

山羊痘病毒形态发生过程的电子显微镜研究

丁明孝 付宏兰 王梅 翟中和

(北京大学生物学系, 北京)

向德林 周青山

(农业部兽医药品监察所, 北京) (湖南师范大学生物学系, 长沙)

用超薄切片、冷冻蚀刻和放射自显影等几种电镜技术研究了一种繁殖比较缓慢的痘病毒——山羊痘病毒 (Goat pox virus) 的形态结构及发生过程。冷冻蚀刻技术显示了发育早期的病毒粒子中已开始有核心和侧体的分化, 在病毒的成熟与释放过程中, 其形状大小及囊膜膜内微粒数量与分布发生一系列的变化。电镜放射自显影术显示了毒浆结构与病毒发育的关系。在感染晚期病毒诱导的一种包涵体样结构中不含 DNA。

关键词 山羊痘病毒; 结构; 形态发生

人们对痘病毒 (特别是其典型代表痘苗病毒) 已进行了大量的研究^[1-8]。但关于复制周期很长的一种病毒——山羊痘病毒 (Goat pox virus, 简称 GPV) 的报道却很少, 并且主要是病毒的流行病学和免疫学等方面的工作, 尚未见到该病毒形态发生方面的研究。GPV 是危害山羊和绵羊的一种主要病原, 该病在我国、印度等国家均有流行。对 GPV 的超微结构及其繁殖过程的深入研究可为该病的鉴定和防治提供依据。此外, 由于该病毒繁殖周期长, 便于观察其形态发生的详细过程, 为深入研究痘病毒的发生过程提供了一个良好的材料。我们采用超薄切片、冷冻蚀刻和扫描电镜等多种电镜技术研究了 GPV 的释放过程^[10]和囊膜形成过程, 本文就 GPV 的形态结构及在细胞内的复制过程进行较全面的报道。

材料与方 法

(一) 病毒株

系国内分离的山羊痘病毒弱毒株, 滴度为 10^7

TCID₅₀/0.1ml, 由农业部兽医药品监察所提供。

(二) 电镜试样制备

将 GPV 接种于长成良好单层的羊睾丸原代细胞上, 感染 120—168 小时后, 50—70% 的细胞出现 CPE, 用 1.5% 戊二醛的 Hanks 液固定细胞, 按常规方法制备超薄切片、冷冻蚀刻^[9]、扫描电镜和细胞表面复型样品^[10]。或将细胞冻融两次, 经微孔滤膜和超速离心提纯后, 制备负染样品。冷冻蚀刻样品和细胞表面复型样品分别在日立 HFI-1 型冷冻断裂装置、HVS-5 型真空喷镀仪和 Balzers 高真空冷冻蚀刻仪中进行。上述样品分别于 H-300、H-500 和 JEM-100CX 透射电镜和 35-C 扫描电镜下观察。

(三) 放射性同位素标记

在 GPV 感染羊睾丸细胞 2 小时后, 用 ³H-胸腺嘧啶核苷 (比度 25ci/mM, 浓度 1μci/ml, 上海原子能研究所生产) 进行标记, 分别在感染 36、72、120 和 168 小时后固定细胞, 制备超薄切片^[11]。

结 果

GPV 复制周期很长, 与痘苗病毒不同, 病毒感染 72 小时后, 细胞刚出现 CPE, 120

本文于 1985 年 5 月 11 日收到。

小时后,约有 50% 左右的细胞出现 CPE, 168 小时后,大部分病变细胞仍不脱落。

(一) 病毒的形态与大小

在 GPV 感染 120 小时以上的宿主细胞内外,均可见到大量的成熟病毒(图版 I—II),在超薄切片中,成熟的病毒粒子呈两端钝圆的梭形,大小为 $170 \times 270 \text{ nm}$,可以清楚地观察到病毒由囊膜、侧体和核心几部分组成(图版 I-1 左下),病毒的核心呈哑铃形,周缘电子致密,内部电子密度较低,可见到直径约 10 nm 的绳索状结构(图版 I-1 左下)。在冷冻蚀刻样品中,某些偶尔从中部断裂的病毒核心中,未见有颗粒状结构,而电镜放射自显影的结果表明,病毒的核心可准确的被 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记,说明其中含有 DNA(图版 I-1 左下),核心的两侧为病毒的侧体结构。冷冻蚀刻技术显示出病毒的侧体呈梭形,中间最大直径为 100 nm (图版 II-3 左上,箭号),外表面似乎由膜状结构围绕,上面仅有少量的膜内微粒。

在超薄切片样品中,可观察到病毒囊膜的层次(图版 II-4)。释放到细胞外的成熟病毒由两层膜结构围绕,外层膜常常不完整,它可能来自宿主细胞质膜,这在以出芽方式向细胞外释放的病毒中尤为清楚(图版 I-2-D、E),冷冻蚀刻技术进一步显示了病毒囊膜的细微结构:在细胞质内成熟病毒的 PF 和 EF 面上都充满了直径为 $7-15 \text{ nm}$ 的膜内微粒(图版 II-3),而大多数细胞外成熟病毒的 PF 和 EF 面上,却仅有少量的膜内微粒(图版 I-2)。不仅如此,成熟的病毒在细胞质内呈球形,在细胞外呈不规则的球体,其直径大小为 $320-380 \text{ nm}$,这与超薄切片所见有明显的不同,因在病毒囊膜形态发生研究一文中拟对这一现象作详细报道,这里不再赘述。

在负染色的样品中,有的病毒呈钝角砖形(图版 I-2-A),有的略呈梭形,或介于二者之间,其大小约 $240-290 \text{ nm}$ 。病毒表面均未观察到象痘病毒表面所见到的管形嵴状结构(tubular ridges),由于取材于冻融悬液,故难以区分它们是细胞内还是细胞外的病毒。我们统计了大量扫描电镜下的病毒粒子,其大小为 $260-300 \text{ nm}$ 的椭圆形粒子^[10],为了进一步观察它们的 ES 面的细节,还制备了病毒表面复型的样品(图版 I-2-B)。

(二) 病毒形态发生过程

在 GPV 感染 72 小时的细胞中,仅可见到少量的毒浆结构(viroplast),而在感染 120 小时以上的细胞中,却很容易观察到病毒的毒浆结构,及处于不同发育阶段的病毒,同时还可见到大量成熟病毒存在于细胞质中或释放到细胞外(图版 I, 图版 II)。此时,细胞结构仍比较完整,核仁依然存在,核膜完好,核膜孔的形态、大小及细胞染色质的分布均不出现明显的变化(图版 I-1)。在 GPV 感染的细胞中,未见到病毒诱导的多核细胞。

GPV 是在细胞核附近电子致密的毒浆结构周围装配与成熟的。图版 II-3、4 中显示了病毒形态发生的可能过程:

1. 毒浆周围出现弧状膜样结构,冷冻蚀刻样品显示出它是由双层颗粒组成,外层颗粒有时呈突起状(图版 II-3 细箭号)。超薄切片中常常可以见到膜内侧物质与周围电子致密的纤维状和颗粒状物质相连,呈慧星状(图版 II-4),毒浆基质中的颗粒成份在冷冻蚀刻样品中清晰地显示出来(图版 II-3)。

2. 直径为 $250-270 \text{ nm}$ 的圆形病毒粒子形成。其内部由较为均一且电子密度低于毒浆基质的纤维状物质组成,冷冻蚀刻技术显示出其内部存在均一颗粒结构,但

其直径在 350nm 以上。值得注意的是在病毒毒浆周围某些区域,还可以观察到一种直径约 400nm 由均一颗粒组成的圆形结构(图版 II-3 左下),其中有些还可以分辨出有类似成熟病毒的哑铃状核心和侧体的分化,但均由颗粒结构组成。它的断裂特性与一般生物膜结构不同,常常在其中部裂开。电镜放射自显影的结果表明,这类内部电子致密且均一的病毒粒子已被 $^3\text{H-T}$ 所标记。

3. 病毒核酸的浓缩和核心与侧体等结构的分化,导致病毒内部出现一系列的复杂变化,其电子密度变为不均一,而且颗粒成份在病毒内的分布也发生变化。此时仍可见到病毒周缘的双层颗粒结构(图版 II-3)。

4. 核心与侧体的出现,病毒趋于成熟,病毒粒子体积缩小。超薄切片中的形态由圆形变成近似梭形,但在冷冻蚀刻样品中病毒形态一直呈规则的球形。

5. 多数成熟的病毒粒子以出芽的方式直接向细胞外释放(图版 I-2-D、E、F),并不需要首先进入细胞质的空泡中。常常可见到许多与细胞质膜垂直分布的微丝结构,相应的细胞膜表面存在大量正在释放的病毒粒子,某些微丝甚至与释放中的病毒相连(图版 I-2-F)。这种特殊的释放方式导致细胞表面出现了特异的微绒毛,在病毒释放后细胞表面的断痕上看得非常清楚(图版 I-2)。正常细胞微绒毛呈圆形,直径约 90—110nm(图版 I-2 细箭号),病毒诱导的特异微绒毛,直径相当正常微绒毛的 3—4 倍,而且形态也不规则(图版 I-2 粗箭号)。病毒释放中另一个现象是本来膜内微粒丰富的细胞质膜的 PF 面上,由于病毒粒子的附着和向外释放,膜内微粒大大减少甚至消失,但在正在释放的病毒粒子的基部尚存少量的膜内微粒(图版 I-

2-D)。

(三) 电镜放射自显影研究结果

病毒感染早期,细胞质中出现的电子致密的毒浆基质,可被大量的银颗粒标记(图版 III-5),说明其中含有病毒 DNA,而毒浆周围的细胞质基本上见不到银颗粒。随着病毒的发育,毒浆内部和周围出现了越来越多的形态不同的病毒粒子,虽然毒浆基质逐渐减少,其电子致密程度也降低了,但仍可被 $^3\text{H-T}$ 所标记(图版 III-6)。与此同时,某些内部电子致密的未成熟病毒也可被 $^3\text{H-T}$ 标记。在病毒感染的晚期,大量成熟病毒释放到细胞外,多数成熟病毒均可被 $^3\text{H-T}$ 标记,细胞质中残存的病毒和毒浆基质也有少量银粒(图版 III-7、8)。

在 GPV 感染晚期的细胞质中,常常可以观察到一种特殊的包涵体样结构,它是由直径 60—70nm 的电子致密颗粒连成的绳索状结构组成,大小可达数微米(图版 III-7)。其结构与痘苗病毒感染的胞胞中出现的 A 型包涵体和 B 型包涵体均有所不同。这种结构从未被 $^3\text{H-T}$ 标记,说明其中不含有病毒 DNA 成份。

讨 论

GPV 的形态结构及形态发生的基本过程与痘苗病毒相似^[1,4],但又有不同于痘苗病毒的某些特点。在形态结构上的最显著差异是病毒囊膜的超微结构,无论在负染色还是冷冻蚀刻的样品中,均见不到类似痘苗病毒囊膜上的嵴状结构^[7]。GPV 的囊膜结构更接近于一般的生物膜,但又不同于细胞质膜,与牛传染性鼻气管炎病毒^[12]、辛德毕斯(Sindbis)病毒^[13]等的囊膜也有明显的不同。特别是细胞内成熟病毒与释放到细胞外成熟病毒的囊膜的膜内微粒在数量与分布上有很大的区别,再加上

GPV 复制缓慢的特点,使之有可能成为研究膜发育过程较为理想的材料。

成熟的 GPV 的形态趋于球形,这在冷冻蚀刻样品中看得十分清楚,很可能在负染色或超薄切片中所见到的钝角砖形或近似梭形的病毒形态是制样中的膺象。

痘苗病毒的形态发生资料主要来自超薄切片的研究和少量的冷冻蚀刻的工作^[6-8]。我们将几种电镜技术结合起来,以便对痘病毒形态发生做更深入的探索。冷冻蚀刻样品中显示超薄切片下电子致密的毒浆结构是由大量的微粒成份组成。电镜放射自显影证实其中含有大量 DNA 成份,分布较为均一,显而易见,毒浆具备病毒装配的主要成份,而且,内部呈电子致密的发育中的病毒粒子可以被 $^3\text{H-T}$ 标记,说明病毒 DNA 已进入病毒粒子中。电镜自显影还进一步显示了病毒的发育阶段与毒浆结构的关系。病毒感染晚期细胞质中出现的电子致密结构与病毒毒浆有某些相似,但它们从未被 $^3\text{H-T}$ 标记,说明可能仅仅是病毒诱导产生的一种包涵体样结构,其生物学意义尚不清楚。

在超薄切片样品中,很难区分发育早期未成熟病毒中的核心与侧体等结构,只有在趋于成熟的病毒中,这些结构才明显地显示出来。但在冷冻蚀刻样品中,我们发现某些未成熟病毒中已可分辨出核心和侧体结构。这说明,可能在病毒 DNA 进

入病毒囊膜中以后(即本文提到的第二阶段)就已初步形成了核心与侧体等结构。这与经典的病毒发育模式图^[4]有所不同,其原因可能是冷冻蚀刻技术在显示病毒某些内部结构上比超薄切片技术更为优越。

综合采用多种电镜技术还清楚地显示出 GPV 释放过程及其与细胞内部微丝结构和特异微绒毛的关系。通常在组织培养细胞中痘苗病毒只有 10% 以上的病毒粒子释放到细胞外^[4],而 GPV 感染晚期的细胞表面常常覆盖大量的成熟病毒粒子。

参 考 文 献

- [1] Dales, S.: *Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophage: An Atlas*, Academic Press, London, p. 109, 1973.
- [2] Stern, W. and S. Dales: *Virology*, **75**: 242, 1976.
- [3] Dales, S. and E. H. Mosbach: *Virology*, **35**: 564, 1968.
- [4] Du'becco, R. and H. S. Ginsberg: *Virology*, 3rd ed., Harper and Row Publishers, p. 1077, 1980.
- [5] Morgan, C.: *Virology*, **73**: 43, 1976.
- [6] Easterbrook, K. B.: *J. Microbiol.*, **18**: 403, 1972.
- [7] Easterbrook, K. B.: *J. Microbiol.*, **15**: 337, 1972.
- [8] 洪涛、周静仪: *微生物学报*, **20**: 240, 1982.
- [9] 丁明孝等: *电子显微学报*, **2**: 24, 1983.
- [10] 施扬谷等: *病毒学报*, **1**: 43, 1985.
- [11] 丁明孝、翟中和: *电子显微学报*, **1**: 60, 1982.
- [12] 丁明孝等: *科学通报*, **30**: 114, 1985.
- [13] Brown, D. T., et al.: *J. Virol.*, **10**: 524, 1972.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE MORPHOGENESIS OF GOAT POX VIRUS

Ding Mingxiao Fu Honglan Wang Mei Zhai Zhonghe

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Xiang Delin

(The Control Institute of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals, Ministry of Agriculture, Beijing)

Zhou Qingshan

(Department of Biology, Hunan Teacher's University, Changsha)

The morphology and morphogenesis of goat pox virus in goat testicular cells were studied by means of several EM techniques including sectioning, freeze-etching replica and EM autoradiography.

The result of freeze-etching showed that the cores and the lateral bodies can be identified in the early stage of viral development. In the processes of viral maturation and release, the shape and size, as well as the number and the distribution of viral intramembrane particles,

altered gradually.

EM autoradiography demonstrated the relationship between viroplasm and viral development and also proved that the inclusion body-like structures induced by virus at the late stage contained no DNA.

Key words

Goat pox virus; Structure; Morphogenesis

图 版 说 明

图 版 I

1. GPV 感染120小时的羊睾丸原代细胞。细胞质中出现大量成熟的病毒粒子(V),此时核仁(Nu)依然存在,核膜仍比较完整($\times 28,000$)。插入图为 $^3\text{H-T}$ 持续标记的电镜放射自显影图片,病毒粒子可准确的被 $^3\text{H-T}$ 标记($\times 72,000$)。

2. 病毒感染168小时的冷冻蚀刻电镜图片,清楚地显示了细胞表面正常微绒毛(细箭号)和病毒诱导产生的特异微绒毛(粗箭号)。双箭号显示一个从中部断裂的成熟病毒粒子($\times 28,200$)。A. 负染色电镜图片,病毒粒子呈钝角三角形,240—290nm($\times 93,600$)。B. 细胞表面复型的电镜图片,可观察到病毒FS面的某些细节($\times 98,000$)。C. 释放到细胞外成熟病毒,病毒近似球形,其PF和EF面上仅有少量膜内微粒($\times 100,000$)。D. 正在以出芽方式向细胞外释放的病毒粒子,仅在其基部有少量的膜内微粒($\times 65,000$)。E. 超薄切片中正在向细胞外释放的病毒粒子($\times 79,800$)。F. 与细胞膜垂直分布的大量微丝结构(F)和正在释放的病毒粒子。可清楚地区别细胞微绒毛(细箭号)和病毒诱导的特异微绒毛及其与病毒释放的关系($\times 15,000$)。

图 版 II

3. GPV 感染120小时的冷冻蚀刻电镜图片,可以见到细胞质中的毒浆结构(VP)及不同发育阶段的病毒粒子(图

中 1—4 所示)。粗箭头指示发育中的病毒外层的双层颗粒结构,细箭头指示呈突起状的外层颗粒 ($\times 30,000$)。左上插图显示病毒侧体结构(箭头)($\times 44,000$)。左下插图:直径约 400nm 的早期发育病毒粒子中,已可辨别出核心 (C) 和侧体 (L) 的分化 ($\times 72,000$)。

4.超薄切片电镜图片,图中 1—5 显示病毒的发育过程,5 显示一个即将释放到细胞外的病毒粒子 ($\times 31,000$)。插入图为一个释放到细胞外成熟病毒的放大图片,可看出病毒囊膜的层次及核心中绳索状结构 ($\times 93,900$)。

图 版 III

5.发育早期的毒浆结构,毒浆被大量 $^3\text{H-T}$ 标记 ($\times 14,600$)。

6.处于不同发育阶段中的病毒粒子出现在毒浆基质中,此时毒浆基质电子致密度减少,标记银粒较为分散 ($\times 14,900$)。

7.病毒感染晚期,细胞质中可观察到一种特殊的包涵体样结构 (IB),它们未被 $^3\text{H-T}$ 标记 ($\times 14,900$)。

8.病毒感染晚期,细胞质中仅少数残留病毒和某些部位可被少量 $^3\text{H-T}$ 标记,释放到细胞外的大量成熟病毒几乎都可被 $^3\text{H-T}$ 标记 ($\times 14,900$)。

Plate I

1. Primary culture of goat testicular cells at 120th hr p. i. (postinfection). Many mature virions (V) emerged from the cytoplasm, while the nucleus (Nu) and nuclear membranes still kept intact. The insert is an EM autoradiography of $^3\text{H-T}$ labeled sample. The virions could be exactly labeled with $^3\text{H-T}$.

2. Freeze-etching replica at 168 hr p. i. showing normal microvilli (fine arrows) and viral induced specific microvilli (thick arrows). The double open arrows show a mature virion fractured through its middle. A. A photograph of negative staining. The virion appeared as brick shape with diameters of 240—290nm. B. The photograph of the replica of cell surface. Some details can be seen on the viral ES. C. The mature viruses releasing from the cell appeared as spherical shape and only a few intramembrane particles can be seen. D. The viruses are under releasing by means of budding. A few intramembrane particles existed only at their fundus. E. Ultrathin section showing releasing viruses. F. Releasing viruses and large amount of microfilamentary structures (F) verticle to the cell membrane. Cellular microvilli (thin arrow) and viral induced specific microvilli (thick arrow) can be distinguished easily. The relationship between the viral specific microvillus and viral release is clear.

Plate II

3. Freeze-etching replica at 120th hr p. i. The cytoplasmic viroplasm (VP) and viruses at different developmental stages (1—4) can be seen. Thick arrows show the double layered particles of developing viruses. Thin arrow show the projection of outer layer particles. The upperleft insert show the structure of a lateral body (arrow). The underleft insert shows the differentiation of the core (C) and lateral body (L) in a viral particle with the diameter of about 400nm at its early stage of development.

4. Ultrathin section demonstrating the processes (1—5) of viral development. The "5" shows a virion which is releasing out of the cell. The insert is a high magnification of a mature virus released from the cell. The layers of viral envelope and the rope-like structure in the core can be seen.

Plate III

5. The viroplasm at its early stage of development was heavily labeled with $^3\text{H-T}$.

6. Viral particles at different stages of development appeared in the viroplasmic matrices, meanwhile the electronic density of the viroplasmic matrix reduced and the silver particles were rather scattered.

7. The late stage of viral infection. A special inclusion body-like structure (IB) which was never labeled with $^3\text{H-T}$ can be seen.

8. The late stage of viral infection. Only a few viral particles were left in the cell and the cytoplasm was lightly labeled, meanwhile many mature viruses heavily labeled with $^3\text{H-T}$ released from the cell.