

死细菌和活细菌的细胞壁对溶菌酶敏感性的比较观察*

中国科学院微生物研究所微生物细胞生物学研究组

(北 京)

研究了溶菌酶对溶表微球菌和枯草芽孢杆菌死细菌和活细菌的细胞、以及制备的细胞壁的作用。讨论了所制备的细胞壁纯净度的测定方法。由衍射图谱所示明的“指纹”证实了细胞壁结构的不均一性。还讨论了偏光显微镜用于鉴定细胞壁特征的局限性和用处。扫描电镜照片为追索三氯乙酸处理后的细胞干粉对溶菌酶敏感性较低的原因提供了线索。

细菌细胞正象高等植物细胞一样,外面环绕着一道坚实致密的细胞壁,它的功能之一是保护和支撑原生质体,对分子量为10000道尔顿以下的物质是全透性的^[1]。由于这道坚实的壁局限着原生质体,当细菌的单个细胞长大时,就要使原有的壁局部破坏,或松动其组成成份——肽聚糖(Peptido-glycan)链,以便于体积增大,这一过程要有溶菌酶参加才能完成^[2]。因此细菌的细胞壁和菌本身的溶菌酶的消长之间有着极其紧密的配合关系。通常测试溶菌酶大多采用整个的死细胞作为底物(例如Yoshimoto^[3]),我国的医学临床工作中(例如硅肺的早期诊断)则习惯采用溶表微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) (以下简称小球菌)的活细胞,这两种底物的差别究竟如何,尚未见较系统的报道,为此我们进行了现在的工作,以期澄清这一问题,并为今后的工作找出依据和作方法上的准备。

材料与方法

(一) 材料

菌株为革兰氏阳性菌。1株是作为标准的溶表微球菌(1.634,性能上相当于NCTC 2665),另1株为我们以前的工作^[4]中选定的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 1.831。

溶菌酶为中国科学院生物化学研究所生产的生化试剂,即由蛋清中提取出的溶菌酶,它对一部

分革兰氏阳性菌有效。蛋白酶为无锡酶制剂厂的粗制酶(每克含5万单位)。超声波发生器为中国科学院物理研究所制造,功率250W,频率约8.5 Kc。电镜大部分用中国科学院科学仪器厂出品的DX-2型电镜。

(二) 方法

1.取上述两菌株在牛肉汁斜面上活化,于液体牛肉汁培养基内,29℃振荡培养16—24小时,收集菌体,在冰浴中用超声波处理15分钟后,4000转/分离心,以除去未破碎的细胞,然后取蛋白酶0.25克,用pH7的磷酸缓冲液配成50毫升,加入经超声波处理过的破碎菌体悬液中,在37℃的水浴中保温30分钟,以除去破碎后在壁上残附着原生质,然后在8000×g条件下,于4℃中离心后,用水洗1次,所得的沉降物呈略透明的白色。将制备出的细胞壁以15°角进行铬投影,在电镜下检查其纯度。并用电子衍射法留下“指纹”。

2.以同上方法培养得到的菌体细胞,用4000转/分离心取得菌体,洗净后,这种活细胞亦用作溶菌酶的底物。

3.以同法取得的菌体细胞用50%的三氯乙酸溶液(以下简称TCA),在100℃的沸水浴中处理5分钟,水洗1次,再用1N的NaHCO₃配制的胰蛋白酶(国产品)在30℃中,处理30分钟,以4000转/分离心收集菌体,再水洗2次,这种整体细胞(以下简称TCA法细胞)亦作为溶菌酶底物

