

电子显微镜观察病毒感染细胞包埋技术的改进

洪涛 方肇寅 周静仪 赵同兴 龔伊红*

(中国医学科学院流行病防治研究所, 北京)

本文报道了旨在简化和提高电镜包埋技术的几项新的技术方法。

为了准确而容易地在病毒感染的单层细胞培养上选择包埋所需的细胞, 我们设计并应用了名为“顶扣细胞原位包埋技术”。将细小的塑料管放到光学显微镜的聚光镜的中央, 对准预先固定、脱水和浸透了国产 618 树脂的感染病毒的单层细胞培养, 使盖玻片的细胞面向下, 对准塑料小管的上端并顶扣之。应用此项技术, 我们在副流感病毒、腺病毒和疱疹病毒上取得了初步结果。该项技术的优点在于: ① 比较准确地选择早期病变细胞, 有助于克服电子显微镜观察上的困难; ② 简而易行, 避免了一些复杂的包埋程序, 节省时间和材料。

此外, 本文还介绍了试管内单层细胞原位包埋方法和简易的人和动物气管和支气管定向包埋方法。

近年来电子显微镜技术在医学生物学尤其在病毒学方面, 已有广泛的应用, 相应的电镜标本制备技术也有许多新的发展^[1-3]。但是, 一方面因为仪器设备上的花费, 另一方面因为标本制作技术上的各种困难, 大大地限制了该项技术的效率。

我们在配合感冒气管炎病因学的研究中, 分离和鉴定病毒遇到的突出困难是电镜检查病毒的阳性率较低, 尤其是不易早期发现病毒。针对这个问题, 我们在兄弟单位的启发和鼓励下, 做了一些并正在从事旨在提高电镜的应用效率的研究。本文介绍被我们定名为《顶扣细胞原位包埋技术》、《试管内细胞原位包埋方法》和《气管和支气管定向包埋法》以及它们在疱疹病毒、副流感病毒、肠道病毒和腺病毒上的初步应用。希望能起抛砖引玉的作用。

材料和方法

带有和不带有狭条盖玻片的人胚肾细胞试管培养**在形成单层后, 分别接种 10^{-2} — 10^{-7} 稀

释度的副流感病毒 I、II、III 株***、腺病毒(居 59)和疱疹病毒(检 14)。副流感病毒感染材料于接种 2—3 天后吸去培养液, 用生理盐水洗两次, 然后各管加入 1% 预先洗好的豚鼠红血球悬液 0.5 毫升, 轻轻振荡后放室温 20 分钟使吸附, 此后将血球悬液倒掉, 用生理盐水洗两次即可观察结果。

取血球吸附阳性而稀释度较高和最高的细胞培养 (10^{-2} — 10^{-7}), 在腺病毒、疱疹病毒和肠道病毒则取最早期出现的少量圆缩细胞的盖玻片或试管单层培养, 分别用顶扣细胞原位包埋技术和试管内细胞原位包埋法进行超薄切片的制备。

一、顶扣细胞原位包埋

将感染的盖玻片细胞培养倒掉培养液, 用 2—5% 的二甲酸钠戊二醛固定液 (pH 7.2 ±) 固定 15 分钟, 经缓冲液洗两次后改用 1% 缓冲的四氧钨 (OsO_4) 固定 15—30 分钟, 经缓冲液洗两次后用 30%、70%、90%、100% 的丙酮依次

* 中国医学科学院宣化气管炎防治小分队。

** 由本所李玉英同志提供。

*** 由卫生部生物制品和药品检定所提供。

本文 1973 年 1 月 28 日收到。

脱水,每个浓度 15 分钟。脱水后的细胞材料经国产 618 树脂浸透 1 小时(为节省树脂可将带有细胞的盖玻片数张同时放到盛有树脂的小平皿内浸透)。树脂的配方为: 618 环氧树脂 1 毫升,顺丁烯二酸酐 400 毫克,邻苯二甲酸二丁酯 0.36 毫升,二乙基苯胺 0.08 毫升。

