

间体不是细菌细胞的正常结构而是矫作物

邱立友* 高玉千 戚元成 刘新育 王明道 宋安东 张世敏

(河南农业大学生命科学院, 郑州 450002)

摘要 间体自 20 世纪 50 年代被发现以来, 被认为是细菌细胞膜内褶形成的囊状结构, 具有多种功能, 如合成酶类、DNA 和细胞壁等, 参与呼吸、细胞分裂和芽孢形成等。但由于纯化困难, 缺乏结构和功能方面的直接证据, 间体一直受到质疑。在 20 世纪 80 年代, 应用完善的电镜制片方法, 充分证实了间体是制片时人为造成的矫作物, 不是细菌细胞的结构。然而, 教科书编写者对此并没给予足够重视, 目前仍保留着对间体的阐述。间体问题给我们许多教训和启示。

关键词 细菌间体; 细胞结构; 矫形物

1953 年首次从电镜中观察到细菌细胞中含有一个或多个大的、不规则的折叠结构, 称为外周体(peripheral bodies)^[1], 后来称之为间体(mesosome)^[2]。之后, 关于间体是细胞的正常结构还是制作电镜切片时人为造成的矫作物(artifact)的争议一直不断。目前, 间体不是真正的细胞结构, 而是在制备电镜切片过程中细胞膜的折叠形成的矫作物的观点已越来越多地被接受^[3-6]。

1 细菌间体的发现

1953 年, Chapman 等^[1]首次报道了比较清晰的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的超薄电镜照片, 并发现蜡状芽孢杆菌在分裂时形成的隔膜附近有许多外周体, 认为这些外周体与细胞分裂有关, 参与细胞壁的合成。这些外周体即是后来所称的间体。Chapman 等采用的制片方法是 OsO₄ 固定、异丁烯酸包埋法。然而, 这些外周体在低放大倍数的光学显微镜下并没有观察到。尽管如此, 这篇文章还是被认为是首先发现了间体。1956 年, Chapman^[7]报道在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中也发现了外周体。Robertson^[2]第一次将这种与膜相联的原生质结构称为间体(mesosome), 并详细描绘了间体的示意图。此后, 术语“间体”便使用开来。

1960 年一篇关键的论文进一步证实了间体的存在^[8]。作者应用光学显微镜和电子显微镜(制片方法是 Ryter-Kellenberger 固定法)均观察到间体。将活的细菌包括蜡状芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌用活体染色用的詹纳斯绿(Janus green)染色, 用光学显微镜可观察到一定数量的间体, 有力地证明了电镜下观察到

的间体在活的细菌中是真实存在的。此前报道的间体的大小一般是直径在 0.15~0.20 μm , 在光学显微镜下是不可能看到的, 经锇固定后, 固定细胞的一些间体则可用相差显微镜观察到。

随后, 又有许多有关应用电镜观察超薄切片发现在革兰氏阳性菌细胞中含有间体的报道, 证实间体是膜的特殊结构, 并进一步推测间体的功能可能还与细胞分裂时隔膜的 formed 和核的分裂有关, 参与能量代谢和呼吸, 细胞壁和细胞膜的合成, 胞外酶的合成与分泌, 参与细菌的转化等^[9]。Reavely 等^[10]定义间体是细胞膜的囊状内陷物, 形状包括管状、泡状和薄片状等。

除在革兰氏阳性菌中发现间体外, 陆续在革兰氏阴性菌新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)、柱形软骨球菌(*Chondrococcus columnaris*)和紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)中也发现有间体^[11-13]。在蓝细菌中也相继报道发现存在有间体^[14-16]。

2 对细菌间体存在的质疑

在 1970 年前后, 一些科学家认为, 不论是光学显微镜观察结果, 还是化学固定的超薄切片电镜观察结果或低温冷冻不固定电镜观察结果均证实间体的存在。而同时另一些科学家则认为, 化学固定的超薄切片电镜观察和低温冷冻不固定电镜观察时间体的电子显微照片均不清晰, 因此, 在活细菌细胞中不存在间体。Rogers^[17]质疑间体在细胞中的形态、位

