

发育中的痘苗病毒的超微形态

洪涛 周静仪 方肇寅 张家驹

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

用冷冻蚀刻技术研究了发育中的痘苗病毒的形态,发现了以下的一些结构:

1. 发育中的痘苗病毒在形成包膜时,在其内膜外表面上出现一个无颗粒区,这个无颗粒区致密光滑,并且总是偏在病毒颗粒的边缘。
2. 在折裂的颗粒上发现了包着核样小体的光滑而致密的膜性结构,其位置和性质与无颗粒区非常相似。
3. 在病毒发育过程中出现六角形态。
4. 在病毒发育的基质中发现少量晶格样结构。

讨论了痘苗病毒形态发育过程中包膜的形成、包膜与核样小体的关系,并以示意图显示了发育中的痘苗病毒的立体结构。

病毒的形态发生学 (Morphogenesis) 是基础病毒学中最重要课题之一。它研究病毒在宿主细胞内发育的全过程,以及病毒与宿主细胞的关系,这对于认识和防治病毒病都是不可缺少的^[1]。

痘病毒是一组包括人和动物多种病毒疾病的病原。近年来由于分子病毒学的兴起,痘病毒成了研究基础病毒学的重要模型^[2-5]。就病毒的形态和生化结构而论,其结构是很复杂的,仅组成痘苗病毒的多肽就有 30 多种^[6-8],它有独自の酶系统,控制其在细胞内组装的过程^[9,10]。以往对痘病毒的形态学研究,主要是靠超薄切片和负染技术,发现了组成病毒的表面线状条纹和内部的哑铃状核心和侧核^[11-14],由于方法学上的限制,看不到这些结构的细节。

冷冻蚀刻技术是近年来发展起来的一项先进技术^[17-20],可观察到生物结构的层次,尤其适用于生物膜结构的研究。利用这一技术,我们对发育中的痘苗病毒进行了一些观察,发现了病毒结构上的某些细

节,增进了对这样一个体积大而结构十分复杂的病毒形态的认识。

材料和方法

(一) 病毒-细胞系统

用痘苗病毒塔什干株以 10^{-1} 接种 HeLa 单层培养细胞,取感染后 72 小时的病变细胞(光学镜下 CPE++—+++)用橡皮小铲刮下,低速离心使成细胞沉淀块,立即用 2.5% 二甲胍酸钠缓冲的戊二醛 (pH 7.2) 固定半小时,缓冲液洗后分别进行冷冻蚀刻和超薄切片。

(二) 冷冻蚀刻

将戊二醛固定过的感染细胞转到 30% 缓冲甘油内浸泡,作为防冰晶的处理。复型在 HFZ-1 型冷冻蚀刻装置上进行。

为了做比较观察同时制备了超薄切片,感染细胞经戊二醛前固定之后,用缓冲液刷洗并经 1% OsO_4 后固定半小时,常规脱水后用国产 618* 环氧树脂于 60°C 下聚合包埋在 2 号胶囊内^[21]。

本文于 1980 年 4 月 16 日收到。

河北医学院电镜室给予技术协助,特此致谢。

结 果

在痘苗病毒感染早期的细胞胞浆内见到颗粒性基质组成的病毒“工厂”，此处没有任何细胞器，只有平均直径约 3 毫微米

的粗大颗粒和由这些颗粒组装起来的正在发育的病毒颗粒（图版 I），与同样标本的超薄切片比较，后者病毒颗粒为平面结构，病毒颗粒呈单方向的卵圆形，这显然是制片过程中的人为变形（图 1）。有关该病毒

