

普通变形杆菌的L型

II. 利用 Feulgen 染色法及螢光色素染色法 研究L-型的細胞化学

李 輝 李天玲

雷爱德

(山东医学院微生物学教研組, 济南)

(天津医学院摄影室, 天津)

在各种因素作用下,許多細菌都可变成L-型。細菌的L-型含有球状体及顆粒。由于方法学的困难,目前对于球状体的細胞化学和顆粒的本質問題,尤其是顆粒和核質的关系問題研究尙少。Feulgen 染色法^[1]和吖啶橙螢光染色法^[2]是显示細胞內含有DNA及RNA成分的特异性染色法。我們用这两种方法研究了普通变形杆菌变₂株L-型的細胞化学。本文报导我們所得的實驗結果,并討論球状体的顆粒,网状結構和团块与核質的关系。

材料及方法

1. 菌株 普通变形杆菌变₂株L-型第24代培养物。

2. 涂片制备 取上述培养物的典型菌落,在載玻片上制成涂片,用甲醇固定后进行Feulgen染色或在空气中干燥后,用甲醇液固定5分鐘,水洗,进行吖啶橙染色。

3. Feulgen 染色法 采用Robinow改良法^[1],用1N HCl在60℃消化5分鐘,水洗后用Giemsa原液染色5—10分鐘。对照标本不經消化,直接用Giemsa原液染色。水洗后加盖玻片,在相差显微镜进行鏡检。

4. 吖啶橙染色法 取甲醇固定标本,用1:10,000的吖啶橙中性水溶液染色5分鐘,水洗后加盖玻片,用石蜡封固后用螢光显微镜进行鏡检。

5. 螢光显微镜鏡检及摄影

Leitz 牌螢光显微镜。炭弧作光源。

滤光板: BG 12/4毫米,用5% CuSO₄溶液滤过紅色可見光。

目鏡滤光板: S. P. 2.5。

摄影: 用Anscochrome F, 3分鐘,放大倍数: 900×,油鏡。

实 驗 結 果

1. Feulgen 染色法

用細菌的繁殖体及芽孢进行預备試驗証明,根据Feulgen氏法用1N HCl消化5分鐘左右,然后用Schiff試剂进行染色,核質染成紫紅色,为Feulgen染色反应阳性。但是由于細菌的核質对Schiff試剂着色較淺,因此不易进行鉴别。用1N HCl消化后以美蓝代替

Schiff 试剂,核质染成深蓝色,胞浆不着色或染成淡蓝色。但是由于不易进行显微摄影,所以我们改用 Robinow 建议的方法,用 Giemsa 氏原液代替 Schiff 试剂,细菌的繁殖体和芽胞用 1N HCl 在 60℃ 消化 5 分钟以后用 Giemsa 原液染色,核质染成深紫色,胞浆不着色或染成浅红色,结果甚为满意。

用 Robinow 法染普通变形杆菌变株的 L-型标本,发现球状体的胞浆部分被消化,不被 Giemsa 染液着色,或仅留有着色很浅的浅红色轮廓。球状体的颗粒被 Giemsa 染液染成深紫色,有些颗粒在球状体外散在或成堆存在。球状体内的颗粒大小极不一致,直径约为 0.3—1 微米左右,但有些颗粒可达 1 微米以上,它们的数目和排列也不相同。在有些球状体内颗粒呈弥散分布,充满整个球状体,有些颗粒彼此“融合”,其外形极不规则,呈不规则的哑铃状或弯曲的棒状,或呈环状。在某些球状体内可见和颗粒着色相同,即被 Giemsa 染液染成深紫色的结构,它们呈网状,充满整个球状体,或呈团块状,团块甚为致密,大小和形状也不规则,有的可达球状体的 2/3,它们的边缘也不整齐。在油浸镜下进行观察,发现团块的表面呈颗粒状,而不是均匀无结构的物质(图 1)。

用 Giemsa 原液将变株 L-型的标本,不经消化,直接染色作对照,由于胞浆成分未被消化,染成红色,而上述的颗粒,网状结构和团块仍染成深紫色,在相差显微镜下观察甚为清晰(图 2)。