收稿日期: 2007-08-06 接受日期: 2007-09-24

* 通讯作者。Tel: 0371-63555153, Fax: 0371-63554528, E-mail: qliyou@henau.edu.cn

置、数量和功能, Nanninga^[18]怀疑间体在细胞中是否存在, 因为他在实验中发现, 在枯草芽孢杆菌未固定的幼龄细胞的冷冻切片仅可看到很少的间体, 而用四氧化钨固定的细胞中则可看到大量的间体。他认为化学固定会影响膜的代谢, 从而导致间体的形成。由于间体纯化困难, 明确证实间体中是否存在酶或化学标记物十分困难^[19]。间体的化学成分与细胞膜并没有任何差别。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)经 Ryter-Kellenberger 法固定后用柠檬酸铅染色, 利用电子显微镜密度观察, 原生质膜和间体膜在密度上没有差别^[20]。

1973年, Nanninga^[21]采用低温法制备细菌的电镜切片, 没有发现之前报道的采用化学法固定和包埋的切片所观察到的间体。在此之前, Nanninga^[18]和其他研究者认为, 应用低温保护剂如甘油处理细菌后, 电镜观察可看到细菌更为清晰的自然结构, 因为应用低温保护剂处理的细胞解冻后可恢复活力, 因而在冷冻过程中能够保留生活状态的结构, 如此具活力的冷冻的细菌应当含有间体。然而, 实际实验结果却是低温保护剂处理的细菌没有观察到间体。尤其重要的是, 低温电镜显微技术曾作为电镜制片时检验细胞结构是否受到破坏的活体实验对照。随着这种低温电镜制片方法被逐渐接受, 间体存在的证据受到广泛质疑, 认为间体可能是矫作物^[22]。

1976年, Silva 等^[23]用 Ryter-Kellenberger 方法制蜡芽孢杆菌的电镜切片时, 只有用 0.1% OsO₄ 进行预固定时才可观察到间体, 并且发现间体的数量随预固定时间(0~1.7 min)的延长呈直线增加。而用 0.1% OsO₄ 处理可迅速导致原生质体的溶解, 使细胞中的 K⁺ 大量泄露。应用 1% OsO₄, 4% OsO₄ 或 2.5% 戊二醛预固定时, 没有观察到大且完整的间体, 仅发现有小而简单的原生质膜内陷。乙酸双氧铀(uranyl acetate)对膜的损伤较小, 应用乙酸双氧铀进行预固定后, 同样没有观察到间体。因此, Silva 等认为细菌细胞膜应当是连续的没有折叠结构(间体)。

关于间体功能的研究也出现了互相矛盾的结果。许多研究认为间体参与能量代谢和呼吸, 然而, 在间体中特异性氧化酶脱氢酶和细胞色素的浓度相当低^[24,25]。间体尽管常常出现在核和细胞膜之间, 可能与核的分裂有关, 但是, 正常生长和分裂的杆菌中没有发现有间体。在芽孢杆菌和链球菌的细胞隔膜处很容易发现存在有间体, 但研究表明间体并不能催化芽孢杆菌的肽聚糖和磷壁酸合成的起始阶段, 这个

功能存在于原生质膜^[9]。

到 20 世纪 80 年代初, 发展了一种新的显微制片方法不固定、不染色、冷冻含水切片技术(amorphous, unstained, frozen-hydrated sections), 为电镜观察提供了一种可靠的、高保真的生物材料, 可克服以往电镜制片时易形成矫作物的缺点。应用这种制片方法, 分别观察了革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 均没有观察到间体或任何类似的结构。因此, 间体在革兰氏阳性菌中并不存在, 而是制片时造成的矫形物^[26]。至此以后, 就不再见在细菌细胞中发现有间体的报道。

到了本世纪初, 应用现代先进的低温透射电子显微镜和原子力显微镜观察生长和分裂的革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、革兰氏阴性菌大肠杆菌和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的冷冻含水切片, 均未发现有间体存在^[27,28]。在高渗透压下, 金黄色葡萄球菌发生质壁分离, 在细胞壁内层区与原生质膜之间发现有膜囊, 形状如间体。但是, 作者认为由于革兰氏阳性菌与细胞膜相联有较多的脂质成分, 这些脂质成分与细胞壁有着较强的相互作用, 另外, 与细胞膜相联的还有一些酶、脂磷壁酸和脂蛋白等, 都有助于在质壁分离过程中将部分细胞膜与原生质体分离开来从而形成膜囊^[29]。为避免形成矫形物, 采用透射电镜快速法制片观察金黄色葡萄球菌, 用抗生素处理的细胞形成有间体, 对照组细胞没有间体, 间体其实是由连续的原生质膜折叠而成的^[30]。

