘液定植 (Mucus Colonization) 是在研究肠道螺形菌粘附机制时提出的一个概念,指的是细菌通过粘液与肠道上皮细胞发生联系,但它与后者无配受体关系^[1]。幽门弯曲菌也是一种生活在粘液下的螺形菌^[2],至今未发现它与上皮细胞有恒定的粘附现象,由此推测粘液定植是胃壁上幽门弯曲菌的主要粘附机制。胃粘液是由高分子糖蛋白构成的胶样物质,它形成厚约 200 μm 的粘液层覆盖于胃粘膜表面^[3],因其极大的粘稠度而对细菌运动形成较强的阻力。但幽门弯曲菌除靠鞭毛进行线性运动外,其菌体还能进行螺旋状运动,它在粘稠物质中的运动能力是大肠杆菌的 10 倍^[4],所以它能从胃腔钻入粘液层,并在其中自由穿行。由于粘液呈高度还原状态,故微嗜氧的幽门弯曲菌有贴近上皮细胞获取微量氧的倾向;又因为胃粘膜上皮细胞的连接处有较高浓度的尿素及血红素^[4],很可能形成这两种物质的梯度使幽门弯曲菌定向趋化运动,这在体外试验中已得到证实。根据该菌不出现在肠粘膜粘液中这一事实^[5],推测粘液的组成不同,会直接影响到幽门弯曲菌的定植。

(二) 幽门弯曲菌的生长繁殖条件

任何细菌定植后都必须有合适的生长繁殖条件,才能在定植的环境中生存。幽门弯曲菌的体外生长条件如气体、营养、湿度等都高于普通菌,对它定居的胃环境进行理化分析,发现上述条件能通过一定的机制得到满足。胃粘液由胃腔至胃上皮细胞层存在着一个递增的 pH 梯度,在贴近上皮细胞表面时 pH 值为 7^[11],这样不耐酸的幽门弯曲菌就避开了胃酸的致死作用,而绝大多数其它菌因无动力或动力不够而在胃腔内被酸杀灭。粘液含有稳定的水层,保证了粘液下胃上皮表面部位有较高湿度,同时使胃腔内氧气难以透过粘液层,从而维持粘液下环境有较低的氧分压。该环境中的 CO₂ 除来自胃上皮细胞分泌的 HCO₃⁻ 与 H⁺ 中和产生的 CO₂ 外^[12],幽门弯曲菌代谢中产生的高活性尿素酶还可不断分解尿素产生所需的 CO₂^[6],生成的 NH₃ 则与 H⁺ 反应。营养物主要来自粘膜上皮、组织间液和胃腔,其成份极其丰富。绝大多数细菌因粘液限制而不能进入这样一个环境,需氧菌和厌氧菌在微嗜氧环境也不易生长,只有幽门弯曲菌不仅能定植,而

且获得了最适宜的生长繁殖条件。

(三) 定植抗力 (Colonization Resistance, CR)^[13]

一般情况下外来细菌进入消化道的某一部位,都要受到该部位常居菌群的拮抗作用,但胃粘膜表面环境有其独特性。据报道在正常情况下健康人胃内呈无菌状态,进餐时由于胃酸被中和,从口腔和咽部带入的细菌可暂时生存,30 分钟后胃内恢复酸性,则细菌被杀灭^[17]。无动力的细菌及只靠鞭毛运动的细菌,都无法穿过粘液到中性环境中生存。对正常人和胃病患者胃活检粘膜切片观察及胃粘膜培养,都未发现恒定的伴随菌,说明整个胃粘膜表面和胃腔很可能无常居菌群,因此幽门弯曲菌也就不至于受到其它菌的拮抗。

(四) 胃局部免疫力

正常情况下粘膜表面的免疫因子主要是 IgA,它能阻止病原体接近宿主细胞;有炎症时局部还有 IgG 渗出,可以中和并促使病原体被杀灭。但在幽门弯曲菌感染中,局部免疫因子的作用不明显,用免疫酶染色发现,绝大部分菌体表面包被有 IgG 和 IgA,但细菌不受损伤而仍然和病灶同在^[18],说明此时的胃环境不利于抗体功能的发挥,相反为该菌的致病性提供了有利条件。

(五) 结语

幽门弯曲菌主要依靠其螺旋式的运动钻入粘液下,避开胃酸的作用,在粘液下胃粘膜上皮之上这一环境,它能得到适宜的生长繁殖条件,且不受其它菌及局部免疫的排斥,从而能生存和致病。系统地开展幽门弯曲菌的微生物学研究,将能揭示出决定幽门弯曲菌定植和生存的主要因素,并指导动物模型的建立,为深入研究幽门弯曲菌的致病机理,为慢性胃炎及溃疡病的预防及治疗提供了可靠的理论基础。

