

一种光学显微镜下观察原生质体的染色方法

杨世辉 方呈祥* 张珞珍

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘要: *Brevibacterium lactofermentum* 菌液经溶菌酶处理后分别与 4 种微生物染色液混合, 在光学显微镜下比较观察原生质体形态的效果。结果表明: 染色样品中的原生质体比未经染色的形态清晰易观察, 而且显微照相效果好; 其中使用草酸铵结晶紫和复红染色液的效果更佳。该方法程序简单、操作方便、效果明显, 还适用于悬滴法观察菌体形态和细菌运动方式。

关键词: 原生质体, 染色, 草酸铵结晶紫, 复红

中图分类号: Q93.33-933 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-055-03

A STAINING METHOD USED FOR OBSERVING PROTOPLASTS UNDER THE LIGHT MICROSCOPE

YANG Shi-Hui FANG Cheng-Xiang ZHANG Luo-Zhen

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: *Brevibacterium lactofermentum* cultures digested by lysozyme were mixed with four dyes for microorganism staining, and then compared with observing effects of protoplasts under the light microscope. The results showed that the effect of the protoplasts was clearer, more convenient and better for photography in the specimens stained than that of unstained. The effects of ammonium oxalate-crystal violet and basic fuchsin dyes were better. This method has such superiorities as simple procedure, convenient operation and obvious effect. It can also be applied to observe the shape and the motion pattern of the bacteria.

Key words: Protoplast, Staining, Ammonium oxalate-crystal violet, Basic fuchsin

通过适当的酶处理, 除去微生物细胞壁形成球形细胞的原生质体是原生质体技术的关键步骤之一。不同的酶、试剂、温度和时间等因素对原生质体形成的影响以及原生质体融合过程中通常需借助光学显微镜进

行活体观察。原生质体需在一定的高渗溶液中方能保

* 通讯作者

收稿日期: 1998-10-12, 修回日期: 1999-01-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

持其球形而不破裂,由于高渗溶液透明,与原生质体和菌体的反差小,因此,在显微镜下捕捉目标要有一定的经验,其清晰度较差,观察其形态,特别是判别个体较小的杆状细胞与原生质体往往不够准确,同时显微照相的效果也受到一定的影响。

本文报道一种染色方法,使溶液的背景加深,原生质体与背景反差加大,而原生质体不会破裂,在显微镜下观察原生质体清晰可见,适宜于普通实验室使用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Brevibacterium lactofermentum*, 由中国典型培养物保藏中心提供。

1.1.2 培养基: 蛋白胨 5g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 蒸馏水定容至 1L, pH7.0~7.2。1 × 10⁵ Pa 蒸气灭菌 20min。

1.1.3 试剂: 稳定剂: 250mmol/L 蔗糖, 250mmol/L 丁二酸钠, 1mmol/L EDTA, 20mmol/L K₂HPO₄, 110mmol/L KH₂PO₄, 10mmol/L MgCl₂, pH7.0。3.5 × 10⁴ Pa 蒸气灭菌 15min。

溶菌酶溶液: 用稳定剂配成终浓度为 2.0mg/mL 的

溶液, 过滤灭菌, 置 4℃ 保存备用。

草酸铵结晶紫、美兰、沙黄和复红染液均按文献 [1] 配制, 其中草酸铵结晶紫配制后再分别进行 5、10、20、40 倍稀释, 美兰、沙黄和复红染液保存原液即可。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备: 先将菌种接入盛有 5mL 培养基的试管, 置 30℃ 震荡培养 (250r/min) 12h 后按 1% 转入盛有 100mL 培养基的三角瓶中, 培养 8h 后加入 0.1mL 青霉素 (640μg/mL) 继续培养 1.5h, 取 5mL 上述培养液离心 (4,000r/min, 4℃, 15min), 细胞沉淀用稳定剂洗涤 2 次, 弃上清液, 加入 5mL 溶菌酶溶液, 置 37℃ 水浴保温, 隔时取样。

1.2.2 染色与显微镜观察: 用微量进样枪、无菌滴管或接种环分别取上述用溶菌酶处理过的菌液和 4 种不同的染色液在干净的盖玻片上进行混合, 再按文献 [1] 所描述的悬滴法制备成玻片, 置光学显微镜下进行观察、照相。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的制备

