

沙眼病毒形态的电子显微镜研究

洪涛 王思智 陈良标 郁文芳 金秀英* 马淑慧*

(中国医学科学院流行病防治研究所, 北京)

我们应用超薄切片, 阴性反差染色, 冰冻切片, 阴性反差染色, 真空喷涂等多种技术方法, 对我国的沙眼病毒进行了较全面的电子显微镜研究。

用于研究的病毒材料包括感染鸡胚卵黄囊经 DEAE-纤维素提纯的病毒、人胚肾单层细胞培养的沙眼病毒以及沙眼病人结合膜刮取物。通过多种方法的综合研究, 使我们对沙眼病毒的形态有了比较全面而深入的认识。

根据提纯材料和感染细胞超薄切片中所见到的病毒形态, 我们以小型致密病毒、大型疏松病毒和多形态病毒等加以描述。同时我们还描述了病毒颗粒的某些亚显微结构或“小器官”。

1. 单层或多层外膜: 其往往呈波浪样褶皱。在我们的研究中最多见到了三层外膜。

2. 病毒浆: 组成病毒颗粒的主要部分, 呈海绵状或网状结构。

3. 核样物: 位于病毒中心或偏中心, 呈不规则形状, 在某些病毒颗粒中发现。

4. 隔膜: 它和外膜颇相似, 有时与外膜直接相连。

此外, 在我们的研究中, 还经常见到病毒颗粒的均等和不均等分裂情况。本文还讨论了各种不同类型的病毒颗粒之间的相互关系。图 8 是我们对沙眼病毒结构的综合性认识。

沙眼是流行极广的常见病, 尤其在亚、非、拉地区, 仍是一个严重问题, 对劳动人民危害极大。解放后随着沙眼防治工作的进展, 1956 年我国汤飞凡、张晓楼等首次成功地用鸡胚卵黄囊接种法分离到沙眼病毒^[1], 为该病毒的病原学、免疫学和形态学等研究奠定了基础。为了更好地开展沙眼的防治工作, 深入地认识沙眼病毒的许多特性, 包括形态结构特性, 是十分必要的。

近几年来, 我们采用了阴性反差染色、冰冻切片、超薄切片和真空喷涂等技术方法, 在电子显微镜下反复地研究了沙眼病毒的形态及其内部微细结构。本文报道了各种方法所得结果, 并试图着重对该病毒的外形、细微结构等方面进行了一些探讨。

15—16 代, 感染 6 天龄鸡胚, 35℃ 孵育。待鸡胚特异性死亡后(一般 6—8 天), 收获卵黄囊膜供病毒提纯使用。

病毒提纯方法 取感染鸡胚卵黄囊膜 20—30 只, 加入 pH 7.2 蔗糖磷酸缓冲液 (SPG), 配成 20% 悬液, 置 4℃ 冰箱过夜, 在高速匀浆器内充分打碎后, 经 3000 转/分 15 分钟离心二次, 取中层, 再经 10000 转/分 60 分钟高速离心二次。用玻璃球打碎并混匀沉淀物, 加适量 DEAE-纤维素处理二次, 低速离心除去 DEAE-纤维素后, 再经高速沉淀, 最后将沉淀物用 SPG 缓冲液悬浮, 经琼脂柱层析一次分管收集, 4℃ 保存备用。

病人材料 直接取自 II 期 (++) 沙眼患者眼结膜滤泡刮取物, 经乳钵充分研磨后 3000 转/分离心除去细胞残渣, 以上清液作为电子显微镜标本的原材料。

材料和方法

病毒 沙眼病毒卵黄囊适应株 Tg 106 第

* 北京市眼科研究所。

薛秀卿同志为本实验提供病毒材料特此致谢。

本文 1973 年 6 月 18 日收到。

阴性反差染色法 采用滴膜法, 磷钨酸浓度为 2%, pH 为 7~8。

真空喷涂法 将滴好病毒的铜网置真空喷涂仪真空罩中于 30° 角度距离 10 厘米, 用金属钽、钽或铂金丝进行喷涂。

冰冻切片法 取提纯病毒悬液约 0.5 毫升置于用锡箔纸做成的杯形小皿中, 于 -30℃ 酒精冰槽中迅速冰冻, 用国产冰冻切片机 (-20℃) 切片, 收集切片材料融化后, 即可制备滴膜阴性反差染色标本。

超薄切片标本 (1) 取经高速离心后之病毒沉淀物, 以 1% 四氧化锇 (OsO_4) 固定, 采用琼脂埋藏法, 经甲丁酯包埋后用 Jung-Mai 超薄切片机切片。(2) 用受染鸡胚卵黄囊病毒材料感染单层人胚肾细胞, 于 24—72 小时后取材制成超薄切片标本。

