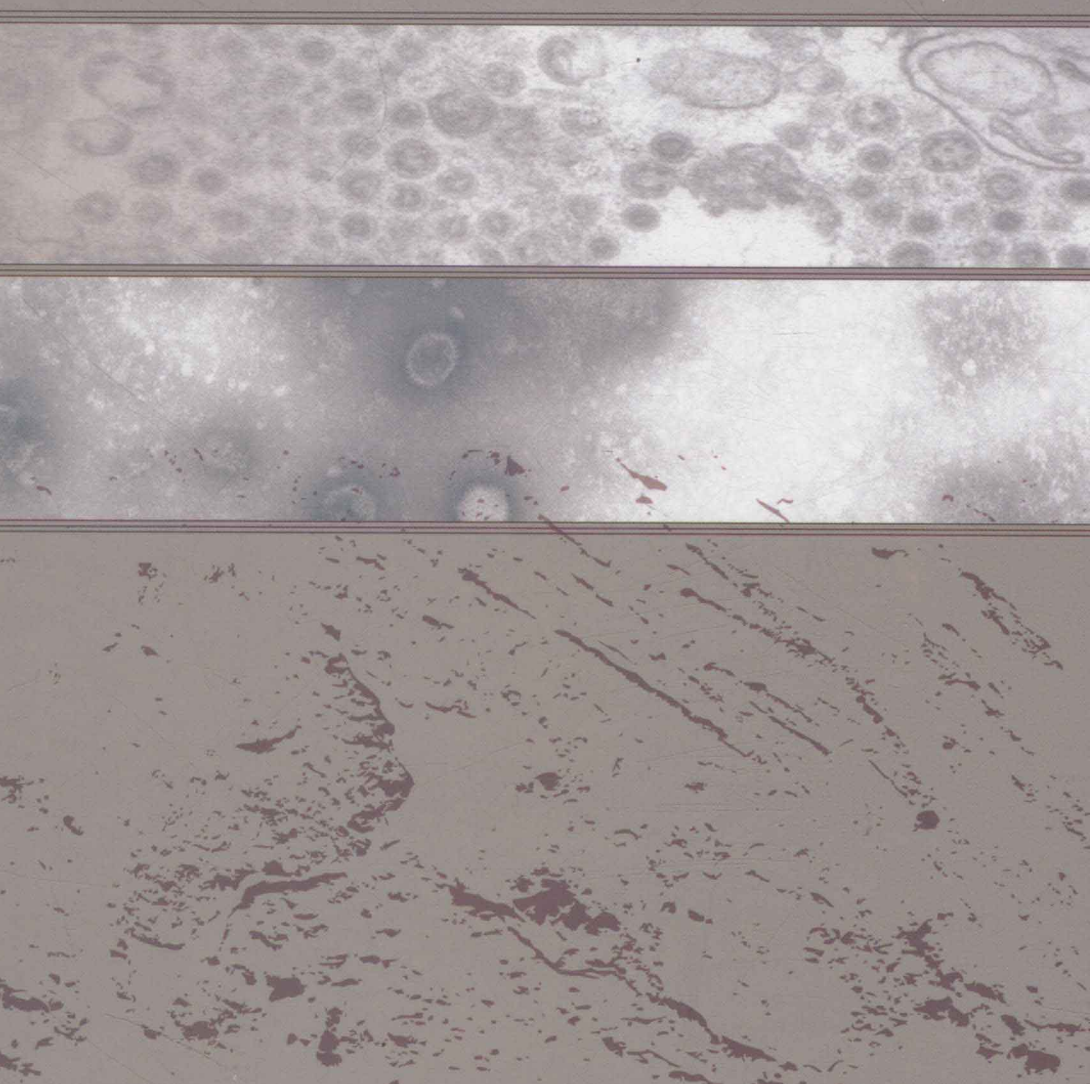
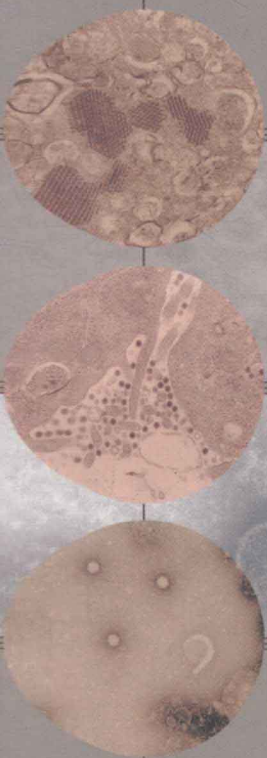
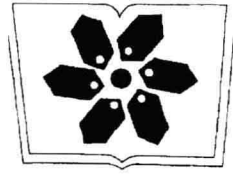


