

固氮螺菌的血清学研究

I. 固氮螺菌的血清学分类

蒋亚平 罗孝扬 曾宽容 蔡金芝 周亿国

蔡昌建 杨宝玉 阮小安* 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本实验采用玉米、谷子、水稻、甘蔗和小麦的根表上分离获得具有较高固氮酶活的细菌 61 株, 根据其形态特征及生理生化特性, 将 61 株固氮螺菌归属于 *Azospirillum* 属 *Azospirillum brasilense* 种, 同时根据它们还原硝酸盐和亚硝酸盐的明显差异分为两群: 第一群 (a) 具有硝酸盐和亚硝酸盐还原酶, 不累积亚硝酸盐产生 N_2O , 第二群 (b) 只具有硝酸盐还原酶, 累积亚硝酸盐不产生 N_2O ^[1,2]。在此基础上, 我们对 61 株菌进行血清学分类^[3,4,5], 共分为 10 群。

材料和方法

(一) 抗原制备

将供试菌株**Sp7、***Sp107 st、****Sp81、Ma99、Mi 224、W261-1、W261-10、W259-2、S248、Mi227、W259-1、Ma231、Ma237、Ma201、Ma233、Ma241、R38-4、R285、R256 分别在肉膏蛋白胨液体培养基中振荡培养 24 小时, 离心, 弃去上清液, 用生理盐水洗涤沉淀两次, 然后用 0.25% 甲醛生理盐水稀释至含菌数达 10 亿/ml 左右, 存放棕色瓶中, 置冰箱保存备用。

(二) 抗血清制备

选择 2—3kg 健康家兔进行免疫, 免疫途径采用加佐剂或不加佐剂的方法进行^[6]。抗血清效价达 3200, 立即由颈动脉放血, 37℃下放置 1—2 小时后冰箱过夜, 析出大量血清离心 (3000 rpm/20') 放入棕色瓶中, 加 0.1% 叠氮化钠再分装小安瓶中, 置冰箱保存备用。

采用试管凝集法测抗血清效价, 先将抗血

清以 1:10 稀释, 再进行一系列二倍稀释, 然后分别取 0.5ml 抗血清稀释液加 0.5ml 对应抗原, 37℃ 过夜, 观察记载。

(三) 抗原分析

1. 试管交叉凝集反应, 方法与抗血清效价测定方法基本相同。

2. 以 1:10 的抗血清分别与各菌株进行试管交叉凝集反应。

(四) 荧光染色

1. 标本制备: 用洁净的载玻片涂上抗原悬液, 加热固定。

2. 荧光抗体间接染色: 按文献[7]进行。设下列对照。(1)标本的自发荧光对照。(2)特异性对照——标本+羊抗兔抗体; 标本+未免疫血清+羊抗兔抗体。(3)阳性对照——已知阳性标本+相应特异免疫血清+羊抗兔抗体。

结 果

(一) 试管交叉凝集反应

1. 以上述方法制备的 20 个抗原, 抗血清进行试管交叉凝集反应见表 1, 2。

从表 1、2 可以看出, Sp7、W261-1、W261-10、W259-1、W259-2 交叉凝集效价完全一致, 属同一血清型。

* 华中农学院 82 届毕业生在本所实习。

本文荧光照片由武汉生物制品所情报室马利民同志拍摄。特此致谢。

** Sp 7 由美国菌种保藏委员会引进。

*** Sp 107 st 由 J. Döbereiner 赠送。

**** Sp 81 由 J. Döbereiner 从玉米根系上分离获得。

表 1 10 株抗原试管交叉凝集反应

抗原	抗 血 清									
	Sp 7	W261-1	W261-10	W259-2	Mi227	W259-1	Sp107st	S247	S248	Mi224
Sp7	5120	5120	5120	5120	—	5120	—	—	—	—
W261-1	5120	5120	5120	5120	—	5120	—	—	—	—
W261-10	5120	5120	5120	5120	—	5120	—	—	—	—
W259-2	5120	5120	5120	5120	—	5120	—	—	—	—
Mi227	—	—	—	—	5120	—	—	—	—	5120
W259-1	5120	5120	5120	5120	—	5120	—	—	—	—
Sp107st	—	—	—	—	—	—	5120	5120	5120	—
S247	—	—	—	—	—	—	5120	5120	5120	—
S248	—	—	—	—	—	—	5120	5120	5120	—
Mi224	—	—	—	—	5120	—	—	—	—	5120

表 2 10 株抗原试管交叉凝集反应

抗原	抗 血 清									
	Ma99	Ma237	Sp81	Ma231	Ma201	Ma241	Ma233	R38-4	R285	R256
Ma99	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ma 237	—	5120	—	—	—	—	—	—	—	—
Sp81	—	—	5120	—	—	—	—	—	—	—
Ma 231	—	—	—	5120	5120	—	—	—	—	—
Ma 201	—	—	—	5120	5120	—	—	—	—	—
Ma241	—	—	—	—	—	5120	5120	—	—	—
Ma233	—	—	—	—	—	5120	5120	—	—	—
R38-4	—	—	—	—	—	—	—	5120	5120	—
R285	—	—	—	—	—	—	—	5120	5120	—
R256	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5120

