

紅血球空膜吸附流感病毒的 電子顯微鏡觀察*

黃元桐 梁榮根 湯飛凡

(衛生部生物製品研究所)

電子顯微鏡的發明和應用給予病毒學研究工作很大的促進作用，特別在利用金屬蒸汽能够造成投影形象之後，我們不僅可以看見病毒的長度和寬度，並且可以看見病毒的高度、表面形態、以至內部結構。但在電子顯微鏡下研究病毒的形態，必須先製出十分純淨的病毒懸液，而普通提純病毒的物理和化學方法，常不能達到滿意的效果，故有人認為電子顯微鏡下的各種形態都是“人爲的物體”。1941年 Hirst 氏^[1]及 McClelland 和 Hare 氏等^[2]發現流感病毒的血球凝集反應以後，不僅對流感病毒的測定是一個很大的進步，而且利用血球吸附和釋放病毒的作用，對於病毒的提純也提供了新的有效的方法^[3]，1949年 Dawson 和 Elford 氏等^[4,5]發現除去血色素後的雞紅血球空膜仍能吸附病毒，並且在電子顯微鏡下研究了紅血球空膜上的流感病毒，獲得了滿意的結果。紅血球對病毒具有特異的選擇性，可以迅速而簡便地從病毒混懸液中製出純粹的病毒標本，是一種很實用的方法。此外，製成一個良好的電子顯微鏡觀察標本需要一個謹慎的製備過程。我們在研究新分離的流感病毒的同時，應用血球空膜吸附病毒的方法在電子顯微鏡下觀察了一株在 1956 年分離的亞甲型流感病毒的形態。本文比較詳細地介紹了製備病毒標本的方法和觀察結果。

一. 紅血球空膜的製備

製備方法基本上參照 Dounce 和 Lan 氏等^[6]的方法製出。從白來亨雞的翅靜脈採取血液 10 毫升，放入含有 2 毫升 2% 枸橼酸鈉溶液的試管中，混合後用 0.9% 生理鹽水洗滌 2 次，然後加入生理鹽水至原血液量。

取 0.11 M, pH 6.8 的磷酸緩沖溶液 10 毫升，加入植物皂素 (Saponin) 0.6 克，製成 6% 的溶液。

* 1956 年 12 月 20 日收到。

於每 10 毫升清洗後的血球懸液中加入 6% 植物皂素溶液 0.5 毫升,輕輕混合後放置室溫 30 分鐘,使發生溶血作用。

取溶血後的血球懸液,加入較大量的 0.9% 生理鹽水洗滌 6 次,每次沉澱 3-4 分鐘,沉澱速度不超過每分鐘 1500 轉。最後一次的上清液應完全清晰無混濁現象。最後將沉澱物即除去血色素後的血球空膜,用 0.9% 生理鹽水製成 5% 懸液備用,保存於 4°C 冰箱中可使用數週。

二. 病毒的吸附和固定

用於本試驗的流感病毒係於 1956 年 1 月在北京 1 次局部流行中分離出來的亞甲型流感病毒 (56-1 株)^[7],在暗視野中可以看見很多的絲狀體形態。

將流感病毒 (56-1 株) 第 3 代的雞胚尿液接種於 10 日齡雞胚尿囊腔內,放 35°C 培育箱中培育 48 小時,收取尿液,在每分鐘 3000 轉的沉澱器中沉澱 5 分鐘,除去沉澱物,吸取上清液測定血球凝集效價^[8]。同時將尿液材料作了細菌學培養,結果證明無厭氣菌或需氣菌存在。

加生理鹽水將尿液血凝效價調整為 1:320,加入等量的 0.5% 血球空膜懸液,混合後置冰浴中 15 分鐘,使病毒吸附於血球表面。用每分鐘 500 轉的沉澱器沉澱 5 分鐘,沉下血球,除去上清液,再加入冷生理鹽水至原量。每 10 毫升病毒血球懸液中加入 2% 鐵酸 0.5 毫升,使鐵酸的最後濃度為 0.1% (或改用 2% 福馬林)。置冰浴中 30 分鐘使病毒固定於血球表面不再釋放出來。

