ICS 11.100;71.040.99
N 53

0900254

中华人民共和国国家标准

GB/T 21637—2008

冠状病毒透射电子显微镜形态学鉴定方法

Method of morphological identification of coronavirus by using transmission electron microscopy

安徽理工大学
图书馆藏书

2008-04-11 发布　　2008-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

中国标准出版社
数码防伪

前　言

本标准的附录A和附录B为资料性附录。

本标准由全国微束分析标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院地质与地球物理研究所、中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所、国家生物医学分析中心、中国医学科学院基础医学研究所、中国人民解放军第二军医大学基础部、复旦大学上海医学院、广州兴世元生物光子微技术有限公司。

本标准主要起草人：陈德蕙、曾荣树、杨怡、刘世德、杨勇骥、俞彰、毕舒。

引　言

随着电子显微学、病毒体外培养和病毒分离纯化技术的发展，有关病毒形态结构、化学成分、基因构成以及其生物学特性等方面的知识日益增长。根据透射电子显微镜下病毒形态结构特征：病毒粒子的形状和大小，衣壳的对称性（是立体对称还是螺旋对称）和大小，壳微粒的数目和排列，核衣壳在宿主细胞内复制和组装的部位，有无包膜，包膜表面纤突的大小、形状及间距以及有包膜病毒芽生成熟的部位等，并结合病毒的核酸和蛋白质的生物学以及分子生物学特性对病毒进行分类和命名。目前已知对人类致病的病毒至少涉及 22 个科（Family）和两个未归类的病毒属（Genus）。在病毒的命名和分类学中病毒的形态特征是首要的指征。实践证明，根据病毒的形态和形态发生学特征可以应用电子显微术准确地鉴定病毒到科。为了正确指导人类病毒性传染病病毒病原的诊断和鉴定工作，有必要制定与人类疾病相关病毒的透射电子显微镜形态学分析鉴定方法的国家标准。

冠状病毒透射电子显微镜形态学鉴定方法

1 范围

本标准规定了应用透射电子显微镜观察与鉴定冠状病毒的方法、要求和冠状病毒的形态和形态发生学特征(参见附录A、附录B)。

本标准适用于利用透射电子显微镜对冠状病毒形态的鉴定。

2 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

病毒 virus

一类比较原始的、仅含一种核酸(DNA或RNA)、能够自我复制和严格细胞内寄生的非细胞生物。

2.2

病毒粒子 virion

复制、装配完善的成熟病毒颗粒。

2.3

核衣壳 nucleocapsid

由病毒的蛋白质衣壳和核酸中心组成,有立体对称和螺旋对称两种。

2.4

核衣壳螺旋对称 helical symmetry of nucleocapsid

蛋白质亚基被复在缠绕的核酸外面,沿中心轴呈螺旋排列,形成高度有序、对称的稳定结构。

2.5

包膜 envelope

在病毒核衣壳外面,由脂蛋白和黏蛋白组成的双层脂质膜。

2.6

表面突起或称纤突 surface projection,spike or peplomer

包膜的外层由糖蛋白构成的穗状突起,具有抗原性。

2.7

负染 negative stain

利用高密度重金属盐(如磷钨酸、醋酸铀等)染液,将微小的病毒包围起来,在暗背景上显示病毒的微细结构。

2.8

超薄切片 ultrathin section

采用超薄切片机将生物样品经固定包埋后,切成厚度为60 nm～80 nm的超薄片,用于透射电镜观察。

3 仪器设备和材料

3.1 主要仪器设备

a) 透射电子显微镜;

b) 超薄切片机；

c) 修块机；

d) 制刀机(附玻璃刀条)；

e) 钻石刀；

f) 真空镀膜仪或溅射仪；

g) 光学显微镜；

h) 恒温烘箱(30℃～70℃)。

3.2 主要材料和试剂

3.2.1 戊二醛(AR)

戊二醛固定液，配制方法见表1。

表1 戊二醛固定液配制方法

戊二醛固定液最终浓度/%	2.0	2.5	3.1
25%戊二醛/mL	1	1	1
0.075 mol/L PBS/mL	11.5	9	7

3.2.2 四氧化锇

四氧化锇固定液配制方法：

A液：2%锇酸储藏液

四氧化锇 1 g

双蒸水 50 mL

B液：1%锇酸固定液

A液 1份

0.24 mol/L PBS 1份

3.2.3 丙酮(AR)

