

辛德毕斯病毒装配及其 6K 蛋白与中间纤维的关系*

吴冬兰 徐婉婷 焦仁杰 丁明孝 翟中和

(北京大学生物系,北京)

用温和的选择性抽提方法与整装细胞电镜技术、DGD 包埋-去包埋剂电镜技术相结合,对辛德毕斯病毒的装配与宿主细胞中间纤维的关系进行了探讨。电镜观察清晰地显示了病毒“装配中心”被中间纤维所网络,病毒的装配过程显然是以中间纤维为支架;正在装配的核壳体与已装配的核壳体紧密结合在中间纤维丝上。根据电镜照片分析,核壳体可能是沿中间纤维由装配中心向外扩散。应用人工合成 6K 蛋白所得抗体进行胶体金标记,证明辛德毕斯病毒非结构性 6K 蛋白也与中间纤维紧密结合。

关键词 辛德毕斯病毒;病毒装配;中间纤维

细胞骨架的研究是近年来细胞生物学研究中异常活跃的领域,细胞骨架与病毒的关系正日益引起人们的重视。前人的工作证明,动物病毒的代谢与细胞骨架有密切的关系^[1]。据报道,核内发生的 DNA 病毒的代谢与细胞核骨架有密切关系:单疱疹病毒的核衣壳在核骨架上进行装配^[2],腺病毒 DNA 的转录活性与核骨架相关^[3],其装配过程依赖于核骨架为空间支架^[4]。我们实验室近年来还证明:胞质发生的大型 DNA 病毒——痘病毒的装配以中间纤维为空间支架^[5]。至于 RNA 病毒在细胞内的装配是以什么为支架的?我们选择了辛德毕斯病毒(一种胞质发生的小 RNA 病毒)作为材料,对此问题进行了探讨。

中间纤维是一种重要的胞质骨架,对其结构与成分早在 70 年代就有一定程度的了解,但它的功能还远未清楚。近年来,S. Penman 实验室建立的选择性抽提与 DGD 包埋-去包埋剂电镜技术^[3],对显示中间纤维具有很大的优越性,并证明中间纤维、lamina 与核骨架在结构上是相互联系的体系^[6]。我们选择 BHK-21 细胞-

辛德毕斯病毒这一实验模式还因为我们对 BHK-21 细胞中间纤维-lamina-核骨架体系的研究已有了良好的基础^[7]。

我们应用选择性系列抽提技术并结合整装制样及 DGD 包埋-去包埋剂电镜技术,证明辛德毕斯病毒的装配过程依赖于中间纤维作为支架。并用人工合成 6K 蛋白所得的抗体进行胶体金标记证明:辛德毕斯病毒非结构 6K 蛋白与中间纤维相结合。

材料和 方法

(一) 病毒与细胞

辛德毕斯病毒来自美国华盛顿大学微生物学系 Schlesinger 教授实验室,在本实验室经 BHK-21 细胞传至 14 代,滴度为 10^{12} TCID₅₀/ml。

BHK-21 细胞系中国兽药监察所提供。用 Eagle's MEM 培养基于 37℃ 静置培养。

(二) 细胞组分分级抽提及中间纤维

本文于 1989 年 8 月 28 日收到,

* 国家自然科学基金资助课题。

lamina-核骨架体系的制备

基本按 E. Fey 等的方法^[3]。辛德毕斯病毒感染不同时间的 BHK-21 细胞与未接毒的对照细胞,按下列基本程序在 4℃ 进行处理:细胞经 PBS 漂洗后,首先用含 0.5% Triton X-100 的 CSK 液(10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 100 mmol/L KCl, 300 mmol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EGTA, 1.2 mmol/L PMSF)处理 5min,再用 RSB-Magik 液(42.5 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 8.5 mmol/L NaCl, 2.6 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L PMSF, 1% 吐温, 0.5% 脱氧胆酸钠)处理 5—7min,再用含 200 μg/ml DNase I 的消化液(CSK 缓冲液中减去 50mmol/L NaCl, 增加 50mmol/L KCl)室温处理 25min,最后加入 1mmol/L (NH₄)₂SO₄ 使其终浓度达 0.25mmol/L, 处理 5min,即可得到中间纤维-lamina-核骨架结构体系。

