DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.040
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1111-02

技术方法

细菌波动生长过程的原子力显微镜观察

Observation on bacterial waving growth with atomic-force microscope

邓国宏[1],徐启旺[1],王 琛[2],刘卯子[2] ([1]第三军医大学生物波研究中心,重庆 400038;[2]中国科学院化学研究所SPM室,北京 100080)

提 要:目的 采用原子力显微镜对奇异变形杆菌菌落边缘的细菌排列及菌间关系进行观察。方法 切取菌落边缘琼脂小块,将琼脂小块上的菌落轻轻印在云母片上,于原子力显微镜下观察。结果 奇异变形杆菌波动菌落边缘细菌成单层紧密排列,菌体周围有大量鞭毛存在并在菌体之间耦合成束,菌体表面见到密集的蛋白颗粒。结论 原子力显微术可在生理条件下原位观察活体细菌膜表面结构及菌体间相互关系,此方法操作简单,成像清晰且分辨率高。

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*,PM)的迁徙生长现象是原核细胞分化和多细胞行为的一种表现[1],也是生物波研究的模型之一[2]。光学显微镜下发现,PM群体细胞向外迁移的过程依赖于紧密的细胞与细胞的接触。要深入研究PM这种多细胞协同迁移的细节,需要能在生理条件下对菌落边缘细菌进行观察的高分辨力的显微技术。原子力显微术(Atomic-force microscopy,AFM)是80年代发展起来的扫描探针显微术(Scanning probe microscopy,SPM)的一种,它是既具有原子级分辨率又能在近生理条件下操作的新一代显微技术[3]。AFM在生命科学中,尤其是在核酸、蛋白质等生物大分子的精细结构研究方面的应用已成为普遍关注的热点,但在细胞形态学研究方面的应用目前尚不多见。我们尝试用AFM对PM菌落边缘直接进行观察,以深入认识PM多细胞群体迁移的生理行为。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 奇异变形杆菌VI株:本中心保存菌种。

1.1.2 波动I号培养基 按刘俊康[4]报道的方法制备:胰蛋白胨1%,酵母提取物0.5%,NaCl 1%,各成分溶于蒸馏水,调pH至7.2~7.4,加入2%琼脂,高压灭菌。临用前加入0.01%氯化三苯基四氮唑(TTC)及0.1%葡萄糖,制成平板。

1.1.3 新解理的云母片 中国科学院化学研究所SPM室提供。

1.1.4 Nanoscope III原子力显微镜 Digital Instruments(USA)产品,中国科学院化学研究所SPM室提供。

1.2 方法

1.2.1 PM的波动培养 按徐启旺[2]的方法进行。将PM点种于波动I号培养基中心,37°C恒温恒湿条件下波动培养8 h,PM开始向外波动生长。

1.2.2 PM菌落边缘印片的制备 PM在波动I号培养基上波动生长,当最外环为黄环时,切下一小块包含黄环区的琼脂(3~5 mm²)。用镊子固定好琼脂小块,菌落面朝上;将新解理的云母片放在琼脂小块上,轻压云母片,然后迅速将云母片揭开。菌落即印在云母片上。

1.2.3 菌落印片的原子力显微术观察 采用NanoScope III原子力显微镜对菌落印片进行观察。成像在大气环境下进行,方式为接触式。微悬臂长度为200 μm,力常数为0.12 N/m,扫描针尖为商用Si_3N_4针尖,图像采集为恒力模式。所有图像均通过自动平滑(Flatten auto)处理以消除慢扫描方向的低频噪音。

2 结果

2.1 PM的波动培养

将PM点种于波动I号培养基中心,波动培养8 h,PM开始向外波动生长,每3 h长出一环。红色环由短杆状的繁殖体堆积而成,红环之间为黄环,由单层丝状细胞平铺形成。黄环区的丝状细胞具有活跃的多细胞群体迁移能力。

2.2 PM菌体表面结构的原子力显微术观察

在光学相差显微镜下观察印片,可见PM菌落边缘的丝状细胞成单层紧密排列,印片能完整地保持原菌落的结构。采用原子力显微镜对印片进行扫描,扫描数据经专用计算机软件处理形成伪彩色图像(用颜色深浅来表示样品表面的高低),见图1、2。图1可见PM菌落边缘细菌成单层紧密排列。图2为3个平行排列的丝状细胞的一部分,可见到菌体表面凹凸不平,有的区域形成较深的陷窝。菌体表面有大量直径约35~70 nm的颗粒物存在。此外,菌体表面有大量鞭毛,从菌体表面发出的鞭毛伸向菌体之间形成波状的耦合鞭毛束。由此可断定,在

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370008)

作者简介:邓国宏(1972—),男,四川省犍为县人,硕士,讲师,主要从事生物复杂性方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752190

收稿日期:1999-10-30;修回日期:2000-05-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PM 多细胞协同迁移过程中，相邻菌体以鞭毛耦合成束的方式琼脂表面协同运动。

