

文章编号: 1000-6281(2012)02-0190-04

# 水生动物病毒的电镜和荧光显微镜观察

陈中元, 朱蓉, 张奇亚\*

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 应用透射电镜和荧光显微镜对三种水生动物病毒粒子形态、病毒感染细胞的超微结构变化及亚细胞定位进行比较和研究。负染电镜观察显示: 鳊鱼弹状病毒(SCRV) 粒子呈典型的子弹状形态, 长约 76 ~ 118 nm, 直径约 29 ~ 52 nm; 鲈鱼呼肠孤病毒(LJRV) 粒子呈正二十面体结构, 具有双层衣壳, 直径约 70 ~ 80 nm; 蛙虹彩病毒(RGV) 粒子呈正二十面体结构, 具有囊膜, 直径大小约 150 nm。超薄切片观察表明, 宿主细胞的基本结构遭到不同程度的破坏, 成熟病毒粒子分布在胞质中或以出芽的方式释放到胞外, 且 RGV 增殖后在胞质中聚集形成晶格状结构。免疫荧光观察进一步显示, RGV 感染细胞后能产生多个直径大小不一的包涵体。本研究结果有助于了解和认识水生动物病毒的超微形态特征、复制过程及致病机理。

**关键词:** 水生动物病毒; 超微结构变化; 亚细胞定位

中图分类号: Q958.8; S852.65; Q336 文献标识码: A

电子显微镜技术是研究细胞超微结构最重要的手段, 广泛应用于生物学、病理学与药理学等各个学科。在水生病毒学研究中, 电子显微镜技术在新病毒的鉴定、病毒结构与形态观察及感染细胞超微结构病变研究等方面, 具有其它方法不可替代的作用<sup>[1-5]</sup>。荧光显微镜作为活体荧光标记观察的有力工具, 在功能上与电镜互补, 能够迅速准确地观察到蛋白质在细胞内的表达、定位以及蛋白质间相互作用情况, 为病毒蛋白的功能研究提供了更直观的观测手段<sup>[6]</sup>。本文在对水生动物病毒进行扩增培养和提纯、感染病毒细胞样品超薄切片与水生病毒抗体制备、荧光染色的基础上, 结合超微和荧光显微技术, 对提纯水生动物病毒的超微形态、感染病毒的鱼类细胞病变及病毒蛋白在细胞内的定位等进行多层次观察和描述, 为深入了解和认识水生动物病毒的超微形态特征、复制过程及与宿主细胞的相互作用提供直观图片和证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒增殖和提纯

按本实验室的常规方法<sup>[7]</sup>进行草鱼鳍条细胞系( grass carp fins, GCF) 的培养。待细胞长成单层后, 在培养瓶内分别接种由本实验室保存的鲈鱼呼肠孤病毒( *Lateolabrax japonicus reovirus*, LJRV)、鳊

鱼弹状病毒( *Siniperca chuatsi rhabdovirus*, SCRV)、蛙虹彩病毒( *Rana grylio virus*, RGV) 进行感染。待 80% 的细胞出现病变后, 收获病毒培养液, 经差异离心和密度梯度离心后, 将沉淀溶于 TE( 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 溶液中获提纯病毒。取部分病毒样品进行电镜负染观察, 其它置 -20℃ 备用。

### 1.2 负染色制样

提纯病毒经适当稀释, 将稀释液滴到蜡板上后, 再将铜网有支持膜的一面向下覆盖到病毒稀释液滴上。室温下 20 min 夹起铜网, 用滤纸将残留液体吸掉, 最后用 2% 磷钨酸负染色 3 ~ 4 min。干燥后用 JEM-1230 型透射电镜在 80 kV 下观察<sup>[8]</sup>。

### 1.3 超薄切片样品制备

取病毒感染后的细胞, 用 5% 的胰酶消化下贴壁细胞, 1500 r/min (Sigma 离心机, 12124 pp 转头) 离心 5 min, 弃上清, 沉淀经固定、脱水、浸透和包埋, 用 Leica Ultracut-R 超薄切片机制备厚度为 50 ~ 80 nm 的超薄切片, 置于附有支持膜的铜网上, 染色后经透射电镜进行观察<sup>[9]</sup>。

