

227636

电子显微镜应用研究

第一分册



北京大学电子显微镜实验室

前 言

目前，电子显微镜已经成为一种越来越重要的研究工具。近十多年来，由于扫描电镜的出现，使电镜的应用范围得到了很大的扩展，但是透射电镜在高分辨率方面仍然占据着遥遥领先的地位。近年来电镜的发展重点在综合分析、透射电镜和扫描电镜的结合使用是发展趋势。

我校电镜室成立已有十五年，目前配备有透射电镜（JEM—6C）和扫描电镜（S4—10）各一台。分析工作的对象涉及物理学、化学、生物学和地学等领域，各方面的研究工作虽然取得了一些成果，但是由于林彪、“四人帮”的破坏，无论在数量或质量方面都远不能令人满意，研究资料的整理工作也做得很不及时。为了交流经验、进一步推动电子显微镜的应用，现将几年来的部分工作成果，分册整理付印。第一分册为生物学分册，第二分册为物理学、化学、地学分册。

由于时间匆促，缺乏经验，汇编中难免有缺点、错误，欢迎读者批评指正。

北京大学电子显微镜实验室

一九七九年四月

目 录

牛流行热病毒的研究

——病毒形态与理化特性

-北京大学生物学系病毒与细胞研究组
北京兽医医学院 (1)
农林部兽医生物药品监察所
北京顺义畜牧兽医站

蜜蜂慢性麻痹病毒的研究

-江西省养蜂研究所 傅守信
北京大学生物学系昆虫学教研组 杜芝兰 (12)
北京市农科院果林研究所养蜂组 陈祺翔

多粘芽胞杆菌噬菌体研究初报

-生物学系 多粘菌素研制组 (16)

应用扫描电子显微镜对小麦穗发育的观察

-生物学系 高信曾
电子显微镜室 朱 宜 张存珪 张晓萍 (20)

小麦雄性不育系和保持系的小孢子发育的电子显微镜研究

-生物学系植物学专业 胡适宜 王模善 徐丽云 (28)

病毒复制与宿主细胞线粒体超微形态的变化

-生物学系 病毒与细胞研究组 (38)

实验针麻诱导前、后肾上腺超显微结构的研究

-生物学系针麻原理研究组 张人骥 朱丽霞 程会文 (45)
数 学 系 刘婉如

骨巨细胞瘤超微结构的观察

-北京大学生物学系肿瘤组 (57)
北京医学院附属人民医院外科实验室骨科组

胃粘膜病变扫描电镜的初步观察

-生物学系 郭振泉 李静涵 李汝祺 (68)

临界点干燥的微生物标本在扫描电镜中的观察

-中国科学院微生物研究所 乔宝义 (76)
北京大学电子显微镜室 张存珪 张惠珍

封面说明：棉花雌蕊的柱头和花粉粒

牛流行热病毒的研究

——病毒形态与理化特性

北京大学生物学系病毒与细胞研究组

北 京 兽 医 院

农林部兽医生物药品监察所

北京顺义畜牧兽医站

摘 要

研究了从北京分离的牛流行热病毒的北 76AMH 毒株（牛源鼠毒适应在 BHK₂₁ 细胞系上的毒株）的主要特性。证明该病毒是 RNA 型，在宿主细胞质内装配，以出芽方式从细胞中释放并成熟。成熟病毒粒子呈典型弹状，大小为 85nm×170nm。毒粒外面有厚 11nm 的囊膜及囊膜小体。病毒对有机溶剂和胰蛋白酶敏感，能耐受反复多次的冰冻—融化处理而不降低其感染力。初步测定了保存在不同温度条件下病毒的灭活情况。根据上述特征以及流行病学资料，该病毒与国外报导的牛暂时热病毒是一致的。而与某些在临床症状上相似的牛流行病病毒如牛蓝舌样病毒、牛鼻气管炎病毒和牛呼吸道合胞体病毒却有本质的区别。

一九七六年我国某些地区流行一种牛急性传染病（暂称牛流行热），从其症状及流行病学判断，有可能是南非、澳大利亚和日本等国报导的牛暂时热（一九六九年以前日本称之为牛流行热）。但是，它与牛蓝舌样病毒（Ibaraki 病毒）牛鼻气管炎病毒及牛呼吸道合胞体病毒等所引起的临床症状也有某些类似之处。为此，我们对牛流行热病毒的某些理化特性、形态和大小进行了研究，希望能够有助于与症状类似的传染病相区别，有助于确定病原的分类地位，并为采取有效防治措施，尤其是疫苗研制提供依据。

材 料 和 方 法

材料:

待鉴定病毒是牛流行热北 76AMH 毒株。此株病毒在一九七六年由北京红星公社北农场自然发病牛高热期血用乳鼠传了 8 代，又适应到 BHK₂₁ 细胞系上。供本实验所用的是在 BHK₂₁ 细胞上的第 15—21 代毒，即 MH₁₅—MH₂₁。（本文内把毒株名首“北 76A”略去）。