将盖玻片取出放在载玻片上。注意载玻片上所带的树脂不宜过多,以免在顶扣时造成选择定位上的误差。将带有盖玻片的载玻片倒置于显微镜载物台上,在显微镜下选好所要顶扣的感染细胞。选择早期病变的细胞需要较多的经验,一般经锇固定后的病变细胞颜色较深,在腺病毒、肠道病毒和疱疹病毒感染的细胞有其比较典型的圆缩形态,而副流感等粘液病毒感染的细胞经血球吸附实验后,其细胞表面吸附有红血球,典型者颇象一朵盛开的葵花。然后将预先切成 2—6 毫米不等长度的小塑料管(我们采用的是市售直径不超过 1 毫米的空心塑料头绳),用镊子安放到光学显微镜的聚光镜的中心,上下调节聚光镜和物镜使标本正对小管,当慢慢向上提高聚光镜时小管即扣准病变的细胞。当聚光镜再次下降时小管即粘到带有细胞的盖玻片上。借毛细管作用小管内渐渐被树脂充满并无气泡留存。移动标本,以同法可在一个盖玻片上选择顶扣多个目标(图 1-1)。

为了在重复操作过程中使已经扣好的小管不致碰到聚光镜,要依次逐渐延长小管的长度。顶扣完毕将载玻片轻轻取下翻转过来使小管竖立,取下盖玻片连同已顶扣好的小管置于 80℃ 聚合 14 至 24 小时,而后将标本放到沸水中加热数秒钟(一般不超过一分钟),此时充满聚合树脂的小管很易从盖玻片上脱下,在小管与盖玻片接触的光滑树脂表面上包埋有所选择的病变细胞。再将小管放到热水中浸泡少许即可使树脂和塑料小管脱离,或用刀片在小管一侧划一下即可剥脱(图 1-2)。至此包埋标本可直接夹在鸭嘴形组织块固定器上切片,或切短后用万能胶水粘到废的树脂块上进行超薄切片。

二、试管内单层细胞原位包埋

固定、脱水、浸透均按上述常规进行,最后将盛有倾斜面树脂的试管直接放 80℃ 聚合,聚合后煮沸 1—2 分钟,趁树脂柔软时打碎试管,全部细胞都包埋在树脂的表面,然后在显微镜下寻找并

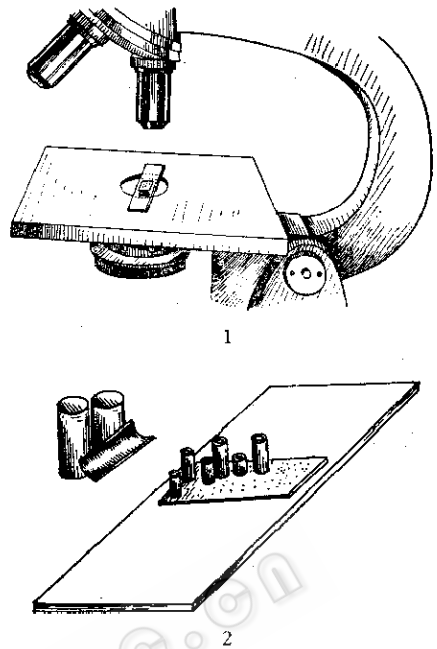


图 1 顶扣细胞原位包埋法图解

1. 将固定、脱水和树脂浸透好的单层细胞盖玻片放到载玻片上,有细胞的一面向下,观察选取所要顶扣的感染细胞,然后将小塑料管放于聚光镜中央,与物镜对准,提高聚光镜使塑料小管顶扣在选好的细胞上,放下聚光镜时小管即粘到有细胞和树脂的标本上。
2. 轻轻取下玻片,将带有小管的盖玻片放到 80℃ 聚合 14 小时左右,包埋告成。右侧为两个包埋有细胞并剥去塑料外壳的树脂小柱的放大示意图。

