

阴性反差染色技术的探讨

洪 涛 陈夏标 龐其方

周思敬

(中国医学科学院病毒系, 北京)

(中国医学科学院仪器研究所, 北京)

阴性反差染色 (Negative contrast staining) 是分子水平上研究生物組織结构的3个重要方法之一, 最早由 Huxley 氏^[1]、后来被 Brenner 氏等^[2-7]应用于病毒结构的研究。这一方法的基本原理是利用重金属盐类(磷钨酸、磷钼酸等)对电子的相对不通透性, 使生物标本在电鏡下借对比反差显出其細微结构。与正染色相反, 生物材料較其外周环境(磷钨酸盐类)更透明而显出倒轉的反差。由于此法具有良好的反差及显现細微结构等独特优点, 很快就被各国学者推广应用。目前, 这一方法已經被广泛应用于各种微生物及其他超微结构的研究, 不仅用来研究病毒本身的结构, 而且正被当作研究病毒与細胞关系的重要方法。

阴性反差染色技术要求以下几个基本条件, 即: 高电压高分辨率的电子显微鏡, 以求得对标本有良好的穿透力和分辨; 双聚光鏡装置以求得到足够的亮度; 孔径很小(30—40微米)的物鏡光栏以便得到高度反差, 以及坚固的支持膜(一般利用碳膜或 (Formvar) 聚氯甲醛膜)以便經得住电子束的冲击。

在我国現有条件下, 能否利用阴性反差染色技术进行相应的研究工作, 曾是一个未得到解决的問題, 这篇报告是我們从事建立阴性反差染色技术所得的結果。

一、材料和方法

病毒 提純的流感病毒 Pr8 株*, 传染性軟疣及帶状疱疹病毒(直接取自患者)。将新鮮提純的病毒悬浮于1%的醋酸鉍溶液內, 浓度視需要而定, 但不宜太稀。

支持膜

碳膜 为了解决碳膜問題, 我們在 HBA-1 型真空噴鍍仪上安裝了自制的噴碳装置(图1)。取两枝約5—10厘米长的碳棒, 一枝磨尖并使与另一枝3毫米直径的平端接触, 两枝碳棒分别与正負电极相联。将整个装置固定在真空噴鍍仪的一枝电柱上。将平滑的云母片用刀剥离成薄片, 放到噴鍍台上, 使其新剥离面向上。云母片大小一般約5×5厘米, 碳棒与云母片之間距离不大于15厘米。在高真空(10^{-4} — 10^{-5})情况下, 用10—15伏、40—60安培, 約經30—60秒即可在云母片上得到需要的碳膜。为了控制碳膜的厚度, 可在云母片旁放一小块白瓷片, 当瓷片表面出現茶色时, 膜的厚度約在100—150 Å左右。

将帶有碳膜的云母片取出, 剪去边缘, 于冷水上使碳膜慢慢与云母片分离而漂浮于水面。然后将其打捞于电鏡銅网上, 待干后即可使用。

火棉胶膜 用醋酸戊酯将火棉胶配成2%溶液, 用吸管将火棉胶液滴2—3滴于盛有冷水的大平

本文1963年8月21日收到

* 流感病毒由本系薛凤举同志提供, 特此致謝意。

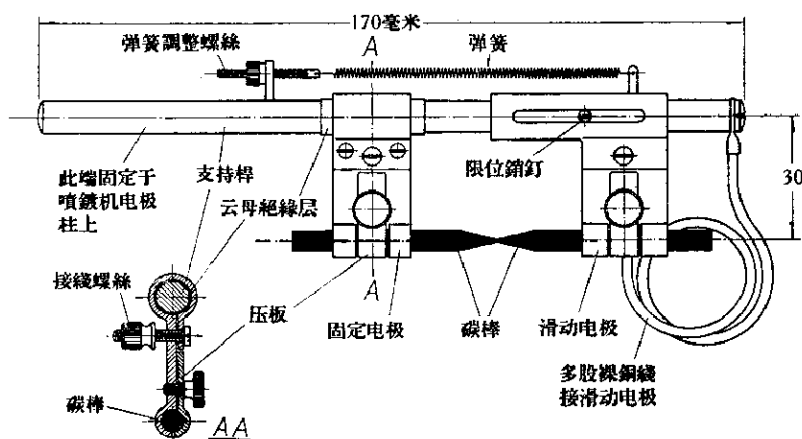


图1 自制喷碳装置(为原大的1/2)

