

负染法和图象分析技术 在病毒研究中的应用

管 汀 鹭

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

负染法及其相关的电子显微镜技术(如图象分析技术), 是研究病毒超微结构的主要方法, 本文拟简介这些技术的基本情况。

负 染 技 术

用超薄切片研究病毒形态结构手续繁杂, 十分不方便; 用悬浮材料制品主要困难是反差不足。

自 Brenner 和 Horne^[1] 创建负染技术, 解决了用电镜观察病毒的制样技术问题以来, 负染法目前已成为电镜技术中的常规方法。一般用它来研究病毒粒子、蛋白质分子和分离的细胞亚显微成分和细菌表面的结构。

一、原理和优点

重金属元素比组成生物材料的轻元素散射电子的能力更强。负染法即利用了这一原理。将重金属盐溶液与病毒悬液混合, 重金属即沉积在样品四周, 使样品周围有很强的散射电子的能力, 在电镜照片上呈黑色; 样品本身则呈浅色。这样便可以辨认样品。由于这种染色效果是在深色背景上呈现浅色样品, 故称负染。有人称作负反差法, 这种叫法不确切, 因为电镜暗场技术也会得到负反差。

负染法主要优点是: (1) 操作简单, 一次分离提纯的样品可以长期保存供多次制片用; (2) 制片时间短, 一般从点样到观察只要几分钟, 可以随做随观察; (3) 能较好的保存生物结构; (4) 反差强; (5) 制片时消耗的材料很少, 这对不易得到的材料尤其重要。

二、方法的类型及操作步骤

(一) 常规负染法

常规负染法有一滴法、两滴法和喷射法。前两法用得较多。

一滴法是将病毒悬液与染液等体积混匀, 用吸管取混合液滴在带膜的载网上, 静置片刻后, 用滤纸除去多余液体, 在空气中自然干燥(图1)。这个方法要求样品与染液必须等渗,

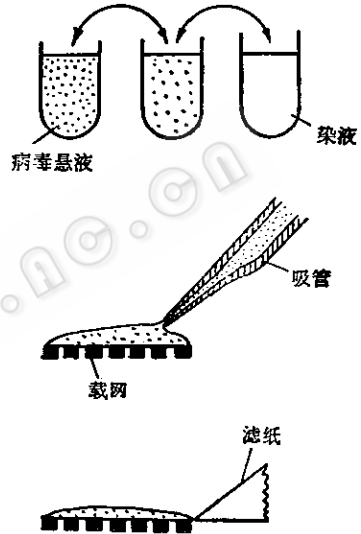


图1 一滴负染法

否则会改变或破坏样品结构。为了避免因渗透压差而引起的不良后果, 可采用两滴法。两滴法操作原则上与一滴法相同, 只是样品悬液与染液不要事先混合。方法是先在载网上滴一滴样品, 稍待片刻用滤纸除去多余液体, 待液体将干而未完全干燥时加一滴染液, 染色2—3分钟, 再用滤纸除去多余染液, 在室温自然干燥。两滴法可以将样品冷藏一段时间, 供多次制片用。

喷射法所用装置较复杂、效果也不比前两种方法好, 所以较少采用。

(二) 负染破膜法

常规负染法不适用于含高浓度病毒颗粒的悬液(1—30 毫克/毫升)的制备。这是因为直

接滴下高浓度的病毒悬液会毁坏支持膜,而支持膜过厚会大大降低分辨率;还因为染液干燥时,病毒颗粒易发生局部堆积;染色条件也很难掌握。为此, Horne^[2]提出了负染碳膜法。用这种方法能制备出呈结晶状排列的病毒颗粒样品。

负染碳膜法的操作步骤是:把新劈开的云母切割成约 2×1 平方厘米的小块,一端切成尖形。将高浓度的病毒悬液和 3% 的钼酸铵 (pH5.2—7.5) 等体积混合,用滴管将混合液滴到上述云母片上,用滤纸吸干,在室温下干燥。在已干的样品上喷涂碳膜,为了便于定位,应在碳表面上标出 4 个黑点。将喷涂后的云母片小心浸入含乙酸双氧铀或甲酸双氧铀 1% 的染液内,样品漂浮在染液面上,再用覆盖着微孔碳膜的载网把样品捞起(图 2)。用这种方法制备的样品,所拍电镜照片不但便于进行结构分析,且分辨率较常规负染法更高,一般优于 20 埃。