(三) 整装细胞 (whole-mount) 电镜样品制备

将 BHK-21 细胞直接接种在覆盖有 Formvar 并喷涂一层碳膜的镍网上,长成 +--+ 后,即以每个细胞 200—300TCID₅₀ 的辛德毕斯病毒感染,在感染 5h、7h、9h 后,分别取材按上述分级抽提程序处理,每步处理时间稍短,不需离心。分级提取后,样品经 CSK 缓冲液漂洗,先用 2.5% 戊二醛(于 Hank's 液中)4℃ 固定 30min, PBS 漂洗后,以系列乙醇脱水,经醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥,不经任何染色,于 JEM-100CX 电镜下观察。

(四) DGD 包埋-去包埋剂切片技术

长成良好单层的 BHK-21 细胞,以每个细胞 100TCID₅₀ 的辛德毕斯病毒感染,感染后 5h、7h、9h 分别刮取细胞按上述程序分级抽提,每步处理后离心,最后得到中间

纤维-lamina-核骨架体系。用 2.5% 及 1% OsO₄ 先后固定,乙醇脱水后转入 n-正丁醇,用 DGD 包埋后,进行超薄切片,厚度为 800—1200 Å,然后用正丁醇溶去切片的包埋剂,乙醇系列脱水,醋酸异戊酯置换后, CO₂ 临界点干燥, JEM-100CX 电镜下观察。

(五) 6K 蛋白抗体胶体金标记技术

整装制备的 BHK-21 细胞,经辛德毕斯病毒感染 6h 后,分级抽提, CSK 漂洗后,先用 0.2% 戊二醛预固定 10min, 用 1% BSA-PBS 于 37℃ 封闭 15min, 加 6K 蛋白抗体(系华盛顿大学 Schlesinger 教授惠赠), 37℃ 保温 1h, PBS 漂洗, 以下步骤与整装细胞电镜制样相同。同时设立两个对照组, 对照组一为接毒的细胞样品不加 6K 蛋白抗体; 对照组二为正常 BHK-21 细胞样品用 6K 蛋白抗体标记。

结果与讨论

(一) 病毒装配与中间纤维的关系

1. 正常 BHK-21 细胞经非离子去垢剂盐溶液与 DNase I 系列抽提,当细胞的膜系统、细胞器、微管微丝与染色质等结构被清除后,可清晰地显示出中间纤维-lamina-核骨架体系(图版 I-1)。它们在结构上相互连接,形成贯穿于核质的网络体系。无论是整装制样,还是 DGD 包埋-去包埋剂切片中,致密的中间纤维网络均十分清楚,中间纤维单丝直径为 10nm,未见有颗粒状物质与纤维结合。病毒感染后的细胞虽经上述的系列抽提,仍可见到很多电子密度较大的“病毒装配结构”。它们被网络在中间纤维网中,这些结构逐渐聚集形成更大的病毒装配中心(暂定名称)。根据照片分析,有大量的核壳体与正在装配的核壳体及其基质结合在中间纤维上(图版 II-3, III-5, III-6)。

2. 病毒装配中心本身也有一个由分散到形成的过程。细胞经系列抽提后, 在胞质内中间纤维网上结合着电子密度较大的结构。这些结构是由大小不一的颗粒组成(图版 II-3), 这显然是病毒装配的原料和亚单位。虽然经去垢剂与盐溶液系列抽提, 它们仍与中间纤维结合紧密。至感染后 7h, 病毒装配中心的结构逐渐形成(图版 II-5), 大多呈圆形或椭圆形结构, 它们被中间纤维网所维系。此时装配中可观察到大量大小均一的已装配好的核壳体, 其直径为 30—40nm。图版 II-4 很清楚地显示了病毒装配中心与中间纤维的关系。