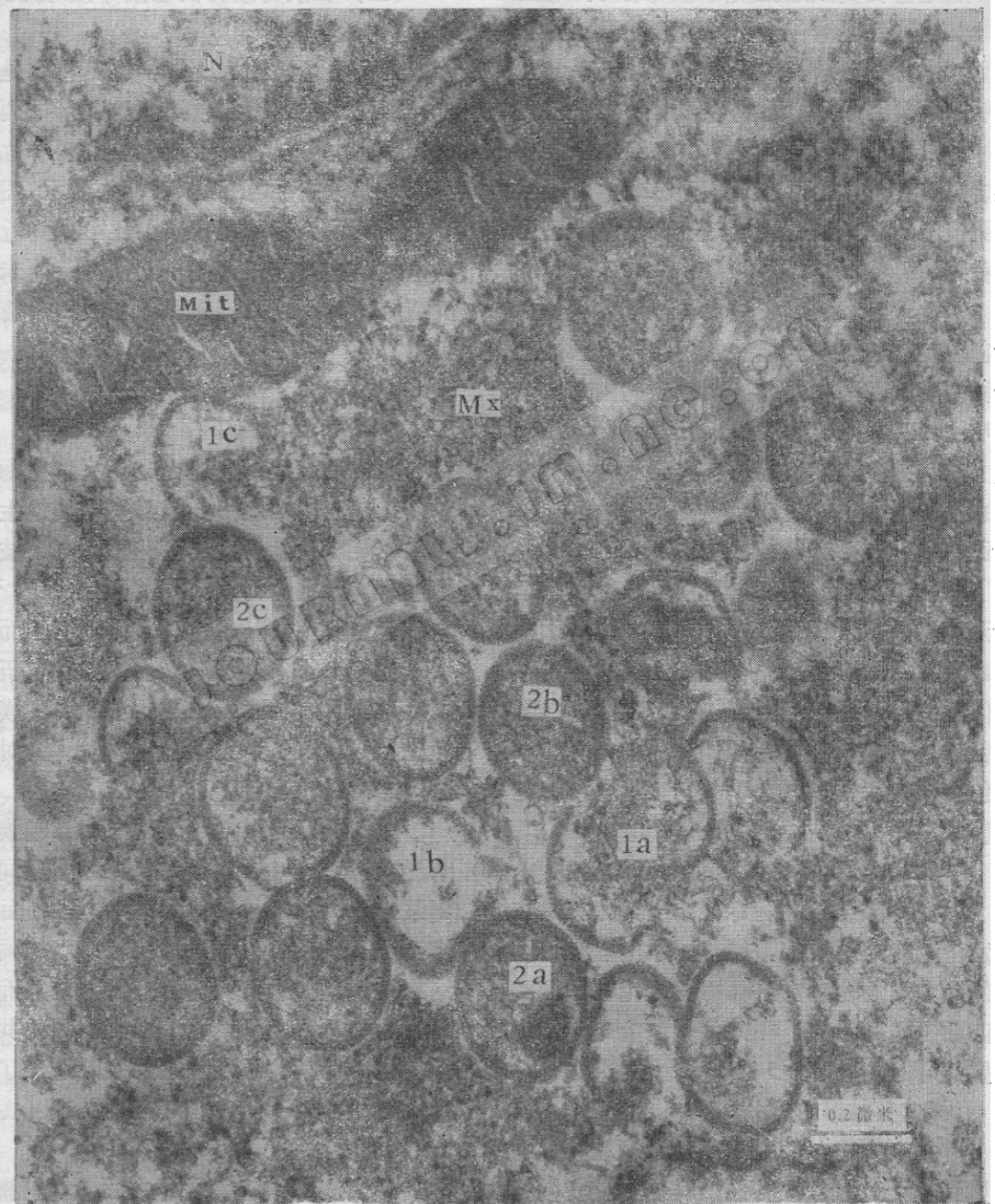


图 1 痘苗病毒感染的 HeLa 细胞超薄切片，胞浆内基质上发育中的病毒颗粒
Mx 为基质，Mit 为呈凝聚型的线粒体，N 为细胞核的一小部分，1a—1c 为正在形成包膜的病毒颗粒，2a—2c 为比较成熟的病毒颗粒，2a 中可见到着色很深的偏核结构。

的超薄切片的研究已早有报道^[11-15]，这里主要描述在冷冻蚀刻上所观察到的结果。

(一) 发育中的痘苗病毒的包膜及其裂解面

病毒在胞浆基质上形成时一个明显的特点是出现类似细胞膜的包膜结构，它把颗粒性基质逐渐包绕而形成病毒颗粒的锥型。发育早期即较大的病毒颗粒几乎都呈平面断裂因而只能看到包膜的平面像，此时可以看出其双层包膜结构和组成双层膜结构的亚单位的形态(图版 I-2)。值得特别指出的是，在这种早期病毒颗粒中已可看到明确的核样小体(图版 I-3、II-3)。

比较晚期的病毒颗粒与早期的不同，它总是从包膜双层结构之间裂开，因而出现相应的凹面和凸面，即包膜的内外两个叶片，凹面即外叶片的内表面比较光滑，其上附着有少量较大的颗粒，凸面即内叶片的外表面上颗粒较细而丰富，有时还可看到其排列成行或条纹状结构(图版 I-5d)。