动物病毒图谱

邹啸环 夏志平 主编



科学出版社



中国科学院科学出版基金资助出版

动物病毒图谱

邹嘯环 夏志平 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书分为总论和各论两部分。总论部分主要介绍透射电子显微镜观察动物病毒的相关基本知识,包括样品制备技术与观察方法、动物病毒的分类和形态结构类型等。各论部分为本书的主体,按照病毒学分类原则及现有图片资料分为十九章,图文并茂,由浅入深,中英文对照,较系统地介绍了常见动物病毒学的基本知识、典型病毒结构,负染色电镜观察及病毒在宿主细胞内的形态发生学特征。全书共收入动物病毒电镜图片 310 幅,其中包括国际上首次观察到的虎源禽流感病毒、大熊猫副黏病毒、鸽子圆环病毒等。

本书是四十多年来动物病毒形态学诊断与研究中获得宝贵科学记录,可以作为动物病毒学教学、科研工作的重要科学参考资料。

图书在版编目 (CIP) 数据

动物病毒图谱 / 邹嘯环, 夏志平主编. —北京: 科学出版社, 2013. 10

ISBN 978-7-03-037310-6

I. ①动… II. ①邹… ②夏… III. ①动物疾病-病毒学-图谱 IV. ①S852.65-64

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 076157 号

责任编辑: 夏 梁 / 责任校对: 胡小洁

责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳信达欣艺术印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 10 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 10 月第一次印刷 印张: 13 1/4

字数: 301 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

编者名单

主 编 邹啸环 夏志平
顾 问 杨盛华
编 者 (按姓氏汉语拼音排序)
常国权 杜林峰 郝 蜀 李吉平
李 楠 李志萍 李忠义 钱 军
邵西群 宋战昀 王铁东 夏志平
杨盛华 杨松涛 姚 旭 张仁诚
赵亚力 郑晓一 邹啸环

前 言

我于1987年开始从事动物病毒形态及形态发生学研究工作,而我的导师杨盛华研究员早在1967年就开始了这一领域的工作,至今仍工作在岗位上。四十多年来我们对19个科100多种动物病毒(依据国际病毒分类委员会1995年的第六次报告)进行了详尽的观察。对常见病毒的形态及形态发生进行了反复数十次、数百次的观察,积累了丰富的经验。有些病毒是国际上首次观察到的,如虎流感病毒、大熊猫副黏病毒、鸽子圆环病毒等。四十多年来,我们开展的病毒形态学观察和研究多次获科研成果奖,撰写论文数十篇。培养了数名研究生,为本单位的教学、科研和军队与地方的病毒性传染病的预防和诊断做出了应有的贡献。

本书中的许多照片出自我的老师和同事之手,他们先后在电镜室工作多年,为动物病毒的观察研究工作做出了贡献。杨盛华、武银莲、贾补年、赵文斌、黄耕、张仁诚、常国权、夏志平、刘畅、王铁东、席辉、孟轲音、李楠、闫香变、王晓薇、史洪杰、戴伟是我的老师和同事,我们共同成就了这本图谱。谨以此书缅怀原领导高宏伟,他为本书酝酿、成稿作出重要贡献。

本书中绝大多数病毒照片的获得源自我周围的科研人员。有了他们广泛涉足动物病毒研究的兴趣,才有我们观察多种动物病毒的机遇;有了他们深入探索动物病毒病的努力,才有我们展示病毒形态发生过程的实践。感谢殷震院士、夏咸柱院士,以及那些杰出的动物病毒研究专家。

本书中绝大部分照片是通过JEM-7和JEM-1200EXII两部透射电镜拍摄的,它们是我们顺利完成这部著作最忠实的保障和无言的战友。

邹啸环

2013年1月6日

目 录

前言

总 论

- 第一章 动物病毒的电镜样品制备技术及观察 (3)
第二章 动物病毒的分类和形态结构类型 (16)

各 论

- 第一章 小 RNA 病毒科 (22)
第二章 杯状病毒科 (31)
第三章 呼肠孤病毒科 (36)
第四章 双 RNA 病毒科 (44)
第五章 披膜病毒科 (52)
第六章 黄病毒科 (58)
第七章 冠状病毒科 (67)
第八章 正黏病毒科 (79)
第九章 副黏病毒科 (93)
第十章 弹状病毒科 (110)
第十一章 布尼病毒科 (125)
第十二章 反转录病毒科 (131)
第十三章 痘病毒科 (139)
第十四章 疱疹病毒科 (155)
第十五章 嗜肝 DNA 病毒科 (171)
第十六章 腺病毒科 (174)
第十七章 乳多空病毒科 (182)
第十八章 细小病毒科 (184)
第十九章 圆环病毒科 (196)

