中 国 科 学
1987 年10月 B 辑 第10期

痘苗病毒的装配与中间纤维的关系

翟 中 和
（北京大学生物学系）

G. Krochmalnic S. Penman
（美国麻省理工学院生物学系）

摘 要

本文用选择性抽提方法，结合非树脂包埋-去包埋剂电子显微镜技术(embedment-free EM)与整装细胞 (whole mount cell)制备方法能清楚地显示中间纤维-Lamina-核骨架体系 (IF-Lamina-Nm System)．首次证明痘苗病毒工厂内有一个精细的中间纤维网架系统，它是胞质内中间纤维网络的组成部分．痘苗病毒的装配原料与亚结构均牢固地结合在中间纤维丝上．装配好的痘苗病毒与正在装配的病毒均固定在中间纤维的网络中，并可以观察到病毒结构与中间纤维的直接连接．根据上述事实，认为痘苗病毒的装配过程要依赖中间纤维为支架．

中间纤维 (IF) 的形态与基本成分早在 70 年代已有一定程度的了解，但对中间纤维的功能与组装过程的认识较之微丝与微管一直是比较模糊的．由于过去的多数工作是用免疫荧光技术显示中间纤维，发现它们总是密集分布在细胞核周围，故人们认为中间纤维对核的位置固定起支架作用[1,2]． 最近提出中间纤维的有限降解产物能进入细胞核，与染色质组蛋白结合，从而对 DNA 活性起调节作用[3]，这是十分有意义的进展．

自从 Penman 实验室建立起非树脂包埋-去包埋剂切片电子显微镜技术，并与低盐溶液选择性抽提方法相结合，显示出研究中间纤维网络结构的巨大优越性，并说明中间纤维与核骨架 (nuclear matrix)，Lamina 是一个相连的复合体系[4,5]．无疑这为研究中间纤维的本质提供了很好的手段．

我们在最近一年相继证实：细胞核内的腺病毒工厂含有一个网架结构，是由核骨架改建的，它与腺病毒装配密切相关[6,7]，腺病毒的 mRNA 加工过程与核骨架有关[8]，并证明腺病毒 DNA 转录活性与核骨架有关．根据以上提供的线索，必然就考虑到在胞质内复制与装配的 DNA 病毒——痘病毒的发生过程是否与胞质骨架有关系．注意力就很自然地集中到痘病毒的发生与中间纤维的关系．

我们应用细胞生化选择性提取方法，结合 DGD (diethylene glycol distearate) 包埋-去包埋剂电子显微镜技术证明痘病毒工厂是维系在胞质骨架的网架之中，痘苗病毒工厂内包含一

本文 1987 年 2 月18日收到，1987 年 4 月24日收到修改稿．

个密集的中间纤维网络系统，痘病毒的亚结构与装配不同阶段的病毒均很牢固地结合在中间纤维上，痘苗病毒的装配过程显然是依靠中间纤维为支架的。这是迄今未曾报道过的现象。

一、材料与方法

1. 细胞培养与病毒感染

HeLa S_3 悬浮培养细胞系与 HeLa 单层培养细胞系分别用痘病毒感染。

HeLa S_3 细胞系用 Eagle'sMEM 培养液加 10% 胎牛血清或马血清进行悬浮培养。每次实验取 2×10^7 细胞，先将细胞浓缩为 2—3ml 悬液，以每一个细胞为 20 PFU（或 $1TCID_{50}$）的痘苗病毒滴度接种，在 35℃ 以微速旋转的状态下吸附 60—80min，然后将被感染的细胞用培养液（仅含 3% 血清）稀释恢复到 50ml 原培养状态，对照组细胞除不接毒以外，处理步骤与上述完全相同。

用贴壁单层培养的 HeLa 细胞制备整装细胞样品。将 HeLa 细胞直接接种在覆有 formvar 并喷涂一层碳膜的金网或镍网上，培养液是 Eagle's MEM 加 10% 胎牛血清，不必长成致密的单层，即可用每个细胞为 20—50 PFU 的痘苗病毒滴度接种，将毒液以悬滴法滴在金网上，在 37℃ 吸附 60min，然后用含5%血清的 Eagle's MEM 液培养在二氧化碳培养箱内。