### 1.4 病毒抗体的制备

取提纯的 RGV 病毒悬液与等体积完全弗氏佐剂充分乳化, 皮下多点注射大白兔, 每周 1 次。在第 3 周, 颈动脉取血, 收集免疫兔血液并分离出血清

收稿日期: 2011-12-27; 修订日期: 2012-02-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目( No. 31072239, 31072231); 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金( 2008FBZ16)。

作者简介: 陈中元( 1982-), 男( 汉族), 湖南衡阳人, 助理研究员. E-mail: chenzy@ihb.ac.cn

\* 通讯作者: 张奇亚. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

(抗体),利用间接 ELISA 测定抗体效价<sup>[10]</sup>。

### 1.5 免疫荧光显微镜样品的制备

将 GCF 细胞传到培养皿内无菌盖玻片上,接种 RGV 进行吸附,培养不同时间后弃去培养液,经 4% 多聚甲醛固定 20 min,无水乙醇 -20℃ 透化 7 min,2% 牛血清封闭非特异性。用上述方法制备的兔抗 RGV 抗血清作为一抗,室温下孵育 2 h。磷酸缓冲液漂洗后,用荧光素 (FITC) 标记的羊抗兔 IgG 作为相应的二抗,室温避光孵育 2 h。随后用荧光染料 Hoechst 33258 (Sigma) 进行染色。将盖玻片有细胞的一面向下,用 50% 甘油封片置于载玻片上,荧

光显微镜 (Leica DMIRB) 油镜下观察,拍照。

## 2 结果

### 2.1 三种水生动物病毒的负染色电镜观察

鲈鱼呼肠孤病毒 (LJRV) 粒子呈正二十面体结构,具有双层衣壳,直径约 70 ~ 80 nm (图 1a)。

鳊鱼弹状病毒 (SCRV) 粒子呈一端为圆锥体、另一端为平底的典型子弹状形态,长约 76 ~ 118 nm,直径约 29 ~ 52 nm (图 1b)。

蛙虹彩病毒 (RGV) 粒子呈典型的正二十面体结构,具有囊膜,直径约 150 nm (图 1c)。

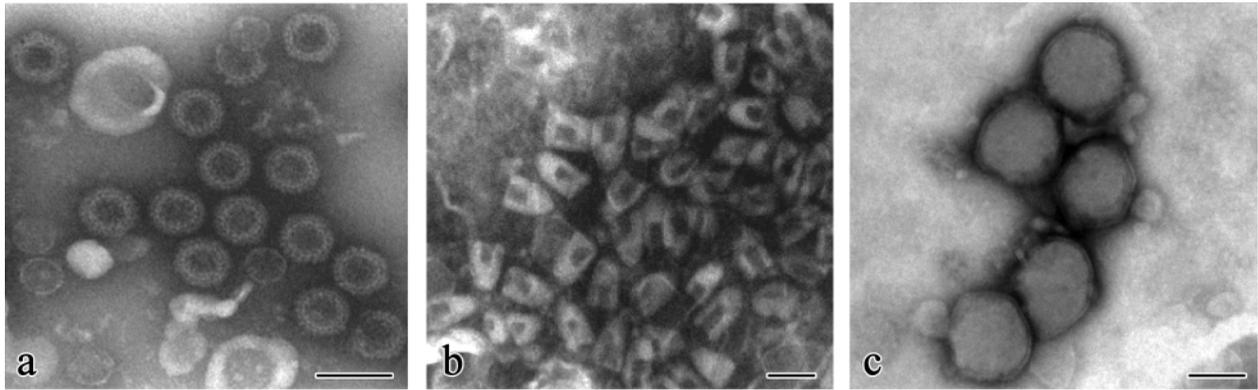


图 1 三种水生动物病毒的负染色电镜像。a: 鲈鱼呼肠孤病毒; b: 鳊鱼弹状病毒; c: 蛙虹彩病毒。Bar = 100 nm

Fig. 1 Negatively stained electron micrographs of three aquatic animal viruses. a: LJR; b: SCR; c: RGV