对照病毒：单疱疹病毒。61001HK₄ 即 61001 毒株在人胚肾原代细胞上传了 4 代的毒

种。

口蹄疫病毒乙K₅T₁₀, 为乙型口蹄疫病毒的乳鼠传代毒株又在猪肾原代细胞上传了10代。

BHK₂₁ 细胞系: 是源自幼仓鼠肾的传代细胞系。培养细胞的营养液是199液含10%的犊牛血清, pH7.2左右。维持液是199液含5%犊牛血清。pH7.6左右。

病毒稀释液: 含10%犊牛血清的 Hanks 液。pH7.2左右。

DNA 合成抑制剂: 5-碘-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (IUdR) 国产的商品名为“疱疹净”。

胰蛋白酶: 活性1:250 (Difco)。

方法:

细胞及病毒培养。BHK₂₁ 细胞传代时, 细胞单层用 0.25% 胰蛋白酶消化后再用营养液作 3 倍—4 倍稀释, 然后将细胞悬浮液分装在培养瓶, 37℃ 静置培养 2—3 天后即形成完整的细胞单层, 这时可以进行细胞传代或接毒。接毒量为维持液的10%。室温吸附 1 小时左右, 倒去毒液, 加入维持液, 37℃ 静置培养。在正常情况下, 接毒后36小时左右开始出现 cpe (细胞病变)。主要特征是病变细胞圆缩, 折光率增强, 先是若干孤立的病变灶, 继而扩散, 在72小时以内 cpe 达90—100% (图片 1), 然后几乎全部细胞从瓶壁脱落。当达到 70% 左右的细胞病变时收毒。存放于 -6℃ 冰箱中, 结冻后取出融化。用此法获得的毒液供病毒继代或供实验用。凡供实验用的病毒液, 先经 3000rpm 离心10分钟, 除去较大的细胞碎片后再用。

病毒感染力滴定: 供滴定用的细胞培养在链霉素瓶中, 每瓶分装 1ml 细胞悬浮液, 37℃ 静置培养 2—3 天形成细胞单层后即可使用。待滴定的病毒样品用稀释液作 10 倍递增稀释。因为此病毒对温度比较敏感, 所以每稀释完一份病毒立即接毒, 然后再稀释第二份毒液。当室温高的情况下, 毒液稀释在冰水浴中进行。每个稀释度的毒液接种 4 瓶细胞, 每瓶接入 0.1ml, 室温下吸附 1 小时左右, 倒去病毒液, 加 1ml、pH7.8 左右的维持液。37℃ 静置培养, 观察 5 天, 按 Reed 和 Muench 的方法计算细胞瓶的半数感染量 (TCID₅₀)。

电子显微镜研究方法: 电镜样品的制备用超薄切片法与经超速离心初步提纯的毒液悬滴法。

超薄切片法: 被病毒 MH₂₈ 感染的 BHK₂₁ 细胞培养物, 待病变细胞达 60—70%, 用 2% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH7.2) 预固定 90 分钟, 再用 1% 锇酸磷酸缓冲液固定 2 小时, 丙酮脱水后用国产环氧树脂 “618” (固化剂为 DDSA) 包埋。切片指示厚度为 200—500Å, 切片用醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色。

初步提纯浓缩毒液悬滴法: 被病毒 MH₂₁ 感染的 BHK₂₁ 细胞病变达 70% 时, 置 -6℃ 冻结, 取出融化后经 2500rpm 初步离心 15 分钟, 取上清液经 650nm 孔径的微孔滤膜过滤。滤液用 90,000×g 低温超速离心 90 分钟, 将沉淀物用极少量的 Hanks 液悬浮, 必要时可用 10,000—15,000 赫芝超声波处理 10—20 秒, 使其分散。在碳膜铜网上悬滴, 用 2% 磷酸铀负染 (pH6.5)。

其余各特性的测定方法在有关部分与实验结果同时叙述。

实 验 结 果

一、核酸型的鉴定

1. DNA 合成抑制物 IUdR 的影响

浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 的 IUdR 能抑制 DNA 病毒在组培细胞中的繁殖。但不能抑制 RNA 病毒的繁殖,这是鉴别病毒核酸型的简便方法之一。

将 MH_{19} 和 MH_{20} 毒液分别作 $10\times$ 递增稀释,每稀释度接种 8 瓶单层细胞。接毒的同时加入维持液,其中 4 瓶加正常维持液(对照组),另 4 瓶加含 $50\mu\text{g/ml}$ IUdR 的维持液 (IUdR 组), 37°C 静置培养,连续观察 5 天。从表一所列结果可见流行热病毒的繁殖不受 IUdR 影响。

对照实验:用已知的 DNA 病毒——单疱疹病毒作对照,在人胚肾原代细胞上进行滴定,实验方法同上。结果对照组滴度 $\geq 10^{5.5}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$,而 IUdR 组滴度为 0。可见 IUdR 能抑制单疱疹病毒的繁殖。

表一 IUdR 对牛流行热病毒和单疱疹病毒的影响

病	毒	组 别	滴度 ($\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$)
牛 流 行 热	MH_{19}	IUdR	$10^{4.75}$
		对 照	$10^{5.25}$
	MH_{20}	IUdR	$10^{3.74}$
		对 照	$10^{3.50}$
单 疱 疹 (对 照)		IUdR	0
		对 照	$\geq 10^{5.50}$