本文于1976年5月8日收到。

* 中国科学院生物物理研究所电镜室和中国科学院感光研究所电镜室惠予协助。

之用。

结 果

1. 用电子显微镜所摄得的照片(图 1, 2)中可以看到, 我们所制备的细胞壁纯洁度约在 85%, 细胞壁对电子束是透明的,

残留的少数完整细胞则呈黑色, 由于完整细胞的厚度远大于壁厚, 留有很长的影子。若壁的厚度为 500 埃^[7], 则依影长比例计算, 经过制片而收缩的完整细胞约为 0.5—0.6 微米。由于壁中干物质多, 在制片时收缩很少, 而完整细胞收缩比达 40—50%。

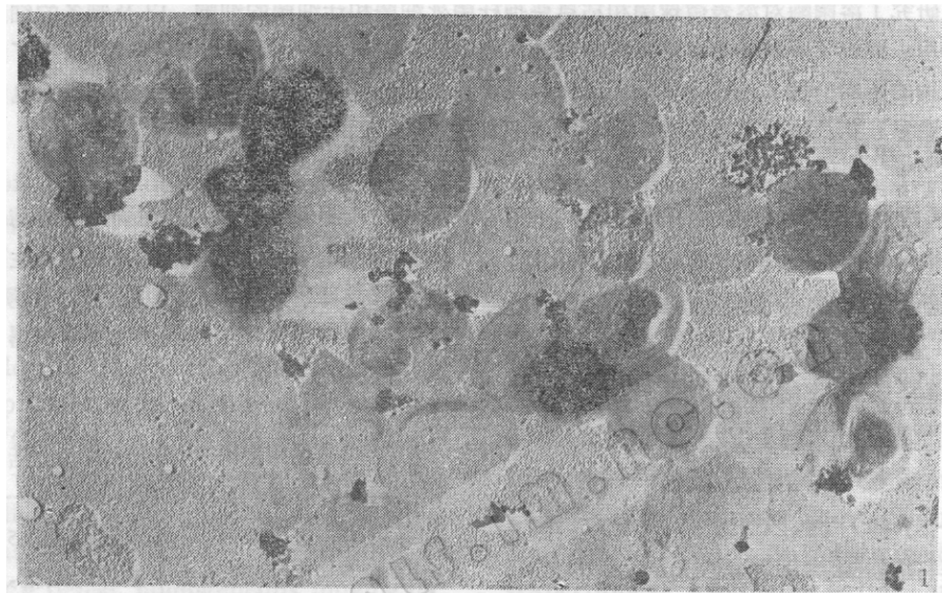


图 1 小球菌细胞壁, 3000×2.5

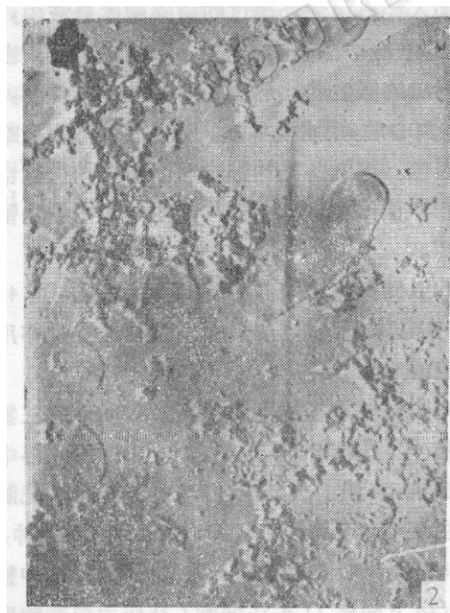


图 2 枯草杆菌细胞壁, 4000×

将此细胞壁作成的水封载片标本, 在偏光显微镜正交条件下(放大倍率 400×),

可以看到有明显的双折射现象。这是细胞壁的典型特征之一。

将制备出的细胞壁悬液滴在覆盖有火棉胶膜的载网上, 然后在电镜下用常规法^[5]作低分辨率的电子选区衍射。(根据经验, 这种实验不宜用 formvar 作支持膜, 否则会有背景干扰。)在电镜下观察到细胞壁时, 然后在该位置进行衍射, 另外在完全同样条件下对镀金的载网进行衍射, 作为对照。金的衍射图最内圈的直径 $D_{\text{金}}$ 所相应的间距 $d = 2.35 \text{ \AA}$, 它可以作为细胞壁衍射图的参比标准。可以看到细胞壁的衍射环很弱, 这是生物材料的特点。如果细胞壁衍射环最内圈的直径为 D_x , 其相应的间距为 d_x , 则有下列关系:

$$D_x : D_{\text{金}} = 2.35 : d_x$$

如两张衍射底片的放大倍数不同, 在计算

时要予以校正,使其测量比例一致,我们所
用金和细胞壁的底片分别作了 $2\times$ 和 $1.5\times$
的光学放大,因此校正系数值为 0.75 ;从金
和细胞壁的衍射图上分别量得其最内圈的
直径 $D_{\text{金}}$ (为 2.5 厘米),和 D_x (为 1.5 厘米),
代入上式即可求得 d_x :

$$d_x = \frac{2.35 \times 2.5 \times 0.75}{1.5} = 2.66 \text{ \AA}$$

可将这种其内圈相应间距约为 2.7 \AA 的衍
射图样作为壁的一种“指纹”。但是我们还
得到另外一种衍射图形,它不像是这种类
似于粉末法所得到的圆环,尚是点阵状。
从结构上看,这种衍射图代表的结构型式
是定取向的^[6],而圆环形的则是非定取向
的。由衍射图的这种差异也说明,同一菌
株的壁的构造有时颇有差别。在用金的衍
射图计算间距时要注意反比关系,那是因
为:

$$R = \frac{L\lambda}{d}$$

其中积 $L\lambda$ 是暗箱常数, R 是由照片上量
得的半径,因此 R 愈大,则 d 愈小,亦即直
径 $D = 2R$ 愈大,则 d 愈小。

在下面的衍射图中,图3和图4是在
同一条件下摄得的,前者作 $2\times$ 的光学放

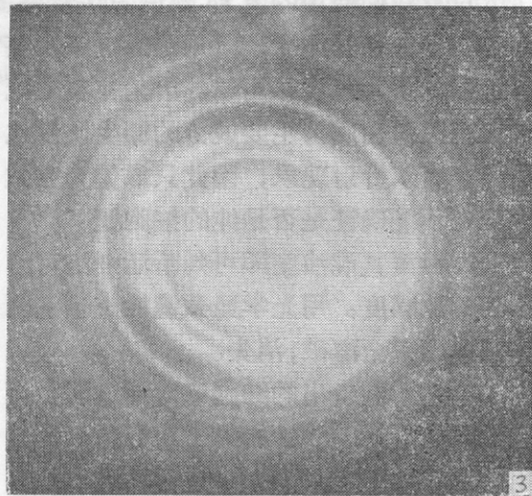


图3 金的衍射图

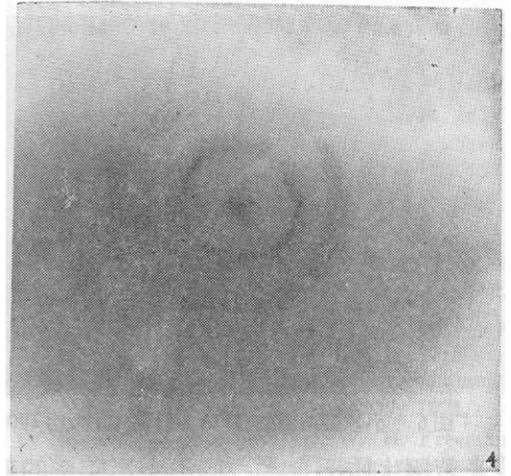


图4 细胞壁的衍射图,条件同图3,示非定取向结构

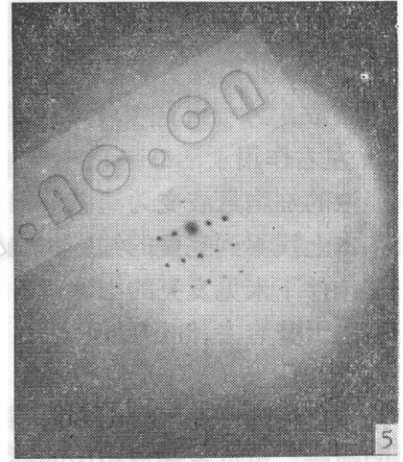


