

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% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>: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 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 与根瘤内固氮酶作用后,部分被还原成 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>,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 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 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。

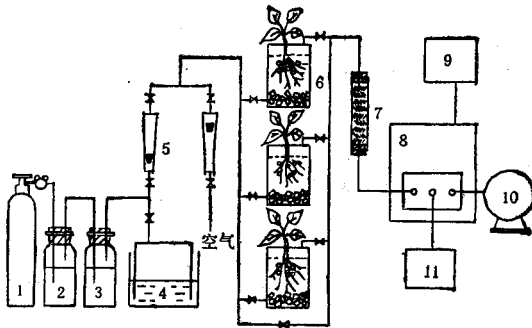


图 1 测定活体完整植株根瘤固氮活性装置图  
1.乙炔钢瓶 2.浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>洗瓶 3.水洗瓶 4.气体贮槽  
5.转子流量计 6.特制砂培钵 7.干燥管 8.气相色谱仪 9.记录仪 10.大气采样器 11.进样器

### (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<sup>[9]</sup>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 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 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,  
ppmC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-流出气体中 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 的 ppm 数,  
P-测量时的大气压。

T-测量时室温(开尔文温度)

DW<sub>nod</sub>-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: N<sub>2</sub> 30ml/min, H<sub>2</sub> 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<sup>[9]</sup>, 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。

表1 两种方法检测大豆-根瘤菌共生体根瘤固氮酶活性的比较

大豆品种	接种根瘤菌	植株干重 (g/株)	根瘤干重 (g/株)	根瘤固氮酶活 ( $\mu\text{molC}_2\text{H}_4 \cdot \text{gDW}_{\text{nod}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	
				测离体根瘤法	测完整植株根瘤法
Ⅴ I	B.j USDA110	4.68(0.18)	0.103(0.011)	9.4(2.3)	122.9(9.4)
	S.f 8866	5.89(0.33)	0.096(0.019)	12.9(1.2)	140.2(15.9)
Ⅴ II	B.j USDA110	2.37(0.50)	0.070(0.017)	4.6(1.4)	88.3(5.4)
	S.f 8866	3.61(0.58)	0.105(0.012)	15.1(2.0)	133.1(8.8)
Ⅴ III	B.j USDA110	3.41(1.94)	0.095(0.011)	10.1(2.6)	131.6(8.5)
	S.f 8866	3.49(0.10)	0.104(0.009)	12.0(1.1)	132.3(11.2)
Ⅴ IV	B.j USDA110	5.05(1.38)	0.088(0.018)	11.0(4.3)	139.6(18.7)
	S.f 8866	4.59(0.61)	0.064(0.010)	5.3(0.7)	66.7(7.2)
Ⅴ V	B.j USDA110	3.10(0.31)	0.095(0.015)	7.3(1.8)	58.1(6.3)
	S.f 8866	4.75(0.59)	0.127(0.021)	16.2(2.8)	111.2(15.8)
国外文献值:					
Maple Arrow <sup>[6,7]</sup>	B.j USDA16			3.9	105(6)
	S.f USDA191			3.5	20(3)
Harosoy63 <sup>[6,7]</sup>	B.j USDA16			3.9	106(3)
	S.f USDA191			3.1	25(4)
Peking <sup>[6,7]</sup>	B.j USDA16			3.1	117(20)
	S.f USDA191			2.5	107(4)

注 ① B.j 为慢生型大豆根瘤菌, S.f 为中国快生型大豆根瘤菌。

② 数据为三组重复实验结果的平均值, 括弧内数字为标准偏差 (SD)。

从表1还可看出, 两种方法测量结果的趋势是完全一样的。尽管用两种方法测量同一个共生体所得到的数值不同, 但由5个大豆品种接种相同的大豆根瘤菌组成的共生体用两种方法测得的根瘤固氮活性高低顺序相同; 用两种方法测到的同一大豆品种接种不同属种根瘤菌组成的共生体根瘤固氮活性高低顺序也相同。表明这一检测技术上的改进能与传统方法相呼应。另外, 我们的测量结果与国外文献值<sup>[6,7]</sup>亦相当, 说明了改良法的可靠性。上述两种检测方法从统计学分析结果比较, 发现前者的又一个优点是, 测量相同处理的植株个体间数据的离散度较小, 因为其试验条件容易控制统一。而以离体根瘤作为检测对象时, 很难保证根瘤离体时间完全相同, 根瘤离体前的不同植株状态与环境温度亦会影响检测结果, 造成个体间数据的差异。

