

用 TEM 和 SEM 对肠毒性大肠杆菌超微结构 及其定居状态的观察

TRANSMISSION AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF ULTRASTR-
UCTURE AND COLONIZATION CONDITIONS OF ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI

谷守林 郭宝清 郝桂玉 姜绍德 李成

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

Gu Shoulin Guo Baoqing Hao Guiyu Jiang Saode Li Chen

(Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

摘要 产肠毒性大肠杆菌以其密集的纤毛实现了它与宿主小肠上皮细胞微绒毛的牢固粘附。用透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)可把这种状态清晰地显现出来。该菌菌体长约 200 nm, 菌壁厚约 10 nm, 为周身性纤毛。纤毛的长短以及菌体定居状态因菌株的不同而有所差异。

关键词 大肠杆菌; 电镜技术; 金属投影

Key words Escherichia coli; Electron Microscopy; Metal shadowing

大肠杆菌是引起人及动物严重腹泻的细菌性病原之一, 其中的产生肠毒性大肠杆菌(Enterotoxigenic Escherichia coli)依靠密布于菌体表面的纤毛的粘附作用, 牢固地定居于小肠上皮细胞上, 并在此大量繁殖, 同时产生肠毒素, 刺激小肠上皮细胞大量地分泌水和电解质, 从而导致动物严重腹泻和脱水。在这一致病过程中, 肠毒大肠杆菌的粘附定居是致病的重要前题。用 SEM 和 TEM 在超微结构水平来研究这种粘附状态, 并为以后研究清除及反粘附作用提供数据和资料都是十分重要的。