用雙蒸餾水在每分鐘 1500 轉的沉澱器中,將帶有病毒的血球空膜洗滌 3 次,最後再用雙蒸餾水加足至原量,輕輕搖動使成均勻的病毒血球懸液。這吸附病毒後的血球空膜懸液即可作為電子顯微鏡檢查的材料。

三. 火棉膠支持膜的製備和病毒材料的放置

為了除去商品火棉膠中的普通溶劑,並測定火棉膠的固體重量,取商品火棉膠溶液約 10 毫升,置沸水浴上加熱,慢慢滴入蒸餾水約 10 毫升,隨滴隨振盪,蒸乾後放於 105°C 烤箱中乾烤 4 小時,這樣就獲得了無水的火棉膠固體。

把火棉膠固體溶解於醋酸戊酯,製成 3% 溶液,擰緊墊有錫紙和橡皮的螺蓋,以防溶劑揮發。

製備火棉膠支持膜時 (參看圖 1),在細菌接種室中做 (灰塵較少),取直徑 10 厘米玻璃雙碟一個,盡量盛滿新鮮的雙蒸餾水。將特製的平匙一個放入蒸餾水內,用鑷子鉗取白金的標本支持片均勻地放置於平匙的上面。取直徑約 1.5-2.0 毫米的潔淨玻璃棍一支,伸入 3% 火棉膠溶液內約半厘米,蘸取火棉膠溶液一小滴迅速移置於水面上,輕

輕接觸水面使火棉膠很快隨水面向四方展開，形成一層極薄的薄膜。靜候半至一分鐘，輕輕提起平匙並離開水面，使薄膜平鋪於平匙上的白金標本支持片上。這樣，白金支持片上即已蒙上了一層厚薄在 $100-200 \text{ \AA}$ 的火棉膠薄膜。蒙有火棉膠膜的平匙和標本支持片新從水中取出時，如帶有過多的蒸餾水，可取濾紙一條，接觸平匙背面或邊緣吸去水分。最後將平匙連同標本支持片放入裝有 P_2O_5 的乾燥缸內過一夜，使完全乾燥。

放置病毒材料時，取出平匙，用刀尖輕輕地把標本支持片推置於一張潔淨的玻璃片上，有火棉膠膜的一面向上。取特別製備的、極細的毛吸管一支，吸取帶有病毒的血球空膜懸液一小滴放置於標本支持片的中央，靜放數分鐘使血球沉下。標本液過多時可用另一支極細的毛吸管，接觸水滴吸去多餘的液體。將置有病毒血球的支持片連同玻片放在普通顯微鏡下檢查一次，檢查火棉膠膜有無破裂，血球是否平整均勻。最適宜的標本每 0.01 平方毫米中應含有 $5-6$ 個紅血球。將放置好病毒血球的支持片連玻片再放入 P_2O_5 的乾燥缸中過一夜，使標本乾燥。次日再用普通顯微鏡檢查一次，如果支持薄膜沒有破裂，即可用小鑷子輕輕鉗起標本支持片，放置於特製的標本固定器上，按裝在電子顯微鏡上進行直接觀察和攝影。

四. 觀 察 結 果

圖 2 中的照像結果是 56-1 株亞甲型流感病毒雞胚尿囊傳代第 4 代的病毒材料，用雞紅血球空膜吸着後，在電子顯微鏡下的攝影形態。圖片中是一個完整但稍變形的雞紅血球，中央的大黑點是雞紅血球細胞的細胞核，細胞膜上除有較淺的、寬度不均的細胞膜褶褶外，可以看見有兩種被吸附的病毒形態：圓形或卵圓形的顆粒狀形態和寬度與顆粒狀病毒相等而且均勻細長的絲狀體形態。這就證明了在我國流行的亞甲型流感病毒，如同世界其他地區流行的流感病毒^[9,10]一樣，也具有絲狀體和顆粒狀兩種不同的形態。我們曾將這一圖片放大至 $31,500$ 倍，用卡尺量取 30 個病毒顆粒的大小，平均每一個病毒顆粒的大小為 3.38 毫微米，除以放大因素，則病毒顆粒的真實平均大小為 107 毫微米。絲狀體一般長度為 $1-2$ 微米，最長有達 5 微米的。