2. 电镜观察病毒在宿主细胞内的装配部位

被 MH_{16} 病毒感染的细胞经超薄切片电镜观察,可以看到宿主细胞质中有毒浆结构。此外,细胞质内的结构变化显著,尤其是出现大量微管与微纤结构(图片 2),而在细胞核内从未观察到任何毒浆样构造以及与病毒装配有关的任何结构变化,这说明病毒在细胞质内装配。

由于牛流行热病毒的繁殖不受 DNA 抑制物 IUdR 的影响,而其核衣壳的装配又在细胞质中进行。所以认为它是 RNA 型病毒。

二、毒粒大小和形态

1. 用微孔滤膜测定毒粒大小

取 MH_{19} 毒液 10ml 留 1ml 作对样品,剩余的依次负压通过孔径为 650nm, 300nm, 220nm 和 100nm 的各级微孔滤膜。从每通过一级滤膜后的滤过液中取 1ml 作样品。剩余的

再通过次一级的滤膜，各份样品同时测定滴度。

从表二可以看出，病毒能够通过650nm，300nm 和 220nm 孔径的滤膜，只是滴度略有降低，但是病毒基本不能通过 100nm 孔径的滤膜，因此估计毒粒大小在 100—220nm 之间。

表二 经过不同孔径的滤膜后牛流行热病毒的滴定

滤膜的孔径	滴 度 (TCID ₅₀ /0.1ml)	
	实 验 1	实 验 2
未 滤 前	10 ^{3.75}	10 ^{5.75}
650nm		10 ^{5.35}
300nm		≥10 ^{4.5}
220nm	10 ^{2.33}	10 ^{4.0}
100nm	≤10 ^{0.5}	≤10 ^{0.5}

2. 病毒颗粒的超速离心沉淀

对离心前的毒液以及经 90,000×g 低温离心90分钟后的上清液同时进行滴定。从表二结果说明毒粒基本上都被沉淀下来了。

表三 超速离心前后毒液的滴定

处 理	滴 度 (TCID ₅₀ /0.1ml)
离 心 前	10 ^{3.33}
离心后上清液的上部 $\frac{1}{2}$	0
离心后上清液的下部 $\frac{1}{2}$	10 ^{0.5}

3. 电镜观察病毒颗粒形态与大小

经超速离心浓缩与初步提纯后的病毒颗粒用磷钨酸负染，可以在电镜下看到很多十分典型的弹状病毒（图片3），顶端略钝圆，两边平行，基部有轴沟，有的可见囊膜及囊膜小体。典型弹状病毒颗粒的直径为85nm，高为170nm，轴沟直径38nm，高65nm，囊膜厚11nm。除这些典型的弹状病毒外，还可观察到形态大小略有差异的毒粒。有的略粗短，大小约102×152nm（图3）。少数略细长，端部钝圆，大小约80(100)×200nm。呈圆锥状的毒粒是极为个别的。将同一份超速离心浓缩与初步提纯的毒液放在-6℃保存14天后悬滴负染，病毒形态变化很大，几乎再观察不到轴沟了。这种形态结构的变化伴随着病毒液感染力的降低。

从超薄切片的样品，可以观察到一些正在从宿主细胞以出芽的形式向外或向胞质空泡内释放的病毒颗粒。典型毒粒大小为80nm×160nm，超薄切片染色的病毒粒子比负染的略小，这是普遍规律。在切片上也有个别特大的锥形病毒。

在宿主细胞内经常可以看到成簇的圆形病毒样颗粒，其直径约为 80—90nm，颗粒内部还有电子致密的“内核”样构造。对于这种圆形颗粒将在后面专门讨论。

三、病毒某些理化特性的测定

1. 对有机溶剂的敏感性

凡是有囊膜的病毒（痘病毒除外）经有机溶剂处理后，囊膜被破坏，病毒感染力随即丧失，而无囊膜的病毒则能抵抗有机溶剂的处理。所以病毒对有机溶剂的抵抗力是病毒分类的重要标准之一。据报导牛暂时热病毒能被有机溶剂所灭活^[13]。

（1）氯仿处理

10×100mm 试管中加 MH₁₇ 毒液 2ml，再加分析纯氯仿 0.1ml，塞紧试管口，用手猛烈振摇呈乳浊，室温（20℃）静置10分钟，3000rpm 离心10分钟，氯仿沉于管底，取上层水相，测定滴度。

（2）乙醚处理

10×100mm 试管中加 MH₁₇ 毒液 1.6ml，再加麻醉用乙醚 0.4ml，塞紧管口，用手振摇成乳剂，室温（25℃）静置10分钟，3000rpm 离心10分钟，乙醚浮在液面，吸取下层水相注入无菌培养皿，将培养皿放在干燥瓶中，使残存的乙醚在负压下挥发掉，然后测定滴度。