1 材料和方法

1.1 病料 攻毒后典型发病的新生仔猪的小肠前、中、后一小段。

1.2 TEM 样品制备 4%戊二醛前固定, 1%锇酸后固定, 乙醇逐级脱水, Epon812 包埋, 超薄切片后经醋酸铀-柠檬酸铅双染色, JEM-1200EX 电镜观察。

1.3 SEM 样品制备 前固定、后固定与 TEM 法同, 在后固定之后, 投入 2%单宁酸中, 然后经乙醇逐级脱水, 空气干燥, 喷镀金, JEM-1200EX 的 ASID10 观察扫描像。

1.4 金属投影 纯化的大肠杆菌经戊二醛固定后, 吸附在铜网上, 在真空喷涂仪中用金属铬投影, 投影角 30°。

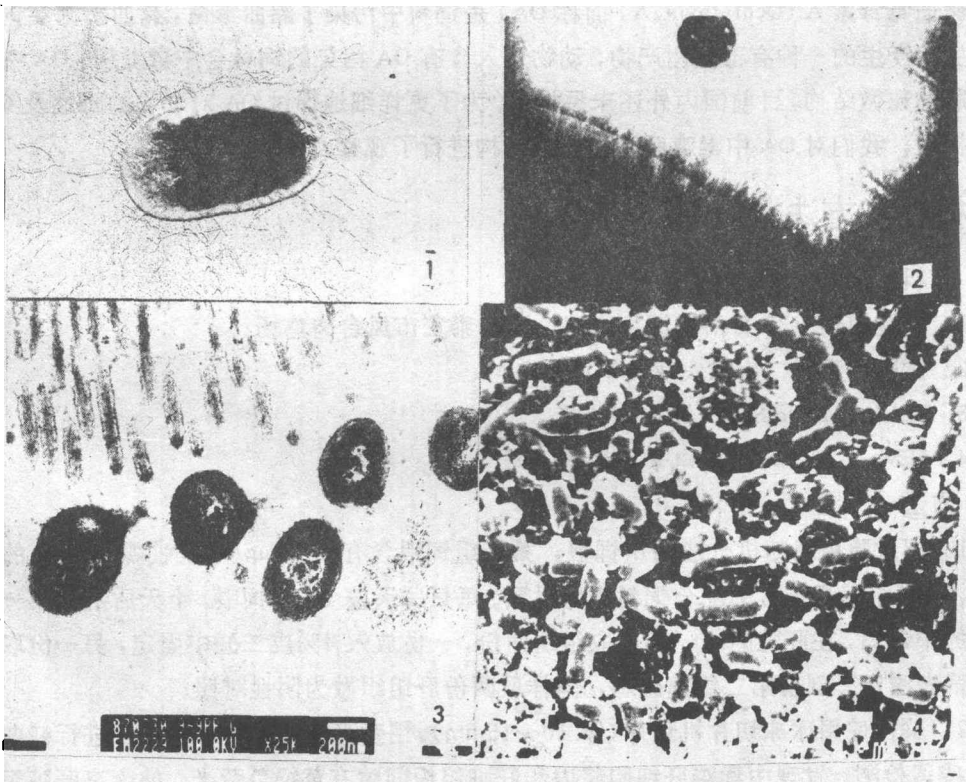
2 结果和讨论

2.1 在透射电镜下, 放大 5 000 倍, 可以看到小肠上皮细胞游离端的刷状缘, 在微绒毛上吸附着大量的大肠杆菌。菌体并不是紧贴在微绒毛上, 它们之间有一空隙, 这条空隙实际上是大肠杆菌纤毛所占据的空间。大肠杆菌正是依靠纤毛这一特殊结构, 才能在宿主肠道长久定居。现已明确, 这种粘附作用是由构成纤毛的粘着素蛋白与小肠上皮细胞微绒毛上的特异性受体相结合的结果。这种结合可以抵抗较强的肠蠕动等一般性外部作用而不被清除, 这是大肠杆菌得以定居肠道并大量繁衍的关键。这种纤毛相当纤细, 以至于在一般的

切片样品和扫描样品中很难看到它。只有用低浓度的 PTA 作负染，并在较暗视野和高放大倍数下才能清晰地显现出纤毛的形态来，用较小的投影角作金属投影时也可以清楚地看到纤毛形态，在透射电镜下，肠毒大肠杆菌菌体长杆形，长约 2 000 nm，甚至更长，横径约 500 nm，菌壁厚约 10 nm，纤毛只有几个埃粗细，呈放射状生长于整个菌体表面，有的纤毛成丛状生长在一起。根据纤毛的有无，以及长短粗细等形态特征可以区分不同的菌株，这在细菌分类学以及工程菌构建方面都作为一项鉴定指标而加以利用。

2.2 在扫描电镜下，可见小肠绒毛上附着大量的大肠杆菌，有的部位菌体相当密集，在低倍镜下看，好象一层表面粗糙的膜复盖在肠绒毛上，几乎看不到下面的刷状缘。尽管样品经历了 10 余次的清洗以及化学试剂的处理，但大量细菌仍牢固地粘附在小肠绒毛上，说明这种粘附不是一般的物理性吸附，类似于免疫学中抗原抗体的结合。在高放大倍数下，菌体可以被清晰地分辨出来，形态保持完好，并可以看到这种吸附状态，但是过分纤细的纤毛还是不易见到。另外在观察中还发现，B-5 (K88+) 株感染的小肠在前、中、后三段都见有细菌定居，而 Xu-1 (K99+) 株只在中、后段见到细菌。这与组织学检查相一致。这说明不同菌株其定居部位状态也不同。

2.3 采用空气干燥法制备扫描样品，对我们来说还是第一次。从结果看，除了肠上皮细胞微绒毛有轻微变形外，肠绒毛、大肠杆菌的形态保持得比较完好。这样做可省去临界点干燥，但要增加一次锇酸处理，这样即能增强样品的导电性能，又强化了固定效果。当然在二氧化碳来源方便的地方还是用临界点干燥法更为理想。



图版 1, 2 大肠杆菌的纤毛。图 1 为金属投影，图 2 为负染色。

3, 4 攻毒猪小肠上皮细胞微绒毛上粘附的大肠杆菌。菌体与微绒毛并不紧密接合，而是借助于纤毛实现这种粘附。