电子显微镜 SEM-3 型和 JEM-6C 型, 加速电压 60—100KV, 电子放大为 10,000—50,000 倍。

结 果

为了避免重复, 将着重描述阴性反差染色观察的结果, 由其他方法所得结果将仅做简要地补充描述。

一、阴性反差染色法所见的沙眼病毒基本形态及其微细结构

在提纯的病毒材料中所见的病毒颗粒, 主要为形态和大小基本一致的成熟病毒颗粒。外形大多为圆形或椭圆形, 少数呈不规则形。为了便于描述, 将所见的病毒颗粒按其大小和形态结构的特点分别以小型致密颗粒、大型疏松颗粒和其他类型加以描述。

(一) 小型致密颗粒: 这是提纯材料中的主要成分, 大小在 300—500 毫微米之间, 结构较致密呈圆球形 (图 1)。在罕见的侧面像上呈现中间凸, 外周凹的轮廓。在这些病毒颗粒中, 主要可分辨出外膜、病毒浆、隔膜和核样物。

外膜 包在病毒颗粒最外层的膜结

构, 一般为双层, 单层或三层者也并不少见。其密度甚大, 不易被 PTA 所穿透。每层膜厚约 100—150 Å, 结构致密而平滑, 往往形成褶皱和弯曲, 看上去有柔韧感。在膜间可见 100 Å 左右的 PTA 穿透间隙。在多层膜情况下, 最内层与病毒浆密切结合, 成为病毒浆的包膜 (图 1、2)。

病毒浆 组成病毒颗粒的主要成分, 处于外膜与核样物之间, 结构较疏松, 在 PTA 的穿透下呈海绵状或网状。在良好呈像和高倍放大条件下, 此结构似由无数成串的致密小颗粒盘曲而成。小颗粒直径约 100—180 Å 左右 (图 3 左)。由于 PTA 对这种结构的穿透程度不同而表现出深浅不一的情况。某些颗粒甚至完全被 PTA 所穿透而给予空瘪的印象。尽管我们观察了大量的病毒颗粒, 但尚未发现病毒浆内部致密颗粒排列的规律。在某些像片上所见的这种结构看来与粘液病毒阴性染色所见的结构颇为相似。

核样物 核样物较为罕见, 它被包在病毒浆内, 大小不一, 约在 100—200 毫微米左右, 占病毒颗粒直径的 1/4—3/4, 位于病毒颗粒的中央或偏中央部位, 结构一般较病毒浆致密。在核样物与病毒浆之间有一个 PTA 穿透区, 使之成为一个独立的结构。从微细结构上看, 核样物与病毒浆无显著差异 (图 4a)。

隔膜 它是病毒浆内一种致密的膜样结构, 与外膜不仅形态上相似, 而且有时可见到它们之间的联系。这种结构数量不多, 一般 2—3 条不等, 而且也不是在所有颗粒中都可见到。在某些颗粒中, 它弯转于病毒浆内, 而在另一些被 PTA 穿透较多的病毒颗粒中, 隔膜把病毒整齐地分割成小房间 (图 4c, d)。

