

腐败假单胞菌的超微结构和酶细胞化学 反应的电镜观察

陈文列 钟秀容

(福建医学院电镜室,福州)

腐败假单胞菌为革兰氏阴性微弯杆菌,能运动,需氧或兼性厌氧,生化鉴定显示过氧化氢酶和氧化酶阳性,近年来常在临床标本中检出。我们应用常规电镜技术与酶细胞化学方法对由腹泻患者粪便中分离出的菌株的形态、结构和某些酶的定位进行了研究。

材 料 和 方 法

(一) 磷钨酸染色

将吸附有菌液的载网用 0.5—1% 磷钨酸染色。

(二) 超薄切片

纯培养细菌经 2.5% 戊二醛和 1% 还原锇酸固定,醋酸铀块染,常规脱水,环氧树脂 618 包埋,切片经铀、铅染色。

(三) 酶细胞化学反应

标本经 2.5% 戊二醛固定,缓冲液漂洗,分别加入下述孵育液于 37℃ 孵育 30—60min。1. 过氧化氢酶孵育液^[1],含 DAB 20mg, pH9.7 的 0.05 mol/L Tris-HCl 液 9.9ml, 6% H₂O₂ 0.1ml (阴性对照加抑制剂 KCN)。2. 过氧化物酶孵育液^[2],含 DAB 20 mg, pH 7.6 的 0.05 mol/L Tris-HCl 液 8.9 ml, 0.05 mol/L MnCl₂ 1ml, 1% H₂O₂ 0.1ml (阴性对照不加 H₂O₂)。样品再经还原锇酸固定,常规脱水、包埋,超薄切片未经染色,直接用 Hu-12A 电镜观察。

结 果

(一) 超微结构

菌体具有革兰氏阴性杆菌的一般结构,相当多的菌体胞质内可见电子密度高的胞浆颗粒(该菌缺乏聚 β-羟丁酸盐^[3]),而缺少胞浆颗粒的菌体游离核糖体丰富(图版 1-1, 2)。

(二) 酶的定位

过氧化氢酶反应产物呈电子密度较高的颗粒状,分散遍布于胞质(图版 1-3);过氧化物酶反应物显示在胞膜与间体(图版 1-4),但不同菌体及每个菌体胞膜的不同部位,反应强弱不同。阴性对照样品未见反应物。

讨 论

电镜酶细胞化学技术近年来在国内有较大发展^[4,5],使用电镜观察细菌超微结构也有详细描述^[6,7],但应用电镜研究酶在细菌体内的定位,国内尚未见报道。对菌体细胞的酶,生化试验仅能鉴定酶的存在,却不能定位;用超速离心等手段研究,又要破碎与分离提取菌细胞成分。而电镜细胞化学法可无需破坏细胞结构,直接将其与化学成分及功能结合起来研究。

过氧化氢酶广泛分布于需氧和兼性厌氧菌中,与分解 H₂O₂ 这种细胞氧化作用的毒性产物有关 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$);过氧化物酶也能催化 H₂O₂ 还原 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$),防止 H₂O₂ 积累^[1,3,8]。本菌为需氧菌,也有分解 H₂O₂ 的酶类。真核细胞过氧化氢酶存在于微体,而菌细胞缺乏微体样细胞器包裹该酶,因此可呈弥散状态分布于胞质。过氧化物酶在不同的生物与组织细胞内,名称不同、生理机能也各异^[1],本菌此种酶定位于胞膜-间体系统,还有何种功能尚待阐明。

细菌膜性结构简单,但胞膜-间体系统功能复杂,担负了真核细胞所具有的线粒体、内质网等细

本文于 1987 年 8 月 31 日收到。

承蒙梁平教授对本文进行审阅、指导,李舜华同志参加部分负染样品观察,福建省卫生防疫站陈扶立、王晓莹同志提供菌株,谨致谢意。

胞器的功能^[9], 早些时候已分离到 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶、细胞色素和脱氢酶等^[9], 但间体与胞膜同属内膜系统, 在离体膜制备物中无法区分, 故对之特殊功能未能做到精确定位^[9]。日本有路文雄观察了人型结核菌体内酶的定位, 细胞色素氧化酶、SDH 酶、ATP 酶、ACP 酶在间体活性较强而胞膜较弱^[10]。因此, 推测间体具有类似线粒体和溶酶体的功能。由于 G^- 菌表层结构复杂, 外膜亦呈单位膜结构^[11,12], 类似胞膜, 在技术上要分离它们得到纯品很困难, 因而未能检定酶的确切分布位置^[11,12]。而酶细胞化学则可直接了解酶的分布, 再结合生化方法, 有利于深入研究菌体内酶的精确分布和间体等膜性系统的功能。

参 考 文 献

[1] 武内忠男等: 新酶组织化学, 人民卫生出版社,

- 北京, p. 118, 120, 130—131, 1983。
 [2] Lewis, P. R. 等: 切片材料的染色方法-电镜技术, 人民卫生出版社, 北京, p. 281, 1981。
 [3] Mac Faddin, J. F.: 医学细菌生化试验鉴定手册, 人民卫生出版社, 北京, p. 40, 300, 302, 1985。
 [4] 汤雪明: 细胞生物学杂志(增刊), 7: 3, 1985。
 [5] 朴英杰等: 电子显微学报, 5(3): 116, 117, 118, 1986。
 [6] 孙纪申等: 生物学通报, 9: 171, 1985。
 [7] 梅国华等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(4): 228, 1982。
 [8] Stanier, R. Y. 等: 微生物世界, 科学出版社, 北京, p. 248, 259, 1983。
 [9] Kwapinski, J. B. G.: 分子微生物学, 科学出版社, 北京, p. 189, 191—193, 355, 370—371, 1986。
 [10] 有路文雄: 抗酸菌病研究杂志, 20(1): 53, 1968。

AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON THE ULTRASTRUCTURE AND ENZYME CYTOCHEMISTRY OF *PSEUDOMONAS PUTREFACIENS*

Chen Wenlie Zhong Xiurong

(Laboratory of Electron Microscopy, Fujian Medical College, Fuzhou)

In this paper, PTA staining, ultrathin sectioning and electron microscopic enzyme cytochemistry techniques were used to study the ultrastructure, as well as reactivity and localization of catalase and peroxidase in *Ps. putrefaciens*. Its ultrastructure is similar to that of other gram-negative bacilli. Catalase is distri-

buted in the cytoplasm, while peroxidase localized at cytoplasmic membrane and mesosome.

Key words

Pseudomonas putrefaciens; Ultrastructure; Electron microscopic enzyme cytochemistry

图 版 说 明

1. 超薄切片, 示菌体二分裂相, 胞浆颗粒 (CG), 核糖体 (Ri) ($\times 54000$; $\times 51000$)。
2. 超薄切片, 显示细胞壁 (CW) 及其中的外膜 (OM), 细胞膜 (CM) ($\times 34000$; $\times 54000$)。
3. 未染色切片, 过氧化氢酶 (C) 反应颗粒分布于胞质 ($\times 35300$)。
4. 未染色切片, 过氧化物酶 (P) 反应物定位于胞膜与间体 (MS) ($\times 27000$)。