

350-356

8

苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒复制  
与宿主细胞核骨架关系初探\*

S476.13.

刘 晓 琼, 余 泽 华\*\*, 王 家 坤, 姚 汉 超, 魏 华 珊, 陈 曲 侯

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

**摘要:**用选择性抽提方法和整装细胞电镜技术观察苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(AcMNPV)感染的 Tn5B1 细胞的核骨架结构体系,发现感染早期病毒的复制过程未对宿主细胞核骨架的形态结构产生明显影响,而感染晚期多角体的装配在核骨架网络中进行。以 *ie-1* 基因和多角体蛋白基因为探针,点杂交分析基因转录活性与宿主细胞核骨架的关系,结果表明在病毒感染早期,无论是正转录活性的 *ie-1* 基因还是不具转录活性的多角体蛋白基因都可紧密结合在宿主细胞的核骨架上。

**关键词:**核骨架; AcMNPV; 复制; 多角体装配; 基因转录活性

苜蓿丫纹夜蛾, 核多角体病毒

**中图分类号:** Q965.8    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0350-07

核骨架是真核细胞核中广泛存在的一类重要的功能性结构,在细胞的 DNA 复制、基因转录、DNA 加工、转运,染色体构建与空间布局等诸多过程中发挥作用<sup>[1]</sup>。研究表明作为外源基因组的病毒在细胞核内的复制亦与核骨架有关。已报道腺病毒新合成 DNA 特异性地结合在核骨架上<sup>[2]</sup>,腺病毒 DNA 的转录活性与核骨架相关<sup>[3]</sup>,其装配过程依赖于核骨架作为空间支架<sup>[4]</sup>。单纯疱疹病毒的核衣壳也在核骨架上进行装配<sup>[5]</sup>。一些病毒特异的核心调控蛋白,如 SV40 的 T 抗原,HSV 的 ICP4, HIV 的 Tat 蛋白等均与核骨架紧密结合<sup>[6]</sup>。

AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus) 是昆虫杆状病毒科核型多角体病毒属的代表成员,是具环状双链基因组,在细胞核内复制的 DNA 病毒。与其它核内复制的病毒相似,AcMNPV 基因组的转录、DNA 复制以及核衣壳的装配,并非是在细胞核内的可溶性介质中进行,而是与核骨架相关。在 AcMNPV 接种后 24 h,与核骨架结合的蛋白在感染细胞内比未感染细胞约增加 150 倍,这包括大部分 P39 主要衣壳蛋白,大部分多角体蛋白,以及部分 P6.9 核心 DNA 结合蛋白<sup>[7]</sup>。超微结构研究表明,衣壳结构形成后被填充以原先与核骨架结合的 DNA,因此核骨架可能不仅是杆状病毒 DNA 复制的脚手架,而且也是核衣壳装配的支撑物<sup>[8,9]</sup>。

核型多角体病毒复制的一个重要特征是感染晚期病毒在细胞核内形成多角体,多角体主要由多角体蛋白构成,当单个或多个病毒核衣壳被囊膜包围形成 PDV 后,多角体蛋白即开始

收稿日期:1999-08-27,修回日期:1999-12-05

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.39870039)

作者简介:刘晓琼(1975年-),女,硕士,现为广州中山大学博士生。

\*\* 通讯作者:余泽华(1945年-),男,教授。

围绕 PDV 沉积,最终形成具特定大小和形状的蛋白质晶体。核型多角体病毒复制的另一个重要特征是病毒基因组以级联方式呈时序性表达。病毒入侵细胞后不久即开始表达极早期和早期基因,随后早期基因产物激活和调控病毒 DNA 的复制和晚期、极晚期基因的转录。本文以 AcMNPV 和昆虫细胞系 Tn5B1 (*Trichoplusia ni*) 为研究对象,应用细胞分级抽提和整装细胞电镜技术观察了病毒感染前后细胞核骨架形态结构的变化,发现 AcMNPV 多角体的装配在核骨架中进行,以 *ie-1* 和多角体蛋白基因为探针,应用点杂交对病毒基因转录活性与核骨架的关系进行分析,结果表明,无论是否具备转录活性的基因均可结合在核骨架上。这些结果丰富了我们对杆状病毒复制与宿主细胞关系的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与质粒

所用限制性内切酶、RNase A、DNase I、蛋白酶 K、切口平移标记试剂盒等购自华美生物工程公司,质粒 pAcIE1 和 pBlue PH 由武汉大学分子病毒实验室构建,刘德立教授惠赠。

### 1.2 细胞培养与病毒感染

粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞 BT1-Tn5B1-4, 由美国 Cornell 大学 Granados 教授惠赠,本所保存,用 Grace 培养基 (GIBCO) 补加 5% 胎牛血清, 28 °C 下恒温培养,野生型 AcMNPV 以 MOI 20-50 pfu/细胞剂量接种 Tn5B1 细胞。对照组细胞不接种病毒。

