

# 索氏甲烷丝菌的表面结构

郑 中 华

(中国科学院成都分院分析测试中心,成都)

张 辉

(农牧渔业部成都沼气科学研究所,成都)

用电子显微镜的负染色和冷冻蚀刻方法,观察了索氏甲烷丝菌的表面结构。索氏甲烷丝菌的细胞壁表面可见两种规则排列的结构,靠近细胞壁处是线状排列的蛋白质亚单位,每根线条宽约 8—14nm。在线状排列亚单位的上面,是呈四角形排列的蛋白质亚单位,每个亚单位直径约 9—14nm。比较了索氏甲烷丝菌与其它产甲烷细菌表面层结构的差异,对表面层蛋白质的特性和功能进行了讨论。同时,对索氏甲烷丝菌细胞质膜的内部结构进行了观察。

关键词 索氏甲烷丝菌;表面层;细微结构

许多细菌的表面都具有规则排列的结构。这种结构覆盖在细胞的最外部分,被称为表面层 (surface layer)。迄今为止,已有不少研究者运用生物化学技术和电子显微镜的超薄切片、冷冻蚀刻、金属投影以及负染色等技术,对多种细菌表面层的化学性质、细微结构进行了分析和比较<sup>[1-8]</sup>。结果表明,各种细菌的表面层通常由一种蛋白质或糖蛋白构成,分子量范围大约从 40,000 到 200,000。表面层蛋白质都具有类似晶体样的周期结构,各种细菌表面层的晶格排列不同,通常呈六角形、四角形(正方形、长方形)或斜形(线形)排列。对于古细菌的表面结构,也有一些研究,认为其晶格排列常常为六角形<sup>[9]</sup>。产甲烷细菌属于古细菌,关于其细胞表面层的结构已有一些观察<sup>[10-17]</sup>,但国内尚无这方面研究。作者运用负染色和冷冻蚀刻电镜技术,对索氏甲烷丝菌表面层的微细结构和细胞质膜的内部结构进行了观察。

## 材 料 和 方 法

索氏甲烷丝菌 (*Methanothrix soehngenii*) 系

从颗粒污泥的乙酸连续富集中获得。

实验采用两种电镜技术制备样品。负染色按常规方法进行<sup>[18]</sup>,冷冻蚀刻与常规方法略有不同<sup>[19]</sup>,即细菌冷冻前不经甘油保护,蚀刻时间为 2—4min,腐蚀液用 70% 的硫酸。上述样品均用 JEM-100CX 电镜,在 80kV 的加速电压,物镜光栏为 60μm 的条件下观察拍照。

## 结 果

索氏甲烷丝菌经磷钨酸染色后,细胞表面可见两种结构(图版 1-1)。一种是规则排列的横向条纹(图版 1-1、3),每根条纹宽约 8—14nm,条纹之间的距离约 1.5—2nm。在高放大倍数下,可见条纹是由许多较小的、形态不规则的亚结构形成。条纹之间可见一些颗粒和丝状结构,把条纹互相连在一起。在一些区域,一根条纹又分成几根更细的条纹,宽约 3nm。在这些条纹的上面,可见另一种由许多规则排列的亚单位形成的结构(图版 1-1),这些亚单位呈四角形排列,每个亚单位直径为 9—14 nm,亚单位中心到中心的距离为

本文于 1988 年 2 月 8 日收到。

12—14nm。从图版 I-1 可见,四角形排列的亚单位不止一层,重叠在一起显得较紊乱。此外,在培养液中存在一些碎片,这些碎片也是由四角形规则排列的亚单位构成(图版 I-6)。在高放大倍数下,这些四角形亚单位并不是均匀的,可见亚单位中央的电子密度较高,好像是一个个小孔。每个亚单位的边上有丝状结构,把亚单位连在一起(图版 I-7)。

当索氏甲烷丝菌经快速冷冻断裂蚀刻后,也清楚地暴露出细胞的表面。与负染色观察相似,可见细胞外表面是由规则排列的亚单位构成。亚单位呈四角形排列,直径约为 10—14nm。每个亚单位中心到中心的距离约为 14nm。在图版 I-2 中也可看出,四角形亚单位不止一层,有 2—4 层。

在冷冻蚀刻中还可观察索氏甲烷丝菌细胞质膜的内部结构,在质膜凸面(超薄切片中细胞质膜靠近细胞质的电子致密层)挤满直径约为 10—14nm 的球形蛋白质颗粒,颗粒排列紧密(图版 I-4)。在质膜凹面(超薄切片中质膜靠近细胞壁的电子致密层)上,随机分布着一些蛋白质颗粒,颗粒直径约 8—12nm,颗粒排列稀疏。此外,质膜凹面上还有许多浅坑,这与质膜凸面上的颗粒基本互补(图版 I-5)。在超薄切片中我们已看到,索氏甲烷丝菌的细胞质膜较厚,双轨层不对称<sup>[18]</sup>,质膜的结构与已描述的产甲烷细菌<sup>[20]</sup>十分不同。在冷冻蚀刻中,索氏甲烷丝菌的细胞质膜断面上,蛋白质颗粒较大,排列很密,也与其它产甲烷细菌有一定差别。

