

草鱼呼肠孤病毒在 CIK 细胞中复制及形态发生的研究*

邹桂平, 方勤**

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S941.41

Q939.4

摘要:以草鱼呼肠孤病毒(GCRV)感染的草鱼肾细胞系(CIK)为模型,进行了草鱼呼肠孤病毒在细胞内的形态发生的研究。当病毒以感染复数为5~10 PFU/CELL感染CIK细胞时,在病毒感染细胞4h以内的切片中,可观察到脱去部分外层衣壳的不完整病毒颗粒。感染细胞8h,可观察到浆胞内病毒发生基质,其内含有大量的直径约50 nm的亚病毒颗粒,无外层蛋白结构。感染12~16h后,这些亚病毒颗粒装配上外层蛋白结构,形成直径为72 nm左右的成熟的病毒粒子。病毒感染细胞8h后,开始出现典型的病毒包含体,16~20h小时病毒包含体裂解,继而释放出有感染性的子代病毒颗粒。该结果有助于对GCRV致病机理的了解。

关键词:草鱼呼肠孤病毒(GCRV); 草鱼肾细胞系(CIK); 形态发生、CIK、致病机理、鱼病毒

中图分类号:Q943.112 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)02-0188-05

草鱼呼肠孤病毒(GCRV)为呼肠孤病毒科新建水生呼肠孤病毒属一成员^[1],亦是我国分离鉴定的第一株鱼类病毒^[2,3]。十多年来,我们对其形态、病毒基因组结构、细胞培养特性、多肽的基因定位、cDNA文库构建及序列分析等^[3-7]进行了研究,特别是对GCRV的RNA聚合酶的序列分析及同源性比较研究^[8],为进一步揭示GCRV分子致病机理奠定了良好的基础。病毒复制是一系列连续有序的生物合成过程,而细胞是病毒转录复制的重要场所。要了解GCRV的致病机理,首先必须建立一个适合于GCRV研究的细胞实验系统。我们在对GCRV细胞培养特性研究中,建立了高滴度病毒培养方法^[4]。这一方法的建立,无疑为对GCRV的复制与形态发生研究奠定了良好条件。本研究通过对GCRV感染草鱼肾细胞系(CIK)不同时间取样超薄切片的电镜观察,阐明了GCRV在CIK细胞内的形成过程,下面报道本实验的研究结果。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、病毒增殖及滴价测定

实验所用CIK细胞系,由本实验室提供;病毒为本实验室传代的GCRV-873株^[2]。细胞培养、病毒增殖及滴价测定按文献进行^[4]。

1.2 用于超薄切片制备的细胞感染实验

挑选对数生长期的CIK细胞进行病毒感染,病毒的感染复数为5~10 PFU/CELL,GCRV吸附细胞时间为60 min。吸附后,倾去病毒液,用PBS漂洗单层细胞三次,以洗去未吸附的病毒粒子,然后加入含2%小牛

收稿日期:1999-07-12,修回日期:1999-09-28

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570035)

** 通讯作者:方勤(1961年-)女,湖北省人,副研究员,主要从事水生动物病毒学及其基因工程的研究。

作者简介:邹桂平(1975年-)男,湖北省人,在读硕士生,主要从事水生动物病毒研究。

血清的 Eagle's MEM 培养基(MEM-2), 置 28 ℃ 培养。此后, 在 0.5、1、2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 取样。离心沉淀病毒感染的细胞培养物, 用 2.5% 戊二醛室温下固定一小时后, 置 4 ℃ 保存备用。

1.3 电镜超薄切片的制备

取 4 ℃ 固定好的样品, 用 PBS 漂洗细胞, 然后用 1% 的 OsO_4 溶液固定 1 h, 50%、70%、95%、100% 乙醇梯度脱水, Epon812 包埋, 60~65 ℃ 下聚合 2~3 d。包埋块在 LKB-2128 型超薄切片机上切制, 常规醋酸铀、枸橼酸铅双染色, 样品在日立 H-7000FA 型透射电镜下观察, 照相与分析。

