

# 猪肺炎霉形体细胞及细胞膜的超微结构

黄 芬 吴玉薇 李跃贞 文德成

(中国科学院生物物理研究所)

董清华

(农牧渔业部中国兽医药品监察所)

## 摘 要

对猪肺炎霉形体168菌株细胞及细胞膜的超微结构进行了观察。负染、扫描电镜及超薄切片结果表明,猪肺炎霉形体168菌株细胞主要为球形或椭圆形,细胞直径约为0.6微米。有些细胞质膜外还有一层似荚膜状结构。冰冻断裂电镜技术结果表明,猪肺炎霉形体膜脂双层内部有较多的内部蛋白颗粒,颗粒直径约为100埃。关于质膜外存在荚膜结构与致病性的关系进行了初步讨论。

猪肺炎霉形体是猪喘气病的病原体,给畜牧业造成巨大损失,目前关于猪肺炎霉形体的致病因素尚不了解,对猪肺炎霉形体细胞形态及超微结构的观察,细胞膜的生化组成及性质等方面的研究将有助于对这种因素的了解,过去文献上虽有一些有关报道<sup>[1,2]</sup>,但多限于被感染的猪肺气管组织学超微结构的观察,而对离体培养的猪肺炎霉形体细胞本身超微结构的系统观察以及霉形体细胞对寄主细胞感染过程研究则不多见。最近文献报道<sup>[3]</sup>猪肺炎霉形体质膜外存在一层荚膜,此荚膜可能与猪肺炎霉形体致病性有关。本文用负染,扫描电镜及超薄切片电镜技术对猪肺炎霉形体168菌株细胞进行了观察,并用冰冻断裂电镜技术研究了完整细胞及分离的细胞膜内部结构。发现有的猪肺炎霉形体细胞质膜外也存在类似荚膜结构,此荚膜结构与文献报道相似。

## 材 料 和 方 法

猪肺炎霉形体168菌株系江苏省农业科学院畜牧兽医所赠予。乳蛋白水解物系英国Oxoid产品,其它试剂均为分析纯。

### 一、猪肺炎霉形体168菌株细胞培养及细胞膜的制备

在800毫升培养基中含有牛心消化汤240毫升(新鲜制备),乳蛋白水解物(1%)的汉克氏液400毫升猪血清160毫升,酵母浸出汁16毫升,青霉素G 8万单位,醋酸铀0.125克,酚红1/10万,加入1N NaOH约4毫升调pH至7.5,取猪肺炎霉形体168种子按1/10接种量加入上述培养基内,37℃培养3~4天,待培养基pH降至7.0左右,即可收获细胞。

\* 本课题系由中国科学院科学基金资助。

\*\* 本文于1984年9月22日收稿。

## 二、细胞膜的制备

培养物首先在2300转/分离心15分钟除去杂质, 上清液在 $14,000 \times g$ 离心15分钟分离细胞, 细胞用生理盐水洗两次, 按每克细胞湿重加入260毫升重蒸水,  $37^{\circ}\text{C}$ 保温30分钟, 低渗破膜,  $14,000 \times g$ 离心15分钟除去未破碎细胞。上清液于 $48,000 \times g$ 超速离心30分钟, 沉淀用1:20 $\beta$ 缓冲液洗两次, 即获初步提纯的猪肺炎霉形体膜。

## 三、负染

取猪肺炎霉形体细胞悬液(蛋白浓度为5毫克/毫升)2~3微升, 滴在铺有Formvar膜及碳膜的铜网上用滤纸吸去多余细胞, 用2%磷钨酸(pH 7.0)进行负染, 在JEM-100Cx电子显微镜下进行观察。

## 四、扫描电镜

采用猪肺炎霉形体细胞直接在盖玻片上生长的方法[4], 当培养基的pH降至7.0时, 取出玻片, 用2.5%戊二醛(用0.1M, pH7.0的磷酸缓冲液配制)固定1小时, 用磷酸缓冲液洗3次, 再用1%锇酸固定1小时, 磷酸缓冲液洗3次, 然后用酒精系列脱水(酒精浓度分别为, 50%、70%、80%、95%)样品在醋酸异戊酯中过夜, 次日进行临界点干燥, 喷金, 在JSM-35CF扫描电镜下进行观察。