（3）对照实验

用已知对有机溶剂不敏感的，无囊膜的口蹄疫（乙型）病毒作对照，处理方法同上。用氯仿或乙醚处理前后的口蹄疫病毒在乳猪肾原代细胞上测定滴度。

结果说明流行热病毒被有机溶剂完全灭活。而口蹄疫病毒则不受影响。

表四 有机溶剂处理对牛流行热病毒和口蹄疫病毒的影响

病 毒	处 理	滴度 (TCID ₅₀ /0.1ml)
牛流行热病毒	不 处 理	10 ^{3.8}
	氯 仿	0
	乙 醚	0
口 蹄 疫 病 毒	不 处 理	10 ^{6.0}
	氯 仿	10 ^{5.7}
	乙 醚	10 ^{6.0}

2. 对胰蛋白酶的敏感性

有些病毒，如牛暂时热病毒经0.5%和0.25%胰蛋白酶处理后完全丧失感染性^[13]，本实验用胰蛋白酶处理 MH₁₅ 毒液，方法如下：

0.5%胰蛋白酶处理：10×100mm 试管中加病毒液0.5ml，再加溶于 Hanks 液中的1%胰蛋白酶 0.5ml（酶的终浓度为0.5%），塞紧管口，将试管倒转几次，使两液充分混匀。混合液 pH7.2，在37℃中保温 1 小时后加入在冰箱中预冷的犊牛血清 4ml，充分混匀以终止胰蛋白酶的继续作用。以这样的混合液当作原液，再用稀释液继续作10倍递增稀释后测滴度。

0.25%胰蛋白酶处理：方法同上，但加入的胰蛋白酶浓度是0.5%。

结果两种浓度的胰蛋白酶都能灭活牛流行热病毒。

表五 胰蛋白酶处理对病毒的影响

处 理	滴 度 ($TCID_{50}/0.1ml$)
不 处 理	$10^{3.3}$
0.5 % 胰蛋白酶	0
0.25%胰蛋白酶	0

3. 牛流行热病毒对冻-融的耐受力

Tanaka(1969)^[13]和 Heuschele(1970)^[13]都报导牛暂时热病毒能经受反复多次的冰冻-融化处理而不降低其感染力,我们按他们的方法处理牛流行热病毒 MH₁₆: 病毒液以 1ml 量分装在 3 个青霉素小瓶中,把小瓶埋入干冰,使瓶中毒液迅速冻结后取出,在室温水融化,然后再次埋入干冰冻结。如此反复冻-融处理 1 次, 5 次或 10 次后,同时分别测定其滴度。结果此病毒经 10 次冻-融后仍保持原来的感染力。

表六 冻-融处理对牛流行热病毒的影响

冻 融 次 数	滴 度 ($TCID_{50}/0.1ml$)
1 次	$10^{3.5}$
5 次	$10^{3.0}$
10次	$10^{3.8}$

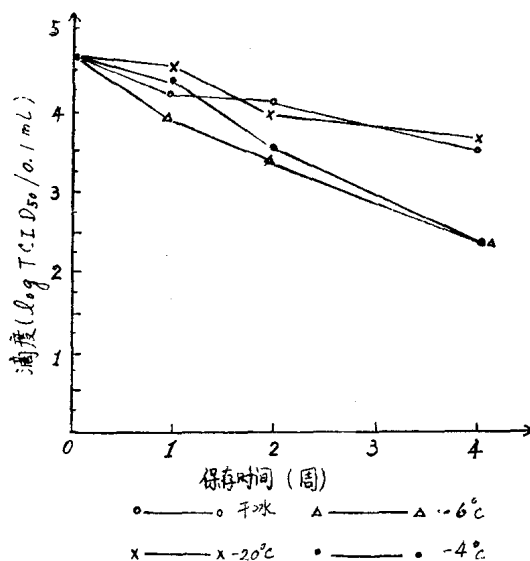
4. 病毒对温度的敏感性

为了解牛流行热病毒保存在不同温度条件下感染力的变化,我们将 MH₁₆ 毒液加入 5% 犊牛血清,使毒液中血清的最终浓度为 10%,将毒液以 1ml 量分装在青霉素小瓶中并分别保存在干冰、-20℃ 冰箱、-6℃ (普通冰箱的冷冻盒)和 4℃ 普通冰箱中。在保存后的 1 周、2 周和 4 周从每种温度中取出 1 瓶毒液,测定滴度。结果见右图。

四条曲线基本上都是平稳地下降,在 4 周的保存期内,保存在干冰中和 -20℃ 中滴度下降约 1log 单位,平均每周下降约 0.25log 单位。保存在 -6℃ 和 4℃ 中滴度下降 2.3log 单位,平均每周丧失约 0.6log 单位。

四、流行热病毒与呼吸道合胞体病毒的中和试验①

据报导^[11,12],牛呼吸道合胞体病毒与人呼吸道合胞体病毒有共同抗原,能交叉中和反应。为查明我们的牛流行热病毒与呼吸道合胞体病毒的关系,将牛流行热病毒的高免牛



牛流行热病毒保存在不同温度下感染力丧失情况

① 此试验由医科院儿科研究所病毒室协助完成。

血清（中和指数 >10000 ）和阴性牛血清（中和指数 $=0$ ）与人呼吸道合胞体病毒按常规进行交叉中和试验。结果说明，无论高免血清或阴性血清与人呼吸道合胞体病毒中和试验均同样地呈典型阴性反应，从而说明牛流行热病毒与呼吸道合胞体病毒无共同抗原。

