

用显微操纵器分离单细胞

董奎微 温肇荣

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所)

用显微操纵技术纯化菌株要比一般的稀释法及平板分离法更可靠。随着器具的改良,技术也在提高。这项技术在国外已被广泛采用^[1-6]。国内也有用以分离酵母菌单细胞的报道^[7]。我们曾对这项技术进行过摸索,分离单细胞的成功率较高,现将方法介绍如下。

一、仪器

1. 滑动式显微操纵器及光学显微镜

2. 微毛细吸管分离器: 选用内径 1.5 mm, 外径 3.5 mm 玻璃管切成 40 cm 和 10 cm 两种长度的节段, 洗净后烘干。在煤气灯火焰上拉成外径 1.5—2.0mm 左右, 再进一步将外径拉细

至 1.0 mm 以下, 然后离开火焰将管径再拉细成微毛细吸管。此时中部往往自动断裂。在小火焰上将微毛细吸管弯成 90—120°, 弯曲部分长 0.5 cm 左右较合适。吸水检查管腔是否畅通。制备好的微毛细吸管长度为 20cm 和 5cm 两种, 切割时应注意切口的角度和光滑度, 以支架固定, 160°C 干热灭菌。

3. 盖玻片: 用自来水洗净后用肥皂水煮, 再用自来水和蒸馏水冲净, 浸泡于 80% 乙醇-冰醋酸-乙醚 (96:3:1) 清洁液中备用。

二、菌悬液的制备

选用合适的液体培养基培养的生长对数期

菌体。以 10 倍系列稀释法稀释至合适浓度。

三、操作

1. 湿室与分离面的准备：操作开始前，在湿室内的四角放一块湿棉花。在擦干的盖玻片上均匀涂一层灭菌的含 50% 凡士林和 50% 石蜡的油脂，盖在湿室的小孔上，涂油脂面向下作为分离面。约 10 分钟后湿室中湿度达到饱和时即可开始操作。

2. 微毛细吸管与操纵器的准备：将显微镜的聚光镜聚焦于盖玻片上。将操纵器向两侧拉开。利用毛细管作用吸进菌液到微毛细吸管内，将其固定在右侧操纵器上，慢慢推动操纵器，将其头部送进湿室侧孔，使吸管的切口向上。在吸管尾端接上细橡皮管，在离吸管尾端约 5 cm 处用夹子夹住。在左侧操纵器上固定吸有液体培养基的长约 5 cm 的微毛细吸管，同样将其头部伸进湿室的另一侧孔，并使切口向上。两根管子不能相互接触，以免污染左侧管。

3. 菌液的释放与观察：转动右侧操纵器螺旋，使微毛细吸管的管口与分离面接触，再轻挤橡皮管，使菌液在分离面上形成一个微滴，其大小不能超过高倍镜视野。在松开挤压的橡皮管前，迅速转动调节器使操纵器降低而微毛细吸

管与分离面脱离，以免菌液重新回到管内。观察液滴中的微生物，如所需分离的菌细胞在液滴中为 0—2 个时，此菌液的稀释度即适用。

4. 菌液的吸取及接种，如菌液滴中菌数合适时(最好为 1 个细胞)，在低倍镜头下把左侧的微毛细吸管移到菌滴下。在高倍镜下证实管口对准菌液后，抬高左操纵器使管口与分离面上的菌液接触并吸入管内，然后使管口脱离分离面。在用高倍镜头证实待分离的细胞确已进入左侧管内后，取出微毛细吸管。将其中的细胞挤入培养基中进行接种。然后即可培养出由单细胞长出的菌落。

我们用上述方法分离过几种细菌，成功率与文献报道相似。操作中应注意：1. 微毛细吸管切口必须圆整光滑；2. 湿室湿度要适当，可用两侧孔的开闭程度调节；3. 盖玻片上油脂要均匀；4. 菌液稀释度必须合适，使分离面上液滴内，多数只含一个细胞。

参 考 文 献

- [1] Chambers, R.: *J. Inf. Dis.*, 31: 334—343, 1922.
- [2] Reyniers, J. R.: *J. Bact.* 26: 251—287, 1933.
- [3] Stain, W. A.: *J. Inf. Dis.*, 34: 148—156, 1924.
- [4] Hildebrand, E. M.: *Bot. Rev.*, 4: 627—664 1938.
- [5] Hildebrand, E. M.: *ibid*, 16: 181—207, 1950.
- [6] Hildebrand, E. M.: *ibid*, 26: 278—330, 1960.
- [7]