2. 细胞的分级提取

细胞的分级抽提的步骤基本按 E. Fey 等[9]，并经我们加以改进的方法[7]。痘苗病毒感染后 8,13,18,24h 的 HeLa 悬浮培养细胞按下列程序在4℃处理。细胞用磷酸液洗涤一次，首先用含 0.5% Triton X-100 的细胞骨架缓冲液（简称CSK 液：10mmol/L PIPES，pH6.8，100mmol/L KCl，300mmol/L 蔗糖，3mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L EGTA，4mmol/L vanady adenosine 1.2mmol/L phynylmethylsulfonyl fluoride）处理2—3min，细胞质膜体系被溶解，可溶性蛋白被洗脱，此时细胞骨架系统与核结构仍完整保存。于 600 × g 离心 3min，用 RSB-Magik 液（42.5mmol/L Tris-HCl，pH8.3，8.5mmol/LNaCl，2.6mmol/L $MgCl_2$，4mmol/L vanadyl adenosine，1.2mmol/L phynylmethylsulfonyl fluoride，1%吐温，0.5% 脱氧胆酸 desoxy lcholate）悬浮沉淀物，处理 5min，此步骤主要抽提微丝、微管及其它胞质内的结构。只有中间纤维与核内的基本结构（除核膜）能很好保存。于600 × g 离心 3min，取部分沉淀物制备电子显微镜样品(见下述)，可以观察到完整清晰的中间纤维结构体系及其与核结构的联系。其余的沉淀物用含有 DNase（200μg/ml）的消化液(CSK 缓冲液减去 50mmol/L NaCl，增加 50mmol/L KCl）在室温下处理 20min，然后加$(NH_4)_2SO_4$ 使终浓度达 0.25mol/L，处理 3—5min，此步骤主要抽提去掉染色质。于 1000 × g 离心 5min，絮状沉淀物乃是保存完整的中间纤维-Lamina-核骨架复合物结构体系。如继续用 RNase 处理，则核仁的主要成分可被抽提掉。

长在金网上的单层 HeLa 细胞在病毒感染后 8,13,18,28h 分别取材抽提，其处理程序与上述基本相似，但每一步骤处理的时间略短，不需要离心，故操作步骤比较简单。

3. 去包埋剂超薄切片技术

用上述分级提取不同阶段的 HeLa 悬浮培养细胞制备去包培剂的切片样品[4,7,10]，简单程序如下：用 2.5% 戊二醛的 CSK 缓冲液在 4℃ 固定 30min，CSK 缓冲液稍洗后，再用 1%

OsO_4 的二甲砷酸钠缓冲液 (0.1mol/L, pH7.2) 在 4℃ 被固定 5min，乙醇脱水，然后转移到 n-正丁醇，用 DGD 包埋，超薄切片厚度为 800—1200 Å. 切片用正丁醇处理，溶去包埋剂，然后浸入乙醇，用醋酸异戊酯置换后于 CO_2 临界点干燥，不需染色。直接用电子显微镜观察。

并用样品倾斜装置拍摄立体照相对，以便进行三维结构分析. 用选择性提取法结合去包埋剂切片电子显微镜技术对观察骨架系统有独特的优越性，可以克服树脂包埋剂因电子衍射特性而湮没骨架结构的可见度.

4. 整装细胞电子显微镜样品制备

生长在金网上单层细胞病毒感染后不同时间，在分级提取的不同阶段用 CSK 缓冲液漂洗后，先后用 2.5% 戊二醛 (CSK 缓冲液) 与 1% OsO_4 (0.1mol/L 二甲砷酸钠缓冲液)固定，以乙醇脱水，于 CO_2 临界点干燥后电子显微镜观察.

二、实 验 结 果

1. 中间纤维-Lamina-核骨架体系

当 HeLa 细胞经 CSK-Triton 与 RSB-Magik 液处理后，胞质内可以显示出一个十分精细的中间纤维网络，当细胞被 DNase 与 0.25 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 继续处理后，由于核内的染色质被抽提掉，呈现出一个中间纤维-Lamina-核骨架结构体系(图版 I,1). 无论是整装的细胞或包埋-去包埋剂切片的细胞内均可以清晰地观察到，中间纤维单位直径一般 10nm 左右，它们直接与 Lamina (核膜下蛋白分子层)连接. 细胞核内也有一个网架系统，核仁被网络在核骨架内，很有意思的是核内骨架纤维丝也与 Lamina 连接(图版 I,1, 图版 III,1)，细胞内明显的存在一个独立的中间纤维-Lamina-核骨架体系，这一结构体系对 $(NH_4)_2SO_4$ 等低盐溶液均很稳定，它们的形态结构与物理性质相似，结构上互相连接，形成了统一的网架系统，贯穿于细胞质与细胞核，显然与微丝和微管骨架系统是有明显区别的.

