技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0393-03

不同细菌浓度及离心条件对大肠杆菌透射电镜观察的影响

王 红[1],范京川[1],徐 晨[2],曾 庆[3],肖 虹[4]

(1.重庆医科大学生命科学研究院;2. 重庆医科大学基础医学院干细胞与组织工程研究室;3. 重庆医科大学公共卫生学院统计教研室;4.重庆医科大学公共卫生学院卫生检验教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨不同的光密度(Optical density,OD)值、离心速度及时间对大肠杆菌透射电镜样品制备及超微结构观察的影响。方法:按照正交试验设计原则,将不同 OD_{600} 值的大肠杆菌分成 9 个不同的离心速度和时间组,比较各组制样难度及电镜下超微形态及纵、横切面比的变化。结果:各种 OD_{600} 值和离心条件对大肠杆菌超微结构影响不大,但 OD_{600} 值为 0.8,离心时间为 15 min 时,样品中细菌多呈纵切形态而更适宜观察分析。结论:离体培养大肠杆菌透射电镜样品制备及观察的最佳 OD_{600} 值为 0.8,离心时间为 15 min,离心速度为 5 000 ~ 12 000 r/min。

【关键词】大肠杆菌;图像分析;样品制备;超微结构;电镜

【中国图书分类法分类号】R329.2;Q249 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-17

The influence of different concentration and centrifugal parameters on TEM sample preparation of *Escherichia coli*

WANG Hong, et al

(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influences of different OD value and centrifugal parameters on the ultrastructure of *Escherichia coli* in order to find out the best OD value, speed and time of centrifugation. *Methods*: According to orthogonal experimental designing principle, the *E. coli* with different OD_{600} values are divided into 9 different groups of centrifuge speed and time. The changes of *E. coli* morphology in each group at different OD_{600} value, centrifuge time and speed were compared under transmission electron microscope. *Results*: The different OD_{600} values and centrifugal parameters have little influence on the ultrastructure of *E. coli*, but when the OD_{600} value at 0.8, centrifuge time at 15 min, the cross-section ratio was significantly higher than other groups and was more suitable for observation. *Conclusion*: The best parameter to prepare the TEM samples of *E. coli* is under the OD_{600} value at 0.8 and centrifugation time at 8 minutes and speed at 5 000 ~ 12 000 r/min.

【Key words】*Escherichia coli*; Image analysis; Sample preparation; Ultrastructure; Electron microscope

随着现代分子生物学技术和微生物学技术的发展,细菌被广泛应用于各种基因水平的研究。大肠杆菌作为外源基因表达的宿主,其遗传背景清楚、技术操作容易、培养条件简单、大规模发酵经济,因而倍受遗传工程的重视,成为目前应用最广泛,最成功的高效表达首选体系。虽然各种实验条件下大肠杆菌超微结构变化的研究已有广泛报道[1,2],但其透射电镜样品制备过程,不同的实验室则有各自的操作程序,迄今未见有关最佳观察效果的样品制备流程的研究报道[3]。由于纵切面能观察到杆菌的更多信息,因此我们希望视野中纵切面的比例能尽可能大。我们的前期实验表明,不同的离心速度和时间对培养细胞的透射电镜观察效果影响较大[4]。本文就大肠杆菌样品制备过程中涉及到的细菌浓度、离心速度和时间等几个关键环节进行系统研究,以寻求最佳的制样方法。

作者介绍:王 红(1962-),女,实验师

研究方向:医用电子显微镜技术。

基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB7271);重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ080317);重庆医科大学校级课题基金资助项目(编号:XBYB2008058)。

1 材料和方法

1.1 大肠杆菌的收集

大肠杆菌由我校公共卫生学院提供。当培养瓶中大肠杆菌的光密度 OD_{600}(Optical density,OD)值量达到 0.5、0.8、1.0 时,分别摇匀注入 15 支 10 ml EP 管中进行收集。

