

牛传染性鼻气管炎病毒的繁殖的冰冻蚀刻研究

王 晓 丁明孝 翟中和

(北京大学生物学系, 北京)

鲁崎吾 董仁杰

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

用冰冻断裂和蚀刻技术对牛传染性鼻气管炎病毒及其在细胞中的繁殖进行了观察。验证了 Furlong 等提出的疱疹病毒核壳体模型; 同时发现在细胞膜上大片形成吞饮泡, 细胞质泡状结构的膜上颗粒随机分布于 PF 和 EF 面。本文对这些现象与病毒繁殖及细胞骨架的关系进行了讨论。

关键词 牛传染性鼻气管炎病毒; 冰冻蚀刻

关于疱疹病毒及其在细胞内的繁殖, 已用超薄切片和负染色等电镜技术进行了大量研究, 然而在一定程度上由于技术本身的局限性, 仍有许多方面还不清楚或不确定。综合运用多种技术, 不仅有助于验证已有的结果, 而且可望获得新的信息。冰冻蚀刻技术不象超薄切片需经化学固定而易造成细胞成分的破坏、抽提和流失, 也不象负染色因空气干燥过程而带来不可避免的形变, 它在观察颗粒性结构和膜结构等方面有其独到的优点, 并且其图象有立体效果。然而将冰冻蚀刻技术用于疱疹病毒研究的报道却很少^[1-3]。因此, 我们用这种方法对一种牛疱疹病毒——牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, 简称 IBRV) 的繁殖进行了观察。

材料和方法

(一) 细胞和病毒

将牛肾组织细胞在 E-MEM 培养液中生长成良好单层, 然后接种病毒。所用病毒为 IBRV-Bartha-Nu/67 弱毒株, 滴度为 10^6 — 10^7 TCID₅₀/0.1ml。病毒接种量为 20TCID₅₀/细胞。细胞于

感染后 24 小时固定。

(二) 冰冻断裂

用 1.5% 戊二醛 Hanks' 溶液于 0—4℃ 固定细胞 1 小时, 经 Hanks' 缓冲液洗涤后, 在 30% 甘油中浸透 6 小时。然后在液氮中快速冷冻, 在 BAF-400D 高真空冷冻蚀刻仪上断裂 (-110°C — -100°C , 1×10^{-6} 托), 喷镀铂和碳。复型膜在次氯酸钠溶液中腐蚀剥离。

(三) 冰冻蚀刻

其过程与冰冻断裂基本相同, 但用 15% 甲醇取代 30% 甘油作冷冻保护剂, 浸透 15 秒钟, 断裂后在 -110°C — -100°C 、 1×10^{-7} 托条件下蚀刻 3 分钟。

(四) 超薄切片

用 1.5% 戊二醛 Hanks' 溶液固定细胞 1 小时, 1% OsO₄ 后固定 1.5 小时, 上述固定过程均在 0—4℃ 下进行。经乙醇逐级脱水后用环氧树脂 618 包埋, 制备超薄切片。

(五) 负染色

细胞感染病毒后 24 小时, 于 -20°C 冻融 2 次, 离心 15 分钟 (3500rpm), 经孔径为 450nm 的微孔滤膜过滤, 滤液于 140,000g 离心 60 分钟, 沉淀悬浮于少量 Hanks' 溶液中再低速离心, 取上清

本文于 1985 年 9 月 21 日收到。

病毒悬液滴于铜网上,用 2% 磷钨酸(pH7)染色。

复型膜,超薄切片和负染样品均于 JEM-100 CX 电镜下观察。

结 果

(一) 细胞核内病毒的观察

细胞核内常可见成团的毒浆(图版 I-1),有的毒浆有很明显的边界。但病毒核壳体的装配并不局限于毒浆之中。靠近核周围的区域颗粒极为丰富,显然是趋边的细胞染色质和病毒核酸与蛋白,核中央部分颗粒相对较少(图版 I-2)。核内大量分布的大小较为均一的颗粒,其形态与核壳体的衣粒极为相似,也有少量较大的颗粒,似与病毒核心的装配有关(图版 I-3)。经大量观察发现,同时存在着三种形式的装配:裸露的核心的装配,空心衣壳的装配和有核心的核壳体的装配。尚不知道前两种方式是否也能装配出完整的核壳体。