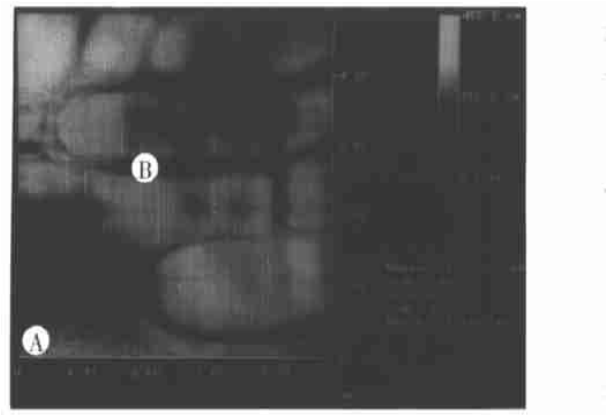


图1 PM 菌落边缘的 AFM 像
A：琼脂表面；B：PM 单层细胞

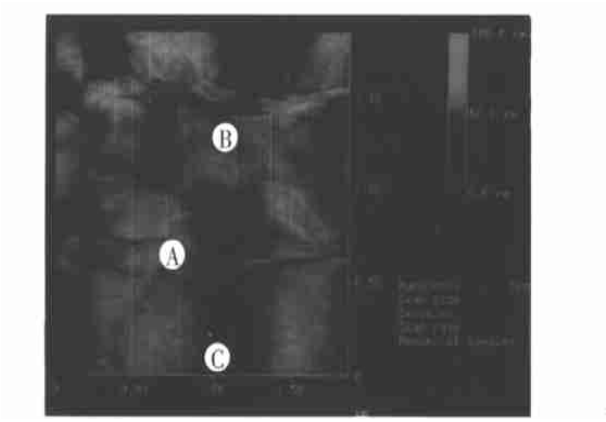


图2 PM 丝状细胞的 AFM 像
A：鞭毛束；B：PM 丝状细胞；C：细胞表面的陷窝

3 讨论

十几年来，以AFM 为代表的扫描探针显微术展示出卓越的应用价值并成为纳米技术（工程）的主要力量。比如在1990 年，IBM 公司的研究人员采用 AFM 将吸附在 Ni 表面的Xe 原子排列成“IBM”3 个字，开创了人工排列原子的纳米技术时代. 在生命科学领域，AFM 也已广泛地用于生物大分子的结构研究。AFM 不仅可在空气、水和其他溶剂中对大分子成像，还可在水溶液环境中直接观察和记录生物大分子相互作用过程；此外，它还可以对DNA 和蛋白质进行超微操作和分子剪接[5]，以及对 DNA 进行物理测序工作[6]。和电镜相比，AFM 不受成象环境的限制，可在近生理环境下进行，不需要固定、脱水或包埋、饱和置换等复杂过程，也不需采用重金属染色或喷涂，并且分辨率高。

我们采用 AFM 对 PM 波动菌落结构不染色而直接观察，成功地得到了 PM 丝状细胞膜表面结构的清晰图像，初步表明AFM 是进行细菌形态学研究的一种新方法。虽然现阶段 AFM 在生物学中的应用仅限于核酸、蛋白等大分子，但相信 AFM 对研究活细胞膜表面结构（胞壁、外膜蛋白、膜通道、膜受体等）具有巨大的价值。对不同生物样品，在 AFM 的样品制备和图像分析解释方面尚需摸索或改进。我们在 AFM 下见到 PM 菌体表面的大量颗粒，可能是 PM 胞壁外膜上的蛋白颗粒；这与革兰氏阴性细菌外膜的冷冻蚀刻电镜图片中所见到的蛋白颗粒相一致。AFM 图片中 PM 的鞭毛直径（约 30 ~ 50 nm）较文献[7] 报道的（约 15 ~ 20 nm）粗，可能是PM 胞外薄层粘液干涸后附在鞭毛上或将几根鞭毛粘在一起，成为粗鞭毛。根据我们在实验中的体会，AFM 的制片要求大致有 3 方面：（1）样品不能变化迅速，因为针尖是扫描成像，需费一定时间才能完成一次成像。在本研究中，虽然印片上的细菌保持活体状态及原位排列，但因菌落中的粘液在空气中干燥失水，细菌已不能移动，因此满足成像条件。（2）基底对样品的吸附力要强，不能被针尖吸走。由于菌落中即存在大量粘液，其粘附力使细菌牢固地吸附在基底云母片上。（3）样品表面的起伏不能太大，因为扫描针尖离样品仅约 1 nm 左右，起伏太大易损坏样品或针尖。

关键词：原子力显微术；奇异变形杆菌；鞭毛
中图法分类号：Q939.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] Rauprich O, Matsushits M, Weijer C J, *et al*. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development[J]. J Bacteriol, 1996, 178(22): 6 525－6 538.
[2] 徐启旺，刘俊康，郭 刚，等. 微生物生长的群体、周期和波[J]. 自然杂志，1992, 15(3): 195－197.
[3] 汪新文，白春礼，朱传凤. DNA 原子力显微镜成象方法研究[J]. 生物物理学报，1996, 12(3): 538－542.
[4] 刘俊康，郭 刚，张守印，等. 生物波理论的研究[J]. 中国微生态学杂志，1994, 6(6): 40－46.
[5] Lyubchenko Y, Shlyakhtenko L, Harrington R, *et al*. Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2 137－2 140.
[6] Hansma H G, Bezanilla M, Zenhausern F, *et al*. Atomic force microscopy of DNA in aqueous solutions[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(3): 505－512.
[7] Belas R, Flaherty D. Sequence and genetic analysis of multiple flagellin-encoding genes from *Proteus mirabilis*[J]. Gene, 1994, 148(1): 33－41.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net