讨 论

关于病毒形态，我们从北京分离的牛流行热毒株的形态、大小和澳大利亚^[4, 10]，及日本^[7, 14]的牛暂时热毒株基本是一样的。悬滴负染和超薄切片样品中的病毒颗粒大多数呈典型的弹状，我们测量的大小（ $85 \times 170\text{nm}$ ）略比他们报导的（ $70 \times 140\text{nm}$ ）大一点，这种误差范围是允许的。负染的病毒比切片正染的^[4]略大一点也是合乎电镜制样技术规律的。在我们制备的样品中，同时也观察到极少量的呈锥体状病毒。其形态与大小和南非的毒株^[8]颇为相似。实际上已有报导^[10, 15]，同一毒株在不同的收毒时间和培养条件下可能出现不同比例的弹状或锥状病毒颗粒。除了上述典型的病毒形态外，还存在着一定数量形态大小很不正常的病毒颗粒。为什么从宿主细胞释放出这些“怪胎”呢？这些病毒有无感染力呢？这是值得继续研究的问题。

关于“T颗粒”：还有一个重要现象值得提出来讨论。弹状病毒属中的水泡性口炎病毒当用不经稀释的毒液传代，往往会产生许多无感染力的、有缺陷的病毒颗粒。它们近于球形，直径与正常子弹状病毒的宽度相近，因此称作“T颗粒”，意即“缩短了的颗粒”。这种“T颗粒”有两个特点：第一，它本身没有感染力，第二，它专门干扰正常的弹状毒粒的产生，即自家干扰现象。当用未经稀释的病毒液连续多次传代后，T颗粒越来越多，正常弹状毒粒越来越少，感染滴度越来越低^[2]。后来 Murphy等（1972）^[10]和 Tzipori（1975）^[16]在牛暂时热病毒的传代中也证实了T颗粒及其严重的自家干扰现象。我们用未经稀释的北京牛流行热病毒传代过程中也发生了感染滴度下降的现象，曾怀疑是由于自家干扰所引起的。本实验证实我们的病毒无论是用感染细胞的切片样品还是病毒悬滴的负染样品中都经常见到相当数量的球形病毒样颗粒，有的还含有“内核”，其直径（ $80-90\text{nm}$ ）也相当于正常弹状颗粒的宽度（ 85nm ），因此它们很可能就是T颗粒。由于T颗粒对正常毒粒严重的自家干扰作用，所以这是一个很有实践和理论意义的问题，值得进一步探讨。

关于病毒的保存温度：牛流行热病毒在不同温度下保存试验的结果可为今后的工作提供参考。尤其是在一个月的保存期内，看来保存在 -20°C 和在干冰中的效果差不多，这就简化了疫苗研究和生产的条件。但是，与国外暂时热病毒比较，在同样温度条件下我们病毒的感染滴度下降更快些。例如，同样保存在 4°C ，Heuschele（1970）^[3]用20%的鼠脑毒乳剂（含牛血清10%），30天时滴度只下降1log单位，Tanaka等（1969）^[13]用BHK₃₂细胞适应毒在含20%牛血清的条件下，30天内滴度基本稳定，73天时感染力下降1log单位，而我们的实验结果是28天下降2.3log单位，这种差别可能是由于毒株特性不同，保护剂（血清、组织匀浆不同或其他原因造成的。

北京分离的牛流行热病毒与国外牛暂时热病毒的关系：1976年北京以及我国其他一些地区发生的牛流行热在流行病学和症状上与南非、澳大利亚和日本报导的牛暂时热比较相象，而且从北京分离的牛流行热毒株和暂时热病毒一样，也能用乳鼠脑内接种和在BHK₂₁细胞

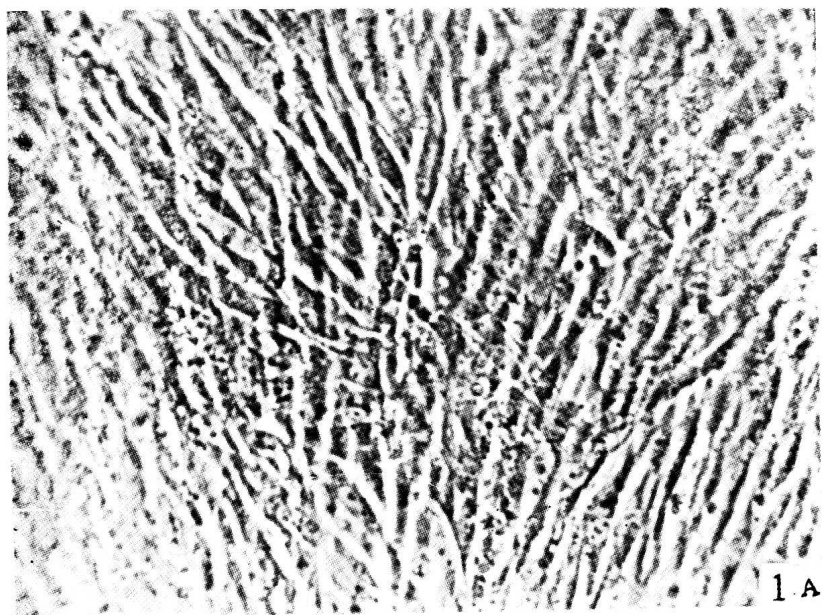
上顺利传代，其细胞病变形态和产毒的滴度也相近。本报告的实验结果又证明北京分离的牛流行热病毒与国外的暂时热病毒有相同的形态和理化特性：它们都是 RNA 病毒，其繁殖不受 DNA 抑制物 IUdR 的影响^[13]，两种毒粒都能通过 220nm 孔径的但不能通过 100nm 孔径的滤膜^[3, 13]，它们都以出芽方式从宿主细胞释放，成熟毒粒呈子弹状，大小也相近，毒粒外面包有囊膜^[4, 7, 10]，它们都能被有机溶剂和胰蛋白酶所完全灭活，都能耐受反复多次冻-融处理而不降低感染力^[3, 13]等等。我们认为北京的牛流行热就是国外报导的牛暂时热。

