

## AcMNPV 核衣壳的形态发生\*

陈建国 滕俊琳 翟中和

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

**摘要** 报道了缺失多角体蛋白基因的 AcMNPV 在 sf9 细胞内核衣壳的形态发生过程。病毒衣壳蛋白首先装配成许多呈束状排列的直径为 34 nm 中空长管状结构, 然后是病毒 DNA 进入管内, 装有 DNA 的长管按一定的长度间隔断开, 形成成束的核衣壳, 每个核衣壳的大小约 34×260 nm, 最后成束的核衣壳被囊膜包被形成完整的多粒包埋型病毒粒子。

**关键词** 杆状病毒, 核衣壳, 形态发生, 装配

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)属于杆状病毒科(Baculoviridae)的成员<sup>[1]</sup>。NPV 是昆虫病毒中发现最早, 研究得较为详细的一类病毒。有关 NPV 感染细胞后引起的病变及病毒粒子的形态发生等方面的研究已有许多报道<sup>[2,3]</sup>。一般认为, NPV 感染细胞后新合成的病毒 DNA 与衣壳蛋白质在细胞核内装配成核衣壳, 大部分核衣壳在细胞核内获得囊膜, 一部分病毒通过出芽的方式在核膜或细胞质膜上获得囊膜, 形成完整的病毒粒子<sup>[3]</sup>, 但对于核衣壳如何装配形成则未见报道。我们在利用杆状病毒表达体系研究细胞骨架的结构与功能时, 在电镜下偶然发现了缺失了多角体蛋白基因的 AcMNPV 核衣壳装配的一种可能途径, 现将结果报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 病毒

野生型病毒(AcMNPV)DNA 购于 Invitrogen 公司, 与克隆有编码大鼠微管结合蛋白 2c (microtubule-associate protein2c, MAP2c) 或 tau 蛋白的 cDNA 的转染载体 PVL1393 共同转染 sf9 细胞后形成重组病毒。该重组病毒的晚期基因之一多角体蛋白基因已被 MAP2c 或 tau 蛋白基因所替换, 因而不表达病毒多角体蛋白<sup>[4]</sup>。

#### 1.2 细胞培养与病毒感染

Sf9 细胞系(购于 Invitrogen 公司)是由 sf21 细胞克隆得到, Sf21 细胞来源于秋行军虫 *Spodoptera frugiperda* 的卵巢细胞。用 TNM-FH 昆虫细胞培养基(调 pH 至 6.2)加 10% FBS 于 27℃ 下培养。将 sf9 细胞于细胞培养皿内培养至适当的密度后加入重组病毒感染细胞供电镜制样用。

#### 1.3 电子显微镜样品的制备

重组病毒感染 sf9 细胞后 36 或 48 h 进行电镜样品的制备。细胞首先用 0.1 mol/L

\* 国家杰出青年科学基金资助课题。

本文于 1996 年 4 月 2 日收到。

PBS缓冲液洗一次,然后用含2.5%戊二醛、2%多聚甲醛和5%蔗糖的0.1 mol/L二甲砷酸钠固定液于室温固定30 min,再用1%OsO<sub>4</sub>在冰上固定10~15 min。经系列酒精脱水后,在1:1的无水酒精/EPON 812(下同)中抽气渗透过夜。纯EPON抽气过夜,换纯EPON于65℃聚合48h,用液氮急冷法使包埋块和培养皿脱离,在相差显微镜下找出感兴趣的细胞进行切片,样品经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后进行电镜观察。

## 2 结果和讨论

与野生型AcMNPV感染细胞后的情形相似,重组病毒感染sf9细胞后,在细胞核内首先形成海绵状的病毒发生基质,子代病毒的核衣壳即在网状的基质表面装配形成。所不同的是重组病毒感染后在细胞核内不再形成多角体,而仅有核衣壳及多粒包埋的病毒粒子。在感染早期的细胞核内病毒衣壳蛋白可装配成直径为34 nm,数倍于病毒衣壳长度的中空长管状结构,多根长管平行排列成束(图版I-1),并且在附近总是存在大量的电子密度较高的病毒发生基质(图版I和图版II-5),此时细胞核内还很少有完整的病毒粒子,而在横切面上可见到中空的管状结构中间电子密度很低(图版I-2,3),显然病毒DNA还没有进入衣壳内部,在核衣壳及所有的双层囊膜包被的病毒粒子内部则呈现较高的电子密度(图版I-2,3和图版II-5)。在成束排列的管状结构的纵切面上,也能见到一些电子密度较高的区域(箭头所示),可能是由于该部位已有病毒核酸进入的缘故(图版I-1,2)。随着感染的进程,部分有病毒衣壳蛋白装配而成的管状结构成为长度260 nm左右的电子密度很高的束状实心结构(图版I-2和图版II-4,箭头所示),并在周围出现一些来历不明的膜状结构,最终将核衣壳包被形成完整的病毒粒子(图版I-3和图版II)。大小为34×260 nm的核衣壳似乎是从较长的结构断裂而成,一些刚形成的核衣壳整齐地排列在同一连线上,相邻处断裂的痕迹还隐约可见(图版I-2,大箭头所示),而远端都已开始包上囊膜。在平行排列的管状结构的两侧可见到许多排列整齐的多粒包埋型病毒粒子,而靠外侧的区域完整病毒粒子的排列就没有那么整齐(图版II-5)。