注: Ma⁻、W⁻、Mi⁻、S⁻、R⁻ 分别表示由玉米、小麦、谷子、甘蔗和水稻根表分离的菌株。

Sp107st、S 247、S 248 交叉凝集效价完全一致,属同一血清型。

Mi 224、Mi227 交叉凝集效价完全一致,属同一血清型。

Ma201、Ma231 交叉凝集效价完全一致,属同一血清型。

Ma 233、Ma 241 交叉凝集效价完全一致,属同一血清型。

R38-4、R285 交叉凝集效价完全一致,属同一血清型。

2. 将以上制备的 20 株抗血清以 1:10 稀释,分别与 61 株进行试管交叉凝集反应,凝集现象呈“4+”者归属同一血清型。见表 3。

由表 3 可以看出 61 株固氮螺菌可分为 10 个血清型:

1. 与 Sp7 同型的 37 株其中 a 群的 25 株, b 群的 12 株。

2. 与 Sp107st 同型的 4 株属 a 群。

3. 与 Mi224 同型的 7 株属 a 群。

4. Ma99 与其它各株不起交叉凝集反应属 a 群。

5. 与 Ma201 同型的 2 株属 a 群。

6. 与 Ma233 同型的 2 株属 a 群。

7. R38-4 同型的 2 株属 a 群。

8. R256 与其它各株不起交叉凝集反应定为独立血清型。

9. 与 Ma237 同型 4 株属 a 群。

10. Ma244 抗原与以上制备的 20 个抗血清均无交叉凝集反应定为另一血清型,属 a 群。

以上结果看出由小麦根表分离的 37 株和

表 3 20 个抗血清与 61 株抗原交叉凝集反应

抗血清	抗 原						凝集反应	群
Sp7	W251-1	W259-2	W96-6	W96-2	W261-5	W251-8	++++	a
	W251-9	W251-11	W96-4	W259-6	W261-9	W251-10		
	W259-5	W251-4	W251-7	W80-3	W251-1	W251-2		
	W251-3	W251-5	W59-1	S251	W261-8	W261-7 Ma6		
Sp107st	W261-10	W251-6	W80-2	W261-4	W259-1	W261-13	++++	b
	W259-4	W261-3	W251-12	W261-11	W261-12	W261-2		
Sp107st	S247	S248	Ma246		Ma245		++++	a
Mi224	Mi224	Mi227	Mi223	Mi225	Mi226	Mi229 Mi221	++++	
Ma99	Ma99						++++	
Ma201	Ma201	Ma231					++++	
Ma233	Ma233	Ma234					++++	
R38-4	R38-4	R285					++++	
Sp81	Sp82	(国外引进)					++++	
R256	R256						++++	
Ma237	Ma237	Ma242	Ma232	Ma234			++++	
Ma244	Ma244						++++	

表 4 部分固氮螺菌的免疫荧光交叉反应

抗原	抗 血 清							
	Sp7	Sp107st	Ma99	Ma224	Mi227	R38-4	R285	W261-1
Sp7	3+	-	-	-	-	-	-	4+
Sp107st	-	3+	-	-	-	-	-	-
Ma99	-	4+	-	-	-	-	-	-
Ma224	-	-	-	4+	-	-	-	-
Mi227	-	-	-	4+	4+	-	-	-
R38-4	-	-	-	-	-	4+	-	-
R285	-	-	-	-	-	4+	4+	-
W261-1	4+	-	-	-	-	-	-	4+

注: 1. 标本自发光对照。2. 特异性对照——标本+羊抗兔抗体; 标本+未免疫血清+羊抗兔抗体均无荧光。

谷子根表上分离的 7 株均属于一个血清型。而由玉米根表上分离的 13 株分属于 7 个血清型, 由水稻和甘蔗根表分离的 6 株均属于两个血清型。

(二) 荧光抗体间接法染色

结果见表 4。

以上结果说明: 抗原抗体荧光染色反应与交叉凝集反应结果相符。

讨 论

固氮螺菌 *Azospirillum brasilense*, 因 61 株的形态特征、生理生化特性完全相同, 根据它们

还原硝酸盐和亚硝酸盐的明显差异分为 a、b 两群, 但利用血清学方法均可进一步鉴别菌株之间的细微结构的差异, 从而为研究螺菌生态学与植物联合固氮的机制奠定了基础。

由小麦和谷子上分离的菌株均属于一个血清型, 而从玉米等作物分离的菌株, 其抗原性差异较大, 所以用血清学方法对这些菌进行分类具有一定的价值。

参 考 文 献

- [1] 湖北省微生物研究所生物固氮组: 微生物学报, 19(2): 160—165, 1979。
- [2] 罗孝扬等: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983。

- [3] Vincent. J. M: A manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria, p. 27—40, 1970.
- [4] Helve'cio, De-Polli, et al.: *Arch. Microbiol.* **126**: 217—222, 1980.
- [5] Ladha, J. K. et al.: *Can. J. Microbiol.* **28**: 478—485, 1982.
- [6] Strayer, R. F. et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **35**: 192—198. 1978.
- [7] Schank, S. C. et al.: *Soil. Biol. Biochem* **11**: 287—295, 1979.