被痘病毒感染 8 或 13h 的 HeLa 细胞中间纤维系统与未感染的正常细胞比较，未观察到很明显的变化(图版 I,2，图版 III,1)，但在感染后 13 或 18h 的整装细胞样品，中间纤维丝上却结合着大量的颗粒状结构(图版 I,2)，显然是与病毒有关的结构蛋白，不易被低盐抽提.

在痘苗病毒工厂部位，中间纤维的分布相对比较密集，这里的中间纤维网络可能是重新建的. 核内骨架的变化不明显，不像腺病毒感染的宿主细胞核内骨架的变化明显[6,7]. 腺病毒工厂位于核内，其复制过程依赖核骨架，而痘病毒的复制过程可能与核骨架无直接的关系. 无论是痘病毒还是腺病毒感染的细胞内，Lamina 始终是稳定的，是没有明显变化的结构.

2. 痘病毒工厂内的网架结构

病毒感染 8, 13, 18h 在胞质内可以观察到 1 个或 2 个体积很大的病毒工厂. 假如仅用 CSK-Triton X-100 处理细胞，DGD 包埋-去包埋剂切片，病毒工厂则是电子致密度很大的结构，难于分辨内部的结构. 大量的病毒是在其边缘装配与形成. 而整个病毒工厂又被胞质骨架所维系(图版 II,1)，但用这种简单步骤抽提细胞，我们无法区别骨架纤维的性质与类型，根据其形态与直径不易区别是微丝，中间纤维还是微管，而且胞质内未被抽提的物质也掩盖着精细的结构. 当样品经过 RSB-Magik, DNase, 0.25mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 先后处理后，病毒工厂内的大量病毒 DNA 与结构蛋白被抽提，病毒工厂内部呈现出完全另一种景象，包含着一个非常精致的中间纤维网络系统 (图版 II,2, 图版 III,2)，很有意义的是已装配好的病毒与一些正

在装配的病毒对 DNase 与低盐溶液很稳定。病毒工厂的网络上始终紧密结合着一些电子密度大的微颗粒组成的物质，这显然是装配病毒的原料与亚单位，虽经多级步骤提取，它们与中间纤维的结合仍然十分牢固。

病毒工厂内的中间纤维网是胞质内整个中间纤维网的一个组成部分，是相互连接的。中间纤维丝一面与核的 Lamina 连接(图版 II,2，图版 III，1)，在细胞外边缘又象筐篮一样的收边(图版 II,2)。

3. 病毒、病毒的装配与中间纤维的结构联系

根据选择性生化分级抽提的结果与高分辨率形态的分析，已装配好的病毒在释放前是被固定在中间纤维的网络中，而且与中间纤维结合很牢固，这在图版 IV,1,2 中是很清楚的。值得重视的是有些病毒表面结构是直接与中间纤维结合的，这在图版 IV,1 尤为明显。当细胞用 RSB-Magik 处理后，微丝、微管及其它细胞质器均被完全抽提的情况下，病毒装配的亚结构与原料却依然与中间纤维结合得很紧密、牢固（图版 III,1,2)，当继续用 DNase 与 0.25mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 处理，病毒的部分亚结构依然与中间纤维相结合（图版 II,2，图版 IV,1)，这在一定程度上可以说明，病毒装配的亚单位与原料与中间纤维之间不是一般的粘附或机械结合，从所有的照片联系分析，处于不同装配阶段的病毒均与中间纤维丝有直接相连。