2 结果与讨论

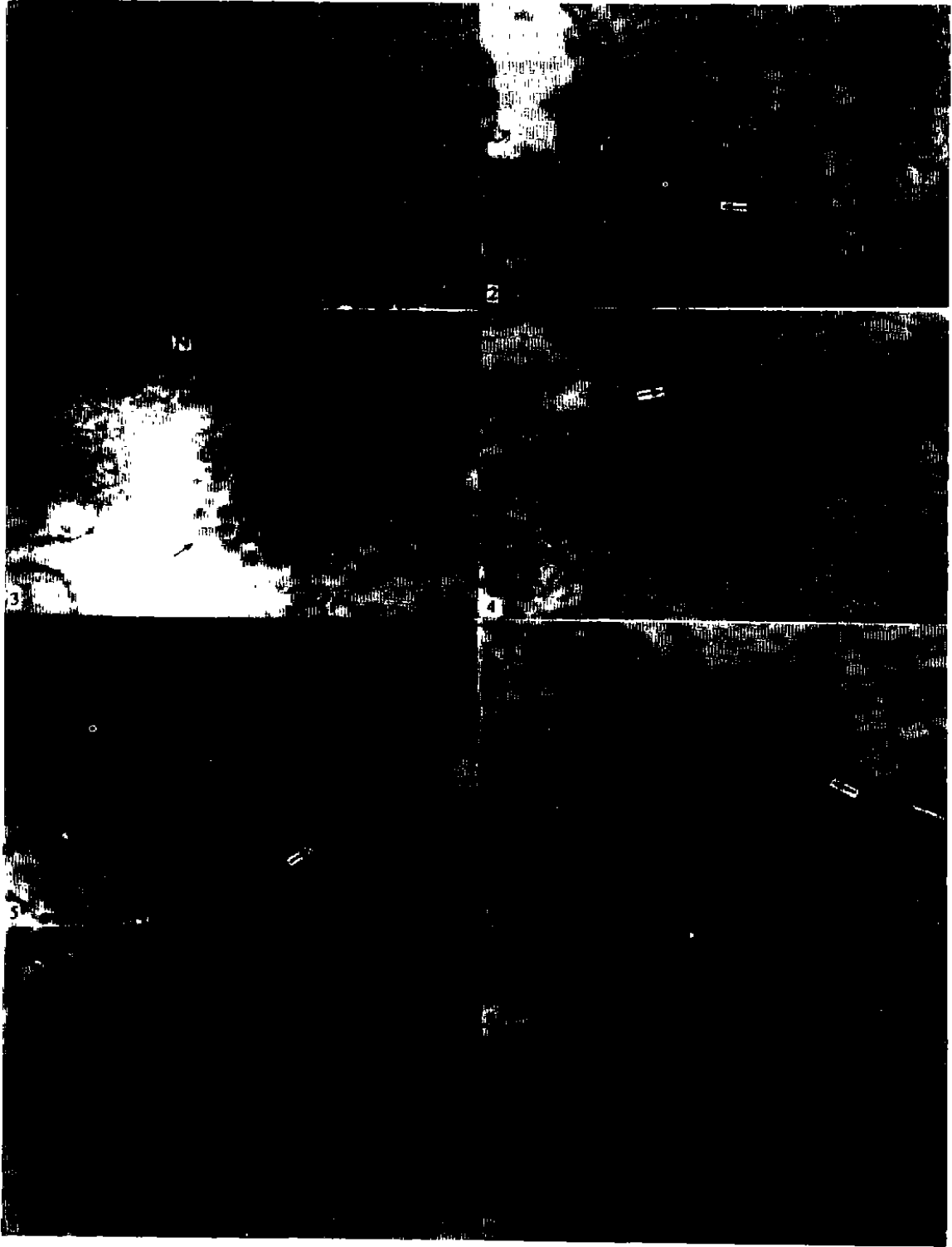
2.1 GCRV 的形态发生过程

在 GCRV 吸附 CIK 细胞 60 min 后, 分别在 0.5、1、2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 收获感染病毒的细胞。电镜观察在感染细胞 0.5 至 4 h 的切片中, 相似的病毒粒子进入细胞的过程(图 1)。从图中可以看到, 这些病毒形态不很完整, 因病毒进入细胞后与溶酶体结合, 其水解酶类使毒粒外衣壳水解而形成亚病毒颗粒(SVP)。因为该病毒的转录与复制是在亚病毒颗粒中进行的, 病毒核心内含有 RNA 多聚酶等病毒早期转录、复制的酶类, 故脱壳过程有助于病毒的转录与复制。此外, 大多数新合成的单链 RNA 分子可通过核心上的钉状物通道离开亚病毒颗粒^[9], 很快与胞浆中的核糖体结合, 在核糖体上翻译产生不同的蛋白质, 以进行子代病毒的复制及包装, 这一过程与病毒的复制需要连续的蛋白合成是极相适应的。从图 2 可见, 病毒感染细胞 8 h 后, 即可在 CIK 细胞的细胞质中观察到病毒发生基质, 基质中存在大量未装配成熟的亚病毒颗粒(图 3)。在病毒感染细胞 12~16 h 时, 新复制的病毒粒子逐渐包装成熟, 最后细胞裂解导致成熟的病毒粒子释放(图 4)。

2.2 病毒包含体的形成

在呼肠孤病毒感染的细胞中, 产生围绕着细胞核的月牙状细胞质内嗜酸性包含体。这一典型的特征在 GCRV 复制中也表现得极为明显。实验结果显示, 在病毒感染细胞 8 h 后, 即可观察到病毒包含体的形成(图 5), 16~20 h 后, 随着子代病毒粒子的包装成熟, 包含体逐渐裂解(图 6)。包含体着色较深, 因在包含体中含有细胞崩解成分以及 dsRNA、病毒特异性多肽、完全与不完全的病毒颗粒。在病毒感染细胞 20 h 后, 包含体完全裂解, 继而释放出成熟的子代病毒颗粒(图 7)。图 8 显示细胞破裂而细胞核形态依然完好; 由此进一步证实 GCRV 的复制是在细胞质中进行, 该结论符合呼肠孤病毒科的复制特征。