3 间体问题的教训与启示

在 20 世纪 50 年代中期间体被认为是细菌的一种细胞结构, 到 20 世纪 80 年代初期该观点被彻底否定。对间体的正确认识经历了近 30 年的历程, 带给我们许多教训和启示。

3.1 实验方法对实验结果有重要影响

Allchin^[31]将科学错误分为四种类型(表 1), 生物学家在间体问题上所犯的错误是典型的材料错误中的方法不正确。20 世纪 50 年代, 应用 OsO₄ 固定、异丁烯酸包埋法发现了“外周体”; 20 世纪 60 年代, 应用 Ryter-Kellenberger 钨固定、聚酯包埋法制片, 观察到管状和扁平状的间体; 20 世纪 70 年代初期, 应用戊二醛或乙酸双氧铀和钨固定、环氧树脂包埋法制片, 观察到数量更多但个体更小的间体。到了 1973 年以后至 20 世纪 80 年代初期, 发展了低温冷冻切片技术和不固定、不染色、冷冻含水切片技术,

表1 科学错误的分类^[31]

错误类型	主要特征
材料错误	不适当的材料(样品不纯, 培养物被污染) 不适当的方法(实验方法不正确, 实验技能不熟练) 观察者对实验现象观测有误(心理作用) 不能区别实验条件下相似的现象
观测错误	不能充分确定主要的应观测的数据或项目 测定方法的原理不完善(对仪器/方法不理解) 观测者的认识有偏差(理论渗透的观测, 必须双盲) 取样错误(缺乏统计, 最适界值点的显著性水平或其他概率因数低)
概念错误	推理上有缺陷(包括简单的计算错误, 逻辑谬误, 错误的因果关联性, 证据不充分) 不适当的统计模型 对理论模型不适当的阐述 无特定限制的假说或条件限定不合理 理论的适用范围过高或过低 理论不完善, 缺乏明确的解释(创造力受限) 理论的认知基础不全面, 有罅隙
论述错误	信息有误: 报告不完整, 印刷不清晰, 有语言障碍, 引用文献/检索系统不完善 判断失误(马太效应, 晕轮效应)/ 欺诈 忽略了社会文化认知方面的偏差(性, 种族, 经济地位等) 科学术语认证系统不健全 公众对科学结果和科学知识的误解(缺乏科学教育, 缺乏科技资料等)

这些技术在制片过程中能够保持细胞的活性, 就不再观察到间体, 从而澄清了间体问题。

3.2 要有完整的证据链

20世纪50年代提出间体是细菌细胞的结构时证据是比较缺乏的, 仅有光学显微镜的观察结果对电镜结果加以佐证, 而缺乏其他重要的证据, 如由于间体纯化困难, 对间体中是否存在酶或化学标记物没有研究结果; 间体的化学成分与细胞膜并没有差别, 间体的功能仅仅根据其出现的时间和位置进行推断, 没有直接的证据^[32]。一个细胞结构的确定, 应当有如下证据链: 形态观察结果, 分离纯化结果, 化学成分分析结果, 功能实验结果等。

3.3 教材内容要及时更新

支持间体是由膜构成的器官的理论的证据在20世纪60年代比其他任何时期都充分, 间体的概念也被编入教材, 即使是在20世纪70年代中期以后对间体的质疑逐渐变得强烈时, 教材中关于间体的论述仍然被保留。到20世纪80年代初实验充分证实间体是矫作物, 但教材中仍然保留间体的内容。直到进入本世纪, 教材内容才开始将间体的内容修订为“近年来也有学者提出不同的看法, 认为‘间体’仅是电镜制片时因脱水操作而引起的一种矫形物”, 仍然没有将间体从教材中剔除。因此, 这个教训超过了对间体认识的实验过程。教材编写一定要及时更新内容, 及时吸纳最新的可靠的研究成果, 力避误人子弟。