### 1.3 细胞分级抽提与整装细胞电镜制样

将 Tn5B1 细胞直接接种在覆有 Formvar 膜并喷镀一层碳膜的镍网或不锈钢网上培养,待细胞覆盖网面积约为 60% 时,对网上细胞攻毒。分别在感染 15.5 h 和 39.5 h 取样,基本参照 Fey 和 Penman 方法进行细胞分级抽提<sup>[10]</sup>。细胞经 PBS 漂洗后,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, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EGTA, 1.2 mmol/L PMSF) 4 °C 下处理 0.5-0.8 min,再用 RSB-Majik 液 (42.5 mmol/L Tris·HCl pH 8.3, 8.5 mmol/L NaCl, 2.6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L PMSF, 1% Tween 40, 0.5% 脱氧胆酸钠) 4 °C 下处理 1 min,再加入含 270 μg/mL DNase I 的消化液 (CSK 缓冲液中减去 50 mmol/L NaCl, 增加 50 mmol/L KCl) 37 °C 下处理 30-40 min,最后加入 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至终浓度 0.25 mol/L,室温下处理 5 min,存留的即为核骨架-核纤层-中等纤维结构体系。抽提后的细胞在 CSK 液中漂洗后,用 2.5% 戊二醛固定 30 min, PBS 漂洗,梯度乙醇脱水,经醋酸异戊酯置换。CO<sub>2</sub> 临界点干燥,不经任何染色,在 HITACHI-600 透射电镜下观察。

### 1.4 三组分法提取 DNA

参照文献[3]进行,略有改动。细胞(细胞量约为  $3 \cdot 10^7$ )经 CSK 液和 RSB-Majik 液处理后,沉淀物用含 0.25 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 CSK 液 4 °C 下作用 5 min, 4 000 r/min 离心 5 min,得上清称组分 C。沉淀 I 用 EcoR I buffer 洗涤一次后,加入 800-1 000 u/mL 的内切酶 EcoR I 于 37 °C 消化 4 h,加入 1 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至终浓度为 0.25 mol/L,室温作用 5 min。4 000 r/min 离心 10 min,得上清和沉淀分别称组分 b 和组分 a,组分 a、b、c 经 100 μg/mL 蛋白酶 K 于 55 °C 消化 3 h (沉淀 a 用含 1% SDS 的 TE 悬浮后加入蛋白酶 K),酚-氯仿、氯仿交替抽提一次。a 号水相直接用乙醇沉淀 DNA, b 号和 c 号水相透析 24-36 h 后,乙醇沉淀 DNA。所得分别为与核骨架处于不同结合状态的三种 DNA。DNA 沉淀用 TE 溶解, 40 μg/mL RNase A 37 °C 处理 1-2 h 后直接用于点杂交。

### 1.5 点杂交

质粒 pAcIE1 经 EcoR I、HindIII 双酶切,质粒 pBlue PH 经 Xho I、Sac I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分离后用 GlasPac 试剂盒 (NSSC 公司)从胶中回收 *ie-1* 基因和 *polh* 基因,依 Nick translation 试剂盒说明书进行探针标记。

三组分法制备的 DNA 样品沸水浴中变性 10 min 后迅速置于冰浴上。加入 1 倍体积  $20 \times$  SSC 使其终浓度为  $10 \times$  SSC。少量多次直接将 DNA 点样于尼龙膜上。杂交参照文献[11]中程序进行。阳性对照为感染细胞中提取的病毒 DNA, 阴性对照为未感染细胞核骨架上紧密结合的染色体 DNA。

## 2 结果与讨论

### 2.1 昆虫细胞中存在精细发达的中等纤维-核纤层-核骨架结构体系

应用细胞分级抽提和整装细胞电镜技术, 本文首次在 Tn5B1、Sf9、BmN(后两者结果未显示)三种昆虫细胞系中均观察到了精细发达的中等纤维-核纤层-核骨架结构体系。当 Tn5B1 细胞分别被选择性抽提去除细胞质, 核内大部分可溶性蛋白、微管、微丝及浓密的染色质结构后, 细胞内残存、暴露出一个耐受高盐和去污剂处理的致密的纤维网络状结构(图 1), 其中贯穿于细胞质空间的是中等纤维, 其走向与排列无明显规律; 核纤层紧贴核膜内层, 其交织的蛋白网络结构围绕细胞核形成明显的核、质边界; 核内骨架纤维则纵横交错, 粗细不一, 密布充满于整个核内空间。三者理化性质相似, 空间结构上相连, 形成一个贯穿核-质的统一结构体系(图 2)。核骨架显然更为耐受去污剂、高盐处理, 展示纤维网络较中等纤维更为致密。常在核骨架纤维交结点处观察到致密的斑状、团块物质(图 1、3), 可能为未抽提干净残余的染色质结构或 DNA 蛋白质复合体(RNP)。

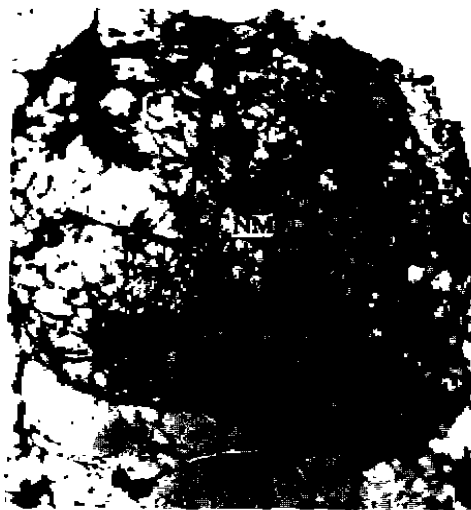


图 1 未感染 Tn5B1 细胞的核骨架(6,000 $\times$ )  
NM: 核骨架

Fig. 1 The nuclear matrix in uninfected Tn5B1 cell  
(6,000 $\times$ ) NM: nuclear matrix



图 2 Tn5B1 细胞中等纤维-核纤层-核骨架统一  
结构体系(15 000 $\times$ )

IF: 中等纤维。L: 核纤层, NM: 核骨架

Fig. 2 The intermediated filament-lamina-nuclear  