2. 吖啶橙荧光染色法

变株 L-型标本用吖啶橙染液处理后,在荧光显微镜下观察,发现球状体的胞浆成分发出鲜艳的红色荧光。颗粒的荧光甚为明亮,它们的颜色可由黄绿色到翠绿色。它们的大小,形状和在球状体内的分布与用 Feulgen 染色法所见的颗粒相同。在球状体内也可以见到发出绿色荧光的网状结构。在有些标本中于绿色的网状结构间可以见到发出红色荧光的胞浆物质,它们呈岛屿状,与绿色荧光物质形成镶嵌样结构,有时在同一球状体内可见此种镶嵌结构与发出绿色荧光之颗粒同时存在(图 3,荧光彩色片)。球状体的团块结构也发出绿色荧光,有时它们充满整个球状体。在油浸镜下仔细观察,可见团块的表面也不是均匀的。网状结构及团块的荧光变化很大,也可以由黄绿色到翠绿色。有时可见个别的球状体主要发出红色荧光,其绿色荧光的结构或仅隐约可见。由于这种标本事先未经 1N HCl 处理,因此说明,这可能是由于大量的胞浆物质遮住了发出绿色荧光的成分。

在荧光显微镜下未能看到空泡样结构。但有意义的是,在有些标本中用相差显微镜和荧光显微镜对某些标本进行对比观察,发现在相差显微镜下看到的一些空泡样结构,在荧光显微镜下也发出均匀的绿色荧光。这说明了在研究 L-型的细胞化学方面,荧光显微镜检查法比相差显微镜检查法更为敏感(图 4)(同一标本进行相差及荧光显微镜摄影)。

事先用 1N HCl 处理普通变形杆菌变株的 L-型标本后,再用吖啶橙溶液进行染色,发现,发出红色荧光的成分消失,只留下发出绿色荧光的各种结构。这个结果和 Feulgen 染色法所得结果,基本上是一致的。