3. 在感染晚期, 当病毒装配中心的病毒颗粒变得逐渐稀松时, 可见大量的病毒核壳体(直径为 30—40nm) 结合在中间纤维单丝上。它们开始是不规则的分布, 然后则很规则并均匀地沿中间纤维丝排列(图版 III-6)。因此, 使人很容易推测到核壳体是由病毒装配中心通过中间纤维向细胞质扩散与运输的。以上事实说明, 不同装配阶段的核壳体与病毒装配的过程显然与中间纤维的关系很密切。RNA 病毒与中间纤维的关系研究至今还是人们未曾涉及的领域。我们的实验结果说明了这样一个基本事实, 当细胞被辛德毕斯病毒感染后, 病毒正在装配时, 用系列抽提细胞组分, 当膜系统、细胞器、微管、微丝与染色质全被除去时, 病毒装配的原料与正在装配好的核壳体却牢固地结合在中间纤维上, 我们认为这种结合绝不是随机的结合。我们提出这样一个事实, 可能有助于分析这一问题。从结构、成份与装配相比, 辛德毕斯病毒核壳体与宿主细胞的核蛋白体很类似, 经过系列抽提后, 核蛋白体几乎全从胞质中除去, 很少见到它们与中间纤维结合的现象。然而病毒核壳体及其装配原料却紧密结合在中间纤维上, 这就不能不使人

认为, 它们之间的结合是特异性与功能性的。这一现象与我们在痘病毒核壳体装配与中间纤维关系的研究结果很类似^[2], 是否具有普遍性尚待进一步研究。

(二) 非结构性 6K 蛋白与中间纤维的关系

6K 蛋白是辛德毕斯病毒感染细胞晚期, 由病毒基因编码的一种非结构蛋白^[3]。我们利用人工合成 6K 蛋白所得的抗体, 对感染 6h 的 BHK-21 细胞进行胶体金标记, 结果可见, 金颗粒特异性结合在中间纤维上(图版 I-2), 这可能是 6K 蛋白或其相关的蛋白与中间纤维的特异性结合。在病毒核壳体密集区, 金颗粒标记密度很大, 说明 6K 蛋白虽不是结构蛋白, 却可能与核壳体及其装配过程有关。为了验证实验结果的可靠性, 我们设立两组对照试验, 一组为同时感染 6h 的 BHK-21 细胞, 不加 6K 蛋白抗体, 进行胶体金标记; 另一组为正常 BHK-21 细胞用 6K 蛋白抗体进行胶体金标记。对照实验结果中均未见到金颗粒结合在中间纤维上, 说明了我们实验结果的可靠性。6K 蛋白是辛德毕斯病毒 26S 基因组编码的一个仅 55 氨基酸的小分子蛋白, 其生物学功能及其在病毒内分布至今尚不清楚。它是病毒感染晚期产生的非结构蛋白^[3], 可能是一段信号序列^[9]。对 6K 蛋白的研究正在引起人们的重视, 我们实验的结果表明, 6K 蛋白可能与中间纤维有特异的结合, 至于它在病毒核壳体装配过程中的作用, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Luftig, R. B.: *J. Theor Biol.*, 99: 173, 1982.
- [2] Bibor-Hardy, V. et al.: *Virology*, 121: 296, 1982.
- [3] Fey, E. G. et al.: *J. Cell Biol.*, 102: 1654, 1986.
- [4] Zhai, Z. H. (翟中和) et al.: *J. Virology*, 61:

1007, 1987.

- [5] Zhai, Z. H. (翟中和) et al.: 中国科学, 10 (B): 1008, 1987.
- [6] Capco, D. G. et al.: *J. Cell Biol.*, 98: 1878,

1984.

- [7] 吴冬兰等, 实验生物学报, 23(1): 71, 1990.
- [8] Willian, J. W. et al.: *J. Virol.*, 33: 230, 1982.
- [9] Hushimoto, K. et al.: *ibid.*, 38: 34, 1981.

THE RELATIONSHIP OF SINDBIS VIRUS ASSEMBLY AND THE VIRAL PROTEIN 6K WITH INTERMEDIATE FILAMENTS

Wu Donglan Xu Wanting Jiao Renjie Ding Minxiao Zhai Zhonghe

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

The relationship of Sindbis virus (Sbv) assembly with intermediate filaments was studied by means of whole-mount and DGD embedment-free technique of EM together with the procedure of gentle extraction. In the early stage of Sbv infection, the "virus assembly center" was suspended in the intermediate filament network. In the late stage, the assembling and assembled virus nucleocapsids were associated with intermediate filaments. It is presume that the virus nucleo-

capsids may move from the "virus assembly center" to cytoplasmic membrane along the intermediate filaments. Further study using immunolabelling technique indicated that the nonstructural protein 6K of Sbv was probably associated with intermediate filaments as well.

Key words

Sindbis virus; Virus assembly; Intermediate filaments