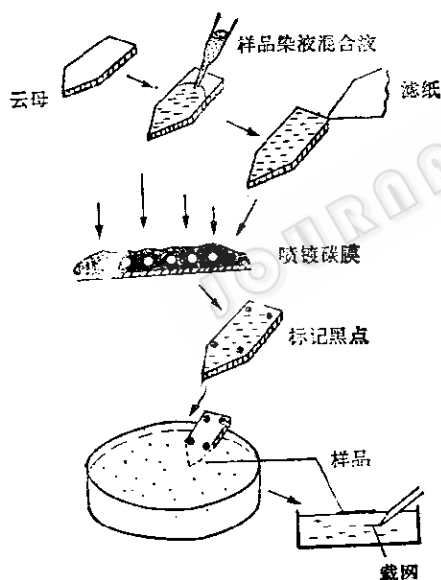


图 2 负染碳膜法

(三) 其它方法

负染液的表面张力效应和染液干燥过程中易造成染色假象。为此,人们设计了另外一些方法来克服假象,这些方法包括纸过滤法,假复型法、扩散法、冰冻干燥法等。关于这些方法,请参考有关文献^[3-6]。

三、负染剂及染色效果

负染剂应考虑符合以下要求:(1)对样品的保存性能良好;(2)不与样品或缓冲液发生反应;(3)反差强。目前常用的负染剂主要有磷钨酸钾 (PTK)、磷钨酸钠 (PTNa)、乙酸双氧铀 (UA)、甲酸双氧铀 (UF)、硅钨酸、钼酸铵、钨酸、乙酸铀、草酸铀等。其中磷钨酸盐和乙酸双氧铀最常使用。

负染剂的染色效果不是绝对的。根据文献和我们的经验,特定的病毒有其特定的最佳染色条件,这些条件包括负染剂的种类、染液的浓度和 pH 值、染液与样品的亲合程度等。往往一种染剂对某些病毒染色效果很好,却又能破坏另一些病毒的结构。如磷钨酸对 T4 噬菌体染色效果好,却会使 RNA 肿瘤病毒产生假象。对 Friend 株系的鼠白血病病毒,染色前如用 5% 戊二醛固定,再用磷钨酸染色,病毒粒子呈圆形,如不事先固定,染色后呈长尾状。如用乙酸双氧铀染色,病毒呈圆形,且结构保存完好,外壳上的蛋白质亚单位也清晰可见。乙酸双氧铀能很好地保存 RNA 肿瘤病毒的结构,但对流感病毒却不合适。用乙酸双氧铀、钼酸铵和磷钨酸分别染色病毒,可发现乙酸双氧铀使病毒表面结构发生了较大变化,似乎出现了聚集和收缩;用磷钨酸染色效果尚可;钼酸铵最佳。对于大肠杆菌 RNA 噬菌体,用乙酸双氧铀较适宜;磷钨酸在 pH7.0 时,染液穿透不进病毒粒子内部;磷钨酸钠在 15 秒钟之后使样品沉淀,结构基本被破坏或聚成团块。

染液的 pH 值也是影响染色效果的因素^[7]。pH 值不当,染液不能透入样品内部因而不能显示内部结构,有时还可能形成网状物淹没样品。

有人在负染前先用戊二醛或四氧化锇固定样品;或者在负染之后用冰冻干燥或临界点干燥法代替室温自然干燥。关于这些处理的效果目前看法尚不一致。

归纳起来,影响负染结果的因素是:(1)负染剂合适,染液的 pH 值得当;(2)染液浓度,用量及样品浓度适当,染液过浓或过稀会遮盖样品或使样品背景不清晰;(3)染液与样品之间亲和力较强,即染液能较强地沾湿样品,这是影响

