

三叶草根瘤菌荚膜的超声波剥除*

徐 浩 陈德高

(中国科学院微生物研究所,北京)

三叶草根瘤菌 (*Rhizobium trifolii*) 是一种有荚膜的杆菌,其荚膜主要是由多糖构成。杨格林 (Ljunggren)^[1] 报道,多糖制剂引起根瘤菌侵入性的转化,但多糖在根瘤菌侵入性方面的作用尚不清楚^[2]。本文用超声波法剥除三叶草根瘤菌的荚膜,为进一步研究荚膜多糖在根瘤菌侵入的作用方面提供一种方法。

一、材料和方法

菌株 中国科学院微生物研究所保藏的 *Rh. trifolii* AS 1.148 (T002)。

培养基 甘露醇酵母汁培养基,其成分 (%) 为:甘露醇 1、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02、NaCl 0.02、 $CaSO_4$ 0.02、酵母汁 0.04、琼脂 1.5, pH 7.0。

荚膜的剥除 所用菌株于 30°C 培养 48 小时后,配成悬液,将 3 支各盛有悬液 20 毫升的试管放入超声波发生器 (CFS-Z50 ×, 上海中原电器厂) 的震动池中,分别进行不同频率 (17.5—27.0 千赫) 和不同时间 (5—40 分钟) 的超声波处理。然后离心 (1000g) 20 分钟,便获得一细胞团块物 (已剥除荚膜) 和一混浊上清液,倾去上清液,洗涤团块物,离心后重新配成悬液,备用。

电子显微镜观察 固定包埋工作与前文^[3]基

本相同,采用 Palade 固定法和 Luft 固定法。将上述悬液 (对照组及处理组) 于 0°C 水浴中固定 30—50 分钟,用 pH 6.8 磷酸缓冲液洗涤并离心 3 次,依次用 30%、50%、75%、95% 及无水乙醇脱水 (各 10 分钟),于预先用无水酒精与甲基丙烯酸丁酯-甲酯混合液 (4:1) 配成 1:1、1:2、1:3 比例的浸透剂中顺序浸透 (各 20 分钟),再用纯丁酯-甲酯混合液浸透一次 (30 分钟以上)。然后在已预聚成半流体的丁酯-甲酯 (4:1) 包埋剂中,于 58—60°C 聚合成块,最后进行超薄切片和电子显微镜观察。所用切片机为瑞典 LKB 出品、捷克 Niklowitz 和日本日立 Um-3 型。所用电子显微镜为日立 HU-11A 和捷克 Tesla BS 242 型。

二、试验结果

在进行电子显微镜观察以前,曾用刚果红-HCl 法对荚膜进行负染色,并用甲烯蓝进行复染,在油镜中见荚膜无色、围绕菌体 (着蓝色) 形成一层较厚的亮圈。经超声波处理后,见亮圈缩小或消失。

用电子显微镜对未处理的对照组进行观察时,荚膜为围绕于原生质体周围的一连续层,其电子不透性较高,透过电子较少,致呈明显的不透光圈 (图 1)。经超声波处理后的样品,观察到剥除荚

表 1 不同作用时间的超声波 (25 千赫) 对菌体存活率的影响

| 实验次数 | 对 照 | 处 理 5 分 钟 | | 处 理 10 分 钟 | | 处 理 20 分 钟 | |
|------|--------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| | 菌 数 | 菌 数 | 存活率 (%) | 菌 数 | 存活率 (%) | 菌 数 | 存活率 (%) |
| 1 | 2.25×10^7 | 2.15×10^7 | 95.5 | | | 2.23×10^7 | 99.0 |
| 2 | 1.42×10^8 | 1.35×10^8 | 95.0 | 1.30×10^8 | 93.1 | | |
| 3 | 3.85×10^6 | | | 3.70×10^6 | 96.1 | 3.69×10^6 | 96.0 |
| 4 | 3.42×10^6 | 3.37×10^6 | 97.9 | | | | |
| 5 | 3.35×10^6 | | | | | 3.12×10^6 | 95.0 |
| 6 | 2.65×10^6 | 2.59×10^6 | 97.6 | 2.59×10^6 | 97.5 | 2.63×10^6 | 99.2 |

* 承范云六和张锦珠同志帮助,生物物理研究所的支援,特此致谢。

本文 1973 年 6 月 12 日收到。

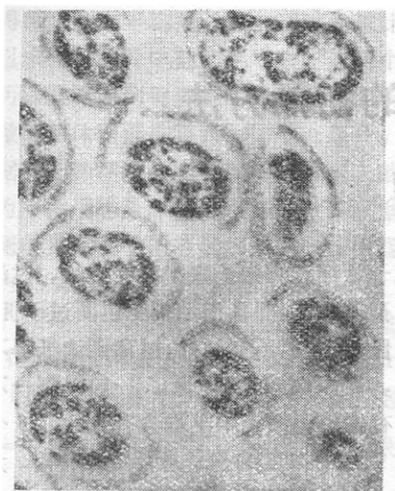


图 1 对照,示围绕原生质体周围的一圈荚膜 ×20000

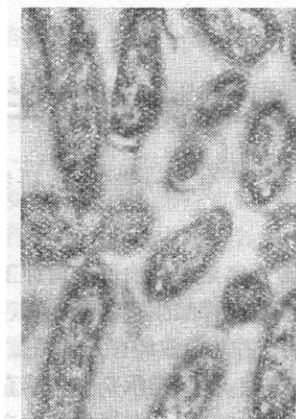


图 2 17.5 千赫超声波处理 5 分钟。示尚未完全剥除荚膜 ×10000



图 3 25 千赫超声波处理 15 分钟。示荚膜已被剥除 ×20000

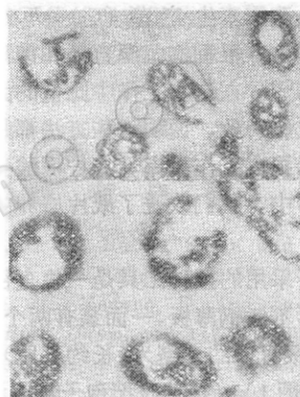


图 4 27 千赫超声波处理 40 分钟。示个别细胞破损 ×15000

膜的效果显著,其效率随超声波的频率和处理时间的增加而增加。当频率较低(17.5 千赫)和处理时间较短(5 分钟)时,观察到许多尚未完全剥除的荚膜(图 2);当频率和处理时间分别增加到 25 千赫和 15 分钟时,荚膜已全部剥除(图 3);而当增到 27 千赫和 40 分钟时,可见到个别破损的细胞(图 4)。

为了观察超声波对菌株存活的影响,进行了存活率试验,结果见表 1。存活率皆在 90% 以上,表明所用剥除荚膜的方法对本菌株的存活影响不大。

三、摘要

借助于电子显微技术证明三叶草根瘤菌的荚

膜经超声波(25 千赫)处理后已被剥除,用此法剥除荚膜对本菌株存活率影响不大。

参 考 资 料

[1] Ljunggren, H.: *Nature*, **191**: 623, 1961.
 [2] 范云六: 1964 年土壤微生物学专业会议专题报告及研究报告摘要集, 88 页, 武汉, 1964。
 [3] 徐 浩、江慧修: *微生物学报*, **11**: 161, 1965。
 [4] Clark, F. M. and Halvorson, H. O.: *Laboratory Outline for General Bacteriology*, p. 17, Burgess Pub. Co., Minnesota, 1959.