1.2 大肠杆菌的离心

根据影响大肠杆菌离心过程的影响因素(细菌 OD_{600} 值、

离心速度、离心时间），设计 3 因素 3 水平正交试验表。因素及水平如下：OD_{600} 值分别为 0.5、0.8、1；离心速度分别为 5 000、8 000、12 000 r/min；离心时间分别为 5、10、15 min。具体组合如表 1。

1.3 电镜样品制备

吸出 EP 管中上清液，加入预冷的 4%戊二醛，4℃固定 2 h 后，进行常规电镜样品固定、脱水和包埋，超薄切片后用于电镜观察。

1.4 电镜观察及图像分析

H-7500 透射电镜下观察各组样品大肠杆菌超微结构，8 000 倍随机拍摄 45 视野用于图像分析。采用北航 CM-2000B 病理图像分析系统计数视野中细菌数，并计算横切面与纵切面细菌的比例。

1.5 统计分析

通过 SAS 8.0 统计软件进行有重复正交实验设计资料的方差分析[5]。

2 结 果

2.1 OD_{600} 值、离心速度及时间对样品制备过程的影响

当细菌的 OD_{600} 值 <0.5、离心速度低于 5 000 r/min，5 min 时，无法收集到足够的细菌。当 OD_{600} 值≥0.5、离心速度达到 5 000 r/min，5 min 时可收集到足够的细菌，但细菌团块较松散，样品制备过程中容易散开，制样难度较大。随着 OD_{600} 值、离心速度和时间的增加，细菌团块越紧密，制样难度相应降低。当 OD_{600} 值 >1.0、离心超过 12 000 r/min，15 min 时，细菌团块体积和密度较大，从而影响制样过程中固定和脱水效果。

2.2 OD_{600} 值、离心速度及时间对大肠杆菌电镜观察的影响

电镜下显示，各组样品大肠杆菌的超微结构无明显差异，未见超微结构损伤。但视野中细菌的横切面和纵切面比例差别较大。第 5~7 组细菌横切面、纵切面各占 40%～60%，有利于超微结构观察；其余各组均以横切面为主（图 1）。

3 讨 论

目前有关大肠杆菌透射电镜样品制备流程中对于细菌浓度、离心参数等的选择多与操作人员的经验有关，缺乏详细的实验对比分析。有研究表明，细菌的 OD 值，可作为测量细菌浓度的有效指标[6]。本研究结果表明，不同的细菌 OD_{600} 值、离心速度和时间对大肠杆菌电镜样品制备的过程及观察视野中横、纵切面的比例影响较大。

实验数据表明，当细菌的 OD_{600} 值 <0.5、离心低于 5 000 r/min，5 min 时，细菌团块较松散，样品制备过程中容易散开，无法收集到足够的细菌，制样难度较大。随着 OD_{600} 值、离心速度和时间的增加，细菌团块越紧密，制样难度相应降低。但

表 1 $L_9(3^3)$正交试验表以及各组细菌切面分布结果

组别	因素水平			大肠杆菌纵切面占总细菌数比例（%）（相同实验条件下做 5 次重复）				
	A	B	C					
	OD_{600} 值	离心速度(r/min)	离心时间(min)					
1	0.5	5 000	5	7.03	1.49	5.11	18.68	19.29
2	0.5	8 000	10	21.49	4.94	5.46	5.00	7.33
3	0.5	12 000	15	11.02	12.59	16.95	12.30	11.81
4	0.8	5 000	10	24.79	37.86	12.40	25.42	30.63
5	0.8	8 000	15	60.27	47.25	63.72	62.89	72.62
6	0.8	12 000	5	71.25	56.06	62.90	60.34	55.29
7	1.0	5 000	15	61.36	56.25	45.12	50.68	42.00
8	1.0	8 000	5	10.12	7.88	18.64	9.88	8.72
9	1.0	12 000	10	21.05	6.37	1.51	0.57	0.61