图5 细胞壁的衍射图,示定取向结构

大,后者作 $1.5\times$ 的光学放大,计算时校正
了放大倍数;由于图5与前两图摄影条件
不同,只能做定性观察之用,不能计算,不
能据此进行定量比较。

2. 活菌体在偏光显微镜正交情况下无
双折射现象,这可能是含有丰富水份的原
生质掩盖了壁的双折射所致。

3. 用TCA法制取的完整细胞,在进
行电子衍射时不透明,无衍射环,但在偏光
显微镜下,在正交条件时有明显的双折射,
从这点看来它具有介于壁及活细胞之间的
特性。我们做了它的环氧树脂包埋的超薄
切片,可以看到细胞内有收缩了的不饱满
的原生质。由于TCA法制取的是干粉,

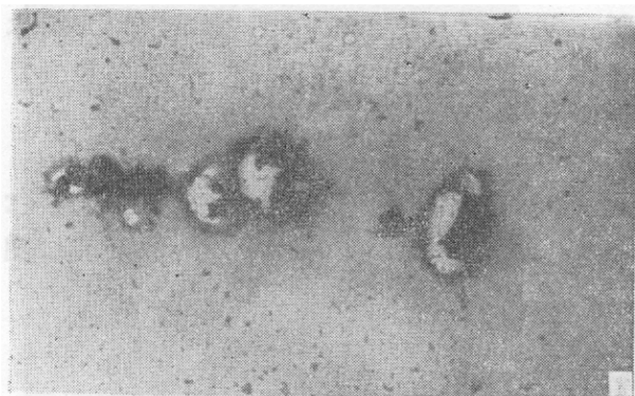


图6 小球菌细胞的 TCA 法干粉切片,约 10000 \times

看来若原生质不含水,则不会影响壁的双折射现象。

溶菌酶对壁的作用

1. 用终浓度为 4 微克/毫升的溶菌酶,在 pH 7.0 左右作用于活细胞,5 分钟内即可见到混浊的细胞悬液变为清澈。相差显微镜检基本上找不到完整的细胞,偏光显微镜正交条件下未见发亮的细胞壁。这表明活细菌由于壁溶去,细胞已经溶破,甚至消失。

2. 用和上述终浓度相同的溶菌酶作用于制备的纯壁,可见点滴反应中的悬液变清,在偏光显微镜正交条件下,基本找不到有双折射的碎块。从反应上看它的情况相同于活细胞。

3. 用终浓度为 4 微克/毫升的溶菌酶液处理 TCA 法获得的细胞干粉,结果悬液不太清澈,表明细胞干粉的破坏不完全,而经显微镜检确有残留物。因此我们对作用后的干粉样品用扫描电镜作了检查,由图 6 中可以看出,在干粉中细胞集成团块,因此一部分干粉很难被溶菌酶作用到。这可由枯草杆菌杆状细胞的一些蜂巢状残余及其完整细胞(像手指一样竖立着)的存在得以看出图 7。可知正是由于聚集状态才造成了菌粉对酶的不敏感。