(二) 大型疏松颗粒: 此型颗粒体积大, 在 600—1000 毫微米之间, 形状不规

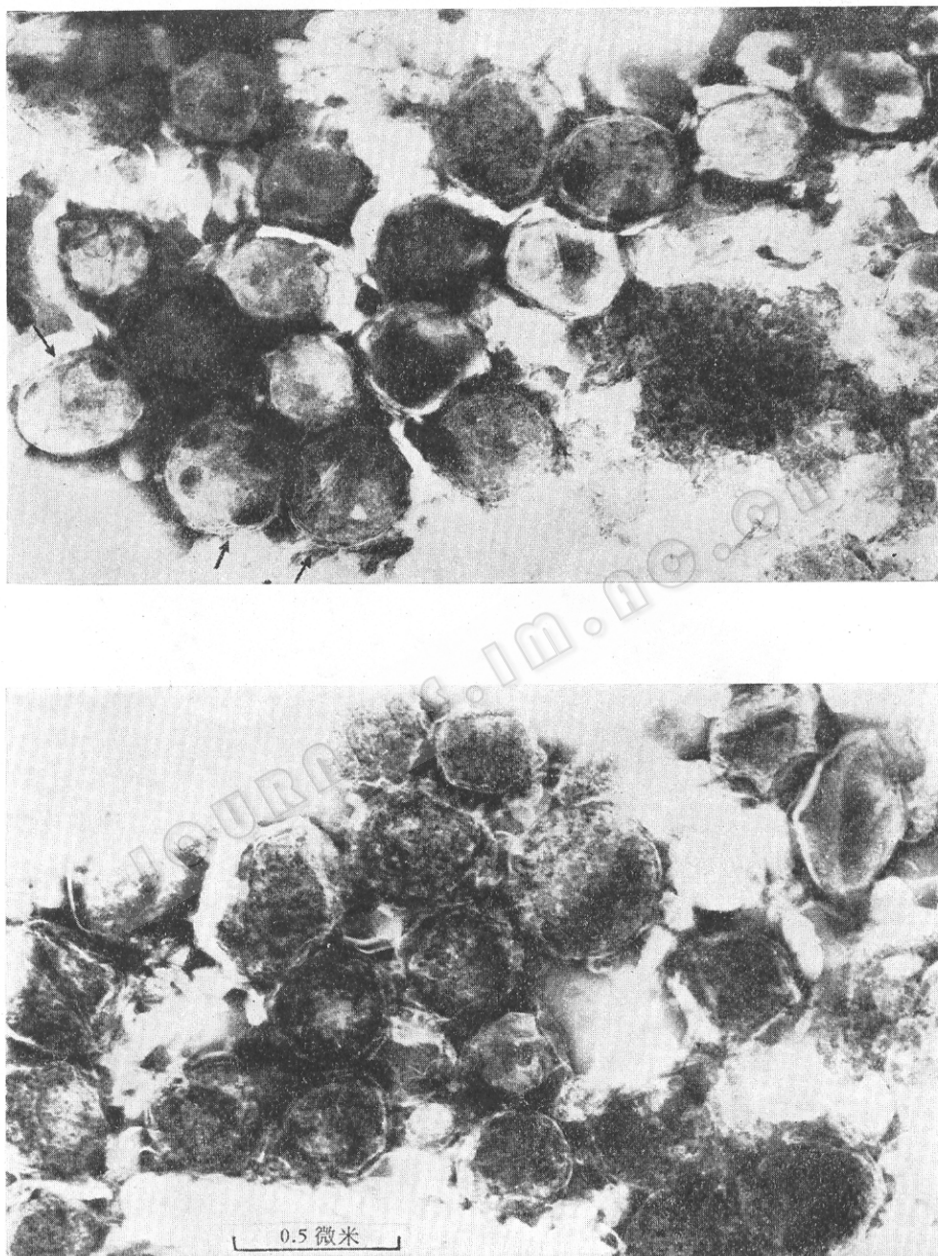


图1 沙眼病毒阴性反差染色看到的形态

上 在某些病毒颗粒上可以清楚地看到双层和三层外膜。×54000

下 注意病毒的外膜、浆和核样物,图右上角可见到一个病毒的侧面像。×54000

则,质量疏松,容易被 PTA 穿透,有的有清晰的单层或双层外膜,膜内包有稀疏的串珠样或丝状致密物(图 3 右)。

(三) 其它类型:除了上述小型致密颗粒和大型疏松颗粒外,在我们实验中还经常见到许多形态很不规则,大小相差极为悬殊的颗粒。其中有的很小,直径在 20 毫微米左右;有的较大,甚至超过大型疏松颗粒的直径。有些颗粒有明显的外膜,膜内有时空白,有时包有单个或数个致密圆形小颗粒,颇与大型疏松颗粒相似。

沙眼病人滤泡刮取物的阴性反差染色所见结果,无论从病毒形态、大小以及结构来看,大体均与卵黄囊提取的病毒相似。但也有值得提出的几点。在我们所观察的病人材料中,病毒的多形态性极为突出,并常见到许多病毒外膜相连而核样物各自独立的情况,病毒颗粒的外膜似较厚,有的外膜往往附有大小不一的小泡。