## 讨 论

多数产甲烷细菌的表面层为糖蛋白。König 等分析了两株从鸡粪便中分离到的产甲烷细菌的表面层蛋白质,其分子量分别是 145,000 和 112,000<sup>[19]</sup>。NuBer 和

König 分析了三株甲烷球菌的表面层蛋白质,其分子量大约是 60,000, 82,500 和 90,000<sup>[17]</sup>。我们在电镜下观察到的表面层规则结构,为蛋白质亚单位。多数细菌的表面层仅由一种排列的亚单位构成,已报道的产甲烷细菌中,除斯氏甲烷球形菌(*Methanospira stadtmaniae*)<sup>[21]</sup>等少数菌表面无特殊结构外,其它菌表面层都由同一排列的亚单位构成,亚单位呈六角形排列。其中卡里亚科产甲烷菌(*Methanogenium cariaci*)和黑海产甲烷菌(*Methanogenium marisnigri*)六角形亚单位的直径是 14 nm<sup>[11]</sup>,栖泥甲烷扁平菌(*Methanoplanus limicola*)六角形亚单位中心到中心的间距是 14nm<sup>[12]</sup>,万尼氏甲烷球菌(*Methanococcus vannielii*)、热无机营养甲烷球菌(*Methanococcus thermolithotrophicus*)和简氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)六角形亚单位中心到中心的距离分别是 10.8 nm, 9.8nm 和 10.5 nm<sup>[17]</sup>。而我们观察的索氏甲烷丝菌的表面层蛋白质亚单位为两种排列,横向条纹是蛋白质亚单位呈线状排列。在细胞质发生收缩的细胞壁上,经负染色能清楚地看见此结构。这种条纹结构在亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatii*)<sup>[22,23]</sup>和其它产甲烷丝菌<sup>[24,25]</sup>的细胞表面也能观察到。这些条纹是由更小的亚单位排列形成,每根条纹围在细胞表面形成环,状似桶上的箍。许多箍紧紧地排列在一起,形成一管形蛋白质外壳,细胞被包围在这个壳内。这种蛋白质外壳与细胞壁不一样,不是分别封住每个细胞,而是一管状套子,包围在整个细胞链的外面。在产甲烷螺菌和甲烷丝菌的细胞表面都具有这种独特的外壳结构。在索氏甲烷丝菌细胞的表面还可见呈四角形排列的蛋白质亚单位。此种亚单位在线状排列亚单位的上面,覆盖在细胞最

外面。在负染色中可看到,四角形排列的亚单位容易从细胞表面脱落。在图版 I-1 中就可以看出,多数四角形亚单位已消失了。在老龄细胞中,往往细胞壁表面只见条纹结构。索氏甲烷丝菌细胞表面的这种四角形排列的亚单位,在产甲烷螺菌和其它种产甲烷丝菌的表面未观察到,也与其它产甲烷细菌表面层蛋白质亚单位仅呈六角形排列不同。我们观察结果表明,索氏甲烷丝菌表面层的结构是独特的,不同于以往关于表面层结构的报道。Hollaus 和 Sleytr 曾指出,表面亚单位排列的差别,可以作为区分两个种类关系很密切的菌株间的一个附加分类学特征。根据索氏甲烷丝菌表面蛋白质的排列,可以将它与其它产甲烷细菌区别开。

Sleytr 等曾做过实验,当细胞壁的表面用尿素处理,细胞的表面层就消失了。当细胞壁抽提物经过透析,然后加入  $MgCl_2$ ,于室温放置,被分离的表面蛋白质又自发地装配在一起。在电镜下,我们也观察到培养液中存在一片片独立的由四角形亚单位形成的结构,这些亚单位的大小和排列阵式与在细胞壁表面上所见的相同。说明从细胞表面分离下的表面蛋白质,不是游离地存在于培养液中,而是自发地组装在一起,这种组装不需要能量和酶。由此可以看出,细菌表面层的蛋白质也具有生物大分子的重要特性,具有自发地组装成高级结构的能力。

关于细菌表面层的功能研究得不多,而要阐明表面层蛋白质的功能,搞清表面蛋白质的空间结构是很有必要的。各种蛋白质分子的多肽链在三维空间上都有其特定的走向与排列。我们在电镜下观察了索氏甲烷丝菌表面蛋白质亚单位的形态和排列情况,可见亚单位形态一致,排列规则,各个亚单位之间通过细丝彼此相联。四角