## 五、透射电镜

取一定量的猪肺炎霉形体细胞, 首先用2.5%戊二醛固定1小时, 用0.1M磷酸缓冲液反复洗3次, 再用1%锇酸固定2小时, 磷酸缓冲液洗3次, 用不同浓度乙醇系列脱水, 样品用Epon 812树脂包埋, 超薄切片, 再用醋酸双氧铀染色2小时, 在JEM-100Cx电子显微镜下观察。

## 六、冰冻断裂术

取一定量猪肺炎霉形体细胞及膜悬液(蛋白浓度10微克/毫升), 加入80%甘油使甘油最终浓度为20%左右, 样品在室温平衡1小时, 然后滴入样品台内, 迅速投入液氮冷冻, 在BAF400D冰冻刻蚀装置中冷刀断裂, 铂-碳投影(真空度为 $5 \times 10^{-6}$ 毫巴), 用次氯酸钠腐蚀30分钟, 再放入70%硫酸溶液中腐蚀过夜。复型用重蒸水洗数次, 在JEM-100Cx电镜下进行观察。

# 结果与讨论

猪肺炎霉形体168菌株细胞用磷钨酸负染后细胞形态为圆形或椭圆形, 有的细胞连接成串, 细胞直径约为0.6微米(图1)。扫描电镜下的猪肺炎霉形体细胞表面形态结构也为圆形或椭圆形。多数细胞聚集成堆, 细胞直径也为0.6微米(图2)。

图3所表示为超薄切片电子显微镜图片, 用超薄切片技术可观察猪肺炎霉形体细胞多形态特征及细胞内部超微结构, 由于霉形体细胞外只有一层质膜, 在一定外界条件影响下, 容易产生多种形态, 从图3a可见猪肺炎霉形体168菌株细胞为圆形、椭圆形、有的细胞还呈棒状, 细胞大小不等, 细胞外为一层质膜, 细胞内靠近质膜周围为核糖体, 细胞中心为核区, 主要为DNA。有的细胞质膜周围有荚膜状结构(箭头所示)。这种荚膜状结构在细胞分裂过程中更为显著(见图3b), 此时细胞分裂形成两个圆形细胞或椭圆形细胞, 细胞之间有一细长带相连, 两个子细胞尚未完全独立形成, 这种细胞的荚

膜状结构比单个细胞的更为显著。

猪肺炎霉形体细胞及膜用冰冻断裂电镜技术均可观察膜内部蛋白，这些内部蛋白为球形颗粒，直径约为100埃，颗粒分布凹面比凸面多，它们与一般霉形体膜内部蛋白颗粒大小相似（图4），这些内部蛋白颗粒是嵌在细胞膜脂双层内部的疏水蛋白，在膜上具有重要的生理功能。

关于霉形体细胞形态及超微结构的研究，过去多是研究鸡毒霉形体，人型霉形体以及人肺炎霉形体的，对于猪肺炎霉形体研究得不多。Livingston等〔2〕曾报道猪肺炎霉形体感染的仔猪肺部气管上皮细胞微绒毛附近出现不少猪肺炎霉形体细胞。Mebus等〔3〕用扫描电子显微镜观察被猪肺炎霉形体感染气管及支气管组织表面形态结构的变化，发现病猪的气管及支气管上出现大量猪肺炎霉形体细胞而上皮细胞的纤毛明显减少。关于霉形体细胞质膜外围荚膜状结构早在1964年Domermuth等〔5〕曾用超薄切片技术观察到人肺炎霉形体，鸡毒霉形体等多种霉形体的质膜外有这种结构。有的霉形体在适当生长条件下，此荚膜结构可以用钒红—钼酸染色，在未经染色的霉形体细胞上观察不到荚膜〔6,7〕。最近Tajima等〔8〕报道被猪肺炎霉形体感染的病猪肺部组织，用超薄切片技术可观察到有荚膜结构的猪肺炎霉形体，这种荚膜结构无论用钒红染色或不用钒红染色均可在质膜外围观察到。荚膜厚度约为20nm，他们认为此荚膜结构与猪肺炎霉形体的致病性有关。作者用负染、扫描电镜、超薄切片等技术系统地观察了猪肺炎霉形体168菌株细胞的超微结构，结果表明其形态结构与过去文献报道相似，未经钒红染色的猪肺炎霉形体168菌株细胞质膜外围也能观察到一层荚膜结构。这种荚膜结构在霉形体细胞分裂时更为明显，关于荚膜结构与猪肺炎霉形体致病性的关系正在探讨中。