二、提纯病毒的观察

病毒提纯后经冰冻切片阴性反差染色所见,完全与阴性反差染色结果一致,但切

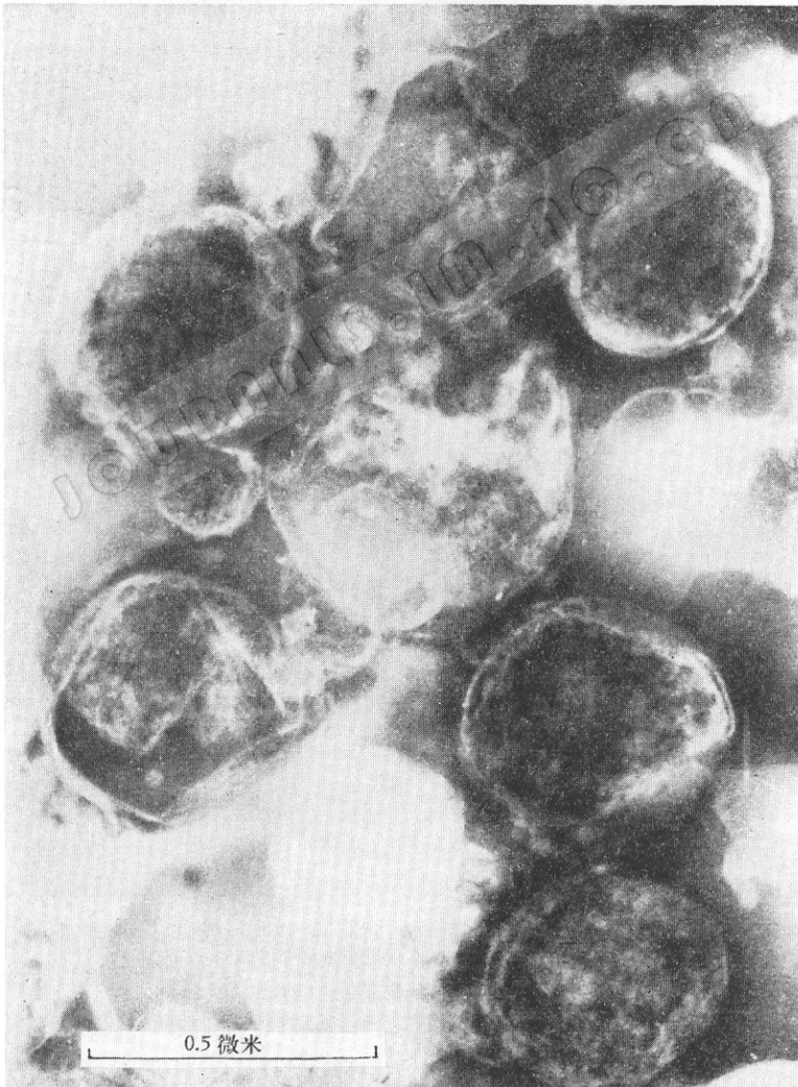


图 2 沙眼病毒阴性反差染色
注意病毒的外膜的褶皱情况

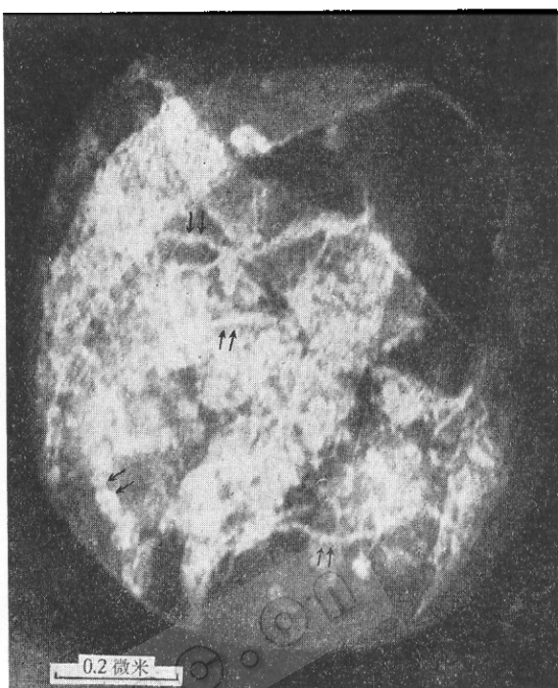
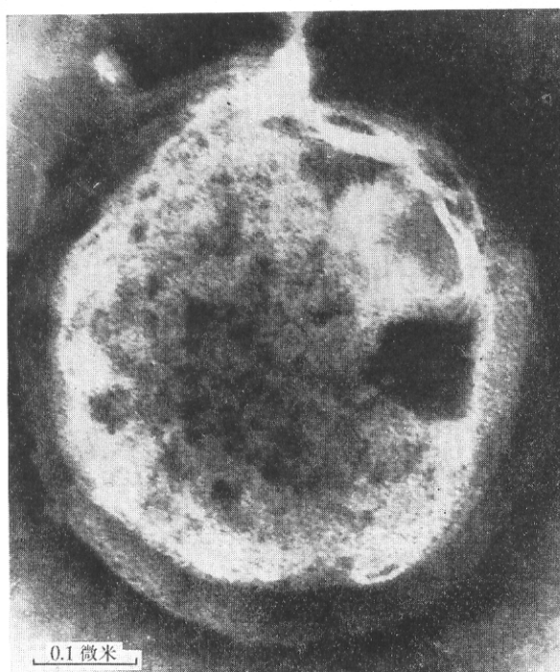


图 3 沙眼病毒阴性反差染色

左 小型致密颗粒, 注意病毒浆的结构, 由 PTA 的浸透而显出海绵状。×135000

右 大型疏松颗粒, 在单层外膜内包有少量串珠样或丝状致密物(箭头指示)组成的病毒浆。×81000

片后可更好地观察其内部微细结构, 有时一个病毒被切成两半, 很象一个被切开的西瓜, 立体感甚强(图 4 b)。

三、超薄切片所见的病毒形态

在感染 3 天后的人胚肾细胞的胞浆内, 我们见到典型的沙眼包涵体。包涵体中有各种类型的病毒颗粒, 按大小和形态特点也可以分为小型、中型和大型三种基本形态。在包涵体的边缘部位, 即病毒形成的基质部位见到无数细小嗜锇酸颗粒, 在这种基质部位可以见到由这些嗜锇酸颗粒组成的病毒雏形(图 5-1, 2)。各型病毒的细微结构与阴性反差染色基本一致, 只不过结构的分辨程度不及阴性反差染色所见的清晰, 病毒外膜与病毒浆之间有较大的空隙而已。