CIK 细胞为 GCRV 敏感细胞系^[4], 我们在病毒吸附细胞 60 min 以后, 采用不同间隔时间对感染的细胞进行取样固定, 通过电子显微镜观察, 得到了 GCRV 在 CIK 细胞中形态发生的典型过程。这一研究结果进一步证实, 该病毒的复制与呼肠孤病毒、轮状病毒、环状病毒极为相似^[9~13]。与 dsDNA 不同, 呼肠孤病毒 dsRNA 的复制是以全保留方式进行^[9], 这一特征可能是与该病毒双链、分段基因组特性相适应, 其机理有待进一步研究。有关该科病毒 10~12 基因组节段是如何准确无误地包装在毒粒内的机制目前尚不清楚。呼肠孤病毒基因组独特的结构和复制特征为双链 RNA 病毒遗传、进化研究提供了良好条件。在呼肠孤病毒科现有九个属的病毒研究中, 对水生呼肠孤病毒属的了解还不甚深入^[1], 我们所进行的 GCRV 在 CIK 细胞中形态发生的研究, 只是在细胞水平上对该病毒复制过程的初步认识。为进一步了解该病毒复制的分子动态过程, 我们将运用原位分子杂交等研究方法, 对该病毒在细胞复制过程中



- 图 1 病毒吸附后进入细胞质,如箭头所示。×24,000
 图 2 病毒发生基质的形成,如箭头所示。×12,000
 图 3 成熟的病毒粒子的形成,如箭头所示。×40,000
 图 4 细胞裂解后病毒释放,如箭头所示。×40,000
 图 5 病毒包含体的形成。如箭头所示。×30,000
 图 6 病毒包含体膜状结构破裂。如箭头所示。×40,000
 图 7 病毒释放后分布于细胞核周围。×40,000
 图 8 细胞裂解后细胞核聚在一起。×6,000