在研究共生体的光合作用与根瘤固氮之间的关系, 或追踪根瘤固氮酶活性的日变化等项目时, 过去多采用间隔时间取根瘤进行离体根瘤固氮活性分析<sup>[10]</sup>。经实践发现这种方法弊端

较多, 因为连续从植株上摘取根瘤影响了共生体的正常代谢, 对残留在根上的其他根瘤固氮酶活性也产生一定影响。本文采用的改良法保证了共生体植株的完整和代谢的正常, 避免了上述方法带来的不良影响。

Fishbeck 法虽然比测离体根瘤方法 (传统法) 有了一些改进, 但在测量时植株的地上部分与根同时暴露在含乙炔的气体中进行暗反应。David 和 Fay 还观察到乙炔对叶子的光合作用有抑制作用<sup>[11]</sup>, 说明用该法测量的结果, 与共生体进行光合作用时根瘤的实际固氮活性有较大差别。

## (二) 检 时 应 注 的 问 题

1. 消除钢瓶乙炔中含有的微量乙烯, 以免影响检测结果。乙炔气必须经过浓硫酸和水洗两步以除去其中微量乙烯, 并在正式检测前先向气相色谱仪直接进样, 分析证明确无乙烯峰出现。若在 GC 上仍有微量乙烯峰出现, 检测结果中必须扣除该峰值以消除干扰。

2. 考虑实验时管路内壁的吸附作用, 所有管路以采用聚乙烯塑料管效果较好, 若使用乳

胶管会使检测结果形成较大偏差。

总之,我们用国产仪器和材料实现了对活体完整植株根瘤固氮活性的动态检测,试验结果与国外使用的全自动定型装置检验结果一致<sup>[6,7]</sup>。该方法可广泛用于豆科和非豆科共生固氮体系的研究。其优点是不损伤被测植株,可在植物正常进行光合作用的同时测定根瘤固氮酶活性,还可同时测量光合作用和呼吸作用,特别适于研究共生体的连续变化。目前我们的装置还是采用手动间断进样,今后可以改进为定时、自动、多管道向气相色谱仪进样,同时测量数株样品。并寻适合的微量氢检测器摸索分析根瘤放氢的条件,使检验完整植株根瘤气体交换技术日趋完善。

## 参 考 文 献

1. Dilworth M: *Biochim Biophys Acta* 127: 286—294, 1966.
2. 上海植生所固氮室: *植物学报*, 16: 382—384, 1974.
3. Turner G and A Gibson in "Methods for evaluating biological nitrogen fixation" edited by F Bergersen, A Wiley-Interscience Publication, Chichester, pp 111—137, 1980
4. Fishbeck K et al *Agronomy J* 65 429—435, 1973
5. Layzell D et al *Plant Physiol*, 75 582—585, 1984
6. Hattori J and D Johnson. *Appl Environ Microbiol* 48 234—235, 1984.
7. Lin J et al: *Plant and Soil*, 99 441—446, 1987
8. Layzell D et al. *Can J Bot*, 62 965—971, 1984
9. Hunt S et al *Planta*, 173 128—141, 1988
10. 许大全等: *植物学报*, 31: 103—109, 1989
11. David K and Fay P *Appl Environ Microbiol*, 34: 640—646, 1977.

## 巴西固氮螺菌巨大质粒的快速检测法

李波 郭俊 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉)

**摘要** 研究了巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 巨大质粒的快速检测方法。由于巨大质粒 (>1000Md) 在提取过程中易于断裂,故用常规的方法不易得到满意的结果。本实验以较温和的 Hirsch 原位裂解法为基础,作了相应的改进,在电泳前采用 0.05% SDS 预洗及冻融处理,电泳时,先反向电泳 15 分钟,然后再正向电泳。所得结果重现率高,且方法简便易行。

**关键词** 巨大质粒;固氮螺菌;原位裂解法;凝胶电泳

巴西固氮螺菌是一类存在于小麦、水稻、玉米、谷类、甘蔗等根系中的联合固氮细菌<sup>[1,2]</sup>。由于其内所含质粒巨大,提取时易断裂,加上其细胞壁外粘性蛋白较多,故难于利用常规方法检测其质粒,国内至今尚未见这方面的报道。

我们把较温和的 Hirsch 原位裂解法<sup>[2]</sup>作了适当的改进,对 3 株国际标准株及 4 株本实验室所分离的巴西固氮螺菌进行了研究。改进后,效果优于原方法,且重现率大大提高。

