

## 家蚕CPV感染离体细胞的电镜观察\*

彭建新 余泽华 黎路林 陈曲侯

(华中师大昆虫学研究所 武汉 430070)

## 提 要

本文报道了BmCPV感染家蚕细胞系后的电镜观察。病毒感染早期,细胞质内形成电子致密的病毒发生基质,由病毒发生基质形成 BmCPV球状病毒粒子;病毒感染 48 小时后,多角体在病毒发生基质周围形成,大量的病毒粒子随机包埋的多角体内;病毒接种后 96 小时,多角体数目增多,其形状有三角,四角,五角及六角形,细胞质内充盈多角体致使细胞核被挤向细胞一侧并伴有形态的改变,受染细胞约为40%。

**关键词:** 家蚕 质型多角体病毒 家蚕细胞系

质型多角体病毒(CPV)是呼肠弧病毒科中感染昆虫的一类病毒,其核酸为双链RNA CPV有可能作为微生物杀虫剂用于农林害虫的防治。因此,有必要阐明CPV感染特征,增殖规律,病毒与宿主相互关系等以期更加有效地利用这一病毒资源。尽管国内已记录的CPV约20余株<sup>[1]</sup>,但所从事的研究,基本上是以敏感宿主为对象进行的<sup>[2][3][4]</sup>,而利用离体细胞实验体系的研究甚少。CPV的活体系统实验是十分必要且具重要价值,然而,应用传代细胞探索CPV的复制方式及超微结构,是一重要途径。尤其在阐述质型多角体病毒RNA的生物合成,蛋白质转译诸方面,离体系统几乎是无法取代的。本文报道家蚕CPV(*Bombyx mori* CPV)(BmCPV)感染其同源细胞的电镜观察。

## 材 料 与 方 法

## 一、材料

1.家蚕细胞系(BmN)系中国农科院蚕业研究所从国外引进而提供的。细胞生长用培养基为1/2Tc100+1/2Tc-199-MK辅以10%小牛血清。

2.病毒 家蚕CPV亦由上列单位惠赠。

## 二、方法

## 1.病毒接种物的制备

病毒接种物采用病虫中肠抽提物与复制病毒的细胞培养物的上清液两种。三龄家蚕幼虫饥饿4小时后,喂食涂有BmCPV的鲜嫩桑叶,然后于室温下饲养。家蚕幼虫感染病毒十天后,解剖罹病幼虫取出中肠,将中肠与适量培养基混合置乳钵中研磨,三层纱布过滤,3000转/分离心10分钟去沉淀,上清液用0.45 $\mu$ 滤膜抽滤除菌,无菌病毒液4 $^{\circ}$ C保存备用。感染病毒的细胞上清按常规方法

本文于1989年2月1日收到。

\* 本文承华师大电镜室饶华珊,魏林,王家坤制备电镜样品与电镜拍片,谨此致谢。

制备。

### 2. 接种病毒

选择传代 5 天生长旺盛, 贴壁的家蚕细胞, 移去培养基, 每瓶细胞 (25ml 培养瓶) 接种 1 毫升病毒接种物, 吸附 1 小时, 倾弃病毒接种液, 用培养基洗涤一次, 吸去洗涤液, 然后加 5 毫升新鲜培养基, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱 28℃ 恒温培养。同时设一对照组, 倒置显微镜观察, 拍照。

### 3. 电镜样品的制备

用冲刷法使细胞脱离瓶壁, 2000 转/分离心 6 分钟, 弃上清液, 沉淀细胞用 2.5% 戊二醛前固定, 磷酸缓冲液漂洗 (PH7.2), 1% 锇酸固定, 磷酸缓冲液洗涤, 乙醇梯度脱水, 苯二甲酸二丙酯脂包埋, LKB-IV 超薄切片机切片, 醋酸铂和柠檬酸铅双染色, H-600 电子显微镜观察拍片。

## 实验结果

### 一、光镜观察

接种病毒后早期阶段, 细胞形态无明显变化, 仅观察到细胞附壁似乎更为紧密, 48 小时后, 细胞质中开始出现折光率极强的多角体颗粒, 这些颗粒多聚集在细胞一侧, 同时, 细胞体积稍微膨大。感染三天后, 多角体数目增多, 细胞充盈多角体 (图 1)。病毒感染率为 40%。对照组细胞与感染病毒细胞间差异十分显著, 对照细胞生长正常形态均一, 无任何病变迹象 (图 2)。感染病毒的细胞上清液也具感染性。