值得特别指出的是, 我们在超薄切片中发现了与阴性反差染色中大型疏松颗粒相对应的颗粒, 在这种颗粒上, 往往可以见

到不均等的类似“出芽”生殖的情况(图 7)。在切片中也往往见到外膜相联而核样物各自独立的情况。

提纯病毒的超薄切片观察结果与以上结果相符, 病毒的外膜、病毒浆和较致密的核样物均清晰可见(图 5-3)。

四、真空喷涂法所见的病毒形态

在真空喷涂标本上显示的病毒外形十分清楚, 其外周扁平, 中央凸起, 很象一种特殊的钮扣。有时在相当于外膜的外周扁平处可见到 2—3 层膜样褶皱, 这与阴性反差染色所见的外膜相符。此外在侧面像中病毒显示出中间凸突两端凹扁的形态。值得提出的是, 在喷涂标本中所见的病毒中央的核样物是有差别的, 有的饱满而高高凸起, 有的较瘪, 甚至有的很难辨认出核样物而呈中间凹陷外周凸起的环状。外膜褶皱的情况也是十分常见的(图 6)。

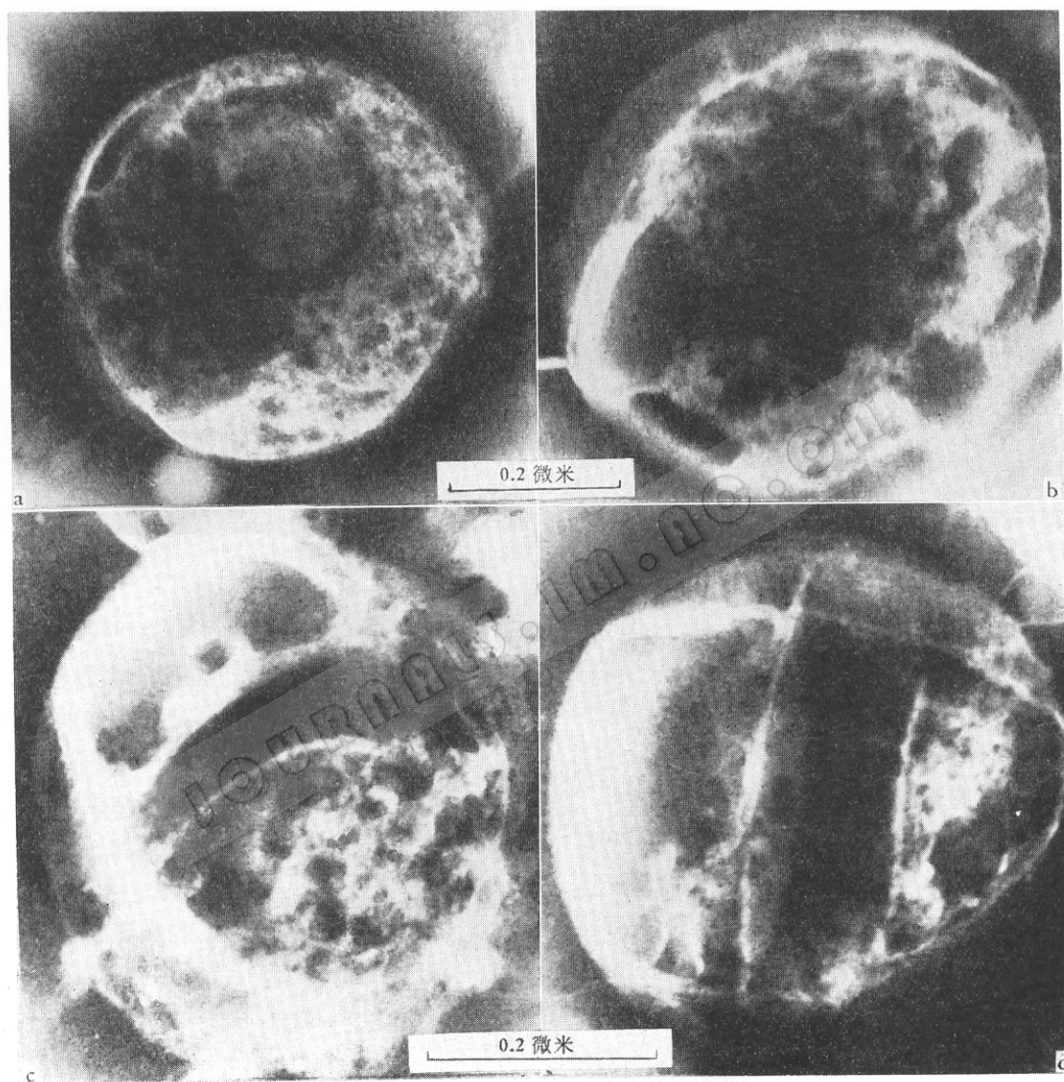


图 4 沙眼病毒的冰冻切片阴性反差染色

- a. 在病毒浆的海绵状结构中有一个清晰的核样物。×120000
 b. 病毒冰冻切片后染色, 示病毒颗粒被切成两半, 象一个切开的西瓜。×120000
 c 和 d. 示病毒外膜和隔膜关系, 隔膜把病毒颗粒分隔成几个小房间。×164100