效果的重要因素(而不是染色时间不够); 4. 样品在支持膜上分布均匀。有不少文献报道, 低分子量物质如十八醇、抗生素、蔗糖、短杆菌肽、去污剂等, 可增加染液与样品之间的亲合性。为了使样品在支持膜上分布均匀, 可利用辉光放电装置使载网带正电, 也可用挥发性溶剂处理载网。

为了确定最适条件, 在对一种未知样品进行负染前, 应进行试验。负染法虽较简单, 掌握好却并非易事。同时, 负染的样品分辨率一般在25—30埃。这显然不能满足更高的要求。为此人们又寻找出另一些更佳的方法。

图象分析技术

病毒的结构常用电子显微镜来观察。但电镜观察常受种种因素干扰, 如电子噪声(灯丝发射出的电子随机到达终象)、电镜本身的缺陷(象散、漂移)、拍照技术、染剂颗粒大小、制品过程中样品结构破坏后释放的低分子量物质及底片乳胶粒子的大小分布等。这些因素亦可统称为“噪声”。噪声严重时常会模糊乃至掩盖病毒的结构特性, 从而大大降低制备样品的分辨率。图象分析技术就是尽可能地去除电镜照片中噪声提高图象质量, 尽可能多地从电镜照片中抽取有用信息的方法。

在图象分析技术中, 光学处理技术占据了重要地位。

一、光学旋转技术

1963年 Markham 等^[8]发展了一种光学旋转技术(即多次曝光照相法)来使样品结构细节更清晰。方法是每次隔一定角度进行多次曝光(图3), 每次曝光量由总曝光量除以曝光次数

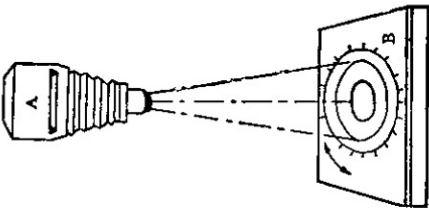


图3 从含有旋转对称结构的照片中获得积分照片的简单方法
A: 放大机; B: 角度已知的旋转相纸的刻度盘(旋转轴必须和刻度盘上标记的中心相符)

决定。通过所拍大量照片的叠加, 可使照片中重复出现的共同特征得到加强。非重复的或随机分布的细节彼此抵消。图4所示照片即烟草花叶病毒的顶观俯视图。经过图象分析、对称结构即清晰可见。但旋转次数不合适, 结构即模糊不清。此方法首先被成功地用来研究球形病毒的结构。

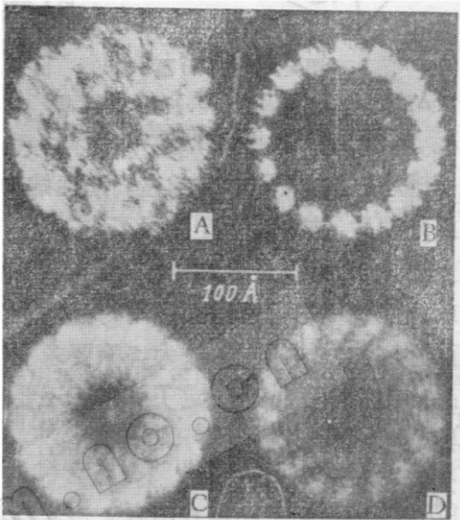


图4 烟草花叶病毒的顶观图
A: 未经光学旋转技术处理的; B、C、D: 分别旋转16次、15次和17次后的积分图象。

二、频闪技术

Markham 等^[9]还发展了较复杂的频闪技术。这一技术的原理和旋转技术相似, 只是省去了放大冲洗过程, 可以直接观察清晰化的图象, 省去了大量劳动。他们利用特制的复杂器具对烟草花叶病毒的杆状结构进行了线性积分, 经处理后, 比原照片清楚得多。