3.2.4 环氧树脂

Epon 812包埋配方表，见表2。

表2 Epon 812包埋配方表

配制数量	配方比例(1∶9)			配方比例(2∶8)			加速剂
	812	DDSA	MNA[a]	812	DDSA	MNA[a]	DMP-30
1	0.51	0.06	0.43	0.50	0.12	0.38	0.015
2	1.03	0.12	0.85	1.00	0.25	0.75	0.03
3	1.54	0.18	1.28	1.50	0.37	1.13	0.045
4	2.06	0.25	1.69	2.00	0.50	1.50	0.06
5	2.58	0.30	2.12	2.51	0.61	1.88	0.075

[a] 常用0.4%火棉胶-醋酸戊脂溶液或0.1%～0.2%聚乙烯醇缩甲醛膜(Formvar)氯仿溶液。

3.2.5 醋酸铀

醋酸铀染色液配制方法：使用棕色试剂瓶配制染液，醋酸双氧铀2 g加50%乙醇100 mL，充分搅拌10 min，静置1天～2天后，取其上清液或过滤后取其过滤液。醋酸铀染液在光照和高温下不稳定，应密封避光冷藏保存。

3.2.6 柠檬酸铅

柠檬酸铅染色液配制方法，见表3。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

表 3 柠檬酸铅染色液配制方法

硝酸铅	$Pb(NO_3)_2$	1.33 g
柠檬酸钠	$Na(C_6H_5O_2)\cdot 2H_2O$	1.76 g
双蒸水		30 mL

将上述成分放入 50 mL 容量瓶中，用力振荡 30 min，至溶液成乳白色混浊状后，加入 1 N NaOH 8 mL，使溶液变为清亮透明，再加双蒸水至 50 mL，染液 pH 值为 12，置 4℃冰箱保存。

3.2.7 磷钨酸(AR)

2%磷钨酸水溶液(PTA)，pH 值为 6.5～7.0。

3.2.8 磷酸盐

磷酸盐缓冲液配制方法：

1) 0.075 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS pH 值为 7.4)，配制方法见表 4。

表 4 磷酸盐缓冲液配制方法

$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$	0.198 g
$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$	1.934 g
双蒸水	100 mL

2) 0.075 mol/L PBS+0.19 mol/L 蔗糖缓冲液 (pH 值为 7.4)，配制方法见表 5。

表 5 蔗糖缓冲液配制方法

$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$	0.198 g
$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$	1.934 g
蔗糖	6.504 g
双蒸水	100 mL

3) 0.24 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS pH 值为 7.4)，配制方法见表 6。

表 6 磷酸盐缓冲液配制方法

$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$	0.712 g
$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$	6.962 g
双蒸水	100 mL

4 样品来源

a) 分离病毒阳性或可疑阳性的培养细胞；
b) 支气管肺泡冲洗液或咽喉含漱液中的脱落细胞(含活细胞)；
c) 病理活检和细针穿刺活检组织；
d) 感染动物脏器的新鲜组织；
e) 病毒感染细胞培养上清液(低速离心除细胞残渣)；
f) 提纯病毒悬液(超速离心 100 000 g，2 h)。

5 样品制备

5.1 负染

5.1.1 负染原理：负染是利用高密度重金属盐(如磷钨酸、醋酸铀等)染液，将微小的病毒包围起来，在暗背景上显示病毒的微细结构，呈现阴性反差。电镜图像片中病毒呈透明浅色和特有的外部亚微结构，