三、讨　论

从以上实验所取得的结果，我们认为有以下一些问题与想法有必要提出讨论。

(1) 长期以来是用免疫荧光显微技术显示中间纤维在胞质内的分布，却不能直接观察到中间纤维单丝清晰的形态结构及其网络。中间纤维虽然是电子显微镜分辨范围易见的结构，但是一般都用环氧树脂包埋样品与切片，由于包埋剂对电子的衍射经常湮没细胞骨架纤维的易见度。或由于样品固定染色后难于区别微丝、微管与中间纤维。Penman 等用 RSB-Magik 与 0.25mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 选择性抽提能较好地保存中间纤维-核骨架系统(其它骨架成分与胞质结构极易被抽提掉)，再用 DGD 包埋切片，再将包埋剂抽提掉，不需要染色，就可以清晰地显示中间纤维系统。这一技术现在也仅在个别实验室中应用，在我国尚是空白。我们在建立与改进这一技术的基础上研究细胞骨架与病毒复制的关系时，不仅能很好地显示中间纤维-Lamina-核骨架体系，而且还发现这一技术能很好地保存不同装配阶段的病毒结构，并能独特地显示病毒的装配过程及其与中间纤维-核骨架的空间关系，到目前为止我们还没有见到这样类似的工作报道。

(2) 我们在不久前发现在核内发生的 DNA 病毒-腺病毒的装配过程必须依赖核内骨架的纤维支架[6,7]。并初步证明腺病毒 DNA 转录活性与核骨架结合有关系[9]。这就给我们进一步启示，在胞质内发生的 DNA 病毒-痘病毒的装配过程与基因表达过程是否也要依赖胞质骨架？我们利用自己设计的实验程序，首次证实：痘病毒工厂内有一个中间纤维网络系统，并与胞质整个中间纤维网连接在一起呈现统一结构。病毒装配是以中间纤维网络为支架，迄今尚未有人报道过这种现象。

(3) 中间纤维丝与病毒和病毒亚结构关系如何？是否直接联系？是我们要讨论的另一问题。既然细胞质器，诸如线粒体、高尔基体、内质网、溶酶体与染色质等经过生化抽提均能去掉，而痘病毒及其亚结构却能保存下来并固定在中间纤维的网络中，按基本成分来说痘病毒与

这些细胞器有类似之处，可是对 RSB-Magik，$(NH_4)_2SO_4$ 与 DNase 却异常稳定。已经装配好的病毒对酶与低盐有较大的稳定性是可以理解的，可是正在装配的病毒亚结构同样对生化抽提有一定的稳定性，并紧密地与中间纤维结合，从实验过程与形态分析，就很逻辑地说明病毒及其亚结构与中间纤维的关系不可能是简单的机械粘附，或是实验过程中产生的效应，而更可能是具有某种特异的、专一性结合的方式。至于中间纤维与成熟病毒和病毒释放的关系是需要进一步研究的。

(4) 根据痘病毒装配与中间纤维的关系所提供的事实，不可回避地要提出新的问题，痘病毒的基因表达过程与中间纤维是什么关系？既然腺病毒 DNA 的转录活性与 mRNA 的修饰过程是与核骨架有关系[7,8]，那么痘病毒的 DNA，mRNA，结构蛋白和中间纤维又会是什么关系。这是我们下一步要认真考虑去解决的问题。

参 考 文 献

[1] Franke, W. W. et al., *Cytobiology*, 17(1978), 365.

[2] Tokuyasti, K. T. et al., *J. Cell Biology*, 96(1983), 1736—1742.

[3] Traub, P. & Vorgias, C., *J. Cell Sci.*, 65(1984), 1—20.

[4] Capco, D. G. et al., *J. Cell Biology*, 98(1984), 1878—1885.

