

沙眼衣原体被膜和细胞壁分离纯化 及其结构的初步研究

胡朝彬

(中国科学院动物研究所,北京)

张友逊 孟宪敏 张利华 苏华

(北京市眼科研究所,北京)

通过强超声处理,酶水解和差速离心等步骤分离了纯化过的沙眼衣原体 TE-55 细胞的被膜和细胞壁,并以 5—50% 泛影葡胺密度梯度离心加以纯化,区带界面清楚、稳定,重复性较好。对完整细胞和分离成份的超薄切片、冰冻断裂及蚀刻和负染标本进行的电镜观察表明:被膜一般分为三层,负染的细胞壁中见到规则的、排列紧密的直径约 28 毫微米的亚单位,完整细胞经冰冻蚀刻后也有类似的六角形突起。初步对被膜和细胞壁的多肽组份进行了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。对比并讨论了该种膜与革兰氏阴性细菌膜的异同。

沙眼衣原体最初由我国汤飞凡等^[1]用鸡胚卵黄囊接种分离成功。近年来发现它不仅可感染眼部,而且能引起泌尿生殖道疾患。

衣原体是一类特殊的原核细胞,它和自由生活的细菌有许多相似之处,但又营绝对细胞内寄生生活,这必然会影响到它的结构,特别是被膜结构。弄清它的被膜的结构以及有无细菌性的细胞壁,对确定它与细菌的相似性和分类地位,探讨它的复制原理,研究它与宿主细胞的关系等,都有重要意义。

材料和方法

(一) 衣原体的培养及纯化

沙眼衣原体选用 TE-55 株,按汤飞凡等^[1]方法进行培养。接种含 TE-55 之卵黄囊膜悬液于 7—8 日龄的鸡胚卵黄囊内,4 日后鸡胚开始规律死亡,无菌手续收取濒死鸡胚之卵黄囊膜, -40℃ 保存备用。纯化系按改进的 Howard^[2]之方法进

行。将低温保存之卵黄囊膜以等体积 0.01M pH 7.2 PBS 作成 50% (克/毫升) 悬液,经高速匀浆后,以 12,000 × g 离心 1 小时浓集,沉淀经差速离心初步纯化。将粗产品以原体积 40% 之 PBS 作成 250% (按起始卵黄囊膜重量计) 悬液,加到 30% 泛影葡胺液上,25,000 × g 离心 2 小时,收集沉淀,以 PBS 洗涤 2 次。

(二) 膜的制备

以 PBS (0.02M pH7.2, 下同) 将纯化衣原体作成浓度为 5 毫克蛋白质/毫升之悬液(此时之体积为原体积)。以 20 仟赫,200 瓦超声波细胞破碎机处理 6 分钟(冰水浴,每 2 分钟停一次,以利冷却),3,000 × g 离心 10 分钟,收集上清液。将沉淀再以原体积 PBS 制成悬液,同上超声并离心,收集上清。合并二次上清,50,000 × g 离心 30 分

本文于 1979 年 4 月 30 日收到。

河北新医大学电镜室及组织教研组协助冰冻蚀刻等电镜工作。

中国科学院生物物理研究所电镜室协助拍摄部分电镜照片。

承张晓楼、李荣德先生审阅文稿,特此一并致谢。

钟,将沉淀用含 0.01 M $MgCl_2$ 之 PBS 制成悬液(至原体积),加入适量 RNA 酶及 DNA 酶(各为 0.1 毫克/毫升),37°C 保温(电磁搅拌)30 分钟,50,000 × g 离心 30 分钟,收集沉淀,以 PBS 洗 3 次,得初步提纯被膜。取 1/2 初步提纯被膜置于 1/2 原体积 PBS 中,加入适量胰蛋白酶(1 毫克/毫升),以 NaOH 液调 pH 至 7.8,37°C 保温(电磁搅拌)30 分钟,50,000 × g 离心 30 分钟,收集沉淀,以 PBS 洗 3 次,得初步纯化的细胞壁。将初步提纯被膜及细胞壁分别以 PBS 作成浓度为 10 毫克蛋白质/毫升之悬液,200 瓦,20 仟赫超声 30 秒。取样品各 0.5 毫升分别加于 5—50% 泛影葡胺(meglumine diatrizoate)连续密度梯度液上,(西德 OMEGA-70 型离心机,离心管内径 1.5 厘米,长 10 厘米)40,000 × g 离心 2 小时,分段收集,被膜及细胞壁部分以 PBS 洗二次,得纯产品。