背景则为无结构的灰色或黑色。负染样品不需要经过固定、脱水、包埋和超薄切片，而是直接对含病毒悬液进行染色，操作简便、分辨率高，可用于病毒快速诊断。

5.1.2 直接负染法

5.1.2.1 将分离病毒培养细胞的上清液经低速离心除去细胞残渣，或超速离心(100 000 g，2 h)提纯病毒悬液，滴在铺有封口膜的载玻片上。

5.1.2.2 将经碳膜加固的被覆有支持膜(一般用火棉胶或 Formvar 膜)的载网倒扣在病毒悬液滴上静置 1 min～2 min。

5.1.2.3 夹起载网，用小滤纸片由载网边缘部吸去多余液体。

5.1.2.4 立即将载网倒扣在负染液滴上[一般用 2%磷钨酸水溶液(PTA)，pH 值为 6.5～7.0]，静置 1 min～2 min。

5.1.2.5 夹起载网，用小滤纸片吸去多余染液，自然凉干。

5.1.2.6 为了确保安全，防止病毒污染环境，带病毒载网必需在紫外线(700 uW/cm^2～800 uW/cm^2，距离 6.5 cm)下照射载网的正反面各 5 min，待检。

5.1.3 琼脂扩散负染法

5.1.3.1 预先在载玻片上制备 0.8%～2.0%的琼脂薄板。

5.1.3.2 将上述待检病毒样品悬液滴加至琼脂薄板表面。

5.1.3.3 快速将经碳膜加固的支持膜载网倒扣在悬滴表面，静置约 2 min～3 min。

5.1.3.4 待悬滴中水分即将全部吸进琼脂后，取出载网进行负染(同 5.1.2.3～5.1.2.6)，待检。

5.2 超薄切片

5.2.1 培养细胞

5.2.1.1 前固定：在无菌室内(P3 实验室)用橡皮刮将细胞从培养皿底部刮下，用离心机低速离心(800 r/min，5 min)成小团块，弃上清，沿管壁加入 2%～3%戊二醛固定液，放 4℃冰箱固定 1 h(样品送电镜室制作超薄切片以前，装样品的玻璃器皿表面必需经碘酒和酒精消毒，避免污染环境)。

5.2.1.2 后固定：经戊二醛固定的细胞团块用缓冲液轻轻漂洗后，加入 1%锇酸，放 4℃冰箱固定 1 h。

5.2.1.3 脱水：用梯度酒精或丙酮脱水。

5.2.1.4 包埋：在按比例配制好的环氧树脂(Epon 812)中浸透后，在胶囊(或硅胶包埋板)内进行包埋。

5.2.1.5 聚合：在恒温烘箱内进行聚合，35℃、45℃各 12 h，60℃，24 h。

5.2.1.6 修块：包埋块在进行超薄切片之前，需在修块机上进行修块。

5.2.1.7 半薄切片：必要时先切 1 μm 厚半薄切片经染色后，在光学显微镜下进行病变细胞定位。

5.2.1.8 超薄切片：用制刀机制成的玻璃刀或砧石刀切制超薄切片，其厚度一般要求在 60 nm～80 nm，按常规经醋酸铀和枸橼酸铅双电子染色后待检。

5.2.2 病理活检或细针穿刺活检组织等

5.2.2.1 前固定：将活检组织在固定液中迅速切成小于 1 mm^3 的小块，用戊二醛固定液进行前固定，组织块需浸泡在 20 倍体积的固定液中 1 h～4 h，4℃。

5.2.2.2 后固定：同 5.2.1.2。

5.2.2.3 脱水：同 5.2.1.3。

5.2.2.4 包埋：同 5.2.1.4。

5.2.2.5 聚合：同 5.2.1.5。

5.2.2.6 修块：同 5.2.1.6。

5.2.2.7 半薄切片：同 5.2.1.7。

5.2.2.8 超薄切片：同 5.2.1.8。

6 透射电子显微镜(TEM)鉴定步骤

6.1 TEM 加速电压选择为 60 kV～100 kV。

6.2 TEM 开机，调整确认仪器处于最佳工作状态后，即可按如下步骤观察，分析样品。

6.3 放大倍数的选择，通常选择放大倍数在 6 000 倍～20 000 倍，若需要观察和拍摄病毒精细结构（如病毒衣壳的对称性、壳微粒的数目、大小和排列、包膜表面有无纤突、纤突大小和形状以及螺旋对称核衣壳丝的直径等）则选择放大倍数在 30 000 倍～60 000 倍。