皿内,待醋酸戊酯挥发后,水面上形成一层约 150—200 Å 厚的支持膜,用铜网打捞后即可使用。

磷钨酸 (Phosphotungstic acid, 以下简称 PTA), 国产, 用双蒸水配成 1—2% 的浓度, 并用 1M KOH 将 pH 调整到中性。

电镜 SEM-3 型民主德国电磁式电镜, 分辨率 20 Å 左右, 加速电压 60、80 和 100 KV, 单聚光镜, 光栏为 60—70 微米, 物镜光栏为 50—60 微米之间, 国产红旗牌电子感光板照相, 电子成象在 6,000—40,000 倍。

染色法:

1. 喷雾法 按 Brenner 和 Horne (1959) 原始方法, 将病毒悬液与等量的 1% 或 2% PTA 混合后放到自制小型玻璃喷雾器(图2)内, 立即喷到碳膜或火棉胶膜铜网上, 进行电镜观察。

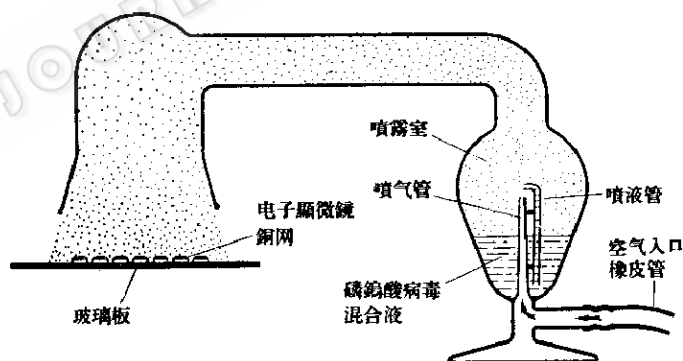


图2 自制小型玻璃喷雾器(为原大的1/2)

2. 滴附法

(1) 将病毒-PTA 等量混合液用拉细的巴氏吸管直接滴到碳膜或火棉胶膜铜网上, 待 10 分钟后将多余的病毒-PTA 混合液用吸水纸吸干, 进行电镜观察。

(2) 先将病毒悬液滴在碳膜或火棉胶膜铜网上, 待 3—5 分钟后, 用吸水纸吸去多余病毒悬液, 并立即滴上 1% 或 2% PTA 溶液, 染色 3—5 分钟后用吸水纸吸干多余的 PTA 溶液, 必要时可以重复滴上和吸掉 PTA 溶液。将铜网放在真空中保存或立即进行电镜观察。

二、结 果

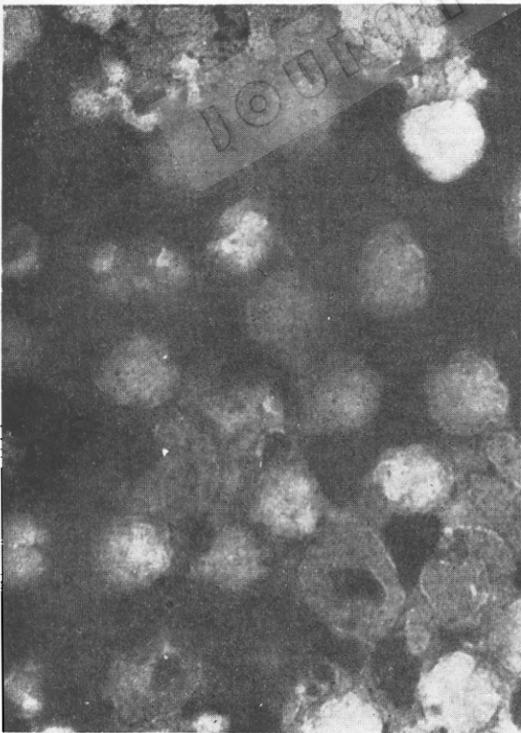
(1) 为了便于比较, 现将两种支持膜和两种标本制作方法列表如下:

兩 种 支 持 膜 的 效 果 比 較

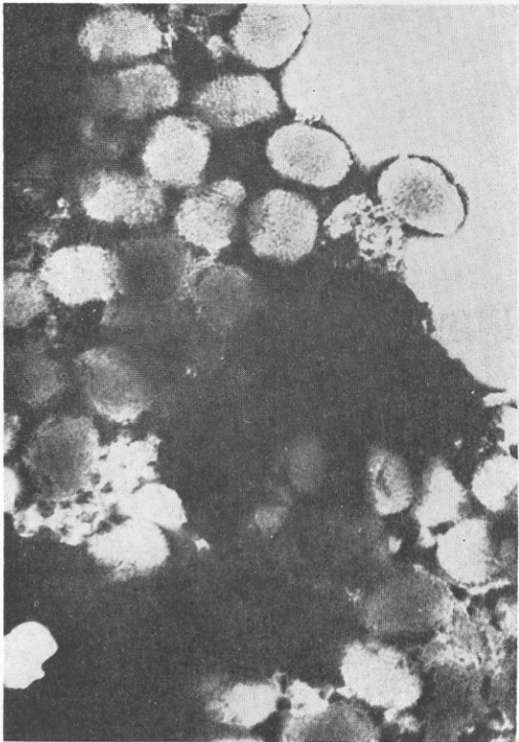
碳 膜	火 棉 胶 膜
1. 制作手續較复杂	制作方便
2. 易产生小裂紋和小皺折,影响滴膜和照相时聚焦,只适于噴霧法	平坦,无裂紋,无皺折,噴霧和滴膜均适用
3. PTA 在高压时很易聚縮成团块	PTA 較稳定,不易聚縮成团
4. 耐高压, 100KV 时不易破裂	耐高压差,适用于 80KV。100KV 时只能短時間应用

噴 霧 法 和 滴 附 法 的 結 果 比 較

噴 霧 法	滴 附 法
1. 所需病毒悬液量較大,至少 1 毫升	少量病毒悬液即可, 0.1 毫升已足够
2. 容器面积較大,造成材料浪費	拉細的滴管很小,节省材料
3. 手續复杂,每次制作标本時間至少 2 小时	操作简单,节省時間,每次最多半小时
4. 电鏡下可見病毒量少	电鏡下到处都可見到病毒(图 3)
5. 磷鎢酸易縮成团,不均,不易观察和照相	磷鎢酸均匀展开,易于观察和照相
6. 易造成标本的沾污,不易控制病毒,有造成实验感染的危險	标本清洁,不易沾污 病毒悬液容易控制,實驗室感染可能性小



A



B

图 3 (A) 带状疱疹病毒的阴性反差染色 $\times 60,000$
(B) 传染性软疣病毒的阴性反差染色 $\times 26,000$

(2) 磷鎢酸的 pH

我們比較了 PTA 的 pH 对染色的影响。看来 pH 的可变范围比原来預料的要大得多。pH 在 5.5—7.2 間的染色結果并无重大差异。pH 过低时 PTA 易变成顆粒性凝縮物,影响細微結構的观察, pH 中性 (pH 7.0) 时結果最佳[图 4(B)(C)]。