(三) 电镜标本制作

1. 超薄切片:按 Howaston 法^[4],以 2% 戊二醛和 1% O_2O_4 双固定,包埋于 EPon 812 树脂中。LKB 切片机制片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染。

2. 负染:按常规操作,以 2% 磷钨酸(pH7.0)为染液。将样品与染液混合后滴到铜网上,空气干燥。

3. 冰冻断裂及蚀刻:纯化的衣原体以 1% 戊二醛(pH7.2)固定 10—15 分钟,切成 2—4 毫米立方大小,以 0.01M pH7.2 PBS 洗 3 次,放入 4°C 冰箱备用。切片前 2 小时加入甘油,使最后浓度达 40%,经氟利昂-22 和液氮双重冷冻或直接以液氮冷冻。以 HF2-1 型冷冻复型机制样。真空度为 2×10^{-3} 托蚀刻温度 -100°C 或稍高,蚀刻时间半分至一分钟。

(四) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳基本按 Weber 等^[5]连续系统方法进行。样品处理:经纯化的被膜及细胞壁分别悬于含 1% SDS、1% 巯基乙醇的 0.01M pH7.2 磷酸缓冲液中,使其浓度为 4 毫克蛋白/毫升,37°C 保温 2 小时,或 100°C 煮 10 分钟,以使蛋白质溶解,用前加蔗糖至 10%。凝胶浓度 10%,Aa:Bis=37:1。玻璃管内径 4 毫米,长 10 厘米,每管加样 15 微升。电泳在室温下进行,开始电压为 20—30 伏(电流 3 毫安/管),半小时后,使电压升至 60—70

伏(电流 7 毫安/管),电泳时间为 3—4 小时。按 Chopra 法^[6]以 0.05% 考马斯亮蓝液染色及以异丙醇-乙酸液脱色。

结 果

一、被膜和细胞壁分离纯化

当细胞悬液浓度为 2—5 毫克蛋白质/毫升时,以 20 仟赫,200 瓦强超声处理,2 分钟后出现明显破坏,6 分钟后绝大多数细胞发生程度不等的破坏。此时,镜检仅偶见未破坏的细胞。经 5—50% 泛影葡胺密度梯度离心纯化后,产品基本纯净(图版 I-2、3)。区带稳定。

二、电子显微镜观察

原体感染后通过一个复杂的发育周期,收集感染后 4—8 天的材料,经纯化,虽然总体看来以原体居多,但仍混有不同形态结构细胞(图版 I-1)。大型及小型细胞分别以网状体(RB)与原体(EB)称之,RB 直径在 0.6 微米以上,大的可超过 1 微米。被膜一般为连续的双层膜,内外二层膜间的距离不尽相等,有些甚至紧缩成单层样。EB 直径多在 0.3—0.5 微米之间,也有稍大及稍小者。细胞浆里电子密度最大的部分往往偏于细胞的一边,被膜也是双层,两高电子密度层,间以一狭而均匀的低电子密度层。介于上二者之间的,有些作者^[7]称之为中间体(I)。Higashi 等^[8]曾将鹦鹉热原体的非典型网状体和原体区分为浓缩型和弥散型,这些是发育周期中出现的特殊形态,在大小和内含物的浓密程度上有些差别。

自图版 I-3 下可以清楚地看到,经强烈超声处理及胰酶水解后的细胞壁规则地排列着紧密相邻的亚单位,它们之间的距离平均约为 17 毫微米。此外,还可见到呈六角形,中心有一致密圆点的结构。在某些折叠处,这种结构显得更为清楚(图版

I-3 右下角)。它们彼此独立, 轮廓清楚, 无公用的边, 直径约为 28 毫微米, 中心间距约 50 毫微米(图版 I-3)。上述两种结构, 在完整细胞上不可见, 在未经胰酶处理的被膜上不清晰(图版 I-2)。