根据北京牛流行热病毒的上述特点，我们可以明确地排除属于 DNA 型的牛鼻气管炎病毒^[1]，同样，也排除了无囊膜的，能抵抗有机溶剂的牛蓝舌样 Ibaraki 病毒^[6]。血清学中和试验又证明它不是牛呼吸道合胞体病毒，况且后者流行于冬末春初^[11]，给 1 日龄乳鼠作脑内接种不引起发病^[9]，这和牛流行热也完全不同。

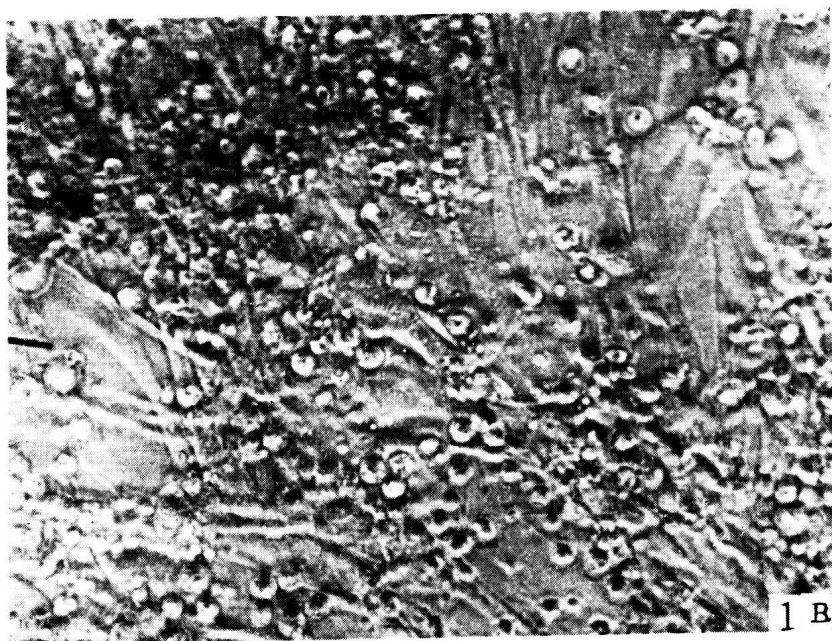
关于牛流行热病毒的分类地位问题，根据北京牛流行热病毒的形态、大小和主要理化特性，我们本可以将它初步归入弹状病毒属^[17]。实际上，1972 年以前牛暂时热病毒也是被归入弹状病毒属的^[1]。但是，后来 Tanaka 等^[14]根据暂时热病毒 RNA 对 RNA 酶的抵抗力及其碱基比例（A/U 和 C/G 均接近于 1）指出这种病毒的 RNA 应该是双键的。如果这样，那么它与目前已被研究清楚了弹状病毒就有本质区别了，迄今所知的一切 RNA 病毒，除呼肠孤病毒属（Reovirus）以外，其 RNA 分子都是单键的，因此暂时热病毒无法纳入目前已知的任何一个病毒科属，可能要为它单独设立一个新的分类地位。至于北京的牛流行热病毒的 RNA 是什么性质，有必要深入研究。