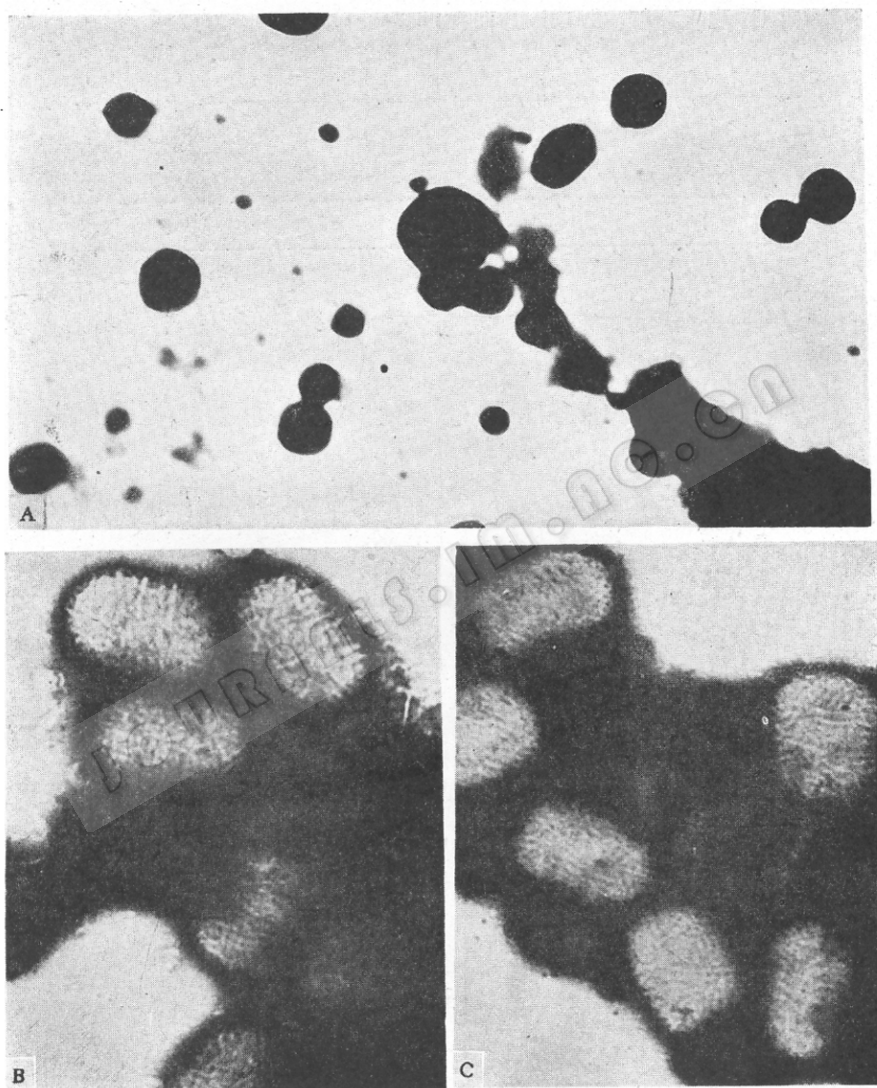


图 4 PTA 的 pH 对染色的影响(传染性軟疣病毒)

- (A) PTA 的 pH 为 1.86 时, PTA 和病毒凝縮成团 $\times 24,000$;
 (B) PTA 的 pH 为 6.58 时, 病毒的结构清楚 $\times 55,000$;
 (C) PTA 的 pH 为 8.0 时, 病毒的结构不很清楚 $\times 55,000$ 。

(3) 电鏡照相技术

PTA 在电鏡下的不稳定性要求在电鏡操作时作出相应的努力, 任何的突然加热都会影响成相結果。新鮮制备的标本应当使有一个“适应”过程, 我們的經驗証明, 开始时最好用較低电压 (40 或 60 KV) 并在灯絲和聚光鏡电流較小的情况下进行 1—2 分鐘的打击, 这样, 可增加标本的稳定性。經過这样处理的标本对高电压有較好的适应。