为进一步了解细胞的表面结构, 进行了细胞的冰冻断裂及蚀刻。与某些只有光滑外表面的细菌不同, 该种细胞表面分布着许多直径为 8—9 毫微米的小颗粒(图版 II-1、3)。图版 II-6 箭头处可见凹面的平滑面上有一种饰钉样突起。图版 II-4、5 示六角形亚单位结构(双箭头), 由六个较小的颗粒按六角形围绕着一个稍大的颗粒而成, 其平均直径为 30 毫微米, 这些突起又按六角形排列, 它们中心点之间的距离约为 60 毫微米, 此特殊结构似乎只在凹面某些区域出现, 切到的机会不多。图 II-2 显示分裂中的网状体, 表面颗粒明显可见。

三、膜蛋白电泳分析

被膜及细胞壁蛋白质在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中可分成 7—8 条带, 4—5 条较清楚。其中分子量为 45,000 的一条

含量最高, 在纯化过的细胞壁(I)中比相应的被膜(II)中者为高, 水解酶不能去掉它, 图 1。

讨 论

一些作者在分离鸚鵡热衣原体的被膜和壁时, 采用 Manire 等^[9]的方法, 即在 Mickle 震荡器中加入玻璃珠破坏细胞, 以蔗糖密度梯度离心分离, 再行酶处理以进一步纯化。我们曾尝试以 X 压, 或加玻璃珠超声以破碎沙眼衣原体, 效果都不甚好。看来沙眼衣原体比普通细菌更难破碎。直接使用强超声, 往往由于破碎程度不一, 在密度梯度离心时, 区带位置不能完全重复。但如能严格控制实验条件, 则可得到明确稳定的区带。要注意超声时间和悬浮液浓度的关系。在纯化细胞被膜和壁时, 我们选用密度大而粘度较小且能较好保存样品活性的碘化物为梯度离心介质, 所得产品纯度较好。

洪涛等^[2]进行过沙眼病毒形态的电子显微镜观察。目前一般将衣原体与革兰氏阴性细菌加以类比, 细胞壁的存在是主要考虑因素之一。革兰氏阴性菌的被膜为复杂的多层次结构^[10], 在细胞质膜与外膜之间为电子密度高的含肽聚糖层。衣原体在发育过程中具有多形态的特点, 被膜的层次少, 厚度小, 是否有如革兰氏阴性菌那样明确的肽聚糖层, 有待进一步探讨。

在革兰氏阴性菌的细胞壁中, 有一层规则排列的亚单位结构^[11, 12], 这是一种有用的标志结构, 在部分细菌中, 已证明为蛋白质^[13, 14], 位于肽聚糖层外侧并与之相连, 其紧密程度可因各菌而有差异。与细菌不同, Matsumoto 等^[15]在鸚鵡热衣原体 EB 细胞壁的铂镑合金投影标本上, 看到这种结构位于细胞壁的内表面, 认为有助于维持细胞的形态。我们在沙眼衣原体 EB 细胞