总 论

第一章 动物病毒的电镜样品制备技术及观察

随着透射电镜在生物医学领域愈加广泛的应用,样品制备技术也得到了进一步拓展和完善。在动物病毒样品制备中,最常用的制样技术是负染色技术和超薄切片技术。根据实验需要,后来又发展了标记免疫电镜技术、核酸电镜原位杂交技术等。

一、负染色技术

负染色技术是利用重金属盐选择性地与生物样品中的背景结合,提高背景散射电子的能力,从而增加图像反差的一种制样技术。

(一) 负染色原理

依据透射电镜原理,电子束穿过样品,将样品图像显现在荧光屏上。样品图像是明暗反差的图像,反差适当时,样品结构清晰、细腻。反差过小或过大,都不能客观反映样品的真实面貌。未经染色的病毒悬液样品反差非常小,病毒结构不清晰,这是因为电子束穿过样品时,样品中构成病毒体的碳、氢、氧、硫等元素的核外电子少,很少与之碰撞发生电子散射,电子束的大部分都穿过样品投射到荧光屏上,在荧光屏上显现强的亮区,同时也正因发生电子散射很少,明暗反差就非常小,形成的图像不清晰。样品染色后效果就不一样了,染色液是一些电子密度高的物质,如2%磷钨酸水溶液,其中钨是重金属,原子序数大,核外电子多,与电子束中的电子碰撞发生电子散射的机会多,沉积有重金属钨的点在图像上呈现为暗区,从而提高了图像反差。对病毒悬液样品染色时,病毒颗粒周围沉积一些磷钨酸,病毒颗粒表面凸凹不平,凹陷的地方也会沉积磷钨酸。电子束穿过样品时,有磷钨酸的地方,在图像上呈现为暗区,没有磷钨酸的地方呈现亮区,从而形成明暗反差比较强的图像,把病毒粒子的立体结构显现出来。

(二) 负染色技术对病毒样品的要求

(1) 用于电镜观察的样品是含有病毒粒子的澄清的水溶液,pH应为中性。由于承载样品的网是铜材质,网上还附有一层有机薄膜,酸性溶液、碱性溶液或有机溶剂都会损坏铜网或膜,影响样品的观察。

(2) 液体中病毒粒子的含量至少要达到 10^6 个/ml。透射电镜观察病毒时,放大倍数比较大,一般要3万~4万倍以上,在将病毒放大的同时,病毒之间的距离也被放大了,如果液体中病毒含量太低,电镜下很难找到,容易得出假阴性结果,因此液体中病毒的含量要适当。如果需要拍照,一个拍照视野内一般应有两个以上的病毒颗粒。

(3) 样品必须是新鲜或短期内冷冻保存的。如果样品不新鲜,病毒会降解,失去原来典型的形态结构,不利于辨认,同时可观察到的数量也会减少,甚至根本看不到病毒粒子。另外,病毒周围环境中的各种蛋白质也会降解,使易与重金属盐结合的小分子物质增多,形成致密的、电子密度高的弥散物,掩盖病毒粒子的形态,不利于观察。

(4) 样品经负染色后不能长期保存。负染色的样品并未经固定,常温下容易降解,因

此负染色后保存时间较长的样品在电镜观察时病毒结构模糊、不清晰。最好是染色后尽快进行电镜观察,以确保良好的观察效果。

(三) 负染色样品的处理

1. 感染病毒的动物组织处理

动物实质脏器的处理:将动物实质脏器,如心、肝、脾、胰、肺、肾等,取适量放入研钵中剪碎,冻融1~2次,加入3~5倍体积蒸馏水,研磨成匀浆,移入离心管,5000r/min离心15min,弃沉淀,上清可用于电镜负染观察。

黏膜上皮的处理:取一段肠管或气管,剪开暴露内腔,弃内容物,用刮刀或刀片刮下黏膜层,放入研钵,冻融1~2次,加入3~5倍体积蒸馏水,研磨成匀浆,移入离心管,5000r/min离心15min,弃沉淀,上清可用于电镜负染观察。

皮肤表面病变组织的处理:用刀割取病变皮肤,放入研钵剪碎,冻融1~2次,加入3~5倍体积蒸馏水,研磨成匀浆,移入离心管,5000r/min离心15min,弃沉淀,上清做电镜负染观察。