五. 討 論

經植物皂素除去血色素後的血球空膜，厚度約在 6 毫微米左右，這樣薄的厚度，吸收電子的能力很小，能够很清楚地觀察到吸附在它上面的病毒原體。Dawson 和 Elford 氏等^[4]曾用實驗證明，正常血球空膜上並不存在類似病毒顆粒的物質。因此，利用血球空膜吸附流感病毒作成電子顯微鏡的檢查標本，可以看到高度純粹的病毒原體。同時由於血球表面對病毒具有很好的選擇性，各種不同體積的病毒原體，可以同時吸附上去，使我們能够觀察到同一病毒的各種形態，這對研究病毒的生長過程，了解病毒在不

同繁殖時期是否有不同的形態是很有幫助的。

利用血球空膜製備電子顯微鏡觀察的標本,手續簡單,省時間,純度高,對流感、新城疫、腮腺炎組的病毒具有很好的實用意義。但是這方法只能適用於有血球凝集反應的病毒,因此應用範圍受一定的限制。

1946 年 Mosley 和 Wyckoff 氏等^[11]發現流感病毒具有絲狀體和顆粒狀兩種形態,1949 朱既明、Dawson 和 Elford 氏等^[9]對流感病毒的絲狀體形態作了詳盡的研究,證明絲狀體確與流感病毒有關,是流感病毒繁殖過程中的一種特殊形態。1954 年 Donald 和 Issacs 氏等^[10]證明絲狀體與血凝效價有密切關係。我們在本文所報告的結果中以及在本國分離的其他 7—8 株亞甲型流感病毒的暗視野觀察中都清晰地看到了絲狀體形態^[12]。我們也充分相信所見到的絲狀體是與流感病毒有密切關係的。至於絲狀體與流感病毒的具體相互關係,目前還缺乏更多的認識^[13],有待於進一步的研究。

六. 摘 要

(一) 本文比較詳細地介紹了用血球空膜吸附病毒製成電子顯微鏡觀察標本的操作方法,並討論了本方法的實用意義。

(二) 應用血球空膜吸附病毒的方法,在電子顯微鏡下觀察了一株1956年在本國分離的亞甲型流感病毒的形態,在電子顯微鏡照片中可以看到本病毒有兩種不同的形態:圓形或卵圓形的顆粒狀形態和細長的絲狀體形態。

附記: 本文電子顯微鏡照片承中國科學院應用物理研究所錢臨照、楊大宇同志協助攝製,特此致謝。

參 考 文 獻

- [1] Hirst, G. K.: *Science*, **94**: 22, 1941.
- [2] McClelland, L. and Hare, R.: *Canad. J. Pub. Hlth.*, **32**: 530, 1941.
- [3] Francis, J. Jr. and Salk, J. E.: *Science*, **96**: 499, 1942.
- [4] Dawson, I. M. and Elford, W. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 298, 1949.
- [5] Dawson, I. M. and Elford, W. J.: *Nature*, **163**: 63, 1949.
- [6] Dounce, A. L. and Lan, T. H.: *Science*, **97**: 584, 1943.
- [7] 1956 年春北京流行性感冒病毒分離及其抗原分析 (待發表)。
- [8] 朱既明、梁榮根、聞仲權: *微生物學報*, **4**: 33, 1956.
- [9] Chu, C. M., Dawson, I. M. and Elford, W. J.: *Lancet*, **256**: 602, 1949.
- [10] Donald, H. B. and Issacs, A.: *J. Gen. Microbiol.*, **11**: 325, 1954.
- [11] Mosley, V. M. and Wyckoff, R. W. G.: *Nature (London)*, **157**: 263, 1946.
- [12] 梁榮根、黃元桐、聞仲權、朱既明: 我國分離的流感病毒的生物學性狀及其抗原分析 (付印中)。
- [13] Burnet, F. M.: *Nature*, **177**: 130, 1956.

AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY OF INFLUENZA VIRUS

HUANG YUAN-TUNG, LIANG YUNG-KEN and TANG FEI-PAN

National Vaccine and Serum Institute, peking

(ABSTRACT)

With the assistance of the staff of the Institute of Applied Physics, Academia Sinica, an electron microscopical study of a strain of a recently isolated A-prime influenza virus was undertaken by the authors making use of the red blood ghost cell technique. The result of the study showed that there were two morphological forms—the spherical and filamentous forms—of the virus as seen on the surface of the balloon or ghost cell. These results confirm the dark-field observation and agree well with the description given elsewhere concerning the morphology of freshly isolated virus strains of influenza. Technical procedures of the whole process leading to the actual electron microphotography have been described in detail step by step and essence of the ghost cell technique discussed.

圖 版 說 明

圖 1: 製備火棉膠支持膜的各種用品, 縮小 4 倍。

1. 盛滿蒸餾水的玻璃碟。
2. 放入水中的不銹鋼平匙, 平匙上放有 2 個白金的標本支持片 (直徑 3 毫米)。
3. 金屬刮板, 滴上火棉膠前用來刮去水面上可能存在的灰塵。
4. 蘸取火棉膠的玻璃棍, 尖端直徑 1.5—2.0 毫米。
5. 3% 火棉膠溶液。
6. 吸去水滴用的濾紙條。
7. 刀片刀。
8. 玻片。
9. 放置病毒標本的毛細吸管。
10. 吸去過多病毒標本液的毛細吸管。
11. 小鑷子。
12. 放置標本支持片的固定器, 將置有病毒後的標本支持片放置於左邊小金屬管的上端, 然後將小帽扣上, 後端是一小段皮管。
13. 膠製帽管, 套在標本固定器上, 保護標本用。
14. 按裝好標本後的固定器。

圖 2: 56-1 株流感病毒吸附在紅血球空膜上的電子顯微鏡照像, $6,000\times$, 中間大黑點是雞紅血球的細胞核, 在細胞膜上, 除淺色的、粗細不均的細胞膜絨毛外, 可以看見顆粒狀和絲狀兩種不同形態的流感病毒。

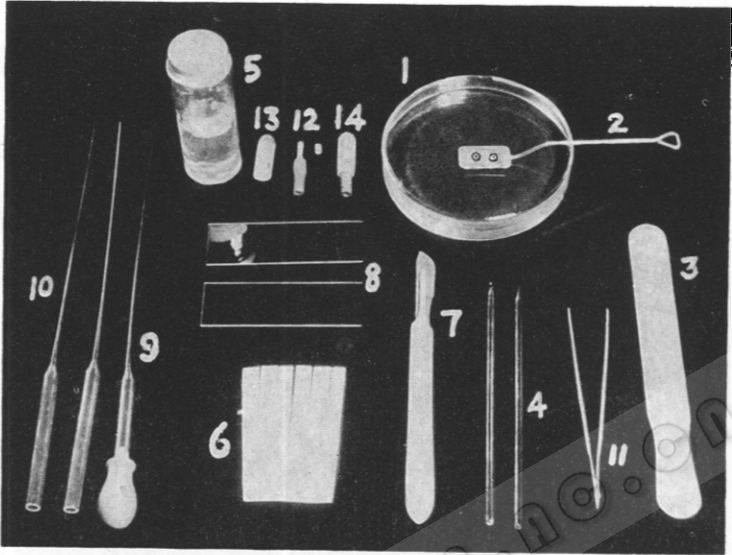


圖 1

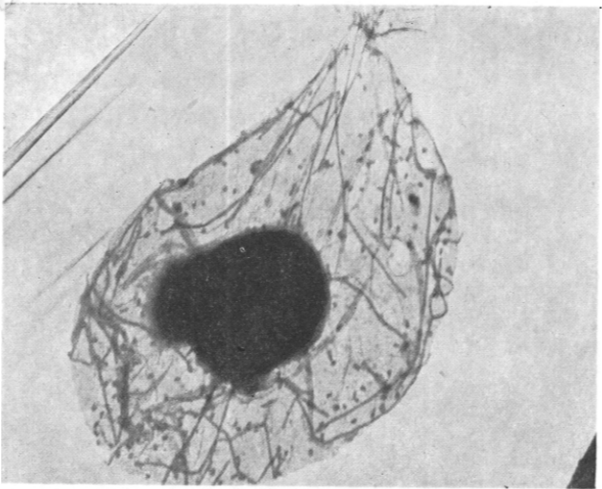


圖 2