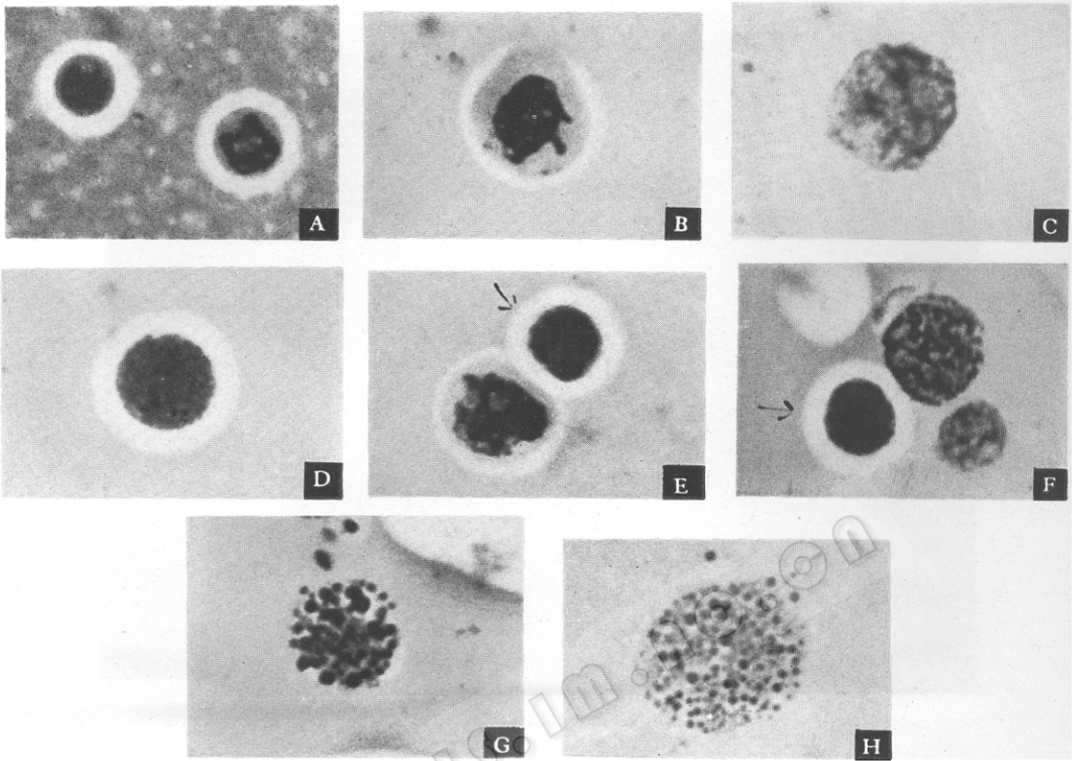


图1 变形杆菌 L-型的組織化学染色 (Robinow 法), 着色深的区域是含有 DNA 的成分、不着色的部分是被消化的、相当于 RNA 的成分

A, B. 团块状结构; C. 网状结构; D, E, F. 致密的颗粒状结构; G, H. 大小及形态不等的颗粒状结构。

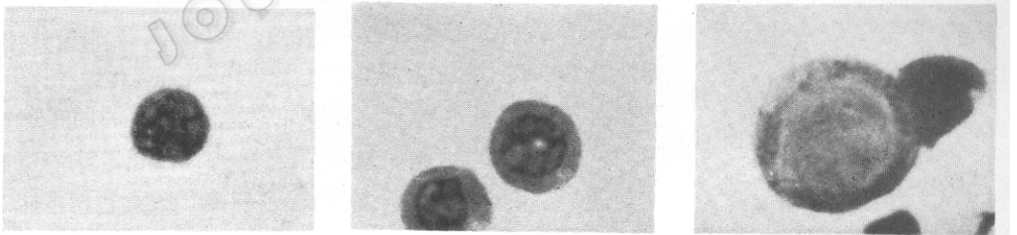


图2 变形杆菌的球状体 (Giemsa 染色)

討 論

关于細菌的 L-型的細胞化学,特别是 L-型的核質問題,目前尚很少有人进行研究。我們用 Feulgen 染色法和吖啶橙螢光染色法研究变株 L-型所得到的一些結果,对于闡明上述的問題是有帮助的。Robinow^[3] 用 Giemsa 原液代替 Schiff 試剂,修改了 Feulgen 染色法,可以特异性地显示細菌的核質結構。利用这个方法 Robinow 研究了許多細菌的核質,发现核質由于含有 DNA 被染成深紫色。胞浆的 RNA 蛋白質,被 HCl 消化后不能着色或只留下浅紅色的輪廓。

Armstrong^[2] 証明,用吖啶橙处理生物学标本,在螢光显微镜下含有 DNA 的成分发出綠色螢光,含有 RNA 的成分发出紅色螢光。这个方法的特异性很高,可用以显示含有 DNA 及 RNA 的細胞成分。目前在研究細菌的 L-型方面,这个方法尚未被人利用。

