

# 沙眼衣原体冷冻蚀刻复型的电镜观察

张友逊\* 张利华\* 左娟娟\* 卢庆新\*\* 李荣德\*

1979年胡朝彬与张友逊等合作对沙眼衣原体原体细胞壁的超微结构作了初步观察<sup>[1]</sup>。1980年我们发表了应用透射电镜观察沙眼衣原体原体被膜超微结构的研究报告<sup>[2]</sup>。为了获得进一步的结果,我们反复对纯化的沙眼衣原体和感染沙眼衣原体的鸡胚卵黄囊膜的冷冻蚀刻复型进行了电镜观察,为以前的研究报告提供了佐证和补充。

## 材料和方法

### (一) 衣原体的培养和纯化

选用沙眼衣原体 TF55 株,按汤飞凡等<sup>[3]</sup>方法在鸡胚卵黄囊中培养,按张友逊等<sup>[2]</sup>方法进行原体的纯化。

### (二) 样品预处理

1. 纯化沙眼衣原体沉淀块: 将衣原体沉淀切成约  $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$  的小块,用 2.5% 戊二醛液  $4^\circ\text{C}$  固定 2 小时。经 PBS 清洗(30 分钟 3 次)后,浸入 30% 甘油-PBS 液中,  $4^\circ\text{C}$  过夜备用。

还可直接用 15% 甘油-PBS 液将未经固定的沙眼衣原体沉淀作成浓悬液,  $4^\circ\text{C}$  过夜备用。

2. 感染衣原体的卵黄囊膜: 自新收取的卵黄囊膜上取充血明显部分,以 PBS 充分洗涤,卷成直径约 1mm 的细条,剪成长约 2mm 的小块后如 1 进行处理。

### (三) 复型膜制备

应用日立 HFZ-1 型冷冻断裂装置及 HUS-5 型真空喷镀仪,按仪器说明书并参考应国华等<sup>[4]</sup>方法制备复型膜。选用氟利昂 22 为样品预冷剂,断裂温度控制在  $-110 \sim -130^\circ\text{C}$  之间。  $-100^\circ\text{C}$  蚀刻 1—3 分钟。  $45^\circ$  角喷铂(2—3 次),  $90^\circ$  角喷碳(5—6 次)。断裂、蚀刻及喷镀时,真空度均优于  $10^{-3} \text{ mmHg}$ 。用 10% 次氯酸钠清除生物组织。用 400 目铜网捞取复型膜,干燥后观察。

### (四) 电镜观察

用 EM400 型电镜观察。工作方式: 透射。加速电压: 80kV 和 100kV。

## 结果与讨论

### (一) 细胞壁

复型中绝大部分表面完整的球形和长球形凸面——完整衣原体的表面光滑,其上仅可见散在的颗粒(图版 1-1)。在另一些凸面上,光滑表层的部分或大部剥脱,显露下方直径 14—16nm 的颗粒(图版 1-2)。这种颗粒有时排列紧密,与负染片中所见到的按六角形紧密排列的颗粒亚单位结构<sup>[1,2,5,6]</sup>十分相似,有时排列稀疏或成片剥脱(图版 1-3)。一些凹面也有疏密不等、大小相近的颗粒,与上述凸面恰成互补(图版 1-4)。它们可能是表层的内侧面。

偶尔自复型的凹面可以见到被膜的内外层间具有空腔,类似切片中的质壁分离。它与细胞壁相应的外侧壁内表面附有不甚密集的、直径约 10nm 的颗粒(图版 1-5)。

上述结果进一步证实了沙眼衣原体原体被膜的外表面为表面光滑的表层,表层下方直径约 14—16nm 的颗粒当为“壁体结构蛋白”亚单位<sup>[2]</sup>。推测它们彼此间的结合较脆弱,与下方结构间的结合也不太牢固,冷冻断裂时一部分留在原位,另一部分随表层被剥去,造成疏密不等的分布。“壁体结构蛋白”颗粒下方的结构也具有光滑的表面。尚难以判断它是怎样构成的。

自图版 1-5 中见到细胞壁的内表面也附有颗粒,可能也像细胞壁外侧那样构成一“结构蛋白”层。参照 Matsumoto 与 Manire<sup>[6]</sup> 和 Chang 等<sup>[7]</sup> 对衣原体细胞壁碎片镀铂样品的观察,我们认为这种可能性是存在的。

在冷冻蚀刻复型中,同样可以看到曾在负染和超薄切片中看到过的褶皱状凹陷<sup>[12]</sup>(图版 1-6),

本文于 1984 年 4 月 10 日收到。

\* 北京市眼科研究所。

\*\* 北京市理化分析测试中心。

在冷冻蚀刻复型膜制作过程中,承上海第一医学院电镜室陈细法、俞永富二同志帮助,谨此致谢。

从而进一步证明这种凹陷是沙眼衣原体细胞壁的固有结构。至少,在一部分个体中是如此。

### (二) 火山口状(饰钉状)突起<sup>[1,8-10]</sup>

与前报<sup>[1]</sup>大致相同,在表面光滑的凹面见到按六角形配布的突起。突起呈火山口状,多分布于凹面的局限部位,其直径约 30—35nm,相邻两突起的中心距为 50—60nm。突起的中央有直径约 6—9nm 的小坑,在小坑中未能见到更细微的结构。小坑的周围有小颗粒,往往连成一片,难以逐一辨认。每个突起所保留的颗粒数目多寡不一。在较为完整的突起中,5—6 个颗粒依稀可辨;而一些残缺严重的突起仅保留 1、2 个颗粒。另外,根据突起的分布情况,还可以判断有些突起完全缺失(图版 1-7、8)。一些大型个体也具有火山口状突起,甚至在直径达 0.8—1μm 的凹面上也可见到这种突起,它们与小型个体中的火山口状突起在形态上无差别。还可见到火山口状突起所在层与外壁的分层,两者间的间隙与超薄切片中所见的芽体相当,它们有自己的隔膜(图版 1-9)。

