**Trwałość elektronomikroskopowych
i immunoelektronomikroskopowych preparatów wirusów roślin
negatywowo kontrastowanych octanem uranylu oraz praktyczny
aspekt stosowania tego „barwnika”**

MAREK S. SZYNDEL

Katedra Fitopatologii, SGGW, Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

M. S z y n d e l (Department of Plant Pathology, Agricultural University – SGGW, Nowoursynowska 166, 02-766 Warsaw, Poland). *Acta Agrobotanica* 45 (1, 2): 51-59, 1992. *The stability of electron- and immunoelectron microscopic plant virus preparations negatively stained with uranyl acetate and practical aspects of using this stain.*

(Otrzymano dn. 1991. 09. 06)

A b s t r a c t

The electron microscopic preparations of tobamo-, potex-, carla-, poty-, clostero-, como-, cucumo-, ilar-, luteo- and cryptoviruses were completed in 1983-87 and stored at room temp. Grids were prepared by immunoelectron microscopic (clumping, ISEM, decoration) techniques and by leaf-dip modified method. All preparations were contrasted with 2 % aqueous uranyl acetate (UA), pH 4.2. Reexamined grids were still of good quality. UA gives high contrast, high resolution and good preservation of the virus particles and a clear image of serological reactions. The advantages and disadvantages of UA and some practical aspects of using this stain are discussed.

WSTĘP

Niektóre substancje służące do kontrastowania preparatów w mikroskopie elektronowym wiążą się z powierzchnią błonki podtrzymującej tworząc równomierną warstwę o małej przenikliwości dla strumienia elektronów. Jednocześnie taki „barwnik” nie reaguje z cząstką wirusa, choć może przenikać do jej wnętrza. Uzyskuje się tzw. efekt barwienia tła, w którym cząstki wirusa widoczne są w postaci jasnych struktur na ciemnym tle. Określa się to mianem negatywowego kontrastowania

(Brenner i Horne, 1959; Hitchborn i Hills, 1965; Horne, 1967; Nermut, 1972; Roberts, 1977). Wśród różnych związków przydatnych i używanych do negatywowego kontrastowania preparatów wirusów (Milne, 1980, 1984; Ko, 1981; Roberts, 1986; Christie *in.*, 1987) jednym z najczęściej stosowanych jest 2 % wodny roztwór octanu uranylu (Milne i Luisoni, 1977; Milne i Lesemann, 1984; Milne, 1980, 1984; Szyndel, 1991).

Octan uranylu nie tylko wyraźnie kontrastuje badane preparaty i wzmacnia zdolność rozdzielczą ale także dobrze utrzuca strukturę cząstek większości wirusów i sporządzone (kompletne) preparaty długo zachowują trwałość (Milne i Luisoni, 1977; Christie *in.*, 1987).

Oceniono jakość i trwałość elektronomikroskopowych preparatów wirusów (z nieoczyszczonego soku i oczyszczonych) jak i preparatów immunoelektronomikroskopowych sporządzonych różnymi technikami a kontrastowanych octanem uranylu, oraz przedyskutowano wady i zalety tego „barwnika”.

MATERIAŁ I METODY

Źródła wirusów i surowic zestawiono w tabeli 1. Oczyszczone preparaty TBBMV otrzymano od dr. H. Pospiesznego (IOR Poznań). Preparaty pozostałych wirusów uzyskano przez wstępne klarowanie soku z roślin stanowiących źródła wirusów wyciśniętego w obecności 0,067 M buforu fosforanowego (pH 7,0) i 0,5 % Na_2SO_3 (5 min., 3000 g, wirówka Janetzki K-24).

Preparaty elektronomikroskopowe (tzw. metoda dip) sporządzono w terminach podanych w tab. 1 przez nakładanie siatki (300 mesh) pokrytej Formvarem i napyłonej węglem na kroplę zawiesiny wirusa na 5 minut i po 5-cio krotnym płukaniu wodą destylowaną kontrastowano w ciągu 2 minut 2 % wodnym octanem uranylu (pH 4,2). Preparaty przeglądano w mikroskopie elektronowym IEM 100 C firmy JEOL w pierwszym kwartale 1991 roku.

Preparaty immunoelektronomikroskopowe sporządzono technikami: zbrylania, wyłapywania czyli immunosorpcji (ang. immunosorbent electron microscopy – ISEM) i dekoracji cząstek wg Milne i Luisoni, 1975, 1977 w wersjach ustalonych przez Szyndla, 1991. Siatki z kompletnymi preparatami przechowywano w temperaturze pokojowej w LKB Specimen grid box.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wszystkie przechowywane przez wiele lat preparaty elektronomikroskopowe (fot. 1, 2) oraz immunoelektronomikroskopowe (fot. 3, 4, 5) okazały się bardzo trwałe i jakość uzyskiwanych obrazów cząstek wirusowych oraz reakcji serologicznych nie różniła się od jakości otrzymywanej zaraz po sporządzeniu tych preparatów.

Tabela 1 – Table 1

Pochodzenie wirusów i surowic oraz termin przygotowania preparatów określonymi technikami elektronomikroskopowymi
 Orygin of viruses and antisera and date of grids preparation with use of electro microscopic methods

Wirus Virus	Źródło wirusa Source of virus	Źródło surowic Source of antiserum	Technika EM EM technics	Termin sporządzenia preparatów Date of grids preparation
Apple mosaic ilarvirus-ApMV	Kolekcja własna (self collection)	R. Fulton	ISEM + dekoracja (decoration)	X. 1987
Beet cryptic cryptovirus-BCrV	IHAR Bydgoszcz	M. Gruntzig	ISEM, zbrylenie (clumping), dekoracja (decoration)	XII. 1987
Beet mild yellowing luteovirus-BMYV	IHAR Bydgoszcz	D. A. Govier	ISEM + dekoracja (decoration)	IX. 1985
Beet yellows closterovirus-BYV	IHAR Bydgoszcz	–	dip	IX. 1985
Carnation latent carlavirus-CLV	Kolekcja własna (self collection)	C. Wetter	dip, dekoracja (decoration)	I. 1984
Chrysanthemum B carlavirus-CVB	Kolekcja własna (self collection)	D. Z. Maat	dip, dekoracja (decoration)	X. 1983
Cucumber mosaic cucumovirus-CMV	Kolekcja własna (self collection)	–	dip	III. 1987
Dasheen mosaic potyvirus-DMV	Kolekcja własna (self collection)	F. W. Zettler	dip, dekoracja (decoration)	I. 1984
Lilac mottle carlavirus-LiIMV	H. E. Waterworth	–	dip	I. 1984
Potato leafroll luteovirus-PLRV	I. Z. Młochów	P. Gugerli	ISEM, dekoracja (decoration)	IV. 1985
Potato M carlavirus-PVM	I. Z. Młochów	Z. Mierzwa	ISEM + dekoracja (decoration)	VIII. 1983
Potato S carlavirus-PVS	I. Z. Młochów	Z. Mierzwa	dip, dekoracja (decoration)	VIII. 1983
Potato X potexvirus-PVX	I. Z. Młochów	Z. Mierzwa	dip	III. 1987
Potato Y potyvirus-PVY	I. Z. Młochów	Z. Mierzwa	dip, dekoracja (decoration)	III. 1987
Prunus necrotic ringspot ilarvirus-PNRSV	Kolekcja własna (self collection)	R. Fulton	dip, dekoracja (decoration)	VII. 1986
Tobacco mosaic tobamovirus-TMV	Kolekcja własna (self collection)	–	ISEM + dekoracja (decoration)	III. 1987
True broad bean mosaic comovirus-TBBMV	H. Pospieszny	H. Pospieszny	dip	XII. 1983
Nitkowaty wirus z bzu czarnego (Filiform virus from elder)	Kolekcja własna (self collection)	–	zbrylenie (clumping), dip, dekoracja (decoration)	VII. 1985
Nitkowaty wirus z frezji (Filiform virus from fnesia)	Kolekcja własna (self collection)	–	dip	XI. 1986

Rys. 1. Cząstki tobacco mosaic virus (TMV). Preparat przygotowany „metodą dip”. Pow. x 66 000
Particles of tobacco mosaic virus (TMV). Grid prepared with the "dip method". Engl. x 66 000

Rys. 2. Cząstki potato virus Y (PVY). Preparat przygotowany „metodą dip”. Pow. x 66 000
Particles of potato virus Y (PVY). Grid prepared with use of "dip method". Engl. x 66 000

Rys. 3. Cząstki true broad bean mosaic virus (TBBMV). Preparat przygotowany techniką zbrylania IEM.
Pow. x 100 000
Particles of true broad bean mosaic virus (TBBMV). Grid prepared with use of clumping method IEM.
Engl. x 100 000

Rys. 4. Oplaszczone przeciwciałami cząstki prunus necrotic ringspot virus (PNRSV). Preparat przygotowany techniką ISEM + dekoracja. Pow. x 66 000
Particles of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) decorated with antibodies. Grid prepared with use of ISEM + decoration. Engl. x 66 000

Rys. 5. Oplaszczone przeciwciałami cząstki potatowego wirusa (PLRV). Preparat przygotowany techniką dekoracji IEM. Pow. x 66 000

Particles of potato leafroll virus (PLRV) decorated with antibodies. Grids prepared with IEM decoration method. Engl. x 66 000

Porównanie elektronogramów zrobionych przed i po okresie przechowywania siatek nie wykazało żadnych istotnych różnic w wielkości, kształcie, ilości jak i ostrości kontrastu badanych obiektów. Nie stwierdzono także, by na błonkach podtrzymujących rozwijała się jakaś mikroflora a i utwardzona węglem błona Formvarowa nie pękała nadmiernie w strumieniu elektronów. Wyniki te potwierdzają stwierdzenia Milne i Luisoni, 1977 oraz Christie i in., 1987, że kompletne preparaty kontrastowane octanem uranylu można przechowywać przez czas prawie nieokreślony. Tak więc nie tylko fotografie ale i same preparaty mikroskopowe można przechowywać jako dokumentację badawczą.

Octan uranylu jest „barwnikiem” łatwym w użyciu i dość trwałym. W ciemnej butelce można go przechowywać od 2 tygodni (Milne, 1984) do 3-4 tyg. w temp. + 4°C (Roberts, 1986) a w opisywanych doświadczeniach i po 8-10 tygodniach przechowywania w lodówce (+ 4°C) zmiany pH „barwnika” były na tyle małe, że używano go z bardzo dobrym skutkiem.

Octan uranylu dobrze utrzymał struktury cząstek wirusów ze wszystkich 10 badanych grup wirusów, ale z literatury wiadomo, że może on uszkadzać cząstki rhabdowirusów (Milne, 1984) oraz niektórych nepo- i hordeiwirusów (Roberts, 1986).

Nie jest znany obecnie idealny „barwnik” do negatywowego kontrastu więc i octan uranylu ma określone wady. Łatwo ulega precypitacji przy pH powyżej 5,5

oraz w obecności nawet niewielkiej koncentracji jonów fosforanowych. Możliwe jest także strącanie się „barwnika” z różnymi składnikami soku z badanych roślin (wyklucza to możliwość stosowania go w technice „leaf-dip”) oraz ze związkami używanymi np. do oczyszczania wirusów np. PEG, sacharoza czy glicerol. Konieczne jest więc bardzo dokładne płukanie błonek wodą destylowaną. Jest to jeden z podstawowych i koniecznych warunków uzyskania wysokiej jakości obrazów mikroskopowych, choć nadmierne płukanie może obniżać liczbę cząstek adsorbowanych do błonki (Milne, 1980, 1984; Roberts, 1986; Christie i in., 1987). Koniecznym wydaje się także kontrastowanie błonek świeżo sporządzonych. Powierzchnia błonek przechowywanych staje się hydrofobowa, co powoduje nierównomierne rozmieszczenie „barwnika” na błonce a w konsekwencji często zanik zjawiska „barwienia tła”. Obserwuje się natomiast efekty pozytywnego kontrastowania cząstek, które z reguły mają wtedy tylko połowę średnicy cząstek kontrastowanych negatywowo. Można tych efektów uniknąć przez regenerację siatek (wyładowania jarzeniowe) lub przez dodatek środków zwilżających np. Bacitracin (Milne, 1980, 1984; Christie i in., 1987). W technikach IEM a zwłaszcza immunosorpcyjnej, uczulone przeciwciałami błonki mogą być długo przechowywane (ok. 8 tyg.) bez utraty ich serologicznej aktywności i nie występują zakłócenia w rozmieszczeniu octanu na błonce. W przypadku technik dekoracji otaczająca cząstki wirusowe warstwa przeciwciał nie tylko zwiększa ich średnicę, ale także silnie pochłania „barwnik” co zwiększa kontrast w stosunku do podłoża i ułatwia obserwację (Milne, 1984; Szyn del, 1991). Nie należy nigdy dopuszczać aby wysychała powierzchnia błonki po naniesieniu badanych próbek a przed ich kontrastowaniem gdyż w takich przypadkach obrazy mikroskopowe mogą stać się zupełnie nieczytelne.

Octan uranylu powoduje także tzw. efekt spłaszczania, czyli zwiększania cząstek wirusów co jest istotne przy pomiarach ich wielkości. Dla ograniczenia artefaktów przy tego typu ustaleniach można sporządzać mieszaniny wirusów z tzw. wirusami standardowymi: sferyczne z oczyszczonymi preparatami tomato bushy stunt virus a wydłużone z tobacco mosaic virus (Boccardo i in., 1987; Zaitlin i Israel, 1975) lub też robić elektronogramy najpierw wirusów standardowych, potem wirusów badanych, ponownie standardów i dopiero ustalić faktyczną wielkość badanych cząstek. Konieczne jest zawsze w tego typu pracach podanie jakim „barwnikiem” były preparaty kontrastowane. Wskazane jest także stosowanie kilku różnych związków kontrastujących. Przy sporządzaniu zawiesiny wirusów dodatki fosforanów w postaci np. buforów fosforanowych ograniczają spłaszczenia cząstek wirusów, zabezpieczają strukturę tych cząstek a w technikach IEM dodatkowo wpływają na przebieg reakcji serologicznej, dlatego też są powszechnie używane, choć niezbędne jest potem dokładniejsze płukanie błonek (Milne, 1980, 1984; Milne i Luisoni, 1977; Szyn del, 1991).

Struktura cząstek wielu wirusów może być ustalana po negatywowym

kontrastowaniu preparatów, gdyż takie „barwniki” penetrują cząstkę i mogą być obserwowane substrukturalne szczegóły. Szczegółowa analiza budowy cząstek wirusa może być jednak utrudniona przez nakładanie się na siebie obrazów zewnętrznych i wewnętrznych struktur cząstki i wtedy interpretacja wyników wymaga dodatkowych analiz komputerowych (Milne, 1984; Roberts, 1988).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że preparaty kontrastowane octanem uranylu (2 % wodnym roztworem, pH 4,2) mają wysoką strukturalną rozdzielczość, ostry kontrast, występuje dobre utrwalenie struktury cząstek wirusów i dają bardzo czyste i klarowne obrazy w mikroskopie elektronowym. Po prostym negatywowym „barwieniu” wirusy nie mogą być bezpośrednio identyfikowane, ale uzyskane dane mogą służyć w diagnostyce wirusów jako wskazówka, do której grupy wirus należy. Identyfikację wirusa i ustalenie jego pokrewieństwa serologicznego umożliwiają techniki immunoelektronomikroskopowe, w których także wykorzystuje się przede wszystkim kontrast negatywowym. I choć w różnych laboratoriach różne „barwniki” są preferowane, octan uranylu uważany jest stale za jeden z najlepszych.

Streszczenie

Przygotowane w latach 1983-87 preparaty elektronomikroskopowe wirusów należących do grup: tobamo, potex, carla, poty, clostero, como, cucumo, ilar, luteo i cryptowirusów przechowywano w temp. pokojowej. Preparaty przygotowano immunoelektronomikroskopowymi technikami zbylania, ISEM i dekoracji oraz zmodyfikowaną techniką „leaf-dip”. Wszystkie preparaty kontrastowano 2% wodnym roztworem octanu uranylu, pH 4,2. Badane preparaty mimo długiego okresu przechowywania okazały się bardzo trwale i zachowały wysoką jakość. Przedyskutowano wady i zalety octanu uranylu jako „barwnika” oraz określono warunki jego stosowania.

LITERATURA

- Boccardo G., Lisa V., Luisoni E., Milne R. G., 1987. Cryptic plant viruses. *Adv. Virus. Res.* 32: 171-214.
- Brenner S., Horne R. W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 34: 103-110.
- Christie S. R., Purcifull D. E., Crawford W. E., Ahmed N. A., 1987. Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. *Bull. 872. Inst. Food and Agr. sci. Univ. Florida*: 45.
- Hitchborn J. H., Hills G. J., 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. *Virology* 27: 528-540.
- Horne R. W., 1967. Negative staining methods. [In]: *Techniques for electron microscopy*. D. Kay (ed.) Blachwell Sci. Public. Oxford: 328-355.
- Ko N. I., 1981. Application of VaMo negative staining for detecting plant viruses. *Plant Prot. Bull. Taiwan* 23: 153-156.
- Milne R. G., 1980. Immunoelectron microscopy (IEM) of plant viruses. *Inst. Fitovirologia del CNR, Torino. Notes for the course*: 18.
- Milne R. G., 1984. Electron microscopy for the identification of plant viruses in vitro preparations. [In]: *Methods in virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski (ed.) Academic Press, New York, tom 7: 87-120.

- Milne R. G., Luisoni E., 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology* 68: 270-274.
- Milne R. G., Luisoni E., 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. [In]: *Methods in virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski (ed.). Academic Press, London, tom 6: 256-281.
- Milne R. G., Lese mann D. E., 1984. Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. [In]: *Methods in virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski (ed.). Academic Press, New York, tom 8: 85-101.
- Nermut M. V., 1972. Negative staining of viruses. *J. Microsc.* 96: 351-362.
- Roberts I. M., 1977. Negative staining in electron microscope serology. *Micron* 8: 215-216.
- Roberts I. M., 1986. Practical aspects of handling, preparing and staining samples containing plant virus particles for electron microscopy. [In]: *Developments and application in virus testing*. R.A.C. Jones and L. Torrance (ed.), Wellesbourne, Assoc. Appl. Biol. 1: 213-243.
- Roberts I. M., 1988. The structure of particles of tobacco ringspot nepovirus: evidence from electron microscopy. *J. gen. Viol.* 69: 1831-1840.
- Szyndel M. S., 1991. The suitability of different immunoelectron microscopy techniques in serological investigations of carlaviruses. [In]: *Virus diseases of plants*. SGGW (ed.), Proc. 20th Conf. Polish Plant Virol. Warsaw, 22-23 Oct. 1987: 63-72.
- Zaitlin M., Israel H. W., 1975. Tobacco mosaic virus. CMI/AAB Descrip. Plant Viruses nr 151.