用笔标记所需要的部位,直接切片。

三、气管和支气管定向包埋

我们采用两种方法进行包埋,其一是将气管顺环状软骨切成 1×4 毫米的长条,按常规固定、脱水、浸透后,直立放入二号胶囊内,加入包埋液将胶囊稍微倾斜以保证组织块的直立方位,放入烤箱进行聚合。其二是将肺切除的新鲜支气管*或大鼠气管用刀片纵切成两半或四份,按常规固定、脱水、浸透后放入事先铺好约 0.5 厘米厚包埋液的小平皿内聚合,平皿背面标记标本号码,聚合后用煮沸法取出包埋块,用刀片或小锯裁割之,这样可任意选择所要切片的方向。

* 由中国医学科学院首都医院病理科提供。

此外我们还采用了树脂包埋块厚切片甲苯胺蓝 (Toluidine blue) 染色法, 进行光学显微镜检查以帮助超薄切片选择定位^[4]。

电镜观察结果

用 LKB-I 型超薄切片机切片, 选择淡黄和银灰色切片, 打捞在复有聚乙烯醇缩甲醛 (Formvar) 膜的国产 2 毫米铜网上, 经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后在 SEM-III 型电镜下观察和照相。

用顶扣细胞原位包埋和试管内细胞原位包埋的超薄切片在电镜下较易观察到选择的病变细胞中的病毒颗粒 (图 2, 3)。在副流感病毒感染红血球吸附的实验里, 病毒滴度 10^{-6} 以上时也同样不难发现吸附有血球的感染细胞和相应的病毒, 甚至还经常见到吸附有红血球而并无明显的病毒形态出现的细胞, 其外膜与血球接触处可见到着色较深而呈锯齿状的结构 (图 4)。

图 5、6 分别为大鼠和成人细支气管的定向包埋电镜照片, 由于采用定向法, 结合厚切片甲苯胺蓝染色, 便可为超薄切片事先选择好上皮细胞层, 这样在电镜下杯状细胞、纤毛、细胞分泌颗粒等清晰可见。

讨 论

到目前为止, 在电镜下研究和检查病毒感染细胞仍然采用传统的方法, 即用消化或直接刮取法从培养管壁上离心收集细胞进行固定、包埋和切片工作。这样的方法主要缺点是改变了细胞的自然状态和造成人为的损伤, 而且动物病毒的种类繁多, 各类病毒在宿主细胞上的繁殖周期不一, 引起细胞病变的情况又各不相同^[6-8]。大量实验证明, 病毒对细胞群的感染并不是同步的, 这就为电镜下早期发现病毒带来了很大的困难。电镜工作者曾为此在包埋技术上做过许多改进^[9-16], 但至今还没有

