

几种病毒核酸的明暗场电镜观察

袁丽 王学兰 邓海凡

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

BRIGHT AND DARK FIELD ELECTRON MICROSCOPY OF NUCLEAR ACID MOLECULES OF SOME VIRUS

Yuan Li Wang Xue-lan Deng Hai-fan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

将暗场技术用于核酸, 且蛋白等生物大分子精细结构的研究, 是近几年来生物电镜发展的一项新技术。1982年Klotz¹报道了核酸分子的暗场像, 阐述了暗场比明场有更大的优越性, 为建立此项技术, 我们作了初步地尝试, 并收到了一定的效果。

材料与方法

取褐点粉灯蛾核型多角体病毒* (Alphaea Plasma)、噬菌体和鱼呼肠孤病毒样品, 先用0.05M Na₂CO₃室温下(28—30°C)处理AP NPV10', 然后离心收集病毒粒子, 再用二步释放法, 将纯净的AP NPV与1M尿素按1:3进行混合, 室温下作用1小时左右, 而噬菌体和鱼呼肠孤病毒样品则分别按1:5²与3M尿素混合, 室温下(30°C)作用4小时, 使其蛋白外壳变性。

取以上各病毒核酸释放液0.01—0.05ml, 分别加入到事先配制好的展层液中(2M醋酸铵, 0.1M EDTA及3.8/ml细胞色素C), 用无离子水或0.25M醋酸铵溶液作为下相液, 进行单分子膜展层, 用火棉胶—碳膜铜网沾取病毒核酸, 将部分铜网在无水乙醇中脱水10"后, 在JEE-4B喷涂仪上进行铂钯合金旋转投影, 用JEM-100C作明场观察(图1—3)。将另一部分铜网用0.1mM醋酸铀70%乙醇溶液染色30"后, 在无水乙醇中脱水10", 按暗场技术调试电镜, 进行暗场观察(图4—6)。

结 果

本实验初步证实了Klotz^[1]的结论, 核酸分子的暗场技术不仅比明场有较大的反差, 而且具有操作简单, 方便, 迅速, 能良好地保存核酸分子的细微结构等特点(图4—6)。

*AP NPV由本所一室孙讼柏同志提供, 鱼呼肠孤病毒由三室提供, 谷氨酸发酵菌7338噬菌体由四室提供, 在此一并感谢! 本文1985年8月3日收到

讨 论

为要得到高分辨率的照片，我们认为：

1. 要选用“低噪声”的支持膜，最好用微筛碳膜或用间接真空蒸发法制作碳膜，使其厚度在 25 \AA 左右，这是核酸分子暗场技术的关键，否则会降低样品的反差和结构的分辨率。由于种种原因，我们采用的是0.1%火棉胶膜上薄薄喷一层碳膜（即肉眼难以看到的程度），但暗场照片反差欠佳，可能是支持膜厚了所致。然而，能否改进火棉胶的浓度，用火棉胶—碳膜代替间接真空蒸发的方法，尚有待摸索。

2. 观察时，电镜要调试到最佳工作状态，要尽可能使用冷阱，或其他冷却装置，以减少辐射损伤，这是提高分辨率，防止污染的有效方法，拍照时要用“低曝光”技术，以保证负片上的亮度均匀。

3. 用金属投影虽能提高样品的反差，但同时也增加了样品的宽度，按照理论数值，核酸分子的直径应为 20 \AA ，当投影角度为 7° 时，投影后的核酸分子可达 70 — 150 \AA 左右，而用铀盐染色时，因染色剂本身仅具有 7 — 10 \AA 的颗粒性结构，所以染色后的核酸分子直径应比投影后的分子宽度小 2 — 4 倍，实验结果证实了用暗场观察的核酸分子象比明场观察的核酸分子要细些，但如何使核酸分子的暗场图象清晰，具有更大的反差，还须进一步摸索。

参 考 文 献

- [1] Klotz,G, 1982,Dark Field Imaging Nucleic Acid Molecules,57—66.
- [2] Christine Brack,1981, DNA Electron Microscopy Critical Reviews in Biochemistry, 10:113—124.
- [3] 王学兰、张世敏、邓海凡：1983，科学通报，24：1524—1526。
- [4] 洪涛主编：1980，生物医学超微结构与电子显微镜技术，科学出版社。