### 二、电镜观察

病毒感染细胞的超微结构观察进一步确证 BmCPV 在家蚕细胞中的复制。病毒感染后 48 小时的电镜图象, 清晰显示病毒增殖的形态特征, 细胞质内已形成电子致密的病毒发生基质, 由病毒发生基质产生的球状病毒粒子散布在其间, 多角体首先在这一感染时期形成, 而且能够看到处于不同发育阶段的多角体环绕在病毒发生基质周围 (图 3), 同时能观察到病毒粒子附着在多角体周边嵌入多角体内, 包埋于多角体蛋白基质内的病毒粒子随机排列, 处于多角体边缘游离的病毒粒子结构较疏松, 而封闭在多角体内的病毒粒子较致密比游离病毒粒子小。多角体晶格构造亦清晰可见 (图 4)。随着病毒感染时间延续, 病毒发生基质逐渐消失 (图 5)。

在病毒感染 96 小时, 细胞质中充满多角体, 多角体的形状有三角, 四角, 五角及六角体。多角体产生的位置似乎有“极性”, 主要聚集在细胞一侧, 在此状态下, 细胞核受挤压移居细胞另外一侧并伴有形态的改变 (图 6)。

## 讨 论

本实验结果表明, 家蚕 CPV 对其同源离体细胞系 BmN 具有较强的感染性。病毒在敏感宿主细胞中的增殖过程主要还在细胞质内进行的。病毒发育早期, 细胞质中形成病毒发生基质。病毒发生基质是核酸, 病毒衣壳蛋白等组分的集合体, 病毒粒子在这里发育成熟。成熟的病毒粒子以随机方式嵌入多角体中。BmCPV 在传代细胞中的增殖特征与其他 CPV 相类似<sup>(8)(9)</sup>。