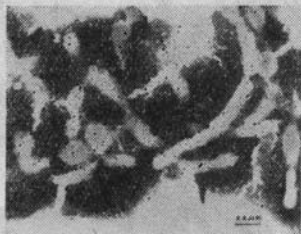


图1 猪肺炎霉形体168菌株细胞，2%磷钨酸负染。 $\times 50,000$

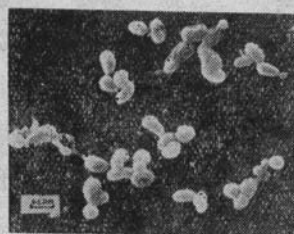


图2 猪肺炎霉形体168菌株细胞。 $\times 24,000$

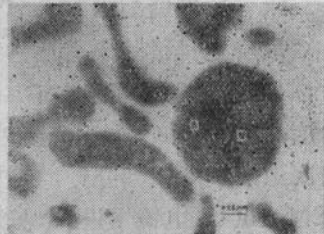


图3a 猪肺炎霉形体168菌株细胞超薄切片。N—核区，R—核糖体， $\times 40,000$

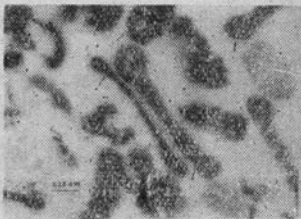


图3b 猪肺炎霉形体168菌株细胞。箭头所示为正在分裂的细胞有明显荚膜结构。 $\times 40,000$



图4a 猪肺炎霉形体168菌株细胞冰冻断裂。 $\times 40,000$



图4b 猪肺炎霉形体168菌株细胞膜冰冻断裂。 $\times 82,000$

## 参 考 文 献

- [1] Livingston, C.W. et al., 1972. Pathogenesis of Mycoplasmal Pneumonia in Swine. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2249~2258.
- [2] Mebus, C.A. et al., 1977. Scanning Electron Microscopy of Trachea and Bronchi from Gnotobiotic Pigs Inoculated with *Mycoplasma Hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1249~1254.
- [3] Tajima, M. et al., 1982. Interaction of *Mycoplasma Hyopneumoniae* with Porcine Respiratory Epithelium as Observed by Electron Microscopy. *Infect. Immun.* 37: 1162~1169.
- [4] 黄芬等, 1982. 支原体膜的结构与功能, 扫描电镜技术研究鸡败血症支原体细胞表面结构. *畜牧兽医学报*, 13: 29~31.
- [5] Domermuth, C.H. et al., 1964. Ultrastructure of Mycoplasma Species. *J. Bacteriol.* 88: 727~744.
- [6] Luft, J.H., 1971. Ruthenium Red and Violet. 1. Chemistry, Purification, Method of Use for Electron Microscopy and Mechanism of Action. *Anat. Rec.* 171: 347~368.
- [7] Robertson, J. et al., 1976. Cytochemical Evidence of Extramembraneous Carbohydrates on *Ureaplasma Urealyticum* (T strain, Mycoplasma). *J. Bacteriol.* 128: 658~669.

THE ULTRASTRUCTURE OF THE CELLS AND CELL MEMBRANES  
OF MYCOPLASMA SUIPNEUMONIAE

Huang Fen, Wu Yuwei, Li Yuezhen, Wen Decheng  
(*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing*)

Dong Qinghua

(*The Control Institute of Veterinary Bioproducts and pharmaceuticals,  
Ministry of Agriculture Animal Husbandry and Fishery, Beijing*)

## Abstract

Electron microscopic observations have been made on the ultrastructure of cells and cell membranes of *M. suis pneumoniae* strain 168. Results of negative staining, scanning electron microscopic and thin sectioning techniques showed that the cells are mainly spherical or elliptical in shape, with a diameter about 0.6  $\mu\text{m}$ ; a layer of capsule-like structure was present outside the membranes of some cells. The result of freeze fracture electron microscopy showed that there are a large number of integral protein particles of about 100  $\text{\AA}$  in diameter within the lipid-bilayers of cell membranes. The relationship between capsule-like structure and pathogenicity of the mycoplasma was preliminarily discussed.