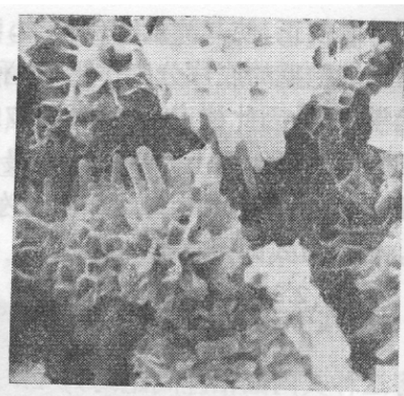


图7 枯草杆菌在溶菌酶作用后的扫描电子显微照片,材料经转靶投金。3000 \times

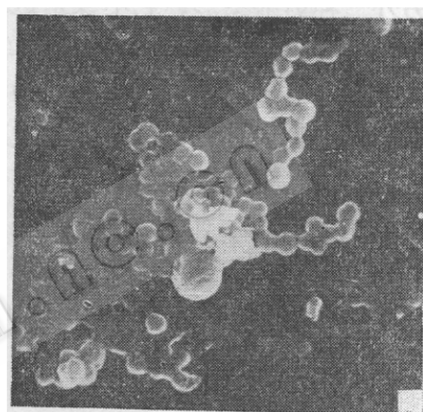


图8 小球菌在溶菌酶作用后的扫描电子显微照片,材料制法同上,本照片所用的溶菌酶系我组自行由细菌中提取的,可以见到在溶破的中间状态的膨大细胞。

3000 \times

结 论

1. 从我们使用的各种测试方法看来,检查制备细胞壁纯度,以用透射电镜观察镀铬制片最为直观和可信。因为完整的死细胞在以蛋白质为主要成分的原生质脱水后仍会有双折射现象,因此只靠偏光显微镜检查不能确证是否是纯的细胞壁。

2. 目测其混浊度即可判断活细胞对溶菌酶的敏感度。用光学显微镜检查也证明细胞确已完全溶破,消失。

3. 由于制备出的细胞壁薄而透明,而且量很少,用“单色”的电子束衍射最为合用。从它的“指纹”看来,有时构造的取向是不定向的,有时是定向的,由于我们所用

的培养物没有同步化, 尚不能找出其规律性。但至少可知纯壁也不是均一的。

4. 从对溶菌酶的敏感性看来, 活细胞及纯壁最为敏感, 我国习惯用活菌体作为底物非常合理。另外我们看到 TCA 法制备的干菌粉要差一些, 这可能与它们聚集成团有关。从扫描电镜照片中可以直观地看出, 若菌粉能预先适当分散, 看来应能代替活细胞作为底物而使用。

参 考 资 料

[1] Burrow, W. et al.: Textbook of Micro-

biology, 18th ed., W. B. Saunders Co., p. 49—59, 1963.

[2] Brock, T. D.: Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., p. 36—43, 1974.

[3] Yoshimoto, T. et al.: Agr. Biol. Chem., 35: 1775—1782, 1971.

[4] 徐浩、江慧修等: 微生物学报, 15: 31—36, 1975.

[5] Reimer, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs-und Präparationsmethoden, 2te Auf., Springer Verlag, s. 85—143, 1967.

[6] van Holde, K. E.: Physical Biochemistry, Prentice-Hall Inc., p. 221—239, 1971.

[7] Stryer, L.: Biochemistry, W. H. Freeman and Company, p. 754—766, 1975.

COMPARATIVE STUDIES ON THE EFFECTS OF LYSOZYME TOWARDS THE VARIOUS OCCURENCE STATES OF THE CELL WALL OF BACTERIA

Microbial Cell Biology Research Group, The Institute of Microbiology,
Academia Sinica

(Beijing)

The effects of lysozyme towards the living or dead cells and isolated wall of *Micrococcus lysodeikticus* and *Bacillus subtilis* were studied. Purity of the isolated cell wall were investigated. The nonhomogeneity of the cell wall structure was confirmed with the "finger prints" showed by the diffraction patterns. The

limitation and availability of polarizing microscopic method for detecting the birefringence of the cell wall were discussed. The scanning electron-micrographs gave the clue to the low sensitivity of the TCA treated cell powder to lysozyme action.