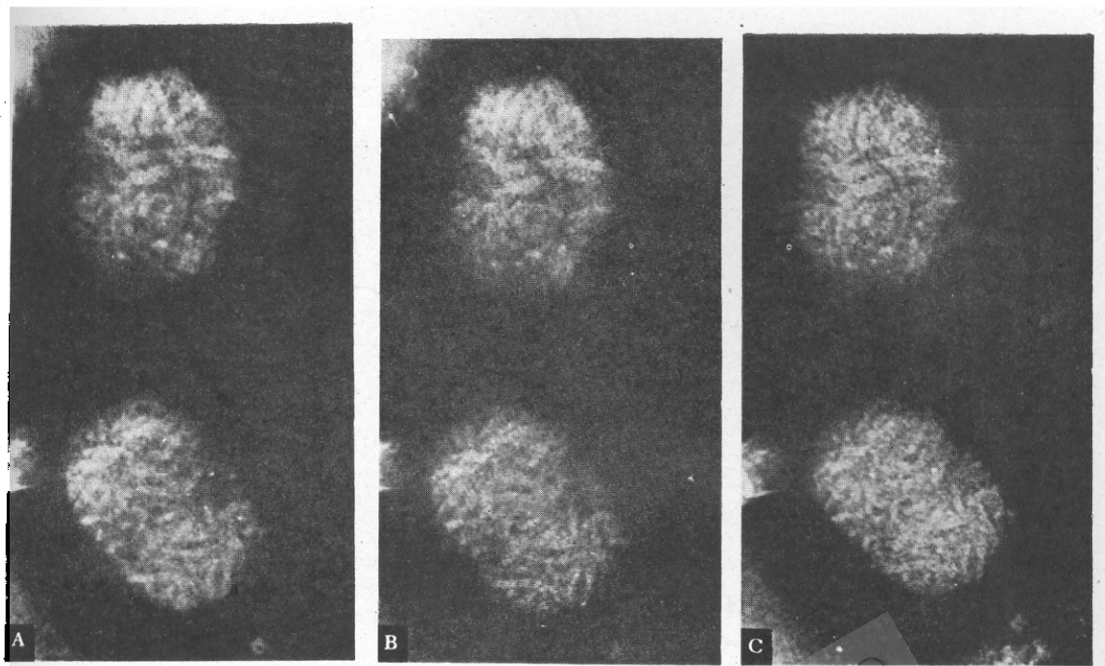


图5 不同电压下的阴性反差染色标本成象结果的比较(传染性软疣病毒) $\times 85,000$
(A) 60 KV 下的成象; (B) 80 KV 下的成象; (C) 100 KV 下的成象。