2. 粪便或分泌物的处理

取粪便或分泌物适量,直接放入离心管,加2~3倍体积蒸馏水,用无菌牙签充分搅拌均匀,5000r/min离心15min,弃沉淀,上清用于电镜负染观察。

3. 鸡胚尿囊液的处理

准确吸取鸡胚尿囊液,直接用于电镜负染观察。

4. 细胞培养物的处理

病毒在体外培养细胞中增殖后,如果大量释放到培养液中,可吸取细胞培养液,直接用于电镜负染观察。

病毒在体外培养细胞中增殖后,一般存在于细胞内,应常规收毒,冻融1~2次,此细胞悬液可直接用于电镜观察。如果病毒量少,可在收毒时将细胞培养液弃掉一些,剩余少量细胞培养液连同细胞冻融1~2次,此细胞悬液可直接用于电镜负染观察。

有些病毒在体外培养细胞中增殖后,不容易释放到细胞培养液中,可在收毒后将感染细胞冻融1~2次,将悬液移入1.5ml离心管,5000r/min离心15min,弃上清,留30 μ l上清将沉淀悬起混匀,负染后电镜观察。

(四) 样品负染色

1. 染色目的

负染色是为了提高样品图像的反差,使被观察的图像更清晰。

2. 负染色方法

负染色用染色剂一般为2%磷钨酸水溶液。细胞培养物用pH6.8的磷钨酸染液,动物

离体组织及粪使用 pH7.0 的磷钨酸染液。染色方法分悬滴法和漂浮法。

悬滴法:

- (1) 用镊子夹住铜网,使有膜的一面沾取液体,用滤纸吸去多余的液体。
- (2) 待铜网上液体干时,在铜网上滴一滴染液,静置 1 min。
- (3) 吸干染液,将铜网放在样品夹中或底部铺有滤纸的培养皿中,待观察。

漂浮法:

如果需要染色的样品较多,为了节省时间可采用漂浮法。

- (1) 把染液按顺序滴在蜡盘或封口膜上。
- (2) 用铜网有膜面沾取样液,用滤纸吸干多余液体。
- (3) 待铜网上的液体干时,将有膜面(有样品面)覆于染液滴上。
- (4) 用另一铜网沾取第 2 份样液,依样覆于第 2 滴染液上。依此类推。
- (5) 待第 1 个铜网染色 1 min 后,用镊子夹取铜网,用滤纸吸干染液,放在样品夹中或底部铺有滤纸的培养皿中,待观察。
- (6) 取第 2 个铜网,依上述方法操作。依此类推。

3. 染色操作要求

(1) 用镊子夹着铜网每沾取一份样品染色之后,要把镊子用滤纸擦干净,再夹铜网沾取第二份样品,以免交叉污染。

(2) 铜网上的样品一定要干了之后马上染色,效果比较好。

二、超薄切片技术

病毒区别于其他生物的一个重要特征是在活的细胞内增殖。如果想获得病毒在增殖过程中的信息,可以将感染病毒的组织或细胞进行超薄切片,然后电镜观察。用来制作超薄切片的样品必须新鲜,冷冻过的样品不宜使用。制作超薄切片的程序一般包括取材、固定、脱水、包埋、修块、切片、染色。

与负染色样品的图像相比,超薄切片样品的图像分辨率比较低,病毒结构不如负染色样品图像清晰细腻。

(一) 取材

取材是超薄切片技术中的关键环节之一。由于电镜观察的视野小,取材的准确性非常重要,必要时可先做半薄切片,在光镜下定位后再做超薄切片。另外,动物组织离体后,细胞中的各种酶会导致蛋白质和核酸降解,造成自溶,所以操作时应动作迅速,且保持小环境温度在 4℃ 左右。具体方法如下:

(1) 动物材料

- ①取洁净干燥的青霉素瓶,加入 2 ml 2.5% 戊二醛固定液,置于 4℃ 环境中冷却。
- ②将动物麻醉或急性处死。
- ③暴露取材部位。
- ④迅速用注射器将预冷的固定液滴洒在取材部位上,或通过近处血管推注预冷的固定液。

⑤用锋利的刀片切取 1 mm 厚的薄片,投入预冷的固定液中,置于 4℃ 冰箱固定。

⑥0.5 ~ 1 h 之后取出样品,用锋利的刀片将薄片切成小于 1 mm³ 的小块,置于 4℃ 冰箱继续固定。

(2) 体外培养细胞和其他单体材料

①取体外培养细胞。培养细胞用量以相当于 100 ml 培养瓶中细胞的数量为宜。

②留 1ml 左右培养液,用刮刀刮下贴壁细胞。

③将细胞悬液移入离心管中,3000 ~ 5000r/min 离心 15 min,使细胞聚成团块。

④弃上清,加入预冷的固定液。

⑤悬浮培养的细胞和悬液中的细胞器可直接离心,弃上清,加入预冷的固定液。

⑥离心后不能聚成团块的样品如细菌和寄生虫,可用滤纸吸干水分。在蜡盘上滴 1 滴 2% 热琼脂,待琼脂即将凝固时,用牙签挑一小块样品埋入琼脂中,琼脂凝固以后,用刀片切下包有样品的琼脂块投入预冷的固定液中,琼脂块不大于 1mm³,置于 4℃ 冰箱。