革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的细胞壁结构有明显

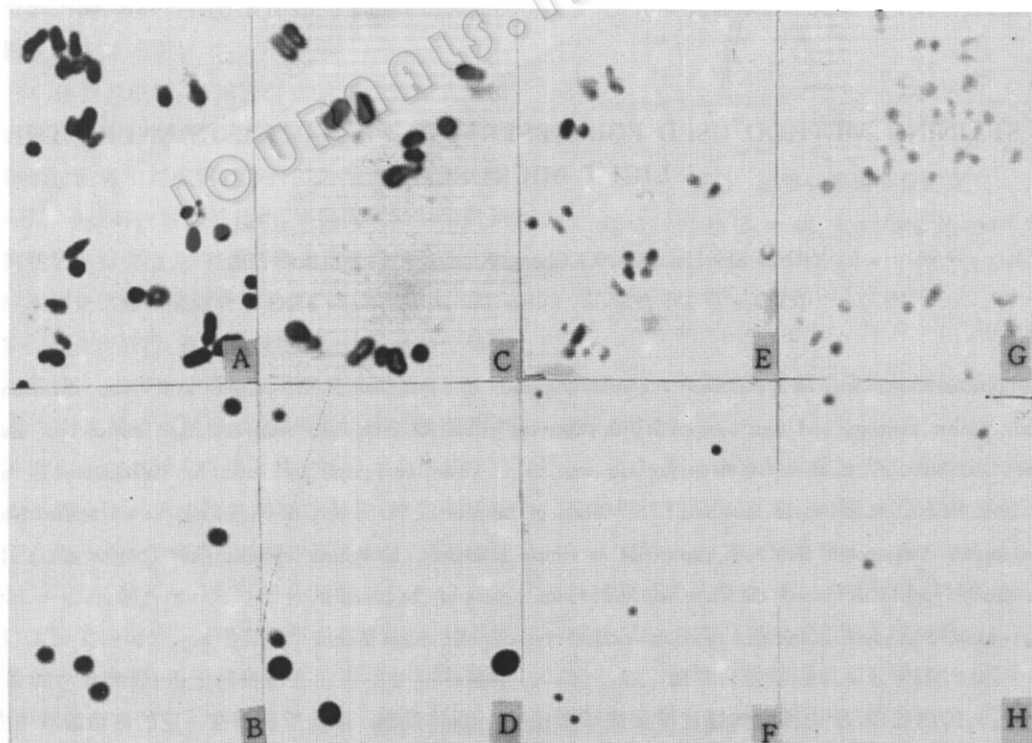


图1 原生质体显微摄影效果的比较

A、B经草酸铵结晶紫染色(稀释10倍), C、D经复红染色, E、F经美兰染色, G、H未经染色
(A、C、E、G为酶解0.5h后取样染色, B、D、F、H为酶解2.5h后取样染色)

的差异,青霉素能抑制生长着的细菌细胞壁肽聚糖中交联的形成。参考常尊学等^[2]的方法,采用 0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素浓度,用 2.0mg/mL 的溶菌酶对加青霉素与不加青霉素培养的菌体进行酶解,发现不加青霉素培养的菌体需酶解 12h 才能使原生质体形成率达到 95% 以上,而加青霉素培养的菌体只需 2.5h 即可。因此,在培养基中加入一定浓度的青霉素有利于革兰氏阳性菌原生质体的形成。用终浓度分别为 0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL 的溶菌酶对菌体进行酶解,取样观察,结果表明溶菌酶的浓度低,酶解的时间延长,而酶解时间过长,原生质体会出现破裂。当溶菌酶浓度为 2.0mg/mL 时,酶解 2.5h 原生质体即可达到 95% 以上,而且原生质体未见破裂,效果好。

2.2 染色液对原生质体的影响

虽然染色液呈强碱性,但与酶处理过的菌液混合时并不导致原生质体破裂。酶作用的早期,样品中全为杆状细胞,其运动方式清楚、明朗。随着酶处理时间的延长,原生质体的数量增加,直至后期几乎所有的细胞均形成球形的原生质体。在染色液中原生质体的形态始终完好,甚至将制作好的悬滴片放置数小时后再观察,原生质体依然清晰可见,未见其破裂现象。这可能是稳定液的缓冲作用,保护细胞膜不受破裂。

2.3 不同染色液染色效果

对不同时间溶菌酶处理的菌液用 4 种不同的染色液进行染色,在光学显微镜下观察原生质体的形成,结果见图 1。

从以上结果可以看出,染色样品的原生质体明显比未染色的清晰,这是因为未经染色的样品在光学显微镜下观察时,菌体和背景的反差太小,且原生质体和菌体在不停地运动,显微摄影时为了其形态清晰,曝光时间必须很短才能使照片不致模糊,这就要求光源增强,光圈加大,但是这又导致反差降低,显微照相效果

不好(见图 1, G, H)。而经染色的样品中背景颜色很深,与原生质体或菌体的反差很大,一方面观察时清楚,界线分明,即使很小的短杆状细胞也能将其与原生质体分辨清楚;另一方面,由于反差大,曝光时间缩短,显微照相效果好。不同的染色液产生的效果也不相同,其中草酸铵结晶紫染色液(见图 1, A, B)和复红染色液(见图 1, C, D)的效果好,美兰染色液(见图 1, E, F)与沙黄染色液的效果较差。这是由于不同染色液其自身的颜色深浅不同,造成原生质体与背景的反差不同。

2.4 不同稀释度草酸铵结晶紫染色效果的比较

分别用不同稀释度的草酸铵结晶紫染色液对菌液染色进行比较,结果表明:10 倍稀释度的草酸铵结晶紫染的效果最好,在光学显微镜下观察时其背景干净,原生质体清晰;稀释度小的染液,如 5 倍稀释后制片观察,其视野中有许多小的颗粒,背景不干净;稀释度大的染液,如稀释 40 倍后制片观察,颜色较浅,背景的反差降低,观察效果欠佳。因此,该染液中结晶紫和草酸铵的浓度分别为 0.2% 和 0.08% 效果最佳。

综上所述,通过对酶处理菌液进行染色,在光学显微镜下观察原生质体是一种非常有效的方法。该方法将悬滴法和染色方法结合起来,程序简单、操作方便、效果明显,适用于普通实验室。同时这种方法也可适用于悬滴法观察菌体的形态以及其运动方式。

参 考 文 献

- [1] 范秀容,李广武,沈 萍. 微生物学实验(第二版). 北京:高等教育出版社,1991.
- [2] 常尊学,马 莉,石松华等. 微生物学通报, 1991, 18(6):332~336.
- [3] Kaneko H, Sakajuchi K. Agric Biol Chem, 1979, 43(5):1007~1013.
- [4] 朱宝成. 微生物学研究与应, 1991, 2:23~27.
- [5] 诸葛健. 微生物学研究与应, 1989, 1:29~31.