表 2 不同 OD_{600} 值、离心速度和时间下大肠杆菌电镜观察的正交结果分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
校正模型	17 862.604	6	2 977.100	18.16	0.000 1
因素 A	11 888.269	2	5 944.134	36.25	0.000 1
因素 B	54.541	2	27.271	0.17	0.847 4
因素 C	5 919.794	2	2 959.897	18.05	0.000 1
空白（误差）	6 230.696	38	163.966		
总计	24 093.300	44			

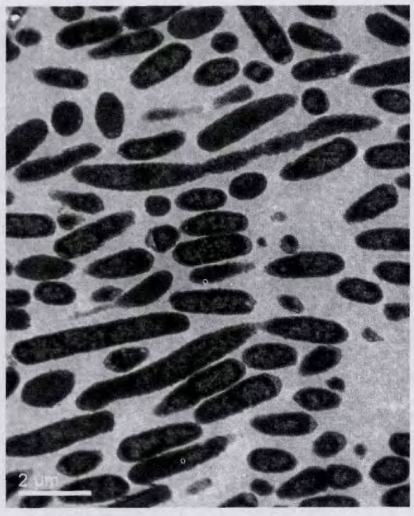
决定系数 =0.741 393



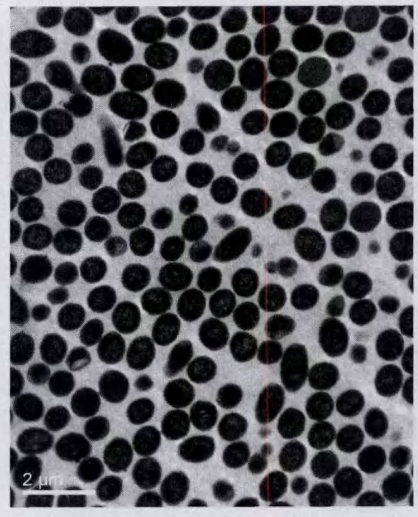
A. 第 1 组(OD_{600}=0.5、5 000 r/min、5 min)



B. 第 5 组(OD_{600}=0.8、8 000 r/min、15 min)



C. 第 6 组(OD_{600}=0.8、12 000 r/min、5 min)



D. 第 9 组(OD_{600}=1.0、12 000 r/min、10 min)

图 1　不同 OD_{600} 值、离心速度和时间下大肠杆菌电镜观察结果

若 OD_{600} 值 >1.0、离心 >12 000 r/min,15 min,细菌团块过于密集,固定剂和脱水剂不能良好的渗透到细菌团块中央,将影响超薄切片的质量。

电镜观察结果表明,上述 3 种因素对大肠杆菌的超微结构影响较小,但细菌浓度和离心时间不同对样品中细菌切面的纵、横比影响明显。通过 SAS8.0 统计分析分析得知,离心速度对结果的影响在各组中无差异,而 OD_{600} 值、离心时间这两个因素对结果的影响在各组中存在显著性差异,其中细菌 OD_{600} 在 0.8,离心时间 10 ~ 15 min 可获得最佳细菌切面的纵横比。

4　结　论

离体培养大肠杆菌透射电镜样品制备及观察的最佳 OD_{600} 值为 0.8,离心时间为 15 min,离心速度为 5 000 ~ 12 000 r/min。

参 考 文 献

[1] 陈　韬. Artemin 在大肠杆菌中的表达及寡聚体的电镜观察[J]. 湖南农业大学学学报,2005,31(3):253.

[2] 宫　霞,施用辉,乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响[J]. 昆虫学报,2004,47(1):8.

[3] 杨　怡,张　飒,周　涛,等.培养细胞电镜样品制备方法[J]. 解剖学杂志,2003,26(5):509.

[4] 范京川,王　红,徐　晨,等.离心速度及时间对培养细胞透射电镜样品制备的影响[J]. 重庆医科大学学报,2009,34(8):1008-1010.

[5] 沈其君.SAS 统计分析[M].南京:东南大学出版社,2001.56-57.

[6] 乔　军,孟庆龄,贾桂珍. 运用 OD 值法进行细菌计数的研究[J]. 中国家禽,1996,4:26.

(责任编辑:关蕴良)