参 考 文 献

1. Adrian Lee: *Advances in Microbial Ecology*. Ed Marshall KC; Australia. 115—161, 1986.
2. Rollason TP et al.: *J Clin Pathol*. 37(1): 23—26, 1984.
3. Koelz HR et al.: *The Gastroenterology Annual/3*. Ed F Kern Jr, et al. USA. 47, 1986.
4. Hazell SL et al.: *J Infect Dis*. 153(4): 658, 1986.
5. Buck GE et al.: *J Infect Dis*. 153(3):664—669, 1986.
6. Borromeo M, et al.: *J Clin Pathol*. 40(4): 462—463, 1987.
7. Hill M et al.: *Scan J Gastroenterol*. 20(Sup111): 1—5, 1985.
8. Wyatt JI et al.: *J Clin Pathol*. 39(8): 865—870, 1986.

活体植物根瘤固氮酶活性的气相色谱法测定*

蔺继尚 胡连生 许广铭 王书锦

(中国科学院沈阳应用生态研究所)

谭克辉 徐继 戈巧英

(中国科学院植物研究所,北京)

摘要 本文改进了利用气相色谱分析活体豆科植物根瘤内根瘤菌固氮酶活性的方法,该方法比用传统的测量离体根瘤的方法所得结果更接近共生体的实际水平。本试验使用国产仪器和材料,组装了一个适合测量大豆 (*Glycine max*)、野大豆 (*Glycine soja*)-大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*/*Sinorhizobium fredii*) 共生体完整植株根瘤固氮活性的装置。其特点是不损伤被测植株,并在植物正常进行光合作用的同时测量根瘤固氮酶活性,还可同步测量植株的光合作用和呼吸作用,特别适于研究共生体的连续变化。应用此装置测量的结果与国外使用的全自动定型仪器的测量结果一致。

关键词 活体植物根瘤;固氮酶活性;乙炔还原;气相色谱

自 60 年代 Dilworth 等^[1]发现固氮酶能将乙炔还原成乙烯的现象以来,人们可以容易地借助气相色谱仪,通过检测固氮酶或天然生态系统中共生固氮根瘤还原乙炔成乙烯的微摩尔数来评价它们的固氮能力。我国在 70 年代就完善了整套测量离体根瘤固氮活性的方法^[2],极大地促进了我国共生固氮的研究。在传统方法^[3]基础上, Fishbeck 等在 70 年代建立了利用乙炔还原法原位测定完整豆科植株根瘤固氮酶活性的方法 (Fishbeck 法), 80 年代又发展了一个称之为开放式气体交换系统 (open gas exchange system) 的动态分析方法 (Layzell 法)^[5]。结合我国的具体情况,我们利用现有条件,因陋就简,改进了 Layzell 法,设计了一个简易的连续测量活体完整植株根瘤固氮活性的流程,并摸索出了适当的测试条件。

材料与方 法

(一) 植物培养

大豆各品种的种子用 0.3% 高氯酸钠溶液表面消毒 10 分钟,再用无菌水彻底清洗,然后置于含 1% 无菌琼脂平皿内使种子充分吸水,

在室温下避光保存 24 小时。根据实验设计分别用处于对数生长期的慢生型大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 菌株 USDA110 和中国快生型大豆根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* 菌株 8866 进行接种,种液中根瘤菌数目约为 10^7 细胞/ml。待种子萌芽后移入砂培,盆钵在温室中培养,自然光照。接种不同根瘤菌的盆钵分区排列,并用隔板分开避免交叉感染。植株每日浇去离子水一次,每周浇无氮营养液两次,以保证氮以外的其他营养供应。50 天后测量整株根瘤固氮活性,然后摘下根瘤测离体根瘤的固氮活性作为对照^[6,7]。

(二) 整体植株根瘤固氮活性的测定

按照自制的测定活体完整植株根瘤固氮活性装置 (图 1) 进行,装置中的特制砂培培养钵用 PVC 塑料制做,下部靠近钵底 1cm 处钻有一泄水孔。先在钵内装约 2cm 厚的碎石子,上面再添砂子,以保证渗水和检测时气流的畅通。塑料钵予先在 0.3% NaClO₄ 溶液中浸泡 24 小时以上作消毒处理,砂和碎石子进行高压灭菌。培