(二) 固定

固定的目的是终止细胞的生化过程。在固定剂的作用下,使细胞原有变化的生活状态转变成不变的稳固胶体状态。这种胶体尽可能完整地再现活细胞的有机结构。由于生物样品的结构不尽相同,选择固定剂的种类和浓度也不一样。一般来说,要求固定液能在固定期间维持一定 pH,具有适当的渗透压和离子浓度,且无毒或毒性较小。常用固定剂有戊二醛、四氧化钨(钨酸)。先用戊二醛固定,再用四氧化钨固定,即双固定法。戊二醛固定时间可长可短,最短要 12 h,最长不超过一个月。钨酸固定则有严格的时间限制。具体方法如下:

(1) 取前述已取材的 2.5% 戊二醛(pH7.0,用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液配制)固定好的样品小块 5 ~ 10 块,每块不大于 1 mm³。

(2) 吸去固定液,加入磷酸盐缓冲液(0.1mol/L,pH7.0),于 4℃ 静置 10 min。

(3) 更换磷酸盐缓冲液,于 4℃ 静置 10 min。如此重复漂洗 3 遍。

(4) 吸去磷酸盐缓冲液,于通风橱内加入 1% 四氧化钨水溶液,置于 4℃ 固定,细胞团块固定 1 h,组织块和细菌固定 2 h。

(三) 脱水

脱水是指用适当的有机溶剂取代组织细胞中的游离水。常用的脱水剂有乙醇、丙酮。具体方法如下:

(1) 取前述固定后的样品,吸去固定液。

(2) 于 4℃ 条件下,按照乙醇 50% → 70% → 80% → 90% → 100% 的浓度梯度,逐级更换脱水剂。每级脱水时间为 15 min。

(3) 于室温条件下,加入 100% 丙酮,静置 15 min(丙酮容易与包埋剂混合,便于浸透)。

(四) 包埋

包埋是指把样品置入含树脂的胶质模板,加温制成包埋块。经脱水后的样品,细胞内含有脱水剂,在样品进入模板之前,应使包埋剂逐步浸透组织细胞,以便与细胞外的包埋剂

同时聚合,从而保证组织细胞的超微结构不受损伤。具体方法如下:

(1) 配制包埋剂:常用的包埋剂为 Epon812 环氧树脂,由四种单体按比例配制而成。具体使用方法参照产品说明书。

(2) 配制浸透液:丙酮与包埋剂比例分别为 2:1、1:1、1:3。

(3) 室温条件下,将样品依次在不同浓度的浸透液中浸泡,时间均为 15 min。

(4) 用一次性注射器将 1 ml 包埋剂加入已烘干并冷却的小瓶中。

(5) 用干燥的牙签挑出样品,置于干燥的滤纸上片刻,待样品表面的液体挥发后,再用另一支干燥的牙签将其挑入上述加有包埋剂的小瓶中,使样品完全浸没于包埋剂中。

(6) 小瓶不加盖,放入干燥器内,过夜。

(7) 取胶质模板(市售),在凹槽内放入标签,用注射器在凹槽内加满包埋剂。用干燥的牙签挑一小块样品,在凹槽顶端放置样品块。

(8) 模板放入温箱,35℃ →45℃ →60℃ 升温聚合,时间分别为 12 h、12 h、48 h。

(五) 修块

用刀片削去组织块周围的包埋剂,使组织块暴露出来,并修成一定形状,便于切片。具体方法如下:

(1) 把包埋块夹在样品夹上,组织块朝向远离样品夹一端。

(2) 在解剖显微镜下,用刀片削去组织块顶端表面的包埋剂,露出组织块。

(3) 侧面对称地削出 4 个斜面,使上表面呈边长小于 0.3 mm 的正方形、梯形或其他规则几何图形。整个包埋块顶端呈金字塔形状,组织块在最顶端。

(六) 切片

在超薄切片机上完成切片过程。具体方法如下:

(1) 制刀:取 5~7 mm 厚、2.5 cm 宽的硬质玻璃条(市售),用制刀机截成正方形,再偏离对角线 2~3 mm 截成 2 个三角形玻璃刀。

(2) 制水槽:在玻璃刀刃斜面一侧用胶条围成水槽,胶条上侧边与刀刃平齐。用固体蜡封住水槽底边,以免漏水。

(3) 装刀:把做好水槽的刀插入刀夹,调整显微镜聚焦至刀刃清晰。

(4) 装块:把修好的包埋块固定在定向头上。在显微镜下把修好的组织块面高度调整到与刀刃平面相等。调整刀刃使组织块由刀刃中心向左移至 1/2 区域(此处刀刃锋利可用)。

(5) 加水:打开日光灯,向水槽内注入双蒸水,直至出现反射光亮面。注意液面要平。

(6) 切片:设好切片厚度,一般为 60~70 nm。先用手动钮将样品组织块面调至靠近刀刃,手动切片 1~2 片,再开启自动程序。观察漂在有反射光的水面上的切片,颜色为银白色表明其厚度适中。

(7) 捞片:用镊子夹住铜网,将膜面朝下,对准液面上的切片轻轻一沾,快速抬起,然后将铜网用滤纸吸干。

(七) 染色

超薄切片染色是指切片的“电子染色”,即某些重金属盐类(如铀、铅等)能与细胞的某

些结构和成分结合,以增加其电子散射能力,进而达到提高反差的目的。一般采用双重染色,即先用铀染色,再用铅染色。具体方法如下:

(1) 在蜡盘上滴一滴乙酸双氧铀染液(50%乙醇配制),将附有切片的铜网覆于染液滴上,染色 10 min,用双蒸水冲洗,用滤纸吸干。

(2) 再将铜网覆于柠檬酸铅染液上,染色 10 min,用双蒸水冲洗,用滤纸吸干,存放在样品夹中,电镜观察。

三、标记免疫电镜技术

免疫电镜技术是免疫学技术和电镜技术的结合。该技术涉及的免疫学技术基础是抗原与抗体发生特异性结合反应。用于电镜观察的抗原一般是病毒、细菌等病原体。当病毒抗原与抗体结合时,即产生抗原-抗体复合物,病毒颗粒之间形成抗体桥。如果这个反应是在悬液中,那么病毒就会凝聚成团,在电镜下可见聚集成堆的病毒粒子,例如在细小病毒的悬液中加入适当的特异性抗血清,细小病毒就会聚集成团,电镜下可见聚集在一起的细小病毒。如果在特异性抗体或抗抗体(二抗)上标记铁蛋白、酶或胶体金,则可得到标记抗体,即铁蛋白标记抗体、酶标记抗体、胶体金标记抗体。当它们与相应的抗原结合时,在电镜下可显示相应抗原是否存在、存在的具体位置等,可进行定性和定位。

下面分别介绍各类型免疫电镜技术。

(一) 未标记特异性抗体与悬浮态抗原的直接作用

病毒悬液与适当比例的特异性抗血清混合,置于 37℃ 孵育 1~2 h,或在 4℃ 过夜,而后经负染色电镜观察。也可以将孵育后的混合液 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀悬起,负染色电镜观察。

这种方法的优点是:①极大地提高了灵敏度,比常规负染法在相同视野内看到的病毒颗粒多十倍甚至几十倍;②具有血清学鉴定作用,如果用单克隆抗体则可检测不同株系的病毒。

(二) 铁蛋白标记抗体技术

铁蛋白是一种含铁离子的蛋白质,广泛存在于哺乳动物体内,电镜下呈颗粒状,有 100~200 nm 直径的外壳,内部含 55~60 nm 直径的铁胶粒核心。在胶粒内有 2000~3000 个铁原子分布于四个区域,形成四个圆形的致密区,在电镜下呈电子致密作用,在戊二醛的作用下,它能与抗体结合形成一种双分子复合物,称之为铁蛋白标记抗体。铁蛋白标记抗体与相应的抗原反应后,就能在电镜下研究细胞表面或细胞内部抗原的定位及定性。这种方法叫铁蛋白标记抗体技术。

(三) 酶标记抗体技术

将酶和抗体共价结合,这种酶-抗体结合物仍然保持该抗体和酶的活性及特异性。结合物中的抗体与相应的组织或细胞内抗原特异性结合,再利用结合物中的酶活性,使特定底物发生酶促反应,产生特殊产物将酶抗体和与之结合的抗原同时显现出来,然后通过相应

的组织化学方法将酶显示出来,这种方法叫酶标记抗体技术,简称酶标。

(四) 胶体金标记抗体技术(免疫胶体金技术)