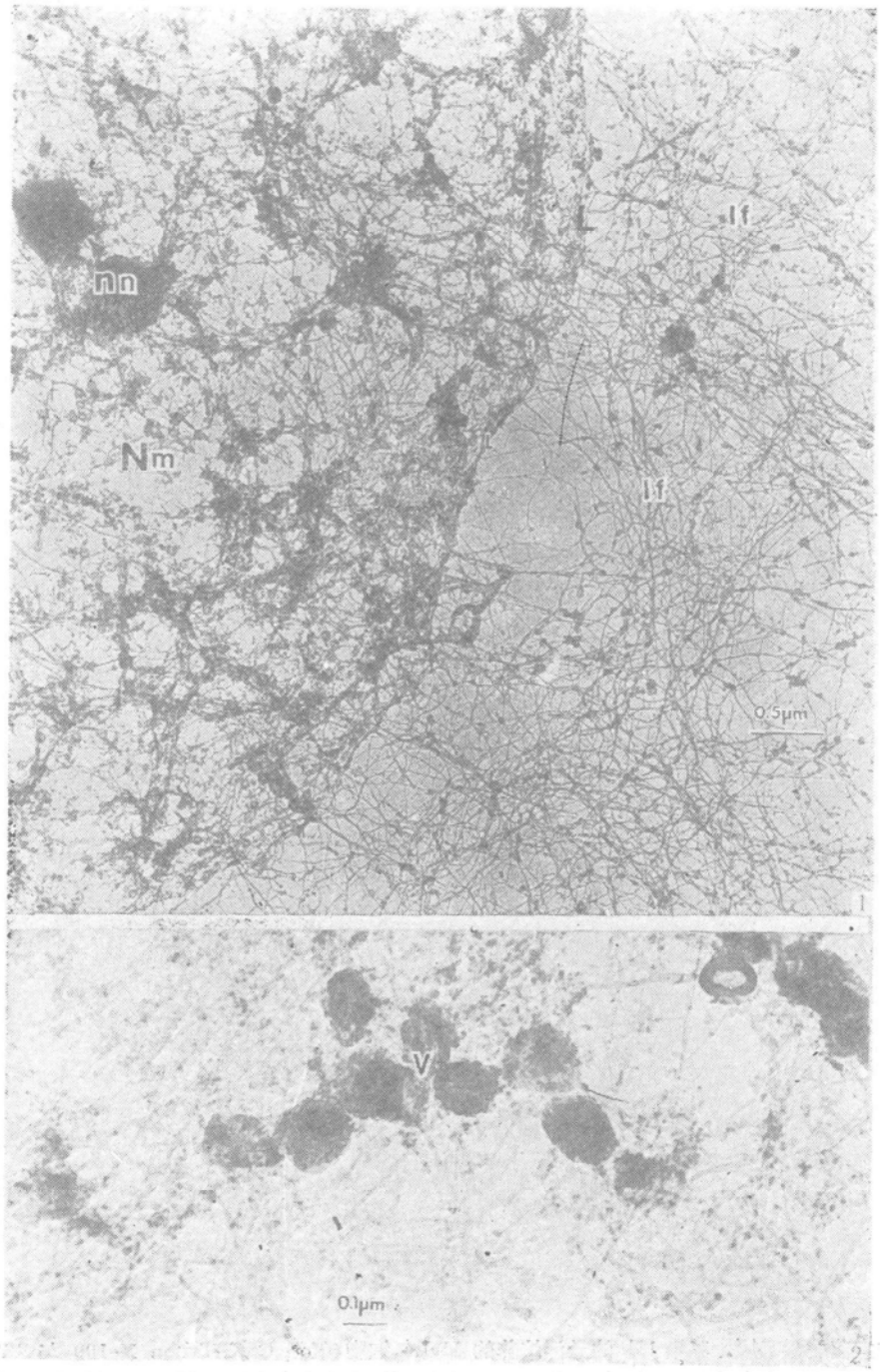
[5] Penman, S., *Virus metabolism and Cellular Architecture. Virology* (Ed. Fields, B. N. et al.), Raven Press, New York, 1985, 169—182.

[6] Zhai Zhonghe (翟中和) et al., *Electron Microscopy (XI International Congress on EM)* Kyoto, III, 1986, 2205.

[7] Zhai Zhonghe (翟中和) et al., *J. Virology*, 61(1987), 4: 1007—1081.