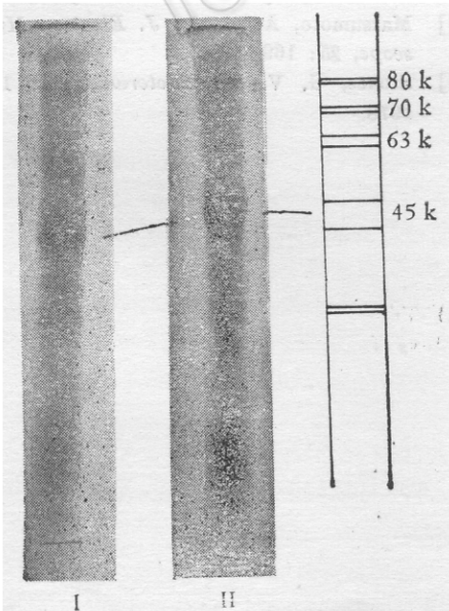


图 1 膜肽 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

壁的负染片上也看到这种规则排列的亚单位结构, 由于它在完整细胞的负染片上不可见, 在未经酶水解的被膜的负染片上不清晰, 可以认为它不在细胞的外表面。

本实验在冰冻蚀刻片的凹面看到的饰钉样突起与贺岛等^[46]所见相仿, 但更细致(六个较细的颗粒按六角形围绕着一稍大的颗粒)。贺岛等认为这种结构存在于细胞壁的内表面, 即壁与原生质膜之间。继贺岛后不久, Matsumoto^[47]等在鸚鹑热衣原体 EB 的冰冻蚀刻片凹面也看到类似的突起。在进一步的工作中, Matsumoto^[48, 49]等还看到在该 EB 细胞的外表面也存在突起。Stokes^[20]在二氧化碳临界点干燥的标本上也看到 EB 表面存在着突起, 它们分布于特定部位(与核物质新月面相对处), 这些特殊结构之间的关系如何, 以及它们有什么功能, 还不清楚。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的初步结果显示, 沙眼衣原体的被膜及细胞壁中含量最高的蛋白质之分子量为 45,000, 大肠杆菌等革兰氏阴性菌被膜数种主要蛋白质中以分子量 44,000 者含量最高, 二者较为接近。这是说明二者可以类比的又一例证。

参 考 文 献

[1] 汤飞凡等: 中华医学杂志, 75:429, 1957。

- [2] 洪涛等: 微生物学报, 13(2):91-101, 1973。
 [3] Howard, L. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27: 102, 1974.
 [4] Howaston, A. F.: *Fundamental Techniques in Virology*, Academic Press, 1969.
 [5] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406, 1969.
 [6] Chopra, R. W. et al.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6: 397, 1974.
 [7] Costerton, J. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 21: 1448, 1975.
 [8] Higashi, N.: *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 3: 35, 1964.
 [9] Manire, G. P. et al.: *J. Bacteriol.*, 94: 1178, 1967.
 [10] Freer, J. H. et al.: In *Microbial Toxins* (Weinbaum, G. et al. ed, Vol. 4, Academic Press, New York, 1971, pp. 67-126.
 [11] Glauert, A. M. et al.: *J. Cell Sci.*, 8: 19, 1969.
 [12] Margaret, J. et al.: *J. Bacteriol.*, 118: 654, 1974.
 [13] Brinton, C. C. et al.: *Bact. Proc.*, 1969, p. 48.
 [14] Rosenbush, J. P.: *J. Biol. Chem.*, 294: 8019, 1974.
 [15] Matsumoto, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 104: 1332, 1970.
 [16] 贺岛正博等: 日眼会志, 77:1184, 1973。
 [17] Matsumoto, A.: *J. Bacteriol.*, 116: 1355, 1973.
 [18] Matsumoto, A. et al.: *Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ.*, 18: 51, 1975.
 [19] Matsumoto, A. et al.: *J. Electron Microscope*, 25: 169, 1976.
 [20] Stokes, G. V.: *J. Bacteriol.*, 133: 1514, 1978.

PRELIMINARY STUDIES ON THE PURIFICATION OF ENVELOPE AND CELL WALL OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AND EXAMINATION OF THEIR STRUCTURE

Hu Chao-bin

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

Zhang You-xun Meng Xian-min

Zhang Li-hua Su Hua

(*Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing*)

The envelope and cell wall of purified *Chlamydia trachomatis* TE-55 were prepared by ultrasonic treatment, enzymic digestion and differential centrifugation. 5—50% meglumini diatrizoici density gradient centrifugation was used for their purification. The reproducible bands of envelope and cell wall was obtained.

Ultra-thin sections and freeze-etched preparations of intact cells, and negatively stained envelope and cell wall, were examined by electron microscope.

The envelope of the elementary bodies

was found to consist of three layers, as described by previous workers. Closely packed and regularly arranged subunits, about 28 nm in dimension, were observed in the cell wall. Other details of the cell fine structure were also described.

The polypeptide components of the envelope and those of the cell wall have also been analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The properties of membranes in *C. trachomatis* and Gram-negative bacteria are compared.