

电镜技术在植物病毒研究中的应用

APPLICATIONS OF ELECTRON MICROSCOPY IN PLANT VIROLOGY

洪 健

(浙江农业大学电镜室)

Hong Jian

(Electron Microscope Laboratory, Zhejiang Agricultural University)

摘要 本文简要介绍了目前常用于植物病毒研究的 5 种电镜制样方法及其应用。

关键词 植物病毒; 超微结构; 电子显微镜

Key words Plant virus; Ultrastructure; Electron microscope

目前电子显微镜在植物病毒学领域的应用主要有两方面。第一,作为一种诊断手段,通过组织粗汁液或提纯负染观察、病组织超薄切片、结合免疫电镜方法,直接观察病毒形态,诊断和鉴别病毒种类,判断血清学关系。第二,运用传统超薄切片,结合原生质体技术、免疫标记定位、细胞化学和放射自显影等,研究病毒的侵染增殖过程、复制装配场所、细胞内含体、病毒与介体关系、复合感染等细胞病理学问题。几年来,我们运用多种电镜手段,研究了一些植物病毒的形态和超微病变,本文主要介绍有关的实验方法以及应用。

1 离体病毒颗粒负染观察

是直接观察病毒形态的最常规方法,病组织汁液或提纯样品。方法虽然简单,但有几点需引起重视:磷钨酸可能破坏某些病毒的结构,如黄瓜花叶病毒组成员,苜蓿花叶病毒、弹状病毒等。因此,最好备有几种不同的负染色剂,如醋酸铀、钼酸铵等。植物病毒鉴定准则中,粒子的形态一般都要有两种不同负染色剂的结果。另一点是样品中的介质,如缓冲液、蔗糖、组织汁液等也会影响负染效果,尤其是醋酸铀一遇 pH 超过 5.5 的样品,即发生沉淀,须先用水冲掉介质或杂质,再作负染。对于不稳定的病毒,可先用 1%戊二醛或甲醛固定,洗净后再负染。

2 免疫吸附和免疫修饰

Derrick 1973 年建立免疫吸附电镜术 (ISEM) 以来,离体病毒的免疫电镜方法日益在诊断中显示出重要价值。利用预先包被抗体或 SPA-抗体的载网来捕获组织汁液中的病毒,可以大大增加电镜下粒子检出量,提高诊断灵敏度。在免疫修饰法中,利用病毒与同源抗体免疫反应所产生的抗体“晕圈”,可以直接在电镜下判断两者的血清学关系,适用于种或株系诊断、复合病毒检测等。

3 免疫修饰结合金标记

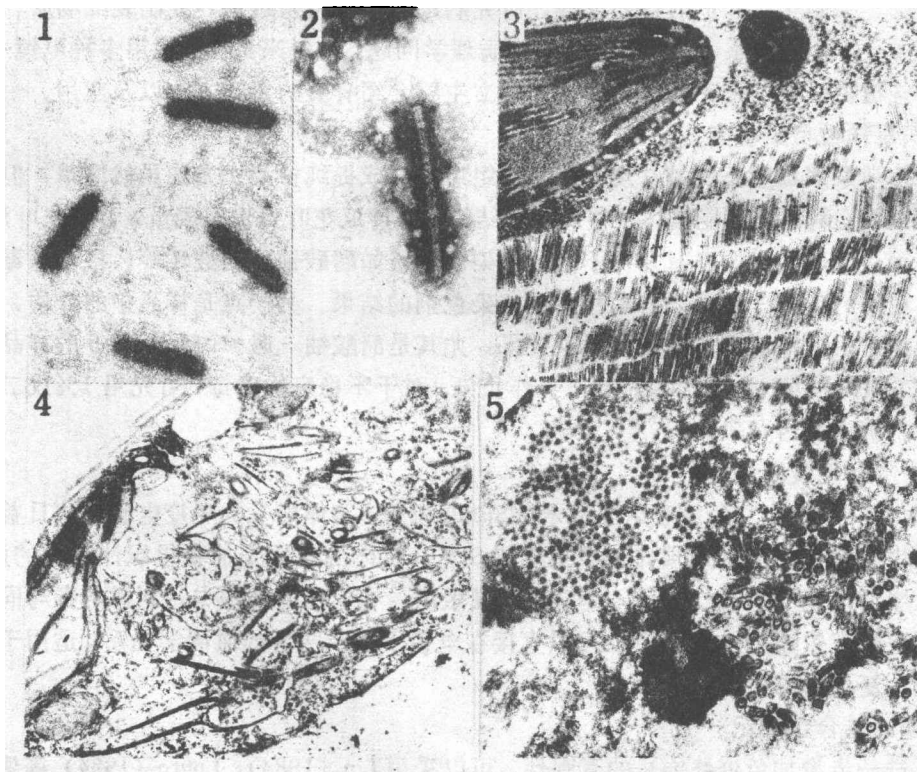
为了进一步增加免疫修饰法的直观性,可以采用 Lin (1984), Louro (1984) 等建立的方法,在免疫修饰后再用金标记二抗或金标记 SPA 处理,形成病毒-抗体-金颗粒复合物,在病毒表面的抗体“晕圈”上结合了直径 10 nm 或 15 nm 的金颗粒,电镜下可见性好,比单纯免疫修饰更易判断。一般用于诊断,以及在做细胞内病毒抗原标记前进行预备实验,了解抗原抗体反应情况。

4 超薄切片

是观察病毒在细胞内存在状态及细胞病变的最基本方法,也是进行细胞内抗原免疫标记定位的技术基础。观察各种病毒引起的寄主细胞病变特征,有助于鉴别病毒种类甚至株系,并了解病毒侵染和增殖过程。有一些技术关键应予以注意:取材一般选系统寄主,田间寄主则不能太老,在病毒增殖高峰期取黄绿交界和退绿部位。对于球状病毒,要用牛胰RNase处理以消除核糖体影响。包埋剂除Epon 812外,还可选用LRwhite, Spurr等低粘度树脂,以增加渗透性。植物超薄切片难度大于动物组织,但注意制样中各步细节,也不难得到优良的结果。

5 细胞内病毒抗原的免疫标记定位

免疫胶体金标记细胞内的病毒或内含体,在国外已有许多应用,但国内尚乏报道,我们在TMY、RMV、TuMV感染的寄主中作了实验,获得了初步结果。均采用包埋后免疫金标记方法,标记抗体是购买的国内商品,戊二醛用蒸馏纯化。用LRGold、LRwhite低温包埋和Epon812常规包埋,戊二醛—多聚甲醛单固定和常规双固定作比较,发现低温包埋剂在保存抗原活性方面较理想,但结构反差较差。而参照Bendayan (1983)提出的方法,对常规双固定、Epon812包埋的切片,先用NaIO₄预处理后,再进行免疫标记,能提高标记率。在没有低温包埋剂的情况下,不失为一个较好的替代方法。目前,我们正应用胶体金标记技术,研究一些病毒的细胞病理学问题,并在实践中不断完善实验方法。



图版 1 免疫修饰的TMV 5万 $\times$;2 免疫修饰结合金标记的TMV 10万 $\times$;3 免疫胶体金标记普通烟细胞质中的TMV 2.5万 $\times$;4 榨菜细胞中的TuMV及内含体 2万 $\times$;5 复合感染水稻叶片细胞中的RDV和RTYV 2万 $\times$ 。