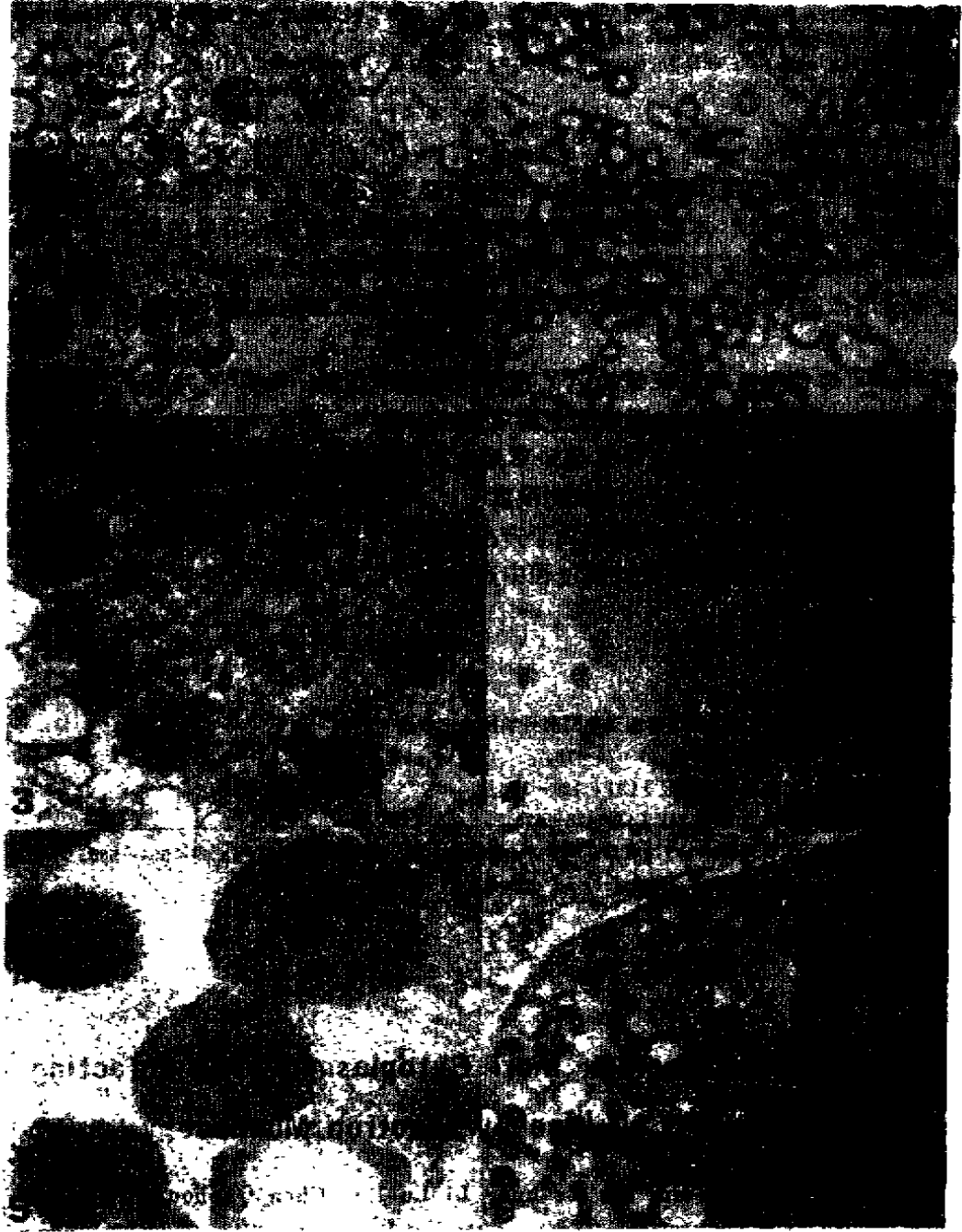


图1 示感染BmCPV的家蚕细胞

Fig1. Bm-n cells infected with Bm-CPV

图3 BmCPV感染48小时后的电镜图象 12,000x

Fig3. Electron micrograph of Bm-N cells  
infected with Bm-CPV 48hr postinfection  
12,000x

VS. 病毒发生基质 P.多角体 V.病毒粒子

图2 对照组家蚕细胞

Fig2. Bm-N cells uninfected

图4 示多角晶格结构 170,000x

Fig4. Lattice structure of  
polyhedra 170,000x

Vs. Virogenic stroma P. Polyhedra V. Virions.

图5 示多角体, 病毒发生基质已消失 20,000X

Fig 6. Polyhera and virogenic stroma  
disappearing within a cell 20,000X

P. 多角体  
P. Polyhedra

图6 受染细胞内充盈多角体及变形的细胞核  
3,500X

Fig6. Bm-N cell filled with polyhedra  
and deformed nuclei. 3,600X

P. 多角体 N. 细胞核  
P. Polyhedra N. Nucleus

一般认为CPV感染虫体或离体细胞, 细胞病理变化通常发生在细胞质, 而细胞核保持正常的超微结构<sup>(4)(6)</sup>。本实验观察到受病毒感染细胞的核产生明显的位移与形态变化。造成细胞核变化的原因显然是由于病毒大量增殖, 细胞内充斥多角体, 且多角体不对称分布所形成的“压力”, 这种压力迫使细胞核迁移至细胞边缘并使细胞核产生形变。

Granados 等曾报道粉纹夜蛾的CPV在传代细胞中复制, TnCPV并不产生可检测到的细胞外病毒, TnCPV感染的无细胞上清液无感染性<sup>(6)</sup>。而Longworth研究南方裸纹夜蛾(*Chrysodeixis eriosoma*) CPV感染草地贪夜蛾细胞结果显示产生了细胞外病毒, 但胞外病毒少到低于TCID<sub>50</sub>测定的检测限度<sup>(6)</sup>。本实验结果显示BmCPV感染细胞的无细胞上清液具有感染性, 感染性是否由于产生了细胞外病毒或其他原因所致, 尚不甚明了。显而易见, CPV在离体系统复制过程中产生胞外病毒问题存在歧异, 需进一步深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 梁东瑞等 1986 《中国昆虫病毒图谱》湖南科学技术出版社 P95.
- [2] 苏德明等 1978 复旦大学学报 1: 74-78.
- [3] 洪华珠 1984, 《华中师院学报》(2): 129-130.
- [4] 乐云仙等 1981, 昆虫学报 24, (4): 475-478.
- [5] Granados, R.R., McCarthy, W.J. and Naughton, M. 1974. *Virology*, 58: 584-588.
- [6] Longworth, J.F. 1981. *J. Invertebr. Pathol.*, 37: 57-91.

## Observations of *Bombyx mori* Cytoplasmic Virus Infecting a Continuous Cell Line by Electron Microscopy

Peng Jian-xin Yu Ze-hua Li Lu-lin Chen Qu-hou

(Institute of Entomology, Huazhong Normal University, Wuhan 430070)

The paper reports observations on a cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) from *Bombyx mori* infecting *Bombyx mori* cells (Bm-N) by electron microscopy. In the early stage of infection, the electron dense virogenic stroma containing virions formed in the cytoplasm of infected cells, Inclusion bodies appear

red at periphery of the virogenic stroma at 48hr after infection. The large number of virions randomly embedded within the polyhedrin matrix. Polyhedra were tri-gonal, tetragonal, pentagonal and hexagonal in shape. By 96hr after infection the cytoplasm of infected cells filled with polyhedra and the nucleus of infected cells deformed.

**Key Words:** *Bombyx mori* Cytoplasmic polyhedrosis virus  
Bm cell line