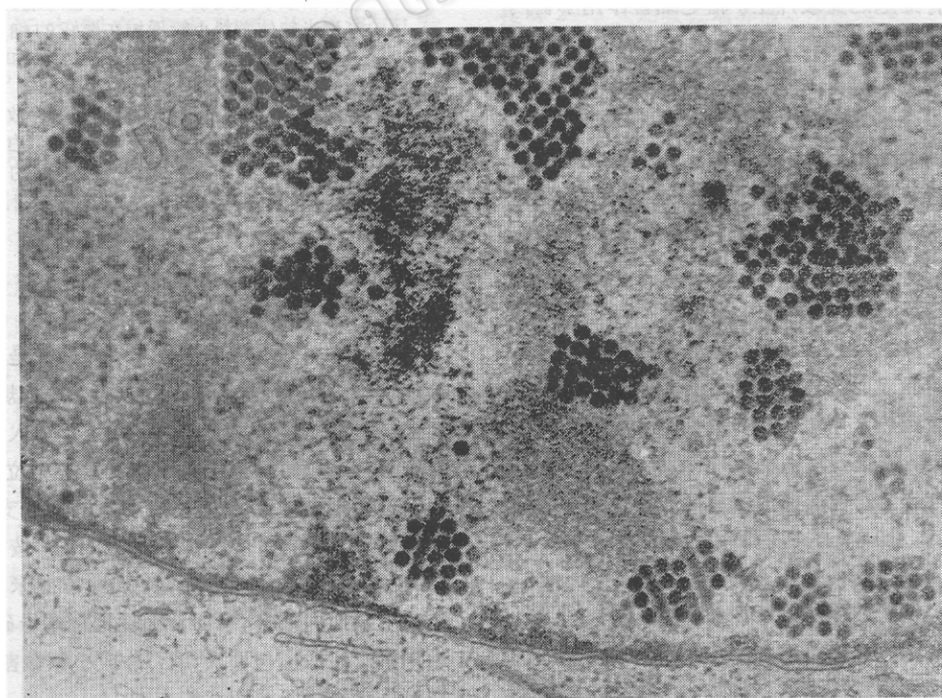


图 2 腺病毒 (居 59) 感染人胚肾细胞 ($\times 28,500$)
顶扣原位包埋, 细胞核内出现典型的腺病毒结晶排列。

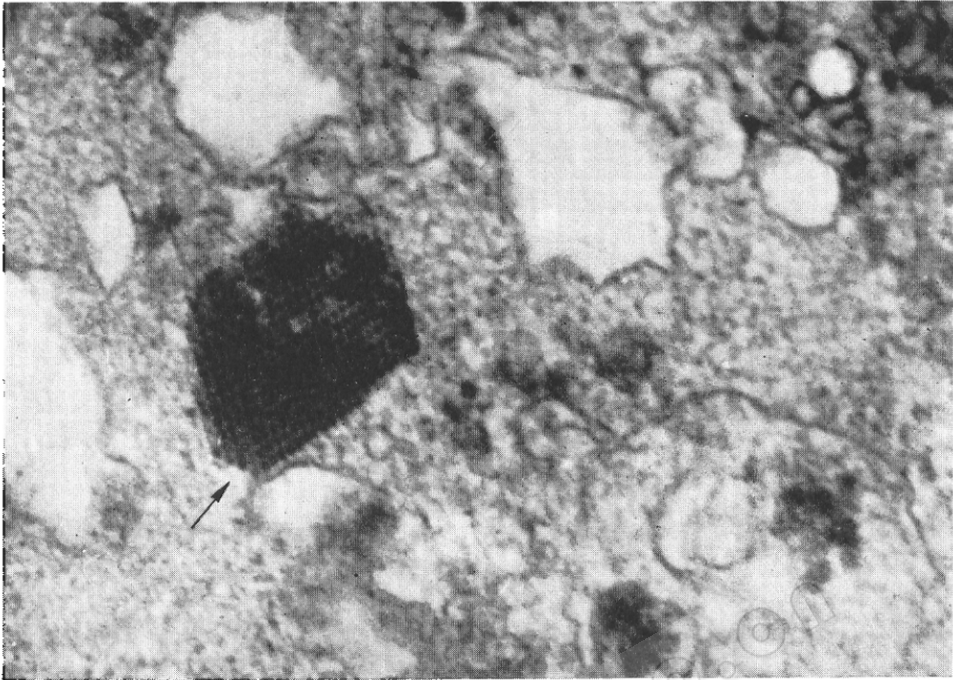


图 3 细胞浆内肠道病毒 ($\times 45,000$)
试管内细胞原位包埋



图 4 副流感病毒 II 型感染人胚肾细胞早期豚鼠红血球吸附 ($\times 60,000$)
顶扣原位包埋, 箭头示细胞表面与红血球咀突吸附的情况, 右下方为另一个咀突的横切面。