N 表示细胞核

- Fig.1 The virus penetrated into the cell after adsorption. as arrow shows. ×24,000
 Fig.2 Viroplasm formed in the cytoplasm. as arrow shows. ×12,000
 Fig.3 The mature virus produced. as arrow shows. ×40,000
 Fig.4 The virus released after the cell lysed. as arrow shows. ×40,000
 Fig.5 The inclusion body produced around the nucleus. as arrow show. ×30,000
 Fig.6 The envelope of the inclusion body cracked. as arrow shows. ×40,000
 Fig.7 Virus were located around the nuclus after cells lysis. as arrow shows. ×40,000
 Fig.8 The nuclei of the cells accumulated after cells lysis. as arrow shows. ×6,000

N; stands for nucleus.

新合成的 RNA 及多肽进行定性及定量分析,以确定 RNA 起始转录、复制及与多肽合成的对应关系。

致谢 本文得到张立人教授的指导,本所电镜室邓红、袁爱华同志对该工作给予很大帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al.* Classification and nomenclature of viruses: Sixth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses [J]. Archives of Virology, 1995, 140(Suppl. 10): 208~239
- [2] 柯丽华,方勤,蔡宜权.一株新的草鱼出血病病毒分离物特性[J].水生生物学报,1990,14(2):153~159
- [3] 陈燕棠,江育林.草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究[J].科学通报,1983,28:1138~1140
- [4] 方勤,柯丽华,蔡宜权.草鱼出血病病毒的生长特性及高价培养[J].病毒学杂志,1989,(3):315~319
- [5] 柯丽华,王伟,方勤,等.草鱼出血病病毒多肽及基因组的体外翻译[J].病毒学报,1992,8(2):169~173
- [6] 王伟,蔡宜权,方勤,等.草鱼出血病病毒多肽的基因定位[J].中国病毒学,1994,9(4):356~361
- [7] 田静,邹桂平,方勤.草鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及序列分析[J].中国病毒学,1999,14(1):87~92
- [8] Fang Qin, Tian Jing, Shi Liang. Sequencing of Grass Carp Hemorrhage Virus (GCHV) S1 Segment revealed a putative RNA-dependent RNA polymerase [C]. Abstract book of XIth International Congress of Virology, Sydney Australia, 1999, 33
- [9] Bernard N Fields, David M Knipe, Peter M Howley. Fields Virology [A], Third Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996, 1575~1583, 1640~1647, 1723~1727
- [10] Zweerink H J, Morgan E M, Skyler J S. Reovirus morphogenesis: characterization of subviral particles in infected cells [J]. Virology, 1976, 73:442~453
- [11] Betty C A, David Y G, Mary K E. Ultra-structural study of rotavirus replications in cultured cells [J]. Journal of General Virology, 1980, 46:75~85

- [12] McNulty M S, Curran W L, McFerran J B. The Morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells [J]. *Journal of General Virology*, 1976, 33:503-508
- [13] Eaton B T, Hyatt A D. The replication of bluetongue virus [J]. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 1990, 162:89-118

Study on Replication and Morphogenesis of the Grass Carp Reovirus (GCRV) in CIK Cells

ZOU Gui-ping, FANG Qin

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071, China*)

Abstract: The morphogenesis of the Grass Carp Reovirus (GCRV) was studied in CIK cells. The CIK cells were infected by the GCRV at MOI (multiplicity of infection) of 5-10 PFU/Cell. It was demonstrated that the subviral particles without outer layer proteins could be seen in the cytoplasm at 4 hours post infection. At 8 hours post infection many viroplasms could be found in the cytoplasm of the cells. And there were many subviral particles without outer layer proteins in them. As the infection progressed, the mature virus, which is about 72 nm in diameter produced after the subviral particles were transiently enveloped during 12-16 hours post infection. During its replication, at 8 hour post infection inclusion bodies were formed, in which there were many immature and mature viruses. And the progeny virions were released after the inclusion bodies lysed at 16-20 hours post infection.

Key words: Grass carp reovirus (GCRV); *Ctenopharyngodon idellus* kidney cell (CIK cell); Morphogenesis