用胶体状态的金颗粒作为抗体的标记物,制成胶体金标记抗体来研究抗原与抗体的关系,称为胶体金标记抗体技术。

胶体金标记抗体技术与铁蛋白标记抗体技术、酶标记抗体技术相比有许多优点:①胶体金的制备较容易、简单、便宜;②几乎不出现非特异性吸附和标记;③可用不同的试剂和浓度制备出直径为5~20 nm的各种规格的胶体金,因而可进行多重标记;④胶体金可与抗体、多糖、凝集素和其他多种蛋白质连接,生成标记大分子,而不影响该大分子的生物活性,用途广泛;⑤可用于扫描电镜和X射线衍射分析,这是其他标记物无法比拟的。

胶体金的制备主要使用还原法:①枸橼酸三钠还原法;②鞣酸-枸橼酸钠还原法;③白磷还原法。

胶体金颗粒与特异性抗体结合,便成为胶体金标记抗体(胶体金探针)。金颗粒从胶体金溶液中获得。胶体金是一种带负电荷的疏水胶体溶液,主要靠静电排斥作用来维持胶体体系的稳定性。由于一种特异性抗体几乎只能与一种相应的抗原结合,所以胶体金标记抗体的应用范围比较窄。有人将金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)与胶体金结合,制成SPA-胶体金。SPA具有与人和多种哺乳动物IgG的Fc段相结合的特征,每个SPA分子能与两个IgG的Fc段结合。

在胶体金标记抗体技术中,特异性抗体与组织细胞内抗原结合后,胶体金标记的SPA与特异性抗体结合,在电镜下可以见到在抗原存在的部位胶体金颗粒密集,不存在抗原的部位没有胶体金颗粒存在。这种方法是一种间接法,对反应有放大作用,敏感性较高。

1. 胶体金标记技术的一般步骤(包埋后标记法)

(1)取材:以病毒感染的细胞为例,按常规方法取材,用0.13 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次。

(2)固定:根据观察目的不同,使用不同的固定液(1%~3%多聚甲醛或0.5%~1%戊二醛)。将固定液加入细胞悬液中,固定0.5 h。然后将细胞离心成团,将团块切成1 mm³小块。

(3)脱水:在-20℃环境中,30%~100%乙醇逐级脱水,每级0.5~1 h。

(4)浸透:将乙醇与包埋剂按1:1、1:2、1:3的比例混匀制备不同浓度的浸透液,包埋剂为低温包埋剂Lowicryl K4M。将细胞团块置入浸透液中浸透,-20℃每级1~2 h。最后使用纯包埋剂将细胞团块浸透过夜。

(5)包埋:将细胞团块加入胶囊,注满包埋剂,加盖。

(6)聚合:将样品包埋块于-20℃在紫外灯下10~15 cm处静置,聚合48 h。

(7)常规修块、切片,并使用不锈钢载网捞片。

(8)将切片浮在1%牛血清白蛋白(BSA)或1%卵蛋白小滴上,封闭30 min。再浮在特异性抗体(IgG)小滴上室温孵育2 h或4℃过夜。

(9)将切片浮在0.01 mol/L PBS小滴上,室温浸洗1 h。

(10)将切片浮在1% BSA小滴上,室温孵育30 min。

- (11) 将切片浮在金标 SPA 小滴上,室温孵育 1 h。
- (12) 将切片浮在 0.01mol/L PBS 小滴上浸洗,双蒸水冲洗,吸干。
- (13) 将切片用铀、铅双重染色,电镜观察。

2. 胶体金标记抗体技术类型

胶体金标记抗体技术包括包埋前标记、包埋后标记和悬液负染色标记等多种类型。

(1) 包埋前标记:抗原抗体的结合反应在包埋前进行。特异性抗体、标记抗体或 SPA-G 设法穿过细胞膜,进入细胞内,待反应完成后再行常规固定、包埋、切片、染色观察。

(2) 包埋后标记:组织或细胞经固定脱水包埋后进行常规切片,将切片与含有抗体的溶液进行孵育,待一系列反应完成后,进行常规染色电镜观察。

(3) 悬液负染色标记:在悬液中进行抗原-抗体反应,再加入标记抗体或 SPA-G 进行孵育,然后负染色电镜观察。

四、电镜核酸分子原位杂交技术

利用核酸的原位杂交,可以对 DNA 或 RNA 的特异序列精确定位。光镜的原位杂交技术已成为在组织、细胞和染色体上定位 DNA 序列的标准方法,但光镜水平毕竟有很大局限性,因此很多学者希望将此技术扩展到电镜水平的原位杂交,将细胞、染色体和病毒等的 DNA 定位与超微形态相互联系起来。