参考文献 (References)

- [1] Chapman GB *et al.* *J Bacteriol*, 1953, **66**: 362
- [2] Robertson JD. In: Crook EM ed., *Biochemical Society Symposium, No.16*, Cambridge University Press, 1959, 154
- [3] Rasmussen N. *Biol Philos*, 2001, **16**: 629
- [4] Allchin D. The Epistemology of Error, Paper presented at Philosophy of Science Association Meetings, Vancouver, November, 2000, 226
- [5] Hudson RG. *Hist Philos Life Sci*, 2003, **25**: 167
- [6] Tortora GJ *et al.* *Microbiology: An Introduction*, 8th ed., San Francisco: Pearson Education, 2004, 89
- [7] Chapman GB. *J Bacteriol*, 1956, **71**: 348
- [8] Fitz-James PC. *J Biophys Biochem Cytol*, 1960, **8**: 507
- [9] Reusch VM Jr *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1973, **300**: 79
- [10] Reavely DA *et al.* In: Rose AH *et al.* (eds). *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 7, New York: Academic Press Inc, 1972, 1
- [11] Cohen-Bazire G *et al.* *J Gen Microbiol*, 1966, **42**: 301
- [12] Pate JL *et al.* *J Cell Biol*, 1967, **35**: 1
- [13] Rucinsky TE *et al.* *J Bacteriol*, 1974, **118**: 717
- [14] Ingram LO *et al.* *Protoplasma*, 1970, **71**: 55
- [15] Allen MM. *Arch Mikrobiol*, 1972, **84**: 199
- [16] Avakyan AA *et al.* *Mikrobiologiya*, 1978, **47**: 739
- [17] Rogers HJ. *Bacteriol Rev*, 1970, **34**: 194
- [18] Nanninga N. *J Cell Biol*, 1971, **48**: 219
- [19] Salton MRJ. *Critical Review of Microbiology*, Cleveland, Ohio: Chemical Rubber Company, 1971, 161
- [20] Highton PJ. *J Ultrastruct Res*, 1969, **26**: 130
- [21] Nanninga N. In: Benedetti E *et al.* (eds.) *Freeze-Etching: Techniques and Applications*, Paris: Societe Francaise de Microscopie Electronique, 1973, 151
- [22] Ebersold HR *et al.* *Arch Microbiol*, 1981, **130**: 19
- [23] Silva MT *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1976, **443**: 92
- [24] Frehel C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1971, **234**: 226

- [25] Ryter A. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1969, **49**: 151
[26] Dubochet J *et al. J Bacteriol*, 1983, **155**: 381
[27] Matias VR *et al. J Bacteriol*, 2003, **185**: 6112
[28] Touhami A *et al. J Bacteriol*, 2004, **186**: 3286
[29] Matias VR *et al. J Bacteriol*, 2006, **188**: 1011
[30] Santhana Raj L *et al. Trop Biomed*, 2007, **24**: 105
[31] Allchin D. *Perspect Sci*, 2001, **9**: 38
[32] Culp S. *Philos Sci*, 1995, **62**: 430

Semomose not a Normal Structure of Bacterial Cell but a Artifact

Li-You Qiu*, Yu-Qian Gao, Yuan-Cheng Qi, Xin-Yu Liu, Ming-Dao Wang, An-Dong Song, Shi-Min Zhang

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Bacterial mesosome had been considered as membranous vesicle organelle, and with many functions, synthesizing several enzymes, DNA and cell wall, taking part in respirations, cell division, and spore formation, from 1950s. But it had been debated that the existence of true bacteria cell structure because of mesosome extraction difficulty and lack of direction evidences for structure and functions. Mesosome was confirmed that it was an artifact when preparing a section for electron micrographs and not a true bacterial cell organelle by a method for high-resolution observation of sectioned, frozen-hydrated biological material in 1980s. Nevertheless, the textbook editors had not recognition the experiments results extremely, and remained mesosome expatiation up to now. Mesosome controversy gave us many lessons and apocalypses.

Key words bacterial mesosome; cell structure; artifact

Received: August 6, 2007

Accepted: September 24, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-371-63555153, Fax: 86-371-63554528, E-mail: qliyou@henau.edu.cn