图6 流感病毒的丝状体在 80 KV 下的成象

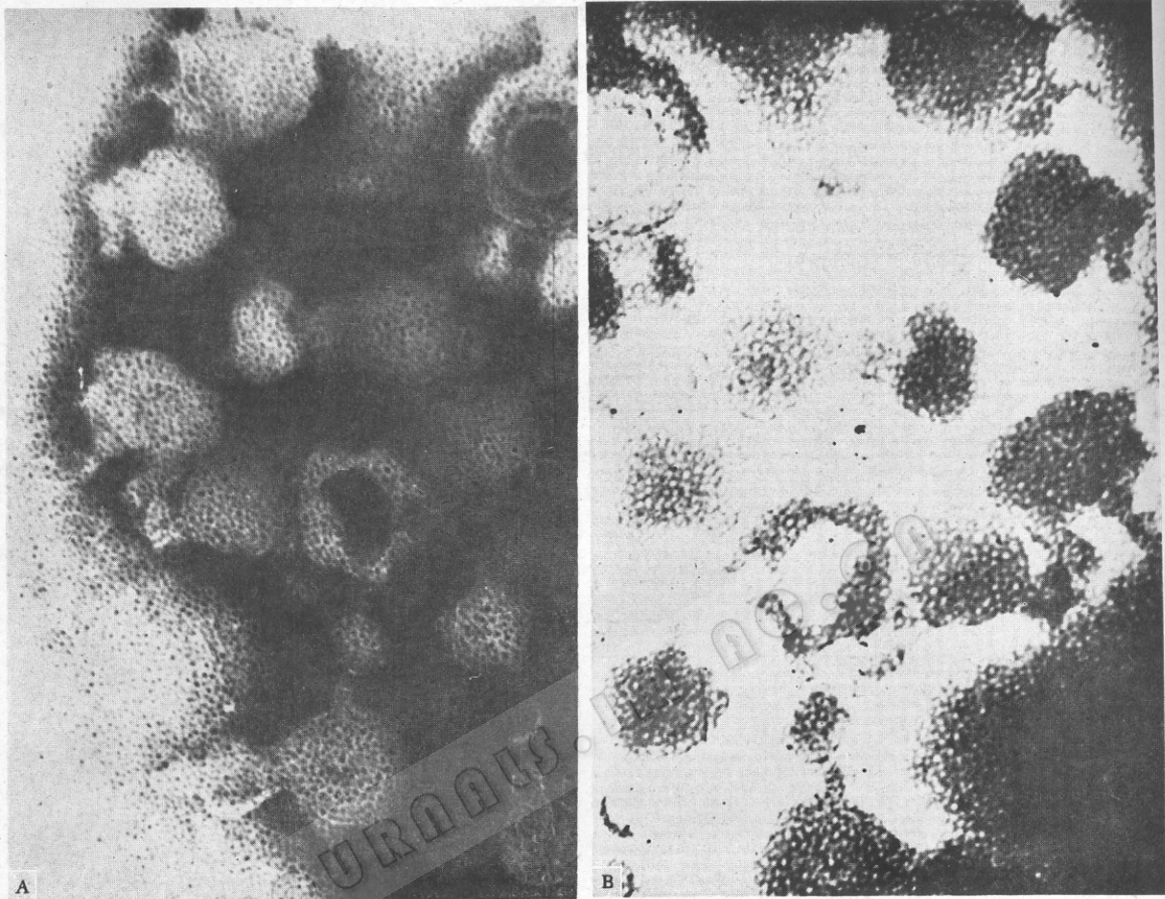


图7 阴性反差染色标本,因电子束的冲击所造成的人工损伤(带状疱疹病毒) $\times 86,600$
(A)(B) 为同一相片的正印和反印,注意凝缩的 PTA 与病毒的亚单位近似。

阴性反差标本在电镜照相时应当有足够的亮度,并相应的缩短电子暴光时间而加长底片的显影时间,否则就不能使细微结构得到充分显露。

我们曾在同样条件下多次地比较了 60 KV、80 KV 与 100 KV 的成相情况,结果表明并无显著差别。图 5 为同一视野在不同电压下所得相片。图 6 为 80 KV 下流感病毒的丝状体。从这两种大小和结构不同的病毒电镜相片中,不仅证明了以低电压代替高电压的肯定可能性,而且还可清楚地见到病毒的微细结构。因此,我们认为,重要的在于照相时适合的曝光时间和相应的显影时间的判断与这两个方面的不协调情况之间的差别。在合适的曝光和显影前提下,60 或 80 KV 的电压所产生的结果不仅不次于 100 KV,相反,可以避免在 100 KV 时很易发生的不良结果,包括高电压引起 PTA 的挥发,PTA 颗粒集结以及生物标本本身的变形等人工损伤(图 7),这种人工损伤甚至易被误认为病毒的亚单位。

三、讨 论

1. 用二级中等分辨能力的电镜,60 和 80 KV 中压进行阴性反差染色的可能性

現有的有关阴性反差染色的研究报告都是用高电压,双聚光鏡,小光栏的高分辨率电子显微鏡完成的,至少在我們进行这一工作时还未能找到利用 60 KV 或 80 KV 以下电压进行研究的报告。本着因陋就簡的精神,我們做了試探,获得了滿意的結果。这些結果表明,阴性反差染色技术在电子显微鏡方面并不要求很严格的条件。我們的經驗証明,着眼点应当是染色技术本身以及照相技术。染色技术和方法可以补偿高电压、双聚光鏡等条件的不足。在不具备足够小的光栏的条件下,60 或 80 KV 的电压比 100 KV 有更多的优越性,既不引起 PTA 的变性又可揭露病毒的亚单位超微結構,滿足研究的要求。

2. 染色操作上的簡化

以往,在病毒的阴性反差染色方面都采用噴霧法。鉴于此法消費較大,操作手續繁多,我們試探以滴附法代替。从結果的比較中可清楚地看出,滴附法不仅滿足了实验要求,并且可以完全用火棉胶膜代替制备过程較复杂的碳膜。碳膜由于“怕水”,不易使 PTA 均匀地攤开,不适用于滴附法,而火棉胶膜对病毒的水溶液有“亲和”性可避免以上缺点。我們认为以火棉胶膜代替碳膜不仅能达到应有效果,而且有利于染色技术的改进。

3. 关于阴性反差染色的原理

尽管这个染色方法已有几年的历史,而且被广泛应用于許多研究,然而有关其染色原理的描述几乎无从考察。我們从所得結果中提出以下几点現象,作为討論的依据:

(1) 与普通电鏡相片相反,在阴性反差染色的相片上所看到的物体越是厚或越是致密則越透明(白),反之,越是疏松則越不透明(黑)。在两个病毒小体的重迭处这种現象尤其明显。

(2) PTA 染色較浅的病毒有立体感,染色較深(穿透良好)时失去立体感变成类似切片的平面相。

(3) 經 PTA 染色后的材料其外周虽然无 PTA 存在,仍然能显示出內部結構。

(4) PTA 染色在短時間內(2—3 分鐘)即可使观察的生物标本“透明”。

在肯定第(4)个現象(即 PTA 使观察的生物标本“透明”化)的前提下,对第(1)个現象的認識是:PTA 不易被电子穿透,生物标本比 PTA 对电子的穿透性大,有标本的地方 PTA 的量少,病毒重迭处 PTA 的量更少,因此,更易被电子穿透。如果把这种关系想象成断面則不难理解(图 8)。