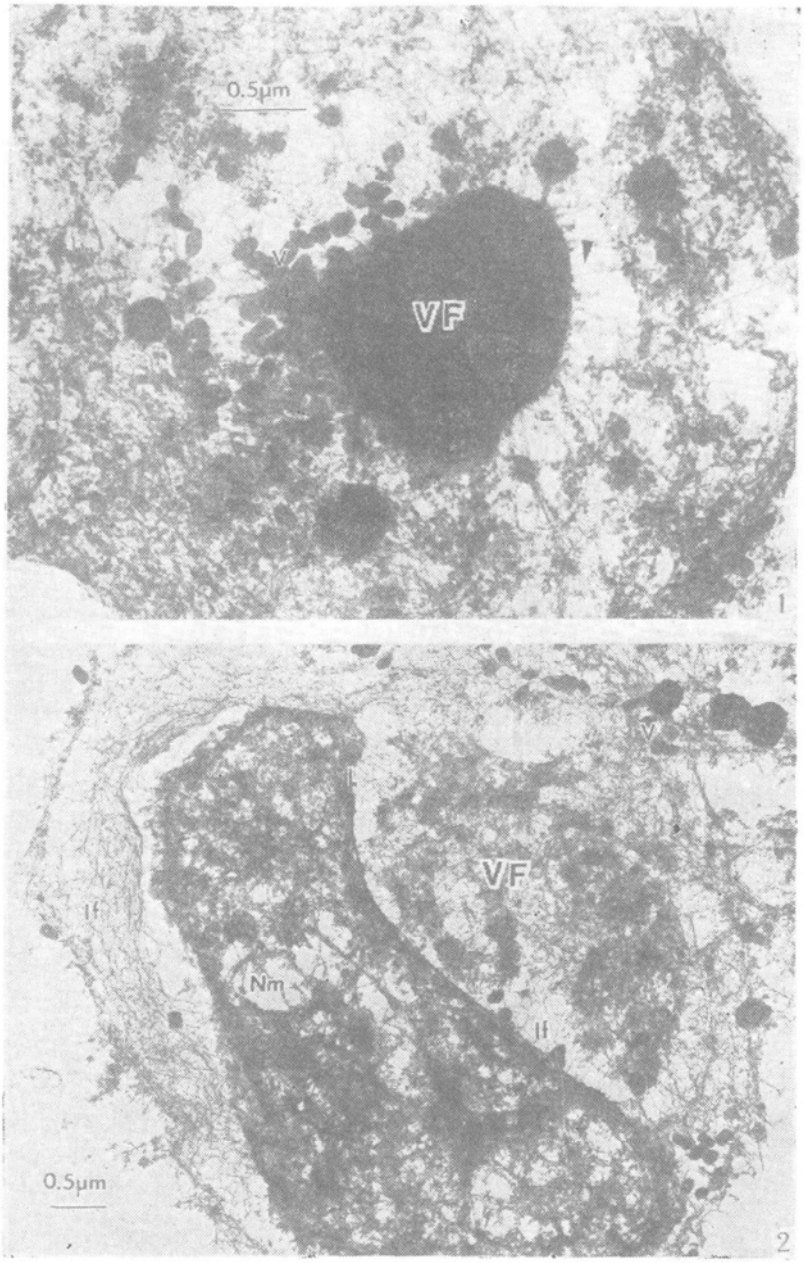
[8] Zhai Zhonghe (翟中和) et al., *Beijing Symposium on Electron Microscopy*. 1986, 25.

[9] Fey, E. G. et al., *J. Cell Biology*, 102(1986), 1654—1665.