6.4 负染病毒样品的透射电镜观察

6.4.1 先在低倍（4 000 倍左右）观察样品全貌，并选择 PTA 着色的含病毒粒子的斑点或斑块。

6.4.2 逐步放大倍数，仔细寻找具有冠状病毒形态特征的病毒粒子，精细聚焦，并拍片（一般在 20 000 倍～60 000 倍拍片）。

6.4.3 负染冠状病毒形态特征

在负染样品中，冠状病毒或单个或成群呈现在被包围的灰色或黑色染液背景中，病毒呈球形或多形态，直径一般在 60 nm～220 nm，有包膜。核衣壳螺旋对称，直径 9 nm～13 nm，包膜表面有大而宽距的梅花瓣状纤突（糖蛋白）长约 20 nm，末端宽 10 nm，呈皇冠状分布[图 1a)]。

6.5 超薄切片样品的透射电镜观察

6.5.1 先在低倍（4 000 倍左右）观察，寻找呈现病变的细胞。

6.5.2 逐步增加放大倍数，仔细观察细胞超微结构是否正常，寻找在细胞内外有无病毒粒子，一旦发现具有冠状病毒形态特征的病毒粒子，精确聚焦并拍片（一般放大倍数在 10 000 倍～30 000 倍即可，少数需放大 60 000 倍）。

6.5.3 感染细胞内冠状病毒的形态学和形态发生学特征

病毒在感染细胞胞质内复制、组装，在粗面内质网内膜上芽生成熟。在显著扩张的核周隙和粗面内质网池中常充满数目不等的成熟病毒粒子。病毒粒子呈球形或多形态，直径 60 nm～220 nm，有包膜。核衣壳螺旋对称，其直径 9 nm～13 nm。包膜表面有细长排列呈冠状的纤突，长约 20 nm。病毒粒子经胞吐释放到细胞外，大量病毒粒子常聚集在细胞突起之间或附着在细胞质膜表面。在有的感染细胞中还可以查见含完整或不完整病毒粒子的致密体，有可能是一种自噬体，而不是病毒包涵体[图 1b)～d)，图 2a)～d)]。

7 形态学鉴定结果的质量要求和报告

7.1 电镜图片要求清晰，层次分明。超薄切片样品要求细胞超微结构清晰，病毒包膜（双层脂质膜）和核衣壳丝清晰可辨。负染样品要求包膜表面纤突（spikes）清晰可辨。