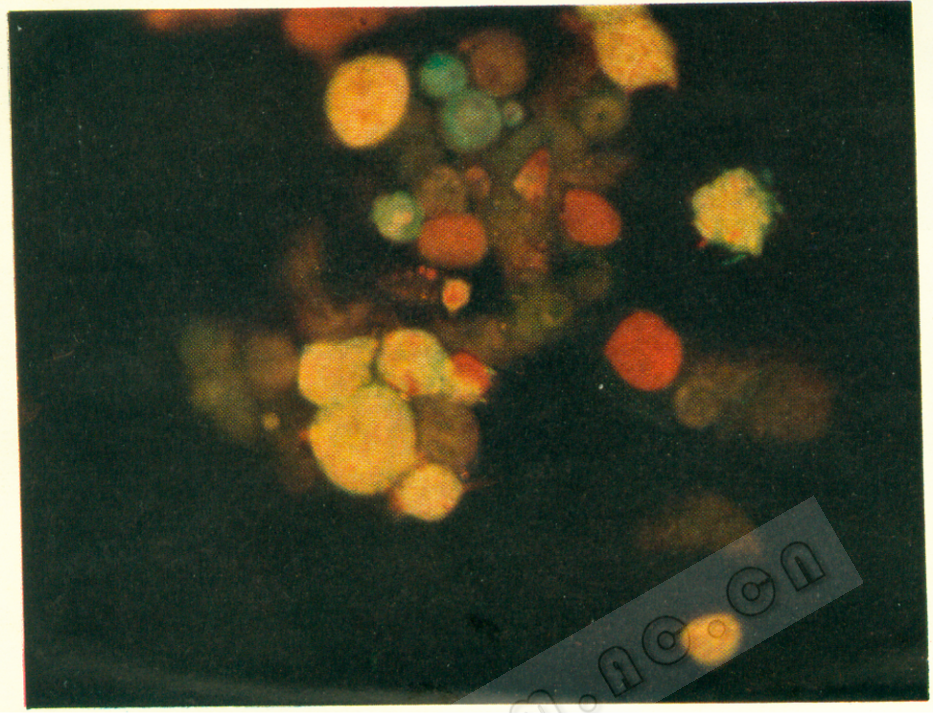


图3 变形杆菌球状体的螢光显微镜的观察。

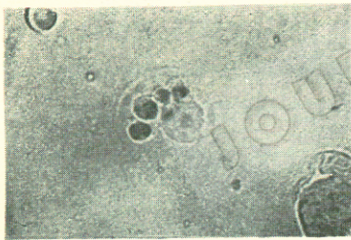


图4 变形杆菌球状体的相差显微镜观察。

我們用上述的两种染色法研究了变株 L-型，証明 L-型的球状体的胞浆含有 RNA 成分，在螢光显微镜下发出紅色螢光，用 1N HCl 消化后，失去染色性，螢光消失，用 Giemsa 染液处理也不着色，或只留下浅紅色的痕迹。顆粒被 Giemsa 染液染成深紫色，用吖啶橙染色，在螢光显微镜下发出綠色螢光，証明它們含有核质的成分——DNA。球状体内的网状結構和团块被 Giemsa 染液染成深紫色，在螢光显微镜下发出綠色螢光，說明它們也含有

核质成分——DNA。

我們已經报导^[4]在青霉素影响下由于核质的分裂和胞浆的增长与細胞分裂間的协调作用发生障碍，細菌的橫分裂虽然停止，但是核质的分裂和胞浆的增长仍在繼續进行，因此，在球状体的胞浆内累积了愈来愈多的顆粒。我們的实验証明了这些顆粒含有 DNA，可以认为它們是协调作用失去以后不断增长和分裂的核质，它們除呈顆粒状在球状体内弥散分布外，也可呈网状及团块状，这可能是核质間彼此融合或重迭的結果，也可能是核质的分裂机制发生障碍，而造成的核质成分的累积。我們用黑地映光法观察发现，顆粒、网状結構和团块具有很強的折光性，它們的結構甚为致密。

Klieneberger^[5]认为球状体的空泡样結構可能是代謝产物的累积。但是我們发现至少有些空泡样結構也发出綠色螢光，証明它們也含有核质成分。这种空泡样結構表面比較均匀，而且在陈旧培养物中(7天左右)数量較多，可能它們是代表核质的不同生理阶段。

值得指出的是，关于 L-型的顆粒能否进行繁殖，发育形成球状体的問題，目前意見尚

不一致。Roux^[6]用显微解剖法研究了变形杆菌 L-型的顆粒，认为顆粒不能进行繁殖。Weibull 及 Lundin^[7]用高速离心沉淀法研究变形杆菌 L-型(I₉株)，証明直径大于0.6—0.7微米以上的顆粒，可以繁殖。我們的实验証明，顆粒含有核质成分——DNA，而 DNA 是遗传信息的载体，因此它們具有繁殖能力是可能的。我們认为对此問題应当用显微解剖法和其他物理化学方法繼續进行深入的研究。

总 結

本文討論了用 Feulgen 染色法和吖啶橙螢光染色法研究变株 L-型細胞化学的結果。球状体的胞浆成分含有 RNA。顆粒、网状結構及团块含有核质的成分——DNA，它們是核质的分裂和胞浆的增长与細胞的分裂之間的协调作用发生障碍以后，核质繼續增长与分裂的結果。

本文也討論了顆粒与 L-型繁殖的关系。

参 考 文 献

- [1] Robinow, C. F.: In *Bacterial Anatomy, Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 6:181, 1956.
- [2] Armstrong, J. A.: *Exp. Cell Research*, 11:640, 1956.
- [3] Robinow, K. E.: *J. Hyg. Camb.*, 43:413, 1944.
- [4] 李 輝等：微生物学报，10: 497—506 1964.
- [5] Klieneberger, E.: In *the Bacteria*, Vol. I: 361, Academic Press, New York & London, 1960.
- [6] Roux, J.: *Ann. Inst. Pasteur*, 99:286, 1960.
- [7] Weibull C., & Lundin, B. M.: *J. Gen. Microbiol.*, 27:241, 1962.

THE L-FORM OF *PROTEUS VULGARIS*

II. CYTOCHEMICAL STUDY OF THE L-FORM OF *PROTEUS VULGARIS* USING FEULGEN'S STAINING METHOD AND FLUORESCENCE MICROSCOPY

LI HUI, LI TIEN-LIN

(Department of Microbiology, Shangtung Medical College, Chih-nan)

LEI AI-TE

(Tientsin Medical College, Tientsin)

The Feulgen's staining method and the fluorescence microscopic method with acridine orange to study the cytochemistry of the L-form of *Proteus vulgaris* "P 2" strain are described. The protoplasmic substance of the spheroplast contains RNA, while the granules, reticular and clumping structures of the chromatin contains DNA. They may be the results of loss of harmony between the division of the chromatin and the growth of protoplasm and fission of bacteria.

The relation between the granules and the growth of the L-form of *Proteus vulgaris* is discussed.