在包膜裂解之后，常常可以见到一个无颗粒区，这个无颗粒区质地光滑，处于病毒颗粒的一端，呈偏核样结构，此种结构不仅见于平面裂解的颗粒(即较大的颗粒，图版 II-4)，尤其明显地见于凸面的颗粒(即包膜内叶片上，图版 II-1)，有时也可在包膜的凹面上见到(图版 II-4 下)。

(二) 发育中病毒颗粒的六角形态

在冷冻裂解的病毒颗粒上，尤其是在发育的晚期颗粒上，往往显示出程度不同的六角形的轮廓，这种情况无论在凸面和凹面上均可看出，在某些颗粒上是十分明显的(图版 I-5 a—5 e、II-2 上)。

(三) 核区与核样小体

如上所述，在裂解的病毒颗粒上常常见到处于边缘部位的偏核样结构。我们把这种结构叫做核样小体，其表面光滑、结构致密、大小不等。一般在早期颗粒中核样

小体较大，晚期则较小。值得特别指出的是，有时在核样小体的外面可以看到一层致密而光滑的膜样结构，看上去和前面所描述的包膜内叶片的无颗粒区从质量和位置上都颇相似(图版 II-2 下)。

(四) 在病毒发育的基质中发现的特殊晶格样结构

这种晶格样结构比较罕见，它们是由十分规则均等大小的微细颗粒成行排列而成，因此也可以看到组成晶格的亚单位之间的六邻体关系(图版 I 双箭头所示，图版 II 箭头所示)，有时在基质中还可见到近似晶格的结构，它们好像是刚刚露头而未被折裂的病毒颗粒的外表面(图版 I 单箭头所示)。

讨 论

近年来，生物膜研究成了医学生物学中最活跃的领域之一。因为生物膜是生理活动和疾病发生的重要基础，而电镜技术是生物膜形态结构研究的主要手段^[17-21]。与细胞膜比较，病毒的膜简单得多，因而便于研究^[22]。我们应用冷冻蚀刻技术，研究了发育中的痘苗病毒的结构。发现了膜间颗粒、无颗粒区、六角形态、核样小体，对于这些结构我们进行了下列的分析。

病毒发育的早期可能因为病毒包膜刚刚形成，其分子结构尚未完善，因而随同病毒浆一起折断使早期病毒颗粒呈平面图像，进一步的发育，病毒颗粒在缩小的同时结构变得比较致密，包膜比较完整，从而在冷冻蚀刻复型上遵循着一般生物膜的共同规律从单位膜双层叶片之间裂开造成了包膜的凸面和凹面两个相对应的图像(图版 I)。

痘苗病毒的包膜裂解之后暴露出膜间颗粒，它们密集地分布在包膜的内叶片上。其形态和分布的情况不仅与一般细胞膜不

同^[17-19]，而且与已知的仙台病毒的膜间颗粒也大不相同，后者膜间颗粒几乎全部附着在凹面上（即病毒包膜外叶片的内表面）^[22]。生物化学研究证明痘苗病毒的包膜合成有独立于宿主细胞的完整的酶体系^[9,10]。至今除了仙台病毒之外，对其它病毒的包膜的形态结构尚不清楚。痘苗病毒与仙台病毒膜间颗粒的差别，可能反映着不同病毒包膜上化学结构（如糖蛋白）的不同。

值得特别指出的是，我们在病毒包膜的内叶片上（偶尔也在外叶片上）发现了偏心的**无颗粒区**（图版 II-4），而且在它的三维图像上可以清楚地看出它与偏心的核样小体有着密切的关系（图版 II-2）。这种精巧的结构无论我们自己或前人在超薄切片上从未见到，这又一次说明在生物膜结构研究中冷冻蚀刻技术的独到之处。根据本实验所得资料及以往超薄切片和负染技术的研究结果，我们将发育中的痘苗病毒绘成立体结构图，显示病毒各结构之间的形态学关系（图 2-4）。如图 3 所示，痘苗病毒在发育的早期作为病毒基因物质的**核样小体**即开始形成。在病毒包膜开始出现并逐渐包绕病毒浆质和核样小体时，核样小体可能也需要进一步的成熟。此时，作为病毒颗粒的限制膜的病毒包膜与核样小体相辅相成，其形态学的表现是偏心的位置和包膜上相应的**无颗粒区**。设想的另一种可能如图 4 所示：病毒的核样小体有自己独立的包膜，在它的外面依次为病毒

浆和双层大的包膜，这种情况与超薄切片观察的一般病毒结构相符。但是，从我们的实验中确实看到发育中的痘苗病毒的核

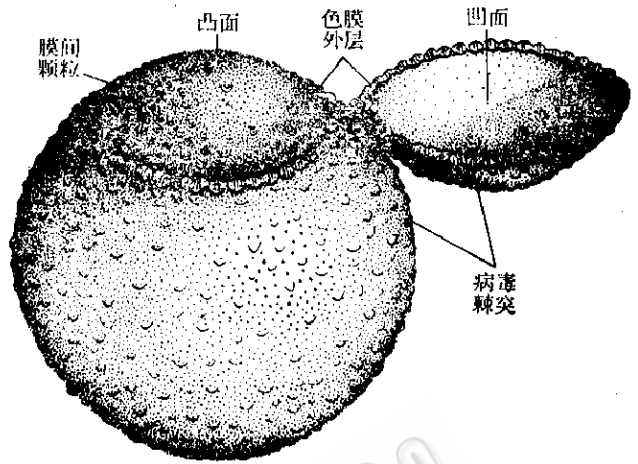


图 2 发育中的痘苗病毒包膜的裂解示意图

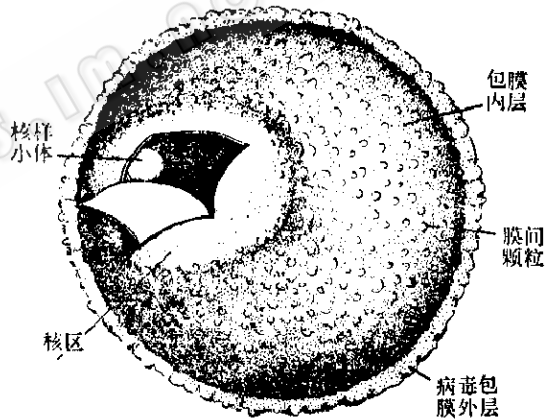


图 3 包膜内层无颗粒区与核样小体的关系示意图

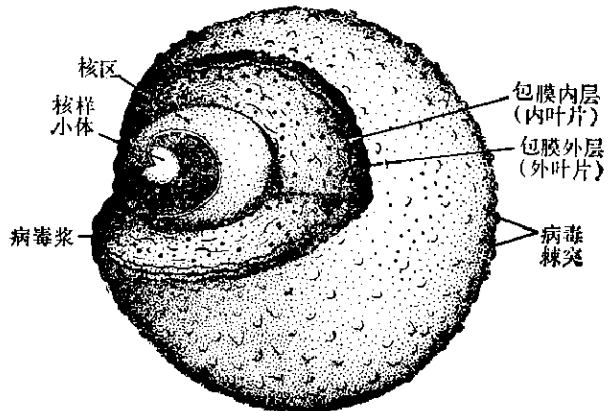


图 4 发育中的痘苗病毒立体结构示意图

样小体与整个病毒的包膜有着非常密切的关系。

我们的实验中发现,痘苗病毒在发育过程中出现六角形态(图版 I、II)。一般认为发育中的痘苗病毒呈圆形或卵圆形,而成熟的病毒呈钝角砖形,六角形态从来与痘苗病毒无关^[40-45]。在超薄切片上,未成熟的痘苗病毒往往呈卵圆形,如图 1 所示,几乎所有的病毒颗粒均呈单一方向的卵圆形,这显然是因为标本制作(切片)过程中的挤压所造成的。由于冷冻蚀刻技术以快速低温冷冻取代了标本固定包埋等容易产生人工损伤的操作,使超薄切片或负染技术不易看到的病毒的本来面貌得到显示。在病毒形态中,六角形态为 20 面体病毒结构的共同特点,痘苗病毒在发育中也具有这一共性,说明它在组装过程中可能也需要遵循圆形或近似圆形结构的几何力学结构原理^[23]。至于在成熟病毒颗粒中,为什么失掉六角形,有待深入的研究。

我们对于在病毒发育的基质内发现的少量呈晶格排列的结构的性质一无所知,因为这种晶格结构未能在细胞质的其他部位发现,我们推测,它可能是与病毒发育相关的物质。由于在基质中有时可以见到刚刚露头而未被裂解的病毒颗粒的外表面(图版 I 单箭头所示),晶格结构与它颇为相似,所以认为这种晶格结构可能是装配病毒表面的某种规则性结构的前身。

参 考 文 献

- [1] Joklik, W. K.: *Annual Review of Genetics*, 5: 297—341, 1971.
- [2] Nakano, J. H.: *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*, Vol. 1, pp. 376—379, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1977.
- [3] Joklik, W. K.: *Annual Review of Microbiology*, 22: 359—390, 1968.
- [4] Sarov, I. and Joklik, W. K.: *Virology*, 50: 593—602, 1972.
- [5] Sarov, I. and Joklik, W. K.: *Virology*, 52: 223—233, 1973.
- [6] Pennington, T. H.: *J. Gen. Virol.*, 25: 433, 1974.
- [7] Harper, L. et al.: Orthopoxvirus differentiation by SDS-PAGE of intracellular Polypeptides, Abstracts of the Fourth International Congress for Virology, pp. 553, The Netherlands, 1978.
- [8] Payne, L. G.: The Polypeptide Composition of Extracellular Enveloped Vaccinia Virus, Abstracts of the Fourth International Congress for Virology, pp. 554, The Netherlands, 1978.
- [9] Joklik, W. K.: *Zinsser Microbiology*, 16th Ed. pp. 828—848, Appleton-Century-Crofts/New York, 1976.
- [10] Fenner, F. et al.: *The Biology of Animal Viruses*, 2nd Ed. pp. 207—220, Academic Press, New York and London, 1974.
- [11] Dales, S. and Mosbach, E. H.: *Virology*, 35: 564—582, 1968.
- [12] Morgan, C. et al.: *J. Exp. Med.*, 100: 301—310, 1964.
- [13] Tsuruhara, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 47: 549—554, 1971.
- [14] de Harven, E. and Yohn, D. S.: *Cancer Research*, 26: 995—1008, 1966.
- [15] Hung Tao et al.: *Chinese Medical Journal*, 82: 718—730, 1963.
- [16] 洪涛等: *微生物学报*, 9(3):210—219, 1963.
- [17] Moor, H.: *Int. Rev. Exp. Path.*, 5: 178—216, 1966.
- [18] Orci, L. and Perrelet, A.: *Freeze-Etch Histology, A Comparison Between thin Section and Freeze-Etch, Replicas* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.
- [19] Branton, D.: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 261: 133—138, 1971.
- [20] 方肇寅、洪涛等:《*生物医学超微结构与电镜技术*》,科学出版社,北京,1980年,第248—287页。
- [21] 洪涛等:《*生物医学超微结构与电镜技术*》,科学出版社,北京,1980年,第110—152页。
- [22] Kim, J. et al.: *Virology*, 95: 523—535, 1979.
- [23] 洪涛:《*生物医学超微结构与电镜技术*》,科学出版社,北京,1980年,第386—398页。

SOME FREEZE-ETCHED ASPECTS OF VACCINIA VIRUS IN THE PROCESS OF DEVELOPMENT

Hong Tao Zhou Jing-yi

Fang Zhao-yin Zhang Jia-ju

(*Department of Virus Morphology, Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

An electron microscopic study has been carried out on vaccinia virus infected HeLa cells by using the advantage of the freeze-etching technique, which is characterized by preferentially splitting of biomembranes and giving the specimens a stereo-appearance. Some new informations have been achieved and were summarized as followings:

1. The fracture faces and intramembrane granules:

The fracture planes of the immature virus particles varied according to the degree of maturation; at the initial stage the particles being just formed were always flatly fractured. With further development when the particles became smaller and denser they were in turn fractured through in between the bilayer of the envelope. Consequently two different faces appeared. The convex face was interpreted as the outer surface of the inner leaflet of the envelope and the concave face the inner surface of the outer leaflet. Most of the intramembrane granules were found on the convex faces

of the envelopes.

2. The granules free area:

This was characterized with smooth membranous structure eccentrically located on the periphery of the intermediate particle. As the area was often seen associated with an underneath nucleoid structure, so it was also designated as the envelope of the nucleoid (core).

3. The hexagonal shape found in the intermediate particles:

As shown in figure I and II, the hexagonal shape being so distinct so as an icosahedron virus. This shape has never been seen so far, either in ultrathin section or negative stained specimens.

4. The crystalline structures found in the virus producing matrix:

The structure was consisted of regularly arranged subunits among them some hexomer relationship could be revealed and these were thought to be precursor materials making of the envelopes.

Some drawings illustrating the presumptive stereo-morphology of the immature vaccinia virus were also presented.