7.2 要认真填写原始记录，包括样品来源、送检日期、编号、拍片条件、底片和照片的编号及标尺或准确的放大倍数。

7.3 鉴定分析报告附有高清晰电镜图片，图片应显示：

a) 病毒粒子的直径和形状；

b) 病毒粒子的双层脂质包膜；

c) 包膜表面纤突的长度和形状；

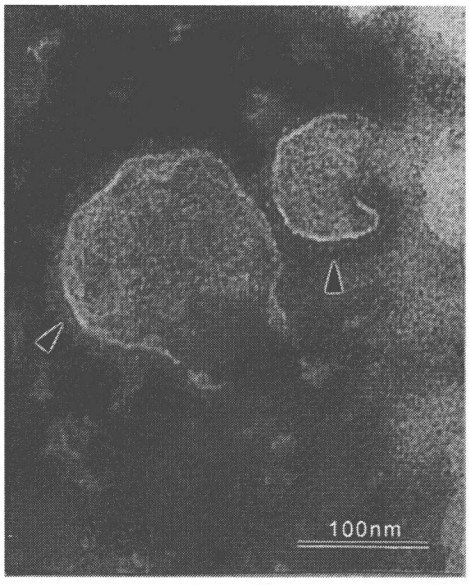
d) 病毒在感染细胞内组装的部位；

e) 病毒在感染细胞内芽生成熟的部位；

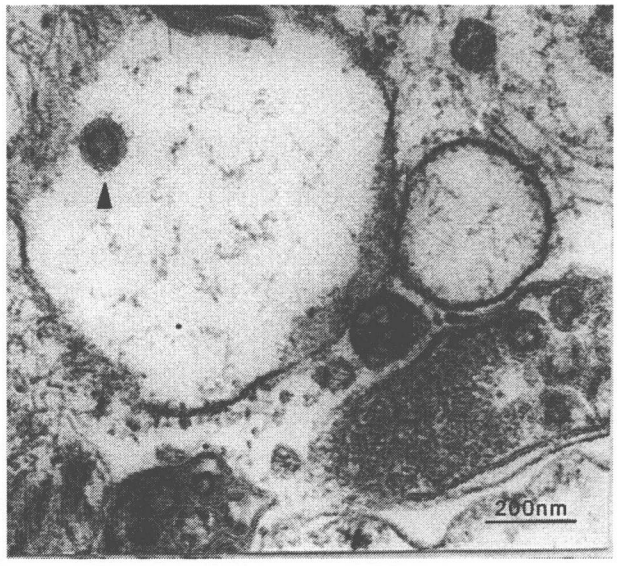
f) 成熟病毒粒子的释放方式；

g) 图片应有精确的标尺，以利计算病毒粒子、纤突和核衣壳的直径或/和长度。

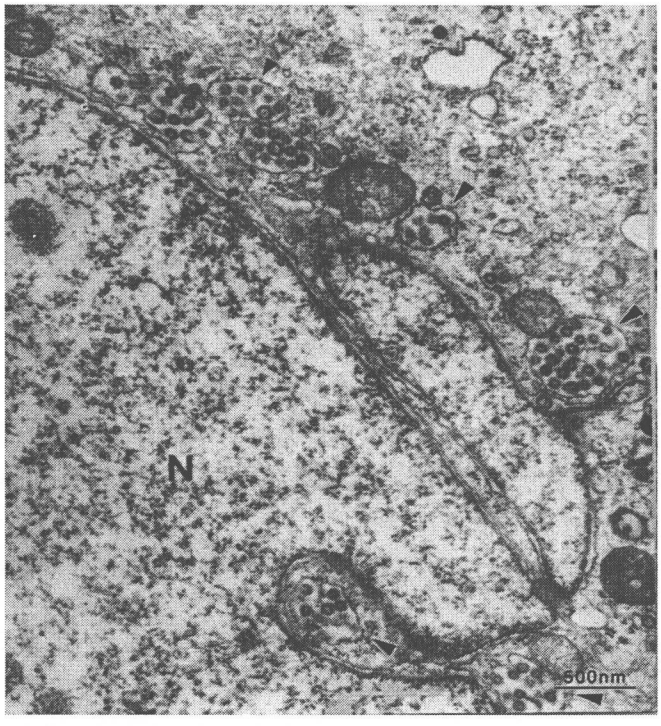
8 电镜图像说明



a)



b)



c)

d)