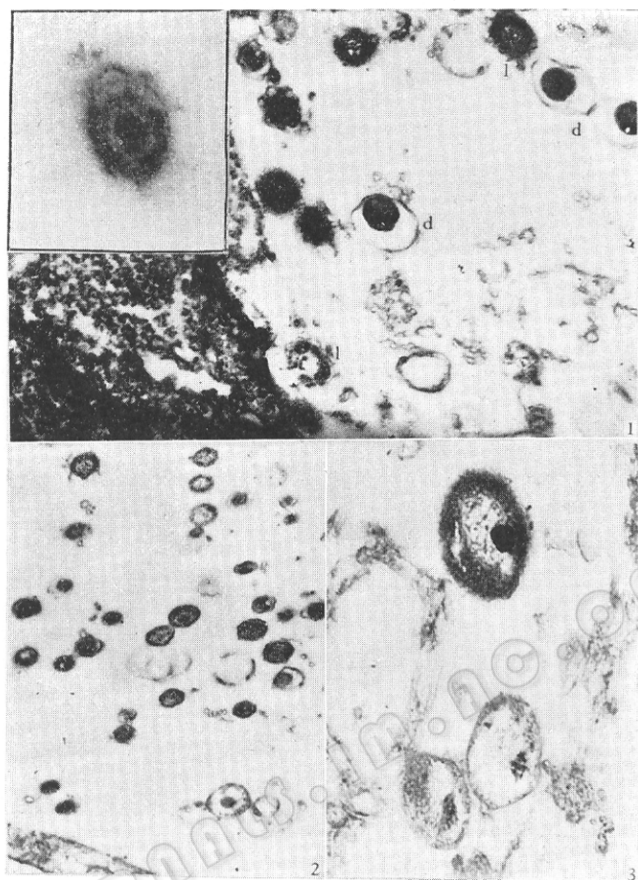


图5 沙眼病毒的超薄切片

1. 人胚肾细胞感染沙眼病毒后, 细胞浆内形成病毒包涵体, d 为小型致密颗粒, l 为大型疏松颗粒。×20000
2. 包涵体内成熟病毒的图像, 在有些颗粒中外膜浆和核样物均清楚可见。×15000
3. 提纯病毒的超薄切片, 注意病毒核样物着色很深。×44200

讨 论

以往虽然有不少人利用超薄切片或真空喷涂法对沙眼病毒的外形进行过研究^[2-10]。但是据我们所知, 这些工作由于未采用多种电子显微镜方法进行综合研究, 对于病毒的外形及其内部结构缺乏全面的认识。我们使用了包括阴性反差染色、冰冻切片后阴性反差染色、提纯病毒的超薄切片、感染细胞的超薄切片及真空喷涂等方法对沙眼病毒的外形及内部结构进行了比较全面的观察。由于经过反复的实

验, 发挥了各种方法的优点, 使我们能够综合分析各种方法的结果, 对沙眼病毒结构有了比较全面的认识。

一、沙眼病毒的外形

成熟的沙眼病毒颗粒, 在电子显微镜下象一个中间凸起周围扁平的钮扣, 中间凸起部位是病毒浆和病毒核的部位, 外周扁平的环形边缘部分是病毒浆和几层外膜的部位。这个典型的轮廓在真空喷涂标本上显得特别清楚(图6)。