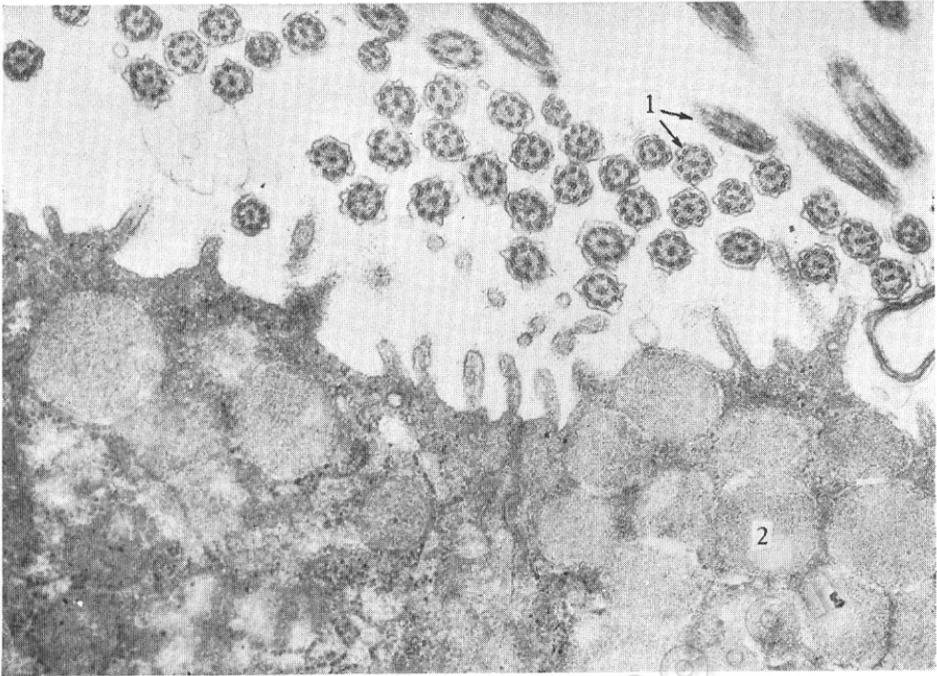


图5 大鼠气管的上皮细胞($\times 30,000$)
1. 纤毛的横切面和纵切面; 2. 分泌颗粒。

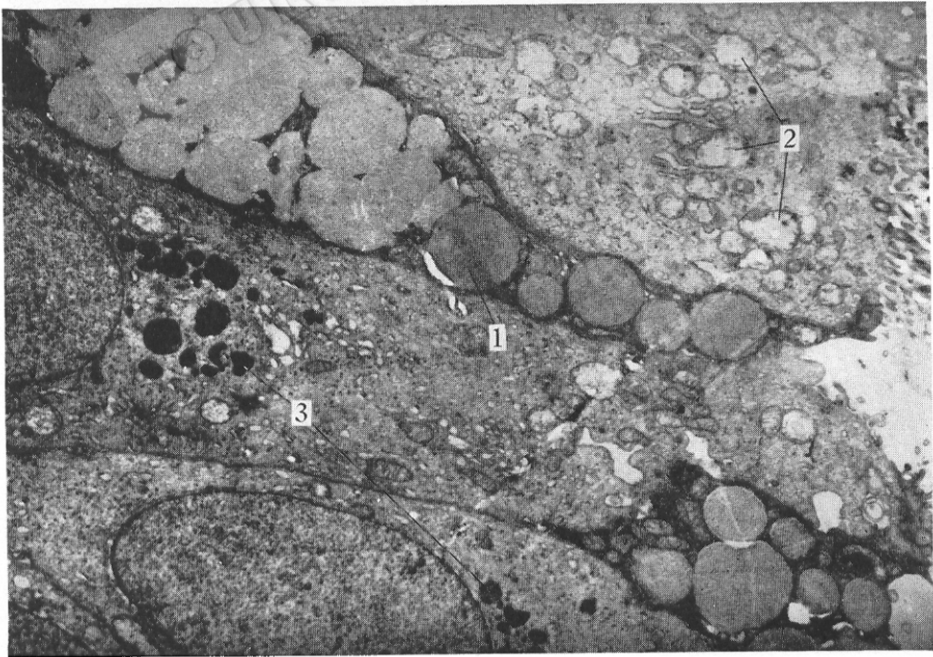


图6 成人慢性支气管炎细支气管上皮($\times 8,450$)
定向包埋,可见1. 杯状细胞明显增多; 2. 空泡变性的线粒体和3. 溶酶体增多。

一个比较理想的结果。我们经过反复实验,建立了顶扣原位细胞包埋等技术方法,并应用于几种不同类型的病毒感染细胞的电镜观察,取得了一些初步结果。我们认为,这些方法简便易行,避免了一些复杂的技术操作,同时可保持感染细胞的原来状态,它不仅可作为在感染细胞上早期发现病毒的一个途径,还可用于研究病毒和细胞的关系、试管内转化细胞等。当然,任何一种方法都不是万能的,而且这种技术本身还有待更多的实践加以考验和改进。