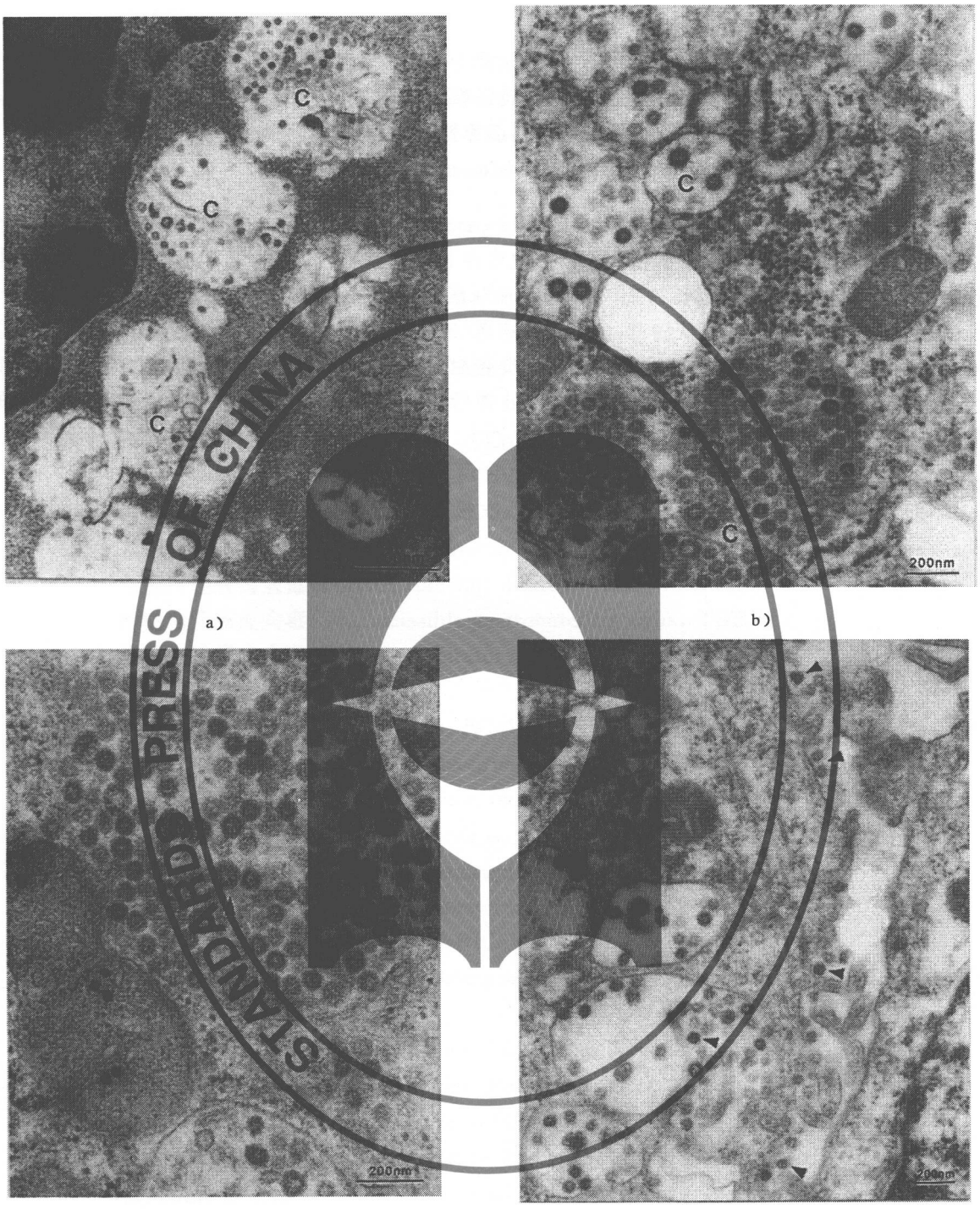
a) 人普通感冒冠状病毒负染电镜图像，显示病毒包膜一侧破裂，包膜表面有冠状纤突(▲)。

b) 人普通感冒冠状病毒感染细胞超薄切片电镜图像，显示胞质大空泡中单个成熟病毒粒子(▲)病毒双层脂质包膜上的纤突和绞绳状核衣壳可辨。

c) 同上感染细胞核(N)旁扩张的粗面内质网池中的大量成熟病毒粒子(▲)。

d) 图 c)的局部放大，显示病毒在粗面内质网上芽生成熟的图像(▲)和池内的成熟病毒粒子(V)。

图 1



从 SARS 患者尸检肺组织分离培养病毒阳性的 VeroE6 细胞中检出冠状病毒的超薄切片电镜图片：

a) 感染细胞核(N)旁胞质大囊泡中大小不等、球形或多形态冠状病毒(C)。

b) 感染细胞胞质内大小不等的空泡和囊泡中的冠状病毒(C)。

c) 胞质囊泡内冠状病毒的高倍图像。

d) 感染细胞质膜下囊泡内和细胞外的冠状病毒粒子(▲)。

图 2

附 录 A
（资料性附录）
冠状病毒科病毒粒子形态学
（Morphology of virion of Coronaviridae）

病毒粒子有包膜，呈球形。冠状病毒属（genus coronavirus）的成员，一般直径为 120 nm～160 nm，有一个可能是 H 面体，约 65 nm 的核心壳以及包含在其中的核衣壳蛋白（N）和 RNA 基因组。冠状病毒有大的表面突起（spikes），由长约 20 nm 的柄和球形顶端的三聚体纤突蛋白（peplomers；trimers of spike protein）构成。在有的冠状病毒，如牛冠状病毒（BCoV）和某些小鼠肝炎病毒株（MHV）还可以观察到由凝血素酯酶（HE）糖蛋白构成的第二层纤突蛋白。应用冷冻电子显微镜可以观察到在冠状病毒的包膜和核心（core）之间有一个裂缝，用洗涤剂处理后核心可以裂开，释放出含 N 蛋白的螺旋对称核衣壳。

摘译自：国际病毒命名学委员会〔ICTV〕第八次报告（Eight Report of International Committee of Virus Taxonomy），2005.