参 考 文 献

- [1] Andrewes, C. *et al.* 1972. *Viruses of Vertebrates*, third ed. P.200.
- [2] Fenner, F. *et al.* 1974. *The Biology of Animal viruses*, second ed. p 129, 261, 321.
- [3] Heuschele, W. P. 1970, *Archiv fur die ges. Virusforsch.*, **30**: 195—202.
- [4] Holmes, H. *et al.* 1970. *J. Virology*. **5**: 91—96.
- [5] Inaba, Y. *et al.* 1968. *Japan. J. Micobiol.* **12**: 253—255.
- [6] Inaba, Y. *et al.* 1970. *Japan. J. Microbiol.* **14**: 351—360.
- [7] Ito, Y, *et al.* 1969. *Nat, Inst. Anim. Hlthquart (Tokyo)* **9**: 35—44.
- [8] Lecatsas, C. *et al.* 1969. *Archiv fur dieges. Virusforsch.* **28**: 390—398.
- [9] Matumoto, M. *et al.* 1974, *Archif fur dieges. Virusforsch.* **4**: 280—290.
(引自 *Vet. Bull.* 1974, #4949) .
- [10] Murphy, F. A. *et al.* 1972. *Archiv fur die ges. Virusforsch.* **38**: 234—249.
- [11] Paccaud, M. F. *et al.* 1970. *Archiv fur die ges. Virusforsch.* **30**: 327—342.
- [12] Rosenquist, B. D. 1974, *J. Infect. Diseas.* **130**: 177—182 (引自 *Vet. Bull.* 1975. #656) .
- [13] Tanaka, Y. *et al.* 1969. *Japan. J. Microbiol.* **13**: 169—176.
- [14] Tanaka, Y. *et al.* 1972. *Japan. J. Microbiol.* **16**: 95—101.
- [15] Theodoridis, A. *et al.* 1973. *Inderstepoort J. Vet. Res.* **40**: 139—142 (引自 *Vet. Bull.* 1974. #5454) .
- [16] Tzipori, S. 1975. *Austral. J. Experi. Biol. Med. Scien.* **53**: 273—279.
- [17] Wildy, P. *et al.* 1971《病毒的分类与命名》(中译本)P. 56.



1A BHK₂₁ 细胞形成良好的单层



1B BHK₂₁ 细胞被牛流行热病毒感染后的细胞病变



2. 被牛流行热病毒感染的细胞质内出现大量的微纤维与微管结构。图片上可以见到两颗正从细胞释放的病毒颗粒（箭号）



3. 初步提纯与浓缩的牛流行热病毒颗粒，磷钨酸阴性反差染色，典型的病毒颗粒呈弹状， 80×75 毫微米，具有轴沟（A）。可以见到病毒囊膜与囊膜小体（B），有时可见到正在裂介的病毒（C）

蜜蜂慢性麻痹病毒的研究

江西省养蜂研究所 傅守信

北京大学生物学系昆虫学教研组 杜芝兰

北京市农科院果林研究所养蜂组 陈禔桐

近年来,蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 普遍发生一种称为“大肚病”的慢性传染病,给我各地的养蜂生产造成了不同程度的影响,特别是随着蜂群的日益流动放牧和互相交流,这种病给我养蜂生产造成很大的损失。

但是,长期以来,有关该病的病因、发病规律及防治方法等问题,国内尚未深入研究过,一九七三、七四年,根据北京市农科院果林研究所蜂病组的研究,初步认为该病在北京地区主要是一种病毒病;从发病时期、症状、病理剖检和组织切片的检查结果来看,都与国外报导的“蜜蜂慢性麻痹病”相似:它们有典型的麻痹症状、有所谓无毛黑蜂,后肠细胞内存在“Merison”体。为了进一步查明病原,使今后的防治工作有更为明确的目标,一九七四年九月至一九七五年底,我们开展了对该病病毒悬液和病蜂大脑及神经节超薄切片的电子显微镜研究。

现将试验工作汇报于后。

试验方法

一、病蜂悬液的电镜检验

供检病蜂(包括自然病蜂和人工诱发病蜂)均为意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica* Spin.) 和高加索蜜蜂 (*Apis mellifera caucasica* Gorb) 等西方蜜蜂,分别采自北京市农科院和北京市郊区蜂场。病毒悬液用病蜂整体研磨离心而成。方法之一是用50只蜜蜂加蒸馏水7.5毫升和四氯化碳2.5毫升,用研钵充分研磨,经2000转/分离心20分钟,抛去沉渣,上清液再经6000转/分离心20分钟,取上清液以32000转/分(80000g)离心2小时,取其沉淀物加0.02M乙酸胺2毫升,再用11000转/分离心30分钟,取上清液作检验样品。另一种方法是将蜜蜂加蒸馏水和四氯化碳研制后,用纱布粗过滤,3500—4000转/分离心15分钟,取上清液。再用10000转/分,在0℃或12℃室温下离心30分钟,取上清液作检验样品。

备检标本用1%磷钨酸(pH6.5)负染1.5—2.0分钟,然后放置电子显微镜下观察和拍摄照片。

有的样品液中先加入少量鞭毛菌(用无致病性的变形杆菌),再加0.5—1倍1%戊二醛溶液,在37℃下静置40分钟,进行负染。

与此同时,同批病毒悬液作了接种健康蜂的感染力测定。备试蜜蜂为出房后1—2天的幼

蜂，先用低温冷冻数分钟，使其冻麻，然后用病毒悬液涂口或作全身喷雾，放入 $10\times 10\times 10$ 厘米铁丝笼内，每笼50只，每处理1—3笼，饲以清洁的50%蔗糖液，置 35°C 温箱内，相对湿度维持在80%左右，每日定时观察记载，对照组以健康蜂悬液作相同处理。

二、病蜂大脑及神经节超薄切片的电镜观察

为了进一步在病蜂组织中检查蜜蜂麻痹病病毒，根据 L. Bailey 等人的资料，我们作了病蜂大脑及胸、腹神经节的超薄切片的电镜观察。

试验材料采自北京市农科院试验蜂群。蜜蜂放在蒸馏水中解剖，取其大脑及胸、腹神经节放入 $2-3^{\circ}\text{C}$ 的Palade 1%锇酸固定液内固定3小时以上，然后在室温下用Palade A液冲洗30分钟，再用丙酮逐级脱水，最后用Epon812包埋，用LKB8800型超薄切片机切片，用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色，在电镜下观察并照相。

三、鸡胚和乳鼠的接种试验

用10000转/分离心制得的0.85%生理盐水病蜂悬液，加青、链霉素各1000单位/毫升，分别接种在 37.8°C 下孵育7—8天的莱亨鸡胚尿囊腔和绒毛尿囊膜上，每卵注射原液0.1—0.2毫升，继续培养观察，然后检验接种尿囊腔的死鸡胚和接种绒毛尿囊膜5天的活鸡胚，并传代和回接蜜蜂。

用同样方法制得的病蜂悬液接种1—5日龄的小白鼠，再将接种致死的鼠体在无菌条件下研磨、离心并继续传代，回接蜜蜂。

结 果

一、在电子显微镜下，无论是自然发病蜂还是人工诱发的病蜂的离心悬液，都可以看到大量病毒颗粒。病毒颗粒的形态和大小差别很大，是一种多态型病毒。它们大多为椭圆形或棒形、棒槌形，并在一端多有乳状突起。有的近似哑铃状或其它非对称状。其大小，椭圆形颗粒约在 $40-70\times 18-40$ 毫微米之间，平均为 53×25 毫微米；棒形颗粒约在 $80-513\times 15-21$ 毫微米之间，平均为 161×18 毫微米。（见图1）

在健康蜂的离心悬液中未发现上述典型颗粒。

以上述同批病蜂悬液接种健康蜜蜂，经多次反复试验观察，无论是涂口或全身喷雾，在 35°C 下均在接种后3—4天开始发病，罹病蜜蜂的四肢及翅膀不停地颤抖，明显表现蜜蜂慢性麻痹病的症状，而在开始发病后1—3天内大量死亡。兹以一九七四年九月十一日的试验（用80000g离心悬液接种）为例，见表。

由表可见，该项试验的蜜蜂在接种后第三天开始发病，而在第四、五、六三天内，蜜蜂大量死亡，死去整个试验死亡蜂数的82.5%，特别是在开始发病后的第二、三天，这说明蜜蜂在显出症状后在很短期间内即行死亡。

我们也曾作过 30°C 和 35°C 不同温度的处理，结果看出，都是在接种后第三天开始发病，但 35°C 下的接种蜜蜂的死亡率比 30°C 的高，与国外的研究结果相一致。

二、对病蜂大脑及胸、腹神经节超薄切片的初步观察，发现病蜂大脑神经细胞的内质网内存在成堆不均匀分布的椭圆形或棒形的颗粒，与病蜂离心悬液内所看到的类似。见图2°而在健康蜂中并未发现。

三、鸡胚的接种结果，无论是尿囊腔或绒毛尿囊膜接种和传代的，均未见明显稳定的病

表：慢性蜜蜂麻痹病病毒悬液的室内涂口试验结果

死亡率 处理	日期 (天)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
病液组	0		2	0	6	28	32	8	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
		※	2	2	8	36	68	76	76	78	78	78	80	80	80	80	80	80
健液组 (对照)	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	8	4	0	0	0	2
			2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	12	16	16	16	16	18
备 注		(1) ※表示当日开始发病; (2) 死亡率一栏内, 上方为当日死亡率, 下方为累计死亡率。																

变, 回接蜜蜂亦未见发病, 对该病亦无免疫效果。

1—3日龄乳鼠在接种后4—12小时内陆续死完, 但传代乳鼠不死, 回接蜜蜂亦无发病, 亦无免疫效果。

分 析 与 讨 论

根据对北京地区蜜蜂意大利蜂、高加索蜂等) “大肚病”的病蜂离心悬液和病蜂大脑超薄切片的电子显微镜的观察, 以及从病蜂的发病症状和发病温度等特点来看, 它们类似国外研究者如 Bailey L. 和 Woods R. D. 等人所描述的蜜蜂慢性麻痹病。在我们所发现的病毒颗粒中, 有一种棒状颗粒, 其中有一些长度较长, 可达518毫微米甚至更长。而在人工接种后蜜蜂开始呈现症状的时间是3—4天, 比国外报导的5—8天短得多。根据Bailey L. (1965) 的研究, 认为世界各地自然发生的蜜蜂慢性麻痹病实际上均由同一种病毒引起。以我们的初步研究结果来看, 在发病时间上和国外报导的情况是不同的。

参 考 文 献

- [1] Bailey L., 1965, J. Invertebr. Pathol., 7: 132—140.
- [2] Bailey L., 1965, J. Invertebr. Pathol., 7: 167—169.
- [3] Bailey, L., Gibbs, A. J. and Woods R. D., 1963, Virology, 21: 390—395.
- [4] Bailey L., Gibbs A. J., & Woods R. D., 1968, J. Gen. Virol., 2: 251—260.
- [5] Bailey L. & Milne R. G., 1969, J. Gen. Virol., 4: 9—14.