### 2.2 三种水生动物病毒感染细胞的电镜观察

超薄切片的电镜观察显示,在 LJR 感染的宿主细胞中,细胞的基本结构遭到破坏,病毒颗粒聚集在胞质胞中(图 2a);在 SCR 感染的宿主细胞中,细胞核凝集,核质边缘化,胞质浓缩,大量的病毒粒子以出芽的方式释放到细胞膜外,散在或堆积分布在细胞间隙空泡小腔中(图 2b);在 RGV 感染的细

胞中,细胞核变形,核质稀疏,病毒基质 (Viroplasm, VP) 在细胞质中形成,且在 VP 周围出现由大量病毒颗粒组成的晶格状结构(图 2c)。

### 2.3 病毒包涵体的荧光显微镜观察

有的鱼类病毒感染细胞后可形成包涵体。在鱼类病毒感染细胞中形成的包涵体经荧光抗体染色后,可在荧光显微镜下观察检出绿色荧光信号。同

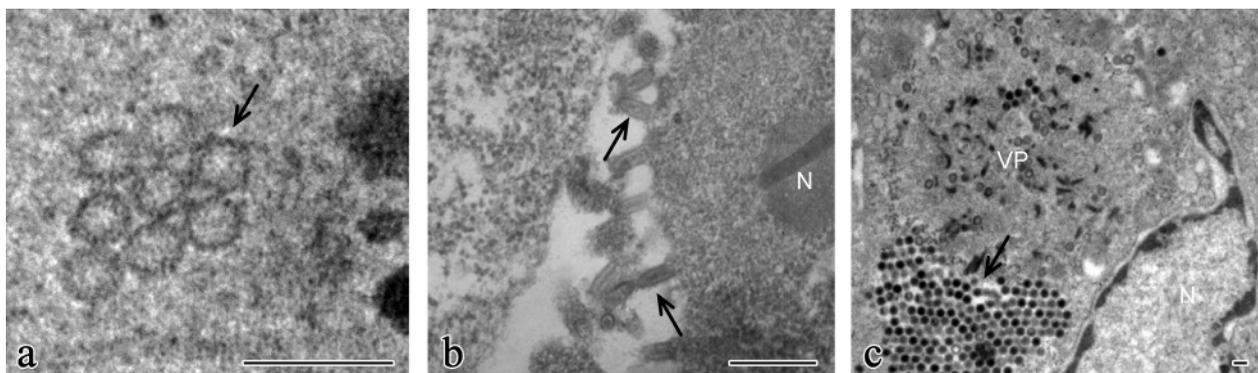


图 2 病变细胞超薄切片的电镜照片。a: 鲈鱼呼肠孤病毒感染的细胞; b: 鳊鱼弹状病毒感染的细胞;

c: 蛙虹彩病毒感染的细胞。箭头: 病毒颗粒。Bar = 200 nm

Fig. 2 Electron micrographs of the ultra-thin section of infected cells. a: LJR-infected cells; b: SCR-infected cells.

c: RGV-infected cells. VP: Viroplasm; N: Nucleus Arrows: virus particles



图 3 感染 RGV (22h 后) 的细胞荧光图片。a 和 b 两图重叠合成 c。箭头: 病毒包涵体。绿色荧光是抗体标记病毒的信号; 蓝色荧光为核酸荧光染料( Hoechst33258) 信号。×900

Fig. 3 Fluorescence microscopy images of virus infected cells ( after 22 h) . a and b merge to form c.

Arrows: viral inclusion bodies. Green fluorescent signals were detected with virus antibody.