如上所述,病毒感染细胞的形式多种多样,电镜工作者应当在熟悉各类病毒细胞病变的前提下才能使选择定位技术得以发挥其优越性。有时细胞的病变和病毒繁殖周期并不很一致,甚至十分不一致,某些细胞在感染病毒时,甚至生成大量病毒也不引起明显可见的细胞病变^[5,6],因此根据病毒的不同情况,寻找早期而准确地发现病毒的手段就成了电镜工作者的一项艰巨而重要的课题。我们坚信只要遵照唯物辩证法的哲学思想,对具体事物进行具体的分析,努力实践就会使电镜这个微观世界的眼睛更好地为防治疾病服务。

参 考 资 料

[1] Meek, Geoffrey, A.: *Practical Electron Microscopy for Biologists*, London, Wiley-

Interscience, p. 406—460, 1970.

- [2] Kay, Desmond, H.: *Techniques for Electron Microscopy*, 2ed. Oxford, Blackwell, p. 213—253, 1965.
- [3] European Congress on Electron Microscopy, *Electron microscopy 1972*, London and Bristol, p. 217—290, 1972.
- [4] Trump, B. F. et al.: *J. Ultr. Res.*, 5: 343—348, 1961.
- [5] Fwanner, F. & White, D. O.: "Viral Multiplication" Chapter 3 of "Medical Virology", 1970.
- [6] Luria, SE. & Darnell, JE.: "Multiplication of animal Viruses", 2ed. Chapter 4 of "General Virology", 1968.
- [7] 柳元元, "病毒的繁殖"——"医学病毒学总论", 第五章 88—111 页, 黄祯祥主编, 上海科学技术出版社, 1965.
- [8] Albert Z. Kapikian, June D. Almeida, and E. J. Stott: *J. Virol.*, 10:142—146, 1972.
- [9] Howatson, A. F. et al.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:115—118, 1958.
- [10] Heyner, S.: *Stain Techn.*, 38:335—337, 1963.
- [11] Egeberg, J.: *Stain Techn.*, 40:343—346, 1965.
- [12] Bunge, R. P. et al.: *J. Cell Biol.*, 24: 163—191, 1965.
- [13] Kiroshi Kushida & Kenji Suzuki: *J. Electron Microscopy*, 17:351, 1968.
- [14] Kiroshi Kushida & Kenji Suzuki: *J. Electron Microscopy*, 19:191—194, 1971.
- [15] Brinkley, B. R. et al.: *J. Cell Biol.*, 35: 279—283, 1967.
- [16] Michele, Henry-Aymard, S. et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, 122:91—113, 1972.

SOME NEW IMPROVEMENTS IN METHODS OF EMBEDDING PROCEDURES OF VIRUS INFECTED CELLS FOR ELECTRON MICROSCOPY

HUNG TAO, FANG CHAO-YIN, CHOU CHING-YI, CHAO TUNG-HSING AND KUNG YI-HONG
(*Institute of Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

Some new improvements in the methods of simplifying and facilitating embedding procedures for electron microscopy were introduced.

In order to select cells in monolayer cultures infected by viruses, a new method, namely "Fine tube top-fit mounting technique for in situ cell embedding" was devised by placing a fine plastic tube in the center of the condenser of a light microscope. A slide with a cover slip of a monolayer cell culture infected with virus and previously fixed, dehydrated and infiltrated in epoxy resin (No. 618, China product) was placed downward facing the top of the fine plastic tube. Then the condenser is gradually elevated until the top of the plastic tube touches the cells. Preliminary results have been obtained in the examination of cultured cells infected with para-

influenza, adeno- and herpes viruses.

The present technique has the following advantages:

1. As readily correct selection of cell groups in their relatively early stages of infection still remains to be a difficult problem in electron microscopy, the technique introduced may be helpful to overcome this difficulty.

2. This technique is simple and easily operated. As no complicated embedding procedures are involved, it is timesaving and economical in material consumption.

In addition, we have introduced another in situ embedding method of monolayer cells which were cultured in test tubes and a simple method of orientation of both man and animal tracheal and broncheal embedding.