然而, 从超薄切片和阴性反差染色结果看来, 这种外形并不是病毒原来的面貌,

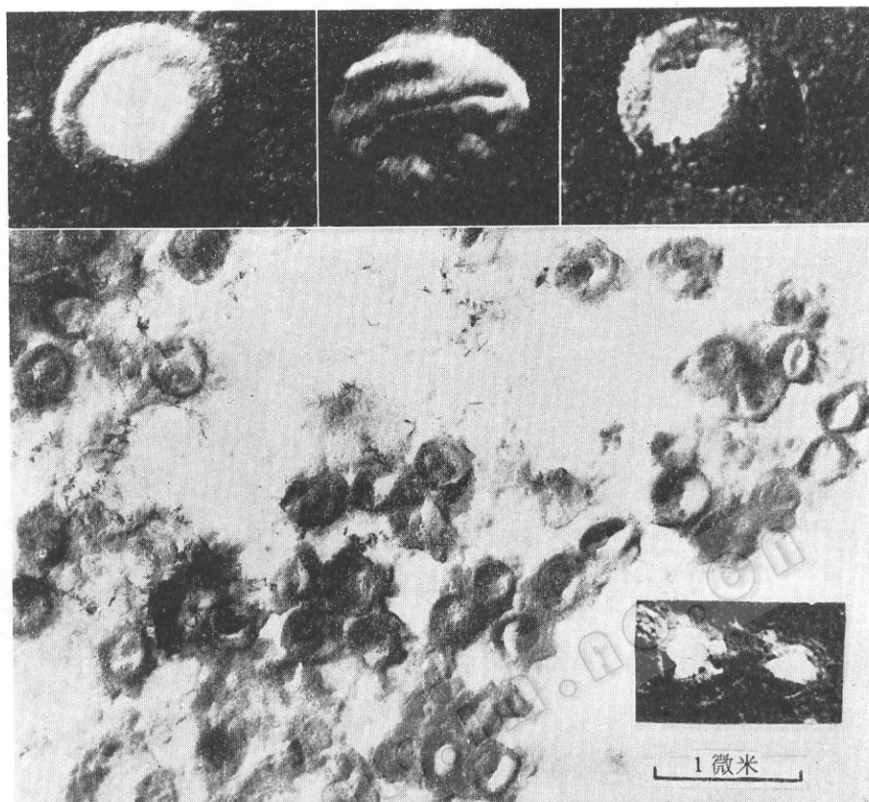


图6 提纯的沙眼病毒铀-铂真空喷涂像片

上 为三个放大的病毒颗粒,注意凸突的核样物和遍平外膜,中间为侧面像。 $\times 48750$

下 见到核样物大小不一的情况,有的病毒显不出核样物而呈环状。 $\times 23000$

右下方显示一个三层外膜的病毒

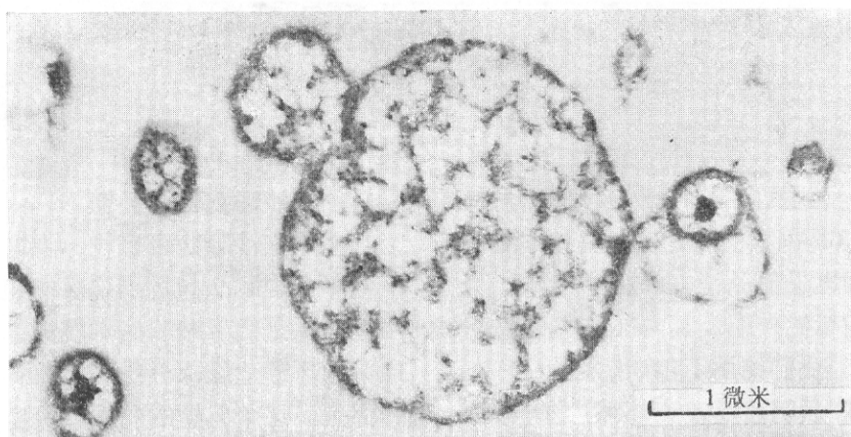


图7 沙眼病毒超薄切片中看到的大型疏松颗粒,显示凸出的“子体”,外周还有几个已脱落的“子体”。 $\times 30000$

病毒的原来形态可能象图 8 上图所示的扁圆形态。由于病毒浆和核样物在处理标本过程中收缩,而在病毒外膜与核样物之间形成“中空”地带,因此,外周下陷而中央仍旧突起,形成了真空喷涂标本上所见的特殊形态。但有时也能看到中央部位下陷的情况(图 6)。

二、沙眼病毒的结构

根据我们的实验资料说明,沙眼病毒主要由外膜、病毒浆、核样物和隔膜等部分组成。外膜一层、二层或三层,富有弹性,容易弯曲和褶皱,每层厚度约 $100-150 \text{ \AA}$ 。病毒浆为病毒颗粒的主要组成物质,外膜的最内层与病毒浆紧密结合,成为它的限制膜。病毒浆由无数成串的致密小颗粒盘曲而成,小颗粒宽约 $100-180 \text{ \AA}$ 。核样物居于病毒浆中,其结构与病毒浆相似,但较致密,它与病毒浆之间有时形成一个较宽的间隙,在超薄切片上成为空白区,在阴性反差染色中为 PTA 占据。隔膜结构与外膜相似,弯曲地伸展于病毒浆内,并与外膜常有直接联系。这与在脑膜肺炎病毒超薄切片所见相似^[11]。

应当指出,以上这些基本结构,尤其是核样物和隔膜并不是在所有病毒颗粒中都能见到的,这可能因为切面不同,或 PTA 穿透深度不同所致。当然,也有可能是病毒颗粒发育上的差别。

图 8 是我们对沙眼病毒形态和结构的综合性认识。

三、关于沙眼病毒的发育过程和繁殖方式问题

对于这个问题曾有过许多争论^[12]。我们在自己的工作中见到不少均等的和不均等的分裂形态。在分裂的图相中有的“核样物”已分裂成二个,而外膜仍然相连,有的则分裂近于完成。在芽孢繁殖的图片上