(一) 电镜核酸分子原位杂交的基本要求

(1) 探针的核苷酸序列要与 DNA 或 RNA 的靶序列互补。

(2) 为使核酸靶序列能与这些探针杂交,必须对组织和细胞做某些形式的消化,以允许探针穿透细胞到达靶序列位点。此外,必须使靶序列从结合的蛋白质中释放出来。

(3) 杂交的靶序列必须是单链的。双链 DNA 必须要经过变性,一般采用热变性法。

(4) 杂交适于在有甲酰胺和非特异的 DNA 或 RNA 的环境中进行。最后漂洗以除去不希望有的物质。

(5) 原位杂交结果要能够看得见。为使原位杂交结果能看得见,早期应用的探针是掺入某些具有放射性的核苷酸,但在超微结构上照相分辨率较低。近年来使用生物素化的核苷酸标记探针,同时应用能与生物素特异性结合的金标亲和素示踪,在电镜下胶体金颗粒便成为可见的标志。

(二) 电镜核酸分子原位杂交的一般步骤

电镜原位杂交一般分为包埋前原位杂交和包埋后原位杂交。以病毒感染的体外培养细胞为例,电镜包埋前原位杂交技术的一般步骤如下:

(1) 实验所用器皿均用 0.04% DEPC(二乙基焦碳酸酯)浸泡,然后高压灭菌以防止 RNA 酶污染。

(2) 5% 多聚甲醛固定细胞悬液 18 h(多聚甲醛用 0.02mol/L PBS 配制)。

(3) 洗涤:用 0.03% TritonX-100 PBS 洗 2 次,每次 10 min。

(4) 消化:37℃ 条件下用 10 μ l/ml 蛋白酶 K 消化 10 min,以去除核蛋白,增加细胞透性。

(5) 洗涤:PBS 洗 2 次。

(6) 2 \times SSC 洗两次,离心弃上清。

(7) 细胞团用预杂交液 100 ml 悬起,于 60℃ 孵育 30 min。

(8) 加探针杂交液:1 份 cDNA 探针加 5 份探针稀释液,煮沸 3 min 变性,每个样品加 100 μ l,于 37℃ 过夜。

(9) 洗涤:用 0.03% TritonX-100 PBS 洗一次;用 2 \times SSC 洗 10 min,37℃;用 0.01% TritonX-100 PBS 洗两次,每次 5 min;用 1% BSA PBS 洗一次。

(10) 加链亲和素胶体金(1:10 稀释)。

(11) 洗涤:1% BSA PBS 洗两次,每次 10 min。

(12) 2.5% 戊二醛、1% 锇酸固定制成超薄切片,电镜观察。

说明:PBS 为 0.01mol/L PBS。0.03% TritonX-100 PBS 和 1% BSA PBS 分别指在 0.01mol/L PBS 中含有 0.03% TritonX-100 和 1% BSA。

电镜包埋后核酸分子原位杂交技术应首先将样品制成超薄切片然后再进行杂交程序,电镜观察。

五、动物病毒电镜观察常识

利用透射电子显微镜快速识别病毒并准确确认病毒的分类地位,是兽医学与医学诊断和研究必不可少的实验技能,但对于初学者来说很难做到。面对复杂的超微结构,初学者往往分不清哪些结构与病毒颗粒有关,十分困惑。其实,电镜观察同人们认识其他事物一样,遵循着由浅入深,循环往复,以至无穷的规律。只要熟知病毒形态结构特点,掌握一些相关知识,就能正确使用透射电镜,认识病毒。

(一) 初学者应具备专业基础知识

初学者应具备动物病毒学、组织胚胎学、超微病理学和细胞生物学等基础知识。

动物病毒学是以动物病毒为研究对象,研究这些病毒的本质,及其与动物乃至人类疾病的关系的一门科学。对于观察者来说,掌握病毒分类、形态结构及形态发生十分重要。早期动物病毒分类是以形态结构为依据,相同或相似的形态结构分为同一科。随着分子病毒学的发展,病毒分类逐渐加进一些分子结构方面的因素作为依据。同一科的病毒形态结构基本相同,这对于我们观察病毒非常方便。只要我们记住每一科病毒的形态特点,就可以在宿主动物、流行病学特征、疾病临床症状和致病特点等资料综合分析的基础上,通过电镜观察、辨认、鉴定成百上千种病毒。不过,单纯的病毒形态学观察只能鉴定到科,不能鉴定到属、种和血清型。同一科的病毒形态发生基本相同,不同科的病毒形态发生过程相差很多,观察者掌握病毒形态发生特点有助于提高镜下识别能力。例如大部分病毒都遵循 DNA 病毒在细胞核内装配,RNA 病毒在细胞质中装配的规律,但个别病毒例外,如痘病毒,虽然是 DNA 病毒,却在细胞质中装配。

病毒是在活的细胞内增殖的微小生物,在感染生物体时并不感染所有细胞,而是有选