1971年 Warren 和 Hicks^[10]根据光学原理设计了一种较简单的装置(图6, 7)。这种装置

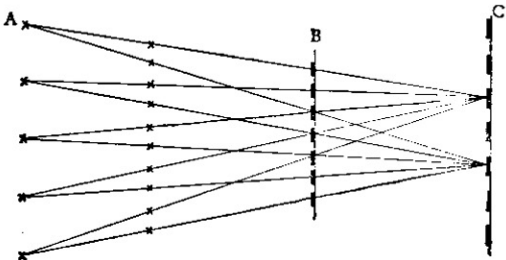


图5 周期性结构经光学处理得到加强的示意图
A: 点光源; B: 样品; C: 观察屏(或记录器)

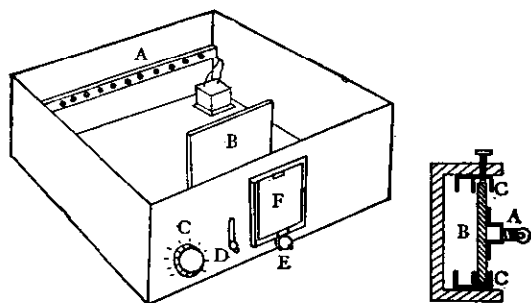


图6 线性积分器

A: 光源; B: 样品夹; C、D、E: 调节组;
F: 观察屏。右下图为光源装置的细部

中有一排小灯泡, 照片中若存在周期性结构, 经过光照处理后, 结构清晰度增强了。

上述技术, 特别是旋转技术, 虽能显示旋转对称或线性重复的特征, 在应用时必须十分小心。而且这种方法局限性较大, 除要求观察者对样品的生物学特性有一定了解外, 还要求反复试验摸索, 因而化费的劳动量较大。

三、光学衍射技术

为了直接判断未知样品内是否包含对称特性或周期性重复结构, Klug和Berger^[11]成功地把光学衍射技术引进到电镜技术中。他们把电镜照片当作光学衍射仪的光栅, 得到了光学衍射图, 在图上可以反映样品结构的对称性或周期性重复性。目前这项技术已广泛用来分析病毒结构, 包括病毒粒子和结晶状排列的一堆病毒粒子。这项技术还可以用来分析切片, 冰冻蚀刻制片材料, 以及帮助判断结构保存程度, 仪器使用状态等。

光学衍射技术的根据是: 在衍射图上, 样品有规则的结构作为对称衍射点出现, 而噪声

则作为圆盘状随机点出现。因此通过分析衍射图, 可以保留反映结构信息的衍射点, 遮挡住“噪声”造成的衍射点。然后把这种处理过的频谱重新成象, 图象就清晰了。这种方法便称光学滤波法, 这种方法还可以用来进行光学二维重构。

四、电子计算机方法

这种方法是先使电镜照片数值化, 然后用计算机直接算出病毒粒子的三维结构。目前已用此法研究了不少球形病毒。用这种方法重构出的大分子, 分辨率最佳可达7埃。

为了提高图象的分辨率, 图象分析技术是重要的一方面。当然样品制备技术更为重要, 因为不能设想, 分析拙劣失真的样品制备品能得出正确结论。如果把样品制备喻为织锦, 那么, 图象分析技术似可喻为添花。

参 考 文 献

- [1] Brenner, S., R. W. Hore: *Biochim. Biophys. Acta*, **34**: 103, 1959.
- [2] Horne, R. W. et al.: *J. Ultrastruct. Res.*, **47**: 361 1974.
- [3] Kellenberger, E. and W. Arber: *Virology*, **3**: 1141, 1957.
- [4] Nermut, M. V.: *J. Microsc.*, **96**(3): 351, 1972.
- [5] Kleinschmidt, A. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 857, 1962.
- [6] Nermut, M. V. and H. Frnak: *Virology*, **49**: 345, 1972.
- [7] Glauret, A. M. and J. A. Lucy: *J. Microsc.*, **89** (1): 1—18, 1969.
- [8] Markham, R. et al.: *Virology*, **20**: 88, 1963.
- [9] Markham, R. et al.: *ibid*, **22**: 342, 1964.
- [10] Warren, R. C. and R. M. Hicks: *J. Ultrastruct. Res.*, **36**: 861, 1971.
- [11] Klug, A and J. E. Berger: *J. Mol. Biol.*, **10**: 565,