对現象(2)的解释是:PTA 未穿透到病毒小体內部而只限于病毒表面,因此,所反映的只是表面結構,在現象(1)的原理上就不难理解了。

对現象(3)和(4)的解释是:PTA 有极大的穿透力,短時間即能穿透細菌、病毒等微生物机体,在这些微生物机体的疏松处或空隙处滯留。因此,尽管外周沒有 PTA 存在,仍然有良好的反差。

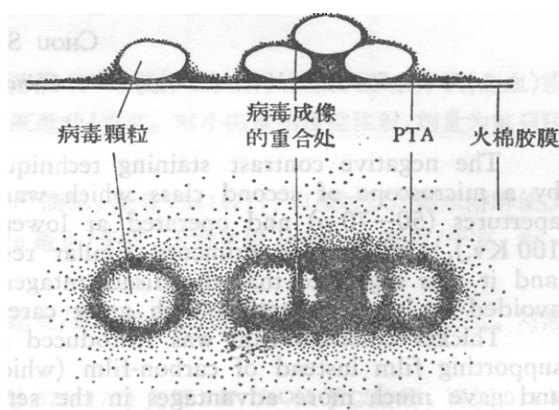


图 8 阴性反差染色投影原理的图解
上图为切面看,下图为正面看。

PTA 如何使生物标本变成“透明”的問題,仅只是假設,其原理有待研究。

四、結 論

1. 我們在現有条件下建立了阴性反差染色技术,并証明这一技术可有效应用于病毒超微結構研究工作。所用仪器为单聚光鏡裝置的二級分辨率电鏡(20 Å 左右),实验使用加速电压为 60、80 和 100 KV,物鏡光栏直径在 50—60 微米之間。

2. 在阴性反差染色中,用較厚的火棉胶膜代替碳膜并比較了两种支持膜的优缺点。

3. 在比較了噴霧法和滴附法之后,肯定了滴附法可以完全代替較为复杂和消費較大的噴霧法。

4. 分析和討論了阴性反差染色的原理。

参 考 文 献

- [1] Huxley, H. E.: *Electronmicroscopy Prec.* Stockholm. Comf. 260—261, 1956.
- [2] Brenner, S., and Horne, R. W.: *Biochim. et Biophys. Acta.* 34:103—110, 1959.
- [3] Horne, R. W., and Wildy, P.: *Advances in Virus Research.* 7:225—325, 1960.
- [4] Lwoff, A., Anderson, T. F., and Jacob, T.: *Ann. Inst. Pasteur*, 97:281—289, 1959.
- [5] Wildy, P., Russell, W. C., and Horne, R. W.: *Virology* 12:204—222, 1960.
- [6] Hoyle, L., Horne, R. W., and Waterson, A. P.: *Virology*, 13:448—459, 1961.
- [7] 洪涛,陈良标,庞其芳:微生物学报, 9 (4): 321—333, 1963.

INVESTIGATION OF NEGATIVE CONTRAST STAINING TECHNIQUE

HUNG TAO, CHEN LIANG-PIAO, PANG CHI-FANG

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

CHOU SZE-CHING

(Institute of Medical Instruments, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

The negative contrast staining technique was set up under the condition restricted by a microscope of second class which was equipped with a single condenser, larger apertures (50—70 μ) and operated at lower potentials (60, and 80 Kv instead of 100 Kv.). In these experiments, similar results were obtained with different potentials and it was suggested that the disadvantages produced by higher potentials could be avoided at lower potentials with great care.

Thicker coloidian-film was introduced in the negative contrast staining method as supporting film instead of carbon-film (which was more complicated in manipulation), and gave much more advantages in the sense of making the PTA well spreaded and, so, permitted a well demonstration of virus particles.

The major attention of the authors was also paid to the staining method, on which a serial of attempts was made to find out a simple and useful procedure. Eventually, a direct dropping method was assured as a simpler and more useful method as compared with the routine spraying method.

Finally, an attempt was made on discussion of the principle of the negative staining technique, especially on the respect of interpretation of electron-micrographs achieved with this technique.