形排列亚单位中央的小孔,有类似一些酶分子的空间结构,由于肽链的盘旋、折叠,形成一个凹形的夹攻底物的活性部位。由于表面蛋白质位于细胞的最外面,推测它可能是细胞与其环境之间相互作用的结果。它可能是维持细胞形态的一种支撑结构,当细胞从这种蛋白质外壳中伸出时,就不能维持原来的形态。它也可能对细胞内外物质交换起屏障作用,对细胞识别、附着起促进作用。关于表面层蛋白质的功能,及其空间结构与功能的关系,有待进一步研究

## 参 考 文 献

- [1] Weiss, R. L.: *J. Bacteriol.*, **118**: 275—284, 1974.
- [2] Sleytr, U. B. et al.: *ibid.*, **126**: 377—383, 1976.
- [3] ———: *J. Ultrastruct. Res.*, **55**: 360—377, 1976.
- [4] Küpcü, Z. et al.: *FEBS Lett.*, **173**: 185—190, 1984.
- [5] Sleytr, U. B. et al.: *Arch. Microbiol.*, **146**: 19—24, 1986.
- [6] Miller, K. R. et al.: *ibid.*, **146**: 111—114, 1986.
- [7] Wahlberg, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**: 75—79, 1987.
- [8] Paul, M. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 202—210, 1984.
- [9] Sleytr, U. B. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, **7**: 310—313, 1986.
- [10] König, H. et al.: *ibid.*, **8**: 159—162, 1986.
- [11] Romesser, J. A. et al.: *Arch. Microbiol.*, **121**: 147—153, 1979.
- [12] Wildgruber, G. et al.: *ibid.*, **132**: 31—36, 1982.
- [13] Jones, W. J. et al.: *ibid.*, **136**: 254—261, 1983.
- [14] Zabel, H. P. et al.: *ibid.*, **137**: 308—315, 1984.
- [15] Van Bruggen, JJA. et al.: *ibid.*, **144**: 367—374, 1986.
- [16] Zellner, G. et al.: *ibid.*, **147**: 13—20, 1987.
- [17] NuBer, E. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **33**: 256—261, 1986.
- [18] 郑中华等: *微生物学报*, **27**(1): 1—5, 1987.
- [19] 郑中华等: *微生物学报*, **28**(4): 295—300, 1988.
- [20] Zeikus, J. G.: *Bact. Rev.*, **41**: 514—541, 1977.
- [21] Miller, T. L. et al.: *Arch. Microbiol.*, **141**: 116—122, 1985.
- [22] Ferry, T. J. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**: 465—469, 1974.

- [23] Zeikus, J. G. et al.: *J. Bacteriol.*, 121: 373—380, 1975.  
[24] Zehnder, A. et al.: *Arch. Microbiol.*, 124: 1—

- 11, 1980.  
[25] Beveridge, T. J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 32: 703—710, 1986.

## THE ULTRASTRUCTURE OF THE SURFACE LAYER OF *METHANOTHRIX SOEHNGENII*

Zheng Zhonghua

(Analysis and Testing Center of Chengdu Branch of Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

Zhang Hui

(Chengdu Biogas Research Institute of Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery China, Chengdu)

The structure of surface layer of *Methanothrix soehngeni* was examined by electron microscopy of freeze-etching and negative staining preparations. Two types of crystalline protein array can be observed in *Methanothrix soehngeni*. One consisted of a series of closely arranged striation. Each striation was about 8 to 12 nm wide. On these striations, there were tetragonally arranged protein subunits. Each subunit diameter was about 9 to 14 nm. The striation structure of cell surface of *Methanothrix soehngeni* was

similar to that of *Methanospirillum hungatii* and *Methanothrix concillii*, but tetragonally arranged subunit of cell surface was entirely different from other all methanogens. This observation showed that the structure of surface layer of *Methanothrix soehngeni* was unique and was different from previous reports.

### Key words

*Methanothrix soehngeni*; Surface layer; Ultrastructure

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

1. 索氏甲烷丝菌的负染色照片, 可见细胞表面规则排列的条纹和四角形排列的亚单位。2. 细胞表面的冷冻蚀刻照片, 可见几层四角形排列的亚单位。3. 规则排列条纹的放大相。4. 细胞质膜的凸断面, 可见上面密布蛋白质颗粒。5. 细胞质膜的凹断面, 上面蛋白质颗粒稀疏。6. 培养液中碎片的负染照片, 可见呈四角形排列的亚单位。7. 四角形排列亚单位放大相, 可见亚单位中央有小孔, 周围有细丝相连。

1. Negative stained micrograph of *Methanothrix soehngeni*, showing regularly arranged striation and tetragonally arranged subunits of cell surface. 2. Freeze-etched micrograph of tetragonally arranged subunits. 3. High magnification view of the striation. 4. Freeze-etched micrograph of convex surface of the plasma membrane. 5. Freeze-etched micrograph of concave surface of plasma membrane. 6. Negatively stained fragment, showing the tetragonally arranged subunits. 7. High magnification view of the tetragonally arranged subunits, showing small holes and fine fibrils between subunits.