Blue fluorescent signals were detected with Hoechst33258. ×900

时,利用 Hoechst 这种可透过细胞膜并对 DNA 染色而发出强烈的蓝色荧光染色,则能使细胞核或 DNA 包涵体出现蓝色荧光信号。借助通用的滤光片分别拍摄荧光抗体染色和 Hoechst33258 两种染料的荧光,然后用数字合成法重叠合成一张图,由此可观察到包涵体的形成及与细胞核的关系等相关情况。

感染 RGV 的细胞在荧光显微镜下观察时,可见被标记有 FITC 绿色荧光的抗 RGV 抗体染色后,多个直径大小不一的病毒包涵体(箭头所示)就可发出绿色荧光信号(图 3a)。由于这种病毒是 DNA 病毒,其包涵体与肾形宿主细胞核还能同时被核酸荧光染料( Hoechst33258) 染色,而发出蓝色荧光信号(图 3b)。当图 3a 和图 3b 这两张图合成一张图时(见图 3c),就可得知病毒包涵体位于宿主细胞核外侧的细胞质中,还能初步了解包涵体的数量及其分布情况。

### 3 讨论

利用透射电镜观察经负染色的提纯水生动物病毒,可了解被观察病毒的基本形态、直径大小、核衣壳等病毒超微结构相关的信息。超薄切片电镜观察病毒在细胞内的形态、分布部位以及细胞病理变化,可为病毒病的诊断及病原分离鉴定提供佐证,同时为了解病毒与宿主细胞的互作提供形态学证据。本文利用电镜对三种水生动物病毒及其感染细胞的超微观察显示,SCRV 病毒粒子呈典型的子弹状形态,而 LJR 和 RGV 病毒粒子均呈正二十面体结构。三种水生动物病毒感染引起的宿主细胞超微病变主要包括:细胞的基本结构遭到破坏、细胞核出现不同程度的变形或凝集、细胞膜被破坏等。同时,增殖后

的 SCR 通过类似出芽的方式从胞质中释放到细胞膜外,释放在胞外的病毒粒子散在或堆积在细胞间隙空泡小腔中;而 RGV 入侵宿主细胞后,病毒基质(即包涵体)在细胞质中形成,大量病毒颗粒在基质区周围聚集组成晶格状结构。

荧光显微镜作为一种具有高灵敏度的显微图像检测技术,广泛应用于细胞结构或组分的定性、定位、半定量以及蛋白间相互作用等研究。利用免疫学技术通过对病毒蛋白进行荧光标记后,能直接观察其在细胞内的形态变化。本研究中,对 RGV 感染细胞的荧光显微镜观察显示,RGV 感染细胞后能形成多个直径大小不一的病毒包涵体,且大多位于宿主细胞核外侧的胞质中。这与 RGV 感染细胞的超薄切片电镜观察结果是一致的。包涵体是在病毒感染的细胞内出现、由光学显微镜可观察到的异常染色区。不同病毒感染所形成的细胞内包涵体的形态、数量和存在部位都具有某种病毒的特征性。已有相关研究证实,多数病毒所形成的包涵体实际上是病毒组分合成或装配的部位,即是病毒加工的活性中心。新合成的病毒体或尚未装配的病毒组分累积在这些部位,如腺病毒感染细胞形成的嗜酸性包涵体中,就含有大量呈晶格状排列的病毒<sup>[11]</sup>。这类包涵体对病毒可能有一定的保护作用。扫描电镜观察证实,鳃鱼球形病毒可以包涵体的形式存在于宿主细胞内,能逃避或减少宿主的免疫作用,只有当病毒扩增到一定量的时候,才会突然大量释放,使宿主难以防备<sup>[12]</sup>。但也有研究表明,有些动物细胞的包涵体是病毒复制时所造成的细胞损伤,如疱疹病毒通过核膜芽殖成熟时,病毒离开核,同时细胞染色质严重破坏,染色质片段聚集成典型的核内嗜酸性包涵

体<sup>[13]</sup>。从上述对 RGV 包涵体观察的初步结果看,它类似于腺病毒增殖时的情况,含有大量呈晶格状排列的病毒颗粒。由此可见,结合荧光显微镜和电镜可对水生动物病毒感染的细胞结构变化进行详细观察,能更深入地了解病毒的装配途径及其致病机理。

致谢:感谢袁秀平老师、孙伟、黄晓红、陶建军和赵哲博士等提供技术支持或参与部分实验。

#### 参考文献:

- [1] 张奇亚,袁秀平,李正秋. 三种水生动物病毒感染鱼类细胞的扫描电镜观察[J]. 水产学报,2001,25:576-579.
- [2] 黄晓红,张奇亚. 扫描电镜细胞样品制备方法的改进[J]. 电子显微镜学报,2003,22:671-672.
- [3] 张奇亚,陶建军,黄晓红,等. 两种鳊病毒的共感染现象及引起感染细胞的超微变化[J]. 水生生物学报,2005,29:473-478.
- [4] 陈中元,刘荃,李正秋,等. 鲤病毒病原的感染性测定[J]. 中国水产科学,2006,13:617-623.
- [5] Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future [J]. *Micron*,2006,37:91-106.
- [6] Hoppe A D, Seveau S, Swanson J A. Live cell fluorescence microscopy to study microbial pathogenesis [J]. *Cell Microbiol*,2009,11:540-550.
- [7] Zhang Q Y, Xiao F, Li Z Q, et al. Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog (*Rana grylio*) with lethal syndrome [J]. *Dis Aquat Org*,2001,48:27-36.
- [8] Tao J J, Zhang Q Y, Gui J F. Isolation and characterization of a rhabdovirus from coinfection of two viruses in mandarin fish [J]. *Aquaculture*,2007,262:1-9.
- [9] Huang X H, Zhang Q Y. Improvement and observation of immunoelectron microscopic method for the localization of frog *Rana grylio* virus (RGV) in infected fish cells [J]. *Micron*,2007,38:599-606.
- [10] Chen Z Y, Liu H, Li Z Q, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to spring viraemia of carp virus [J]. *Vet Immunol Immunopathol*,2008,123:266-276.
- [11] Crespo R, Shivaprasad H L, Droual R, et al. Inclusion body tracheitis associated with avian adenovirus in turkeys [J]. *Avian Dis*,1998,42:589-596.
- [12] 张奇亚,李正秋. 胭脂鱼弹状病毒包涵体在培养细胞中的形成[J]. 中国兽医学报,2001,21:38-41.
- [13] Risco C, Rodriguez J R, Lopez-Telesias C, et al. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly [J]. *J Virol*,2002,76:1839-1855.

## Observations of aquatic animal viruses by electron microscopy and fluorescence microscopy

CHEN Zhong-yuan, ZHU Rong, ZHANG Qi-ya\*

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei 430072, China)

**Abstract:** Electron microscope and fluorescence microscope were used to observe and study three aquatic animal viruses, ultra-structural changes in infected cells and subcellular localization of viral proteins in fish cells. The negatively stained electron micrographs revealed that *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV) has typical bullet-shape and the size ranges from 76 ~ 118 nm in length and 29 ~ 52 nm in diameter. *Lateolabrax japonicus* reovirus (LJRV) has icosahedral structure with a double-layered protein capsid, and the size is 70 ~ 80 nm in diameter. *Rana grylio* virus (RGV) is icosahedral in appearance with diameter of about 150 nm and composed of envelope. The electron micrographs of the ultra-thin section of infected cells suggested that the basic structures of infected cells had been damaged to a different extent, and the mature virus particles were distributed in the cytoplasm or released into the extra-cellular by budding. Moreover, paracrystalline arrays of RGV virus particles were observed in the cytoplasm of infected-cells. In addition, viral inclusion bodies were detected in RGV-infected cells by fluorescence assay. These results may help to understand the ultrastructural features, replication, and pathogenesis of different aquatic viruses.

**Keywords:** aquatic animal virus; ultrastructural changes; subcellular localization

\* Corresponding author