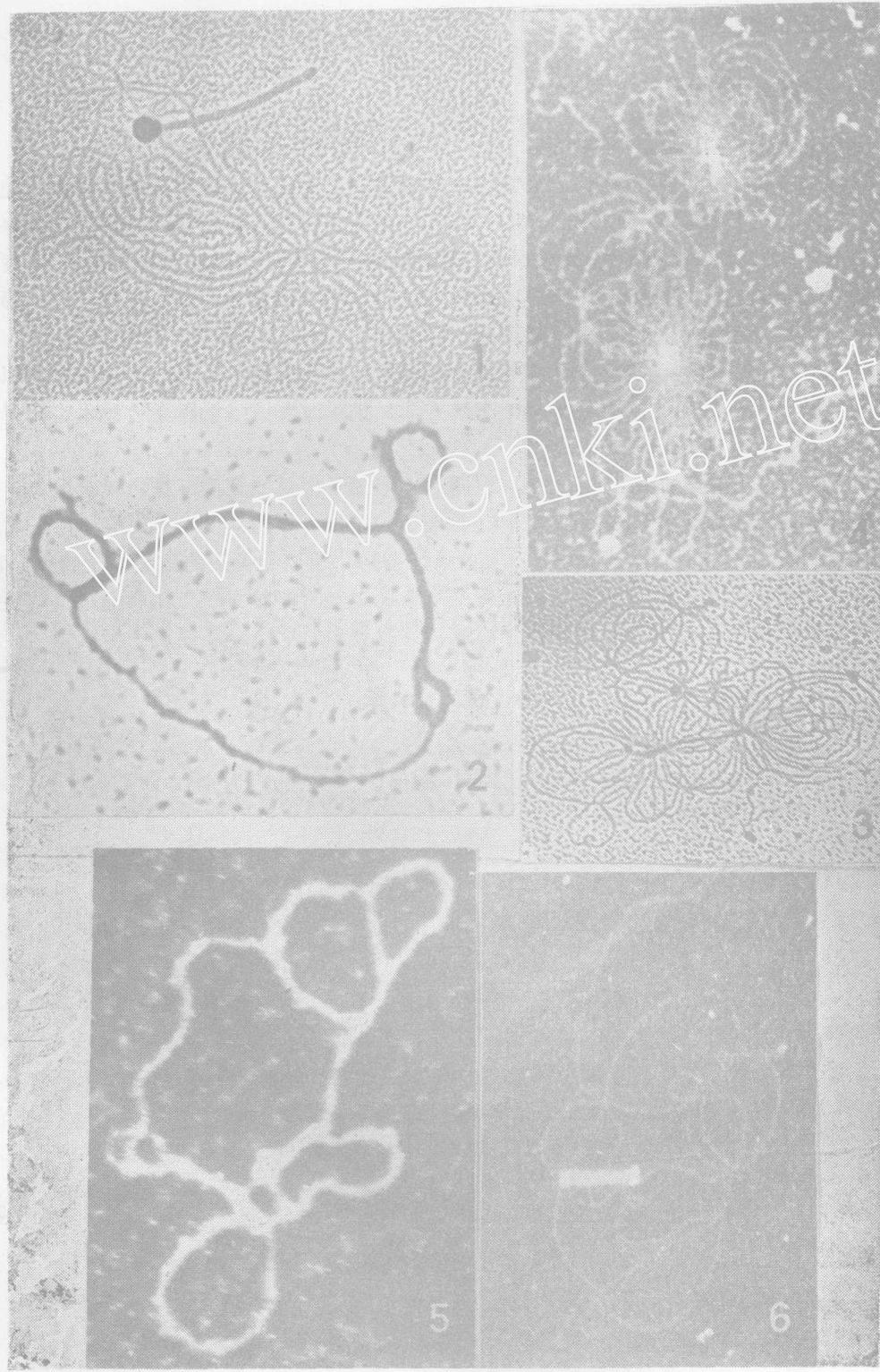


Fig1.4. Bright-dark field imaging of nucleic molecules of the phage.

Fig2.5. Bright-dark field imaging of nucleic acid molecules of Fish Reovirus(FRV)

Fig3.6. Bright-dark field imaging of nucleic acid molecules of Ap NPV.