从上述结果可见,AcMNPV的病毒发生基质中核衣壳的装配并非彼此独立进行,病毒衣壳蛋白在细胞质内合成后进入细胞核,在病毒发生基质的部位聚合,首先装配成数倍于衣壳长度的中空管状结构。由于刚装配好的管子中间还没有病毒DNA进入,因而在横切面上为貌似微管的中空管状结构,中间电子密度较低。当病毒DNA进入后即成为电子密度较高的实心结构,但DNA是如何进入这个管子里面还有待研究,可能是从管子的两端开口处进入,从电镜图片上确实可以见到一些管子的端部已成为电子密度较高的结构(图版II-5,小箭头),而且在同一连线上再靠外侧的核衣壳已被囊膜所包被(图版II-5,大箭头),这大致显示了病毒粒子的形态发生的基本过程。但偶尔也可在管状结构的中部见到成节段状分布的电子致密的区域(图版I-1和图版II-5),因此也可能是在管子将来的断裂部位有病毒DNA进入的开口。由于病毒DNA的进入使得该部分结构易被铀染色而电子的吸收作用增强。这种情况在其它许多病毒的感染组织的切片上或病毒负染样品上也经常可见,一般空衣壳的电子密度较低而完整的病毒粒子的

电子密度较高。

可能是由于病毒 DNA 的进入使得这种长管状结构具有节段性, 在每两个相邻节段的交界处发生断裂, 由此形成完整的但分属于不同病毒粒子的核衣壳, 也正是由于杆状病毒核衣壳这种特有的形态发生方式使得在电镜下纵向相邻的刚形成的核衣壳几乎都排列在一条连线上。尽管两端已有囊膜开始包被, 而中间还刚刚断开或看上去还似乎相连; 这种情况在其它昆虫的 NPV 或杆状病毒科的另一成员颗粒体病毒感染细胞后的电镜图片上也经常可见<sup>[3,5,6]</sup>。随着膜结构从核衣壳的一端向另一端包被, 一个个完整的由双层膜包裹着多个核衣壳的病毒粒子即在细胞核内形成。在这些颗粒刚刚完成包被时, 各个颗粒之间还排列得非常整齐, 病毒核衣壳也还与相邻的还是空心的管状结构相平行或同一线上相连, 而靠近外围的病毒颗粒的则由于运动而使得排列状况有所改变。上述现象表明多粒包埋型的杆状病毒核衣壳的装配是多个衣壳一起连续进行的, 首先衣壳蛋白形成成束的长管状结构, 病毒 DNA 进入管子内部后节段断开, 形成束状的核衣壳, 核衣壳被囊膜包被而成病毒粒子。病毒感染初期形成的成束的管状结构可能是杆状病毒科 A 亚组成员形成多粒包埋型特征的基础。病毒的囊膜通常都来源于细胞的核膜或质膜, 而杆状病毒感染后在细胞核内获得囊膜, 其来源有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Matthews R E F (廖延雄等译). 病毒的分类与命名——国际病毒分类委员会第四次报告. 北京: 科学出版社, 1987. 73 ~ 79.
- [2] 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病. 北京: 科学出版社, 1982. 220 ~ 230.
- [3] Kawamoto F, Suto C, Kumada N *et al. Microbiol Immunol*, 1976, 21 (5): 255 ~ 265.
- [4] Chen J, Kanai Y, Cowan N *et al. Nature*, 1992, 360: 674 ~ 677.
- [5] Harrap K A. *Virology*, 1972, 50: 133 ~ 139.
- [6] Arontt H J, Smith K M. *J of Ultrastructure Res*, 1968, 21: 251 ~ 268.

## MORPHOGENESIS OF AcMNPV NUCLEOCAPSID

Chen Jianguo Teng Junlin Zhai Zhonghe

(College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** In this paper we reported that the nucleocapsid morphogenetic process of AcMNPV in which polyhedrin gene was deleted in the nuclei of sf9 cells. First, the capsid proteins entered the nuclei and assembled many 34 nm diameter long fascicularly arranged hollow-tube structures. Then viral DNA entered these tubes that turned into solid structure with high electronic density. The solid structure separated at a certain distance to form 34×26 nm fascicular bacilliform structure known as nucleocapsid. Finally, fascicular nucleocapsids were wrapped by envelope and became complete multicapsid morphotype virion.

**Key words** ACMNPV, Nucleocapsid, Morphogenesis, Assembly