* 国家自然科学基金资助项目。

养钵的上盖内径与钵底外径匹配,沿上盖中心向边缘开一个 0.5cm 宽的豁口,恰好对着植株的茎,盖上盖可不损伤钵内植株,用橡皮泥密封豁口,用插有铜导管的橡皮塞插入钵底和上盖的开孔。按照图 1 的装置程序,用塑料管将钵底泄水口与配制好的 10% C₂H₂:90% 空气 (V/V) 的混合气体贮槽相接,上盖出口经干燥管与气相色谱仪的气体进样阀入口相接,进样阀出口与 CD-1 型大气采样器的吸气口相连。当大气采样器启动后,气袋中的气体就以匀速流过被测植株根区,其中 C₂H₂ 与根瘤内固氮酶作用后,部分被还原成 C₂H₄,并源源不断地被泵出,形成了动态平衡。此装置可随时转换进样阀位置,将气样注入气相色谱仪进行分析。俟检测到的 C₂H₄ 峰值不再增大,即可根据峰面积与流经根区的气体流速计算出植株当时的固氮活性。

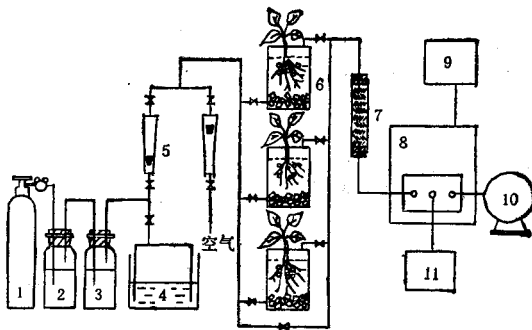


图 1 测定活体完整植株根瘤固氮活性装置图
1.乙炔钢瓶 2.浓H₂SO₄洗瓶 3.水洗瓶 4.气体贮槽
5.转子流量计 6.特制砂培钵 7.干燥管 8.气相色谱仪 9.记录仪 10.大气采样器 11.进样器

(三) 稳态下根瘤固氮酶活性的计算

由于我们的实验是在室温下进行的,需对 Layzell 计算公式^[9]因温度和大气压变化引起的偏差进行校正,经修改的公式如下,单位为每小时每克根瘤干重还原 C₂H₄ 微摩尔数。

$$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{gDW}_{\text{nod}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = K \frac{F \cdot \text{ppm C}_2\text{H}_4 \cdot P}{R \cdot T \cdot \text{DW}_{\text{nod}}}$$

公式中: F-气体流动速度,
ppmC₂H₄-流出气体中 C₂H₄ 的 ppm 数,
P-测量时的大气压。

T-测量时室温(开尔文温度)

DW_{nod}-根瘤干重

R-气体常数

K-系数(与采用单位有关)

(四) 色谱条件

1. 色谱柱: GDX-502, 60—80 目;或 15% ββ'-氧二丙腈, 6201 红色担体 60—80 目, φ 3×2000mm, 柱温 60℃。

2. 检测器: 二氢火焰离子化检测器 (FID), 检测器温度 150℃, 载气: N₂ 30ml/min, H₂ 40ml/min, 空气 500ml/min。

3. 上分 100 型气相色谱仪, 进样量 1ml, 灵敏度 1000×1/2。

结果与讨论

(一) 用两种方法测大豆-大豆 菌共生体固氮活性的比较(表 1)

试验用 5 个大豆品种(亚 I—亚 V) 的每一种, 分别接种慢生型大豆根瘤菌 (B.j) USDA 110 和中国快生型大豆根瘤菌 (S.f) 8866, 组成 10 个试验组, 每组分别用测离体根瘤方法(传统法)和改进的测活体植株完整根瘤方法(改良法), 检测其共生体的固氮活性。从表 1 结果看出, 对于同一个共生体来说, 用改良法比用传统法测得的还原乙炔能力高出 10 倍左右。因为前者植物的光合作用与呼吸作用照常进行, 木质部、韧皮部的维管束输送管路畅通, 类菌体与寄主植物间的物质、能量交换以至信息传递均未受到影响, 因此测量结果接近类菌体固氮的实际水平。而后者根瘤与植物根分开后, 寄主与共生根瘤菌的代谢受到了影响, 物质、能量和信息的交换被阻断。据 Hunt 的最新研究表明, 根瘤皮层具有的气体扩散障碍 (diffusion berry) 是与根瘤内的豆血红蛋白一样重要的^[9], 为类菌体提供了低氧分压的微环境, 既维持着类菌体的呼吸又保证了固氮酶的厌氧状态。一旦将根瘤齐根切开, 其断面直接暴露于含氧气体, 打破了根瘤皮层的气体扩散障碍屏障, 使固氮酶活性受到严重影响。这些都是造成测量离体根瘤固氮活性下降的重要因素。