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

附 录 B
（资料性附录）
冠状病毒的命名结构
（Taxonomic Structure of Coronavirus）

冠状病毒的命名学结构（Taxonomic Structure of Coronavirus）

目（Order）巢病毒目（Nidovirales）

科（Family）冠状病毒科（Coronaviridae）

属（Genus）冠状病毒属（Coronavirus）

冠状病毒属内的各种病毒（Species in the Genus）

第一组病毒（Group 1 Species）

狗冠状病毒（Canine coronavirus ，CCoV）

猫冠状病毒（Feline coronavirus，FCoV）

猫传染性腹膜炎病毒（Feline infectious peritonitis virus，FIPV）

人冠状病毒 229E（Human coronavirus 229E，HCoV-229E）

猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）

传播性胃肠炎病毒（Transmissible gastroenteritis virus，TGEV）

猪呼吸道冠状病毒（Porcine respiratory coronavirus，PRCoV）

第二组病毒（Group 2 Species）

牛冠状病毒（Bovine coronavirus，BCoV）

人冠状病毒 OC43（Human coronavirus OC43，HCoV-OC43）

人肠道冠状病毒（Human enteric coronavirus，HECoV）

小鼠肝炎病毒（Murine hepatitis virus，MHV）

猪凝血脑脊髓炎病毒（Porcine hemagglutinatung encephalomyelitis virus，HEV）

善知鸟冠状病毒（Puffinosis coronavirus，PCoV）

大鼠冠状病毒（Rat coronavirus，RtCoV）

重症急性呼吸综合症冠状病毒（Severe acute respiratory syndrome coronavirus，SARS-CoV）

第三组病毒（Group 3 Species）

传染性气管炎病毒（Infectious bronchitis virus，IBV）

雉冠状病毒（Pheasant coronavirus，PhCoV）

火鸡冠状病毒（turkey coronavirus，TCoV）

冠状病毒属内的暂定病毒（Tentative Species in the Genus）

兔冠状病毒（Rabbit coronavirus，RbCoV）

摘译自：国际病毒命名学委员会〔ICTV〕第八次报告（Eight Report of International Committee of Virus Taxonomy），2005.

参 考 文 献

[1] Van Regenmortel M. H. V, Fauquet C M, Bishop, DHL, et al. ,Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Virus, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

[2] Fauquet CM, Mayo MA, Maniluff J. , et al. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 2005. Amsterdam, etc.

[3] 陈德蕙,几种呼吸道病毒德电子显微镜鉴定. 中华医学杂志,1974,54:211-215.

[4] 陈德蕙. 传染病病理(二),病毒、衣原体和立克次氏体疾病,白希清主编. 病理学,(第二版). 北京:科学出版社,1987,419-458.

[5] 陈德蕙,张贺秋,王国华. 电镜在病毒感染诊断中的应用. 电子显微学报,1997,16:549-568.

[6] Enserink M. China's missed Chance. Science,2003,301,294-296.

[7] 陈德蕙,张贺秋. 病毒、立克次体、衣原体和支原体感染的电镜诊断,武忠弼主编. 超微病理诊断学. 上海:上海科学技术出版社,2003,663-725.

[8] Peiris J S M, L ai S T, Poon L L M, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet, 2003,361:1319-1325.

[9] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med, 2003,348:1953-1966.

[10] 陈德蕙,从 SARS 病原体电镜诊断得到的启示. 电子显微学报,2004,23:1-8.

GB/T 21637—2008

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
冠状病毒透射电子显微镜
形态学鉴定方法
GB/T 21637—2008
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷
*
书号:155066·1-32065 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

GB/T 21637-2008