在一些布满直径约 10nm 颗粒的凸面上,有与火山口状突起相对应的凹陷(图版 1-7、10)。这种凹陷有时难以辨认。在未经戊二醛固定样品的复型中,更难以辨认。

上述凹面上按六角形配布的突起是衣原体被膜上的特有结构。Kajima 等<sup>[8]</sup>和 Matsumoto<sup>[9]</sup>均认为这种突起是细胞壁内表面上的结构,Louis 等<sup>[10]</sup>则判定它们位于原生质膜的 E 面(单位膜外侧类脂层的疏水面)。据图版 1-5 及图版 1-9 所示,我们也认为它们是原生质膜 E 面上的结构,其对应的凹陷则在原生质膜的 P 面(单位膜内侧类脂层的疏水面)。

鸚鵡热衣原体的冷冻断裂复型中所见到的火山口状突起较本文所示结构完整,排列也较整齐<sup>[9,10]</sup>。除了实验条件不同造成的差异外,似乎不能忽视衣原体的种间差异。我们认为:沙眼衣原体的火山口状突起是由多个小颗粒组成。这些颗粒相互之间和与原生质膜 E 面之间的结合不很牢固,在冷冻断裂时可被自 E 面掰去,从而出现结构上的缺损甚至整个突起的缺失。如果鸚鵡热衣原体的火山口状突起也由多个小颗粒组成,并假设它们相互间和与原生质膜 E 面的结合比沙眼衣原体牢固,则在复型上出现的火山口状结构自然

要完整些。

扫描电镜的观察表明,衣原体的外表面具有与火山口状突起相似排列的半球形突起<sup>[11-13]</sup>。但在多次对冷冻蚀刻复型的观察中,均未能见到此种结构<sup>[1,8-10]</sup>。我们进行了反复的观察,仅在一次观察中见到了类似结构。目前对这一现象难以作任何推测。

### (三) 繁殖

衣原体繁殖的三种方式<sup>[14]</sup>在复型中均可见到。一些大小与原体相同或稍大的个体显示出芽(图版 1-11)和二分裂(图版 1-12);在另一些个体的剖面还可见到内含子体(图版 1-13、14);图 15 显示的是一个直径 1,300nm 的巨大个体,它内含许多子体,与“多中心生发”的成熟阶段<sup>[15]</sup>相符。传统上认为只有那些比原体大得多的始体(网状体)才可以繁殖。现在我们在冷冻蚀刻复型中又一次见到一些与原体大小相同的个体正在进行繁殖,为“原体具有繁殖功能”<sup>[16]</sup>说提供了佐证。

此外,我们还在感染沙眼衣原体的鸡胚卵黄囊膜冷冻蚀刻的复型中见到了包涵体。它外包单位膜,各种大小的衣原体松散地分布在囊泡液中。包涵体紧靠细胞核,将核推向一旁。与光学显微镜下所见相符。

## 参 考 文 献

- [1] 胡朝彬等:微生物学报,20: 323, 1980.
- [2] 张友逊等:中国科学,1980年第7期,第712页.
- [3] 汤飞凡等:微生物学报,4: 189, 1956.
- [4] 应国华等:中华物理医学杂志,1: 28, 1979.
- [5] Manire, G. P.: *J. Bacteriol.*, 91: 409, 1966.
- [6] Matsumoto, A. and G. P. Manire: *J. Bacteriol.*, 104: 1332, 1970.
- [7] Chang, J. J., et al.: *J. Mol. Biol.*, 161: 579, 1982.
- [8] Kajima, M., et al.: *Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.*, 77: 1184, 1973.
- [9] Matsumoto, A.: *J. Bacteriol.*, 116: 1355, 1973.
- [10] Louis, C., et al.: *J. Bacteriol.*, 141: 868, 1980.
- [11] Matsumoto, A. and N. Higashi: *Annu. Rep. Inst. Virus Res. Kyoto Univ.*, 18: 51, 1975.
- [12] Gregory, W. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 138: 241, 1979.
- [13] Matsumoto, A.: *J. Bacteriol.*, 150: 358, 1982.

## 图 版 说 明

1—14. 纯化的沙眼衣原体: 1. 左上方个体表面完整、光滑, 上有少量分散颗粒( $\times 36,000$ ); 2. 光滑的表层大部分剥脱( $\times 82,000$ ); 3. 具有疏密不等的颗粒的凸面( $\times 46,000$ ); 4. 具有颗粒的凹面( $\times 48,000$ ); 5. 内层膜与外壁分离, 外壁内表面有不甚密集的颗粒( $\times 90,000$ ); 6. 褶皱状凹陷的横断面( $\times 91,000$ ); 7. 具有火山口状突起的凹面( $\uparrow$ )及具有与此突起相对应凹陷的凸面( $\uparrow\uparrow$ )( $\times 22,000$ ); 8. 具有火山口状突起的凹面( $\times 99,000$ ); 9. 内层与外壁间具有相当于芽体的腔( $\times 76,000$ ); 10. 具有与火山口状突起相对应凹陷的凸面( $\times 89,000$ ); 11. 出芽生殖( $\times 105,000$ ); 12. 二分裂生殖( $\times 66,000$ ); 13. 凹面上的小体( $\times 99,000$ ); 14. 凸面, 剖面可见小体( $\times 92,000$ )。 15. 大型繁殖体, 内含许多个子体( $\times 22,000$ )(自感染沙眼衣原体的鸡胚卵黄囊膜)。