### 材料与方 法

#### (一) 细菌菌株及质粒 (表 1)

#### (二) 培养基

1. B 培养基: Döbereiner 培养基 见文献 [4]。

2. TA 培养基: Oxoid Tryptone 0.4%。

#### (三) 试剂

琼脂粉: Serva 产品,进口分装;溶菌酶: 华美公司产品; RNase A: Boehringer Mannheim GmbH, 西德产品。Tris-蔗糖缓冲液: 25% W/V 蔗糖, 0.025mol/L Tris-HCl pH 8.0; 6 × IV 型加样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40% W/V 蔗糖; 10 × TBE 缓冲液: 0.89 mol/L Tris-碱, 0.89mol/L 硼酸, 25mmol/L EDTA。以上三种缓冲液均需灭菌 10% SDS 液调至 pH7.5。

#### (四) 凝胶制备

取一块与“梳子”同样大小的厚 0.5cm 的有机玻板。用 75% 乙醇擦洗干净所用的工具。制胶时先将有机玻板夹在“梳子”后，并使二者底端对齐，然后一同垂直架在凝胶底板上，与凝胶底板平面相距约 0.1cm，封边。倒入自然胶 (0.6% 琼脂)，待凝后，取出有机玻板，并在其所形成的 0.5cm 宽的槽中注满变性胶 (0.4 琼脂糖+1% SDS，同时可加入一滴 6 × IV 型加样缓冲液作指示剂)。制好的胶厚 0.5cm，长 18 cm。

#### (五) 电泳

固氮螺菌一级培养用 Döbereiner 斜面，二级培养用 Döbereiner 液体，三级培养用 TA 液体。取三级培养液 (OD ≈ 0.6) 1.4ml 离心得菌体，用 0.5ml 0.05% SDS (pH8.0) 迅速洗

140V。电泳 6 小时后，用 EB 染色 20 分钟，脱色 20 分钟，UV 灯下观察并拍照。

### 结 果

1. 实验获得的结果如图 1 所示。所检测的固氮螺菌皆表现出多质粒特性。Sp7 显示了 5 条质粒带，前四条经计算其大小与 Plazinski<sup>[5]</sup> 相符，说明本方法结果可靠。Ma231、Mi221、S247、W251-10、Sp81 及 Sp82 的质粒带数依次为 5 条、3 条、6 条、6 条、8 条及 7 条。根据双对数线<sup>[6,7]</sup>推测，在所检测的质粒中，最小的约有 20Md 左右，最大的为 1000Md 以上。实验结果重复三次以上。

2. 由于巴西固氮螺菌所含质粒巨大，在常规裂解及抽提过程中，极易受剪切而导致实验失败，因此本实验采用较温和的原位裂解法。又因为固氮螺菌菌体表面有较多的粘性蛋白，菌体裂解困难，故采用低浓度 SDS 预洗。虽然 Ma231 及 Sp7 必能检测到微弱的质粒带，但经预洗后，质粒带亮度明显增加，且重现性大大提高。本法中 RNase A 母液配制采用 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，15mmol/L NaCl，

表 1 细菌菌株和质粒

菌株或质粒	联合共生植物	分离地点	来源
巴西固氮螺菌 <i>Azospirillum brasilense</i>			
Ma231	玉米	中国	本室 <sup>[2]</sup>
Mi221	谷子	中国	本室
S247	甘蔗	中国	本室
W251-10	小麦	中国	本室
Sp81	水稻	巴西	Döbereiner
Sp82	水稻	巴西	Döbereiner
Sp7	俯仰马唐	巴西	Döbereiner
根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58			本室
质粒 pck <sub>1</sub>			本室

1—2 次，甩干。置冰上，加入 60μl 酶裂解液 (2mg/ml 溶菌酶+40μg/ml RNaseA 于 Tris 蔗糖缓冲液中，同时加一滴 6 × IV 型加样缓冲液)，打匀，4℃10 分钟后点样。根癌农杆菌 C58 一级培养用 LB 斜面，二级培养用 LB 液体，三级培养用 TA 液体，不用 SDS 预洗，其他处理同固氮螺菌。点样后，先反向电泳 30V，15 分钟，再正向 30V，45 分钟，然后调电压至

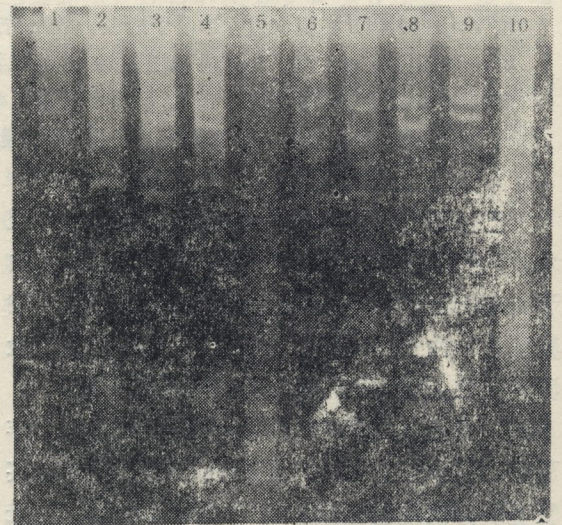


图 1 巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 及根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) 的质粒电泳图谱  
1 Ma231; 2 Mi221; 3 S247; 4 W251-10 5 质粒 pck<sub>1</sub>\* (8.93Md); 6 Sp81, 7 Sp82; 8 Sp7; 9 W251-10; 10 *A. tumefaciens* C58 (120Md; 273 Md)

\* 质粒 pck<sub>1</sub> 按文献 [8] 法提取

而不是常规的 pH7.5, 以保证酶裂解终 pH 为 8.0, 这是溶菌酶的最适 pH 值。改进后的方法还引入了冻融作用, 在冻融过程中, 细胞壁受到了极大的张力作用, 再加上溶菌酶在其上“钻孔”, 从而大大降低了细胞壁的牢固性, 提高了破壁率。本法采用低电压<sup>[3]</sup> 反向电泳的目的是延长了 SDS 作用于菌体的时间, 使裂解更充分。实验中采用三级培养, 菌体新鲜, 生长活跃, 粘性蛋白积累少, 菌壁易破裂。在第三级培养中, 采用 TA 培养基效果优于 PA 培养基, 原因待考。

## 参 考 文 献

1. 罗孝相, 王子芳: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983.
2. 王常霖, P R Hirsch: 遗传学报, 15(1): 25—33, 1988.
3. Okon Y et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 85—88, 1977.
4. Döbereiner J et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22(10): 1464—1473, 1979.
5. Jacek Plazinski et al.: *J. Bacteriol.*, 155(3): 1429—1433, 1983.
6. Meyers J A et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529—1537, 1976.
7. Casse F et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229—242, 1976.
8. Maniatis T et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 90—91, 1982.

## 饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 和棕曲霉毒素 A 的薄层层析测定法\*

殷蔚申 张耀东 吴小荣

(郑州粮食学院)

**摘要** 饲料样品 25g, 用 100ml 乙腈: 4% 氯化钠溶液 (9:1) 抽提, 吸取 25ml 提取液, 以石油醚脱脂二次, 加 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液 12.5ml 后, 用氯仿提取二次, 氯仿层放入蒸发皿中, 于 60℃ 水浴挥干, 残渣以苯乙腈溶解定容为 1ml, 供测定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>。碳酸氢钠水层中加 1mol/L 盐酸 1ml 左右调节 pH 值为 4—5, 再以氯仿提取二次, 氯仿层放入蒸发皿中, 于 60℃ 水浴挥干, 残渣以苯乙酸溶解定容至 1ml, 供测定棕曲霉毒素 A。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 的薄层板以乙醚横展、丙酮氯仿纵展。棕曲霉毒素 A 的薄层板以丙酮氯仿横展, 甲苯乙酸乙酯 90% 甲酸纵展。展板后分别在波长为 365nm 和 254nm 的紫外光下观察。如为阳性样品, 标记后用薄层扫描仪定量。棕曲霉毒素 A 阳性样品应先喷碳酸氢钠乙醇溶液后再扫描。本测定方法对三种毒素的最低检出量均为 0.2ng/点, 最低检出限量均为 3.2ppb。

**关键词** 黄曲霉毒素; 棕曲霉毒素; 真菌毒素; 饲料

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 是众所周知的危害最严重的两种真菌毒素。尤其是黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 不仅毒性强而且污染基质种类多, 污染量大。棕曲霉毒素 A 是棕曲霉毒素中毒性最强的一种, 它可使多种动物发生肝肾损害。玉米、花生饼、豆饼、麦麸等均为配合饲料的主要成份, 据报道, 这三种毒素均在以上成份中检出过<sup>[1,2]</sup>。因此饲料中这些毒素的污染情况是值得注意的问题。

由于配合饲料中除有以上成份外, 还有鱼

粉、骨粉、羽毛粉、石粉、维生素、抗生素等多种物质, 采用常规测定方法, 往往因干扰物质太多, 影响测定结果。本文报道的方法, 一次提取可以同时测定这三种毒素, 且干扰物质去除得干净, 测定效果好, 灵敏度较高, 操作也较简单。

## 材 料 与 方 法

### (一) 仪器

\* 国家自然科学基金资助项目。