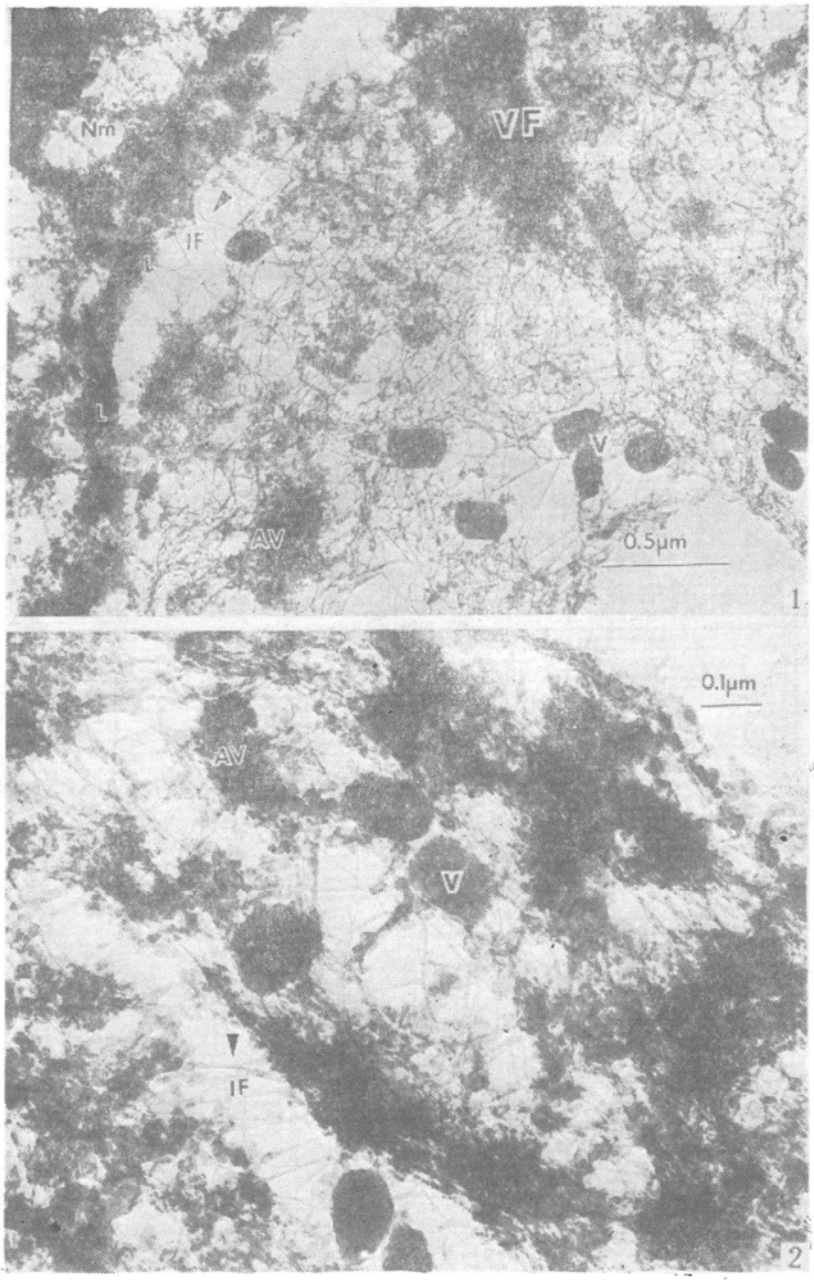
1.整装制备的 HeLa 细胞，直接培养在覆有 Formvar 并喷一层碳膜的金网上的未感染病毒的正常细胞，经 CSK-Triton X-100，RSB-Magik，DNaseI 与 0.25mol/l$(NH_4)_2SO_4$ 先后抽提，CO_2 临界点干燥的整装样品，清晰地显示中间纤维 (If)-Lamina-核骨架 (Nm) 体系．可以见到中间纤维直接与 Lamina 连接，核仁(N_o) 处在核骨架网络中，染色质已被抽提．

2.痘苗病毒感染后 13h 的整装 HeLa 细胞．处理过程与 1 相同胞质内已出现装配好的痘苗病毒 (V)，被网络在中间纤维网架中，有大颗粒结构(可能是病毒亚结构)结合在中间纤维上．