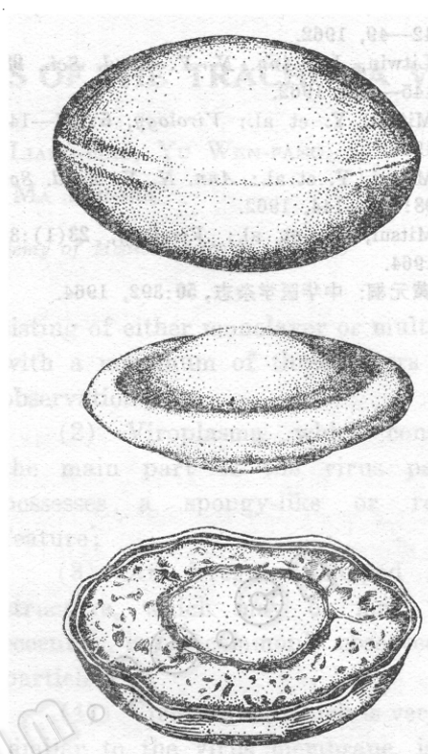


图 8 沙眼病毒的外形及剖面结构的模式图

- 上 病毒自然形态的外形
- 中 真空喷涂所见病毒外形
- 下 剖面所见病毒的结构

也进一步证明了沙眼病毒主要以分裂的方式进行繁殖(图 7)。

从上述沙眼病毒形态结构的研究看出,该病毒的结构一般地说要比中小型病毒复杂,比较接近于单细胞微生物。没有看到大多数中小型病毒的那种规则的立体对称结构。从化学组成上看,近年来已证明沙眼病毒相当复杂^[13-15]。由于其结构和组成上的复杂性也可以理解它对抗生素的作用远较其他中小型病毒敏感的特性。

参 考 资 料

- [1] 汤飞凡等:微生物学报, 4 (2):189—210, 1956
- [2] Armstrong, J. A. et al.: *J. gen. Microbiol.*, 30:59—73, 1963.
- [3] Gordon, F. B. et al.: *Science*, 131:733—734, 1960.

- [4] Collier, L. H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**: 42—49, 1962.
- [5] Litwin, J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**: 145—162, 1962.
- [6] Mitsui, Y. et al.: *Virology*, **6**:137—149, 1958.
- [7] Mitsui, Y. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**:131—144, 1962.
- [8] Mitsui, Y. et al.: *Virology*, **23**(1):30, 1964.
- [9] 黄元桐: 中华医学杂志, **50**:392, 1964.
- [10] 李子华: 中华医学杂志, **49**:697, 1963.
- [11] Erlandson, R. A.: *Virology*, **22**:410—418, 1964.
- [12] Moulder, J. W. "The Psittacosis Group as Bacteria" New York, p. 78—95, 1964.
- [13] Moulder, J. W.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **20**: 107—130, 1966.
- [14] Sorov, I. et al.: *Nature* (London), **217**: 849—852, 1968.
- [15] Sorov, I. et al.: *J. Mol. Biol.*, **42**:581—589, 1969.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF THE TRACHOMA VIRUS

HUNG TAO, WANG SI-ZHI, CHEN LIANG-BIAO, YU WEN-FANG,

JIN XIU-YING* AND MA SHU-HUI*

(*Institute of Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

A thorough electron microscopic investigation was carried out on the trachoma viruses, isolated in our country, by the use of ultrathin sectioning, negative staining, frozen sectioning combined with negative staining and shadow casting techniques.

Materials used in the experiments were DEAE-cellulose purified trachoma elementary bodies from infected yolk sacs of chicken embryos, infected cultures of the monolayer of human embryonic kidney as well as conjunctival scrapings from trachoma patients. Through the studies by means of multilateral and combined methods which offer us more chances of using the advantages of each method and avoiding their shortcomings in revealing both surface and inner structures of the virus particles, we were able to obtain a thorough and much deeper understanding about the morphology of the trachoma virus.

According to the structures observed, the forms of the trachoma virus may be described as small dense particles, large loose particles and particles with a pleomorphic appearance etc. At the same time, we have described some "organelles" of the virus particles; namely:

(1) Virus membranes, which frequently possess a wavy appearance con-

sisting of either monolayer or multilayers, with a maximum of three layers in our observation;

(2) Viroplasma, which constitutes the main part of the virus particles, possesses a spongy-like or reticular feature;

(3) An irregular shaped nucleoid structure, which may or may not be eccentric, is not commonly observed in all particles;

(4) Virus septa, which is very much similar to the virus membrane, is sometimes connected directly to the latter.

In our studies, both equal and unequal fissions of the virus particles were often observed. In the present article we have also given a detailed discussion on the morphology of different particles and the possible relationship between them. Figure 8 is a schematic diagram representing our understanding about the morphology of the trachoma virus. The authors believe that a profound knowledge of the trachoma virus will be of much use in the prevention and treatment of trachoma, which is still a serious problem to the labouring peoples as a whole, particularly in Asia, Africa and Latin America.

* Institute of Ophthalmology, Peking.