蚀刻后的样品暴露出较深的层次,从而得以观察到核壳体不同部位更为精细的结构(图版 I-4A)。图版 I-4A 所显示的在细胞核内装配的核壳体,因断裂部位不同可分为 5 型。A 型是没有断裂的完整核壳体,蚀刻后外表面露出,图版 I-4B 为其放大图,可较为完整地看到正二十面体中的一面(参见图版 I-4C),呈正三角形,顶点处为五邻体,图中位于上方的五邻体周围可见 5 个衣粒。除顶点以外的衣粒均为六邻体。正三角形每边有 5 个衣粒,大三角形内为由 3 个衣粒构成的小的正三角形。衣粒紧密排列,但衣粒之间仍有一定间隙。某些六邻体可看到六棱柱特征,但图中五邻体的五棱柱特征不明显。衣粒直径约为 12.2 nm,顶端看不到明显的孔,可能为喷涂物所填盖。衣粒顶端不很平滑。B 型和 C 型是沿图 1 所示断面 1 断裂所得, B 型仅为一小片衣壳,内表面光滑,与 A 型(核壳体外表

面)有非常明显的差别, C 型则是剩下的大部分核壳体,从衣壳的缺口中可看到完整的核心的部分表面,上有不太明显的颗粒状突起。当核壳体沿图 1 所示断面 2 断裂时,即得到 D 型和 E 型, D 型为内表面上有一钉状突起的一片衣壳, E 型则是完全剖开的核壳体,其核心呈圈形。核壳体外径约 120 nm,内径约 86.4 nm,衣粒长约 16.8 nm,核心外径约 61.1 nm,内径约 30.6 nm。图 1 基本上与 Furlong 等^[4]提出的绕线轴状核壳体模型相同,这个模型可以解释我们观察的结果。

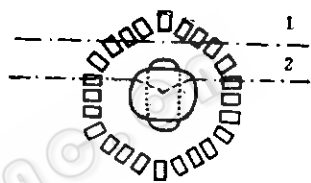


图 1 核壳体模式图

Fig. 1 Diagram of nucleocapsid

(二) 细胞超微病变

核膜孔两端区域与其它区域无明显差异(图版 I-5),也未见核壳体穿过核膜孔的现象,核膜孔复合体亚单位的排列变得不规则(图版 I-6)。

引人注意的是,在细胞膜上出现大量的吞饮泡(图版 II-7);大小基本一致,直径约 75 nm。从尚未离开细胞膜的吞饮泡的小孔看,泡内无可见的颗粒,而主要是液体,而且这样大面积地吞饮,不象是物质转运。吞饮泡形成后可在细胞质中互相融合成更大的泡状结构(图版 II-8)。细胞质中常可见许多无定形的大小泡状结构(图版 II-9),其 PF 面有的有不规则分布的颗粒,有的则是光滑的。EF 面也有同样的情形。内质网周围有弥散的核糖体,仅有稀少的核糖体结合于内质网上(图版 II-10)。线粒体 PF 面多颗粒,病变线粒体的嗜肿胀而变得轮廓不清晰(图版 II-

11)。偶见多重折叠的膜形成的球状体。

讨 论

1. Furlong 等^[4]曾根据超薄切片的观察提出疱疹病毒核壳体的绕线轴模型。本文作者首次运用冰冻断裂和蚀刻的技术为该模型提供了依据。由于这种方法的制片过程破坏性较小,它比超薄切片和负染色技术都更能保存样品的真实状态。同时由于超薄切片具有一定厚度,通常从切片上只能看到具有最大直径处截面的核壳体,其核心为一团电子致密的物质,不易看清细节(图版 II-12)。负染法虽然能较清晰地看到核壳体的衣粒,但核心非常模糊(图版 II-13)。冰冻断裂技术可以从核壳体的任何一个部位将其断开,从不同的截面对衣壳和核心进行观察,适度的蚀刻则能暴露出较深层的结构,这些独到之处使得我们能够进一步了解病毒及其繁殖过程。

2. 核壳体内表面形态是一个有争论的问题。同是采用冰刻法,Šmíd 等^[3]看到的 IBRV 核壳体内表面凹凸不平,而 Hasegana 等^[2]发现 HSV 核壳体内表面是光滑的,本实验所用的是 IBRV,观察结果却与后者相同。没有迹象表明有某种颗粒结合在内表面上。

3. 细胞膜上形成大量吞饮泡,可能是由于病变细胞吞噬功能加强的结果。吞噬泡在细胞质内互相融合,成为胞质内大小泡状结构的来源之一,可能对病毒的成熟

具有一定的意义。IBRV 的核壳体可以在核膜上获得囊膜,也可以在细胞质内的泡状结构上出芽成熟^[5],细胞膜以吞饮泡的形式运向细胞内,形成一个膜流,可能在一定程度上起了供给和补充膜的作用,以适应形成病毒囊膜的需要。

4. 细胞的膜系统一般是 PF 面颗粒丰富,EF 面则少颗粒,但本实验所观察到的病变细胞内的泡状结构不遵从这个规律,无论是 PF 面还是 EF 面,无颗粒或有颗粒,呈随机的状态。我们推测,在正常细胞中,磷脂双层膜从中间断裂开后,近细胞质的 PF 面颗粒多,而 EF 面颗粒少,可能细胞骨架对膜蛋白的锚定作用是一个重要原因。在感染了病毒的细胞中,细胞骨架系统发生了改变,作为病理状态结构出现的细胞质泡状结构,其膜蛋白缺乏与细胞骨架的连结,因此在断裂时随机地留在 PF 或 EF 面上。当然蛋白颗粒的形状大小及其在膜中的位置都起着一定的作用,另一方面可能某些泡状结构本身就缺乏膜蛋白。

参 考 文 献

- [1] Haines, H. and R. J. Baerwald: *J. Virol.*, **17**: 1038—1042, 1976.
- [2] Hasegana, T. and S. Hata: *J. Electron Microscopy*, **24**: 43—44, 1975.
- [3] Šmíd, B. et al.: *Arch. Virol.*, **53**: 167—170, 1977.
- [4] Furlong, D. et al.: *J. Virol.*, **10**: 1071—1073, 1972.
- [5] Jasty, V. and P. W. Chang: *A. J. Vet. Res.*, **32**: 1945—1953, 1971.

FREEZE-ETCHING STUDY OF THE REPLICATION OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS

Wang Xiao Ding Mingxiao Zhai Zhonghe

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Lu Qiwu Dong Renjie

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

By means of freeze-etching we had studied the replication of IBR virus in the cell, and verified the model of herpesvirus nucleocapsid advanced by Furlong et al. We found that large amount of pinocytotic vesicles formed in the cell membrane, and the membrane particles on the cytoplasmic vesicles distributed in the PF face

and EF face at random. The relationship between these facts and viral replication and cytoskeleton were discussed.

Key words

Infectious bovine rhinotracheitis virus;
Freeze-etching

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 细胞核内的毒浆 ($\times 52,000$)。
2. 细胞核。核内周边颗粒丰富,核中央相对较少($\times 14,200$)。
3. 与病毒核心的装配有关的颗粒($\rightarrow$) ($\times 48,500$)。
- 4A. 蚀刻后的核内毒浆 ($\times 50,200$)。
- 4B. A 型核壳体放大图,示核壳体外表面 ($\times 130,900$)。
- 4C. 图 4B 的示意图,●表示衣粒,三角形示正二十面体的一面 ($\times 130,900$)。
5. 核膜孔 ($\rightarrow$) ($\times 100,000$)。
6. 核膜孔 ($\times 45,600$)。

图 版 II

7. 细胞膜上的吞饮泡 ($\times 43,600$)。
 8. 吞饮泡互相融合(*) ($\times 39,800$)。
 9. 细胞质中的泡状结构。黑色 $\rightarrow$ 示颗粒面,白色 $\rightarrow$ 示光滑面 ($\times 26,000$)。
 10. 内质网 ($\times 40,900$)。
 11. 线粒体($\rightarrow$) ($\times 45,700$)。
 12. 病毒的超薄切片 ($\times 108,500$)。
 13. 负染的病毒核壳体 ($\times 130,000$)。
- N——细胞核, C——细胞质。

Plate I

1. The viroplast in the nucleus of cell.
2. Cellular nucleus. The nucleus was rich in granules near the nuclear membrane, and less granules in the center of nucleus.
3. The particles related to assembly of viral cores ($\rightarrow$).
- 4A. The viroplast after etching.
- 4B. High magnification of nucleocapsid A showing the outer surface of nucleocapsid.
- 4C. Diagram of Fig. 4B showing capsomers (•) and a triangular face of icosahedron.
5. The nuclear pore ($\rightarrow$).
6. The nuclear pores.

Plate II

7. The pinocytotic vesicles in cellular membrane.
 8. The pinocytotic vesicles fused each other (*).
 9. The vesicular structure in cytoplasm. The black $\rightarrow$ shows granular face and white $\rightarrow$ shows smooth face.
 10. Endoplasmic reticulum.
 11. Mitochondria ($\rightarrow$).
 12. Superthin section of the virus.
 13. Negative stained viral nucleocapsids.
- N——nucleus, C——cytoplasm.