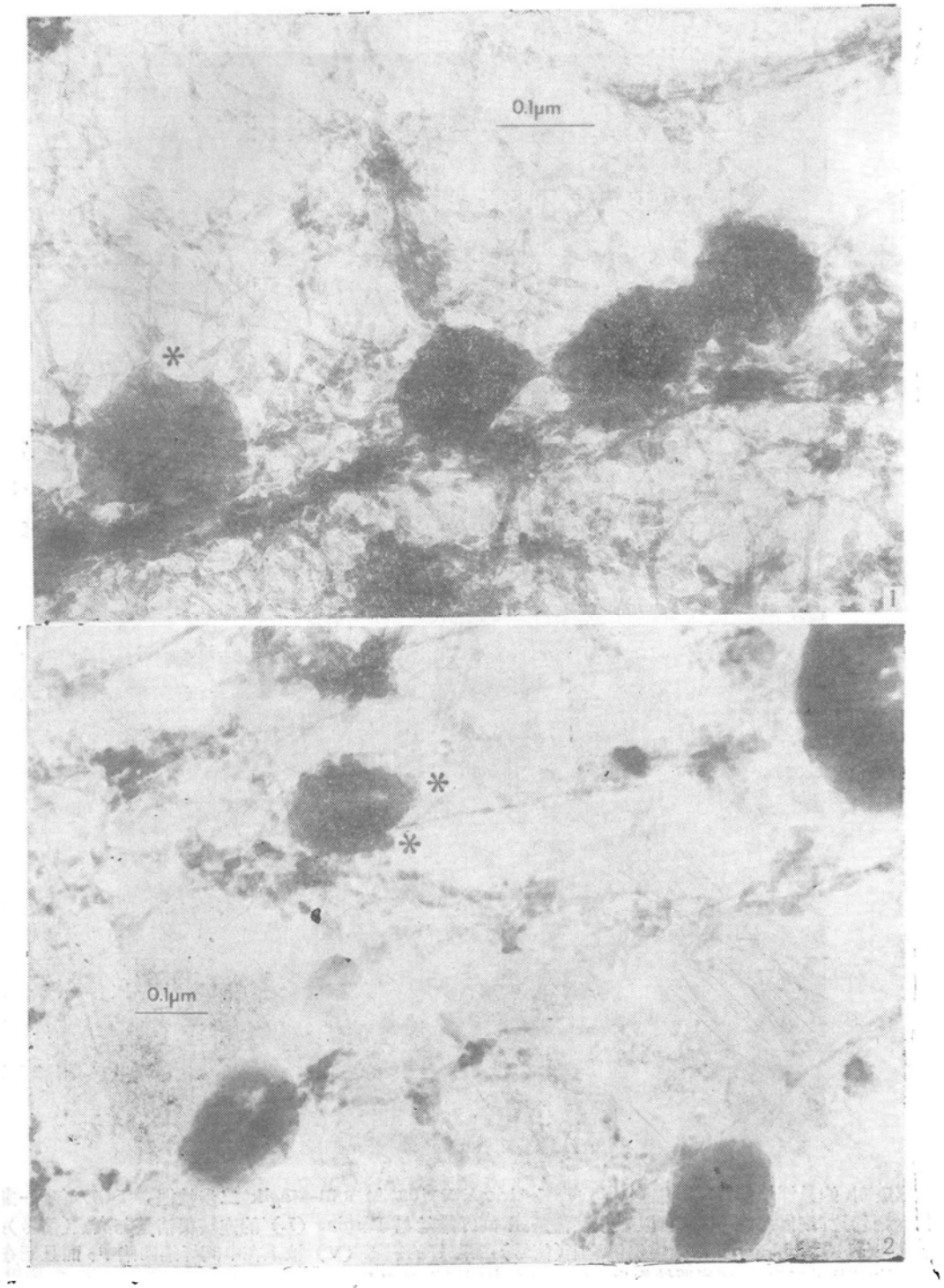
1.典型的痘苗病毒工厂．感染13h的悬浮培养的HeLa细胞，仅经CSK-Triton X-100与RSB-Magik二步处理，DGD包埋-去包埋剂切片，能见到电子致密的病毒工厂（VF）被悬系在胞质结构的网架中（箭号），周缘有大量正在装配的病毒（V），由于仅经CSK-Triton X-100处理，病毒工厂内部结构不能被显示，胞质内很多物质未被抽提．

2.感染8h的悬浮培养HeLa细胞，经CSK-Triton X-100，RSB-Magik，DNase I与0.25 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 先后抽提，DGD包埋-去包埋剂切片，与图3比较，病毒工厂（VF）内部的中间纤维网络被显示很清晰，一些装配好的病毒（V）与正在装配的病毒（AV）网络在网架中，胞质内仅有中间纤维保存完整，中间纤维与核的Lamina直接连接（箭号）．



1.感染 8h 的悬浮培养 HeL 细胞，经 CSK-Triton X-100 与 RSB-Magik 二步抽提，DGD 包埋-去包埋剂切片，中间纤维（IF）可以显示很清楚，中间纤维丝与 Lamina（L）的连接很清楚与真实（箭号），核骨架（Nm）与 Lamina 的连接也很清晰（箭号），装配好的病毒（V）被系在中间纤维网络中，而且正在装配的病毒（AV）与病毒亚结构也紧密连接在中间纤维网架上.

2.病毒感染 8h 的悬浮培养 HeLa S_3 细胞，处理过程与 1 相同，病毒工厂的高倍放大，病毒被固定在中间纤维网络中，正在装配的病毒（AV）与大量病毒的亚结构（病毒装配的原料）也与中间纤维（IF）结合.



1.病毒感染 13h 的悬浮培养 HeLa S_3 细胞经 CSK-Triton X-100，RSB-Magik，DNase 与 0.25 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 先后抽提，DGD 包埋-去包埋剂切片的高倍放大，显示中间纤维与病毒的连接(*).

2.病毒感染 8h 的 HeLa S_3 细胞，处理过程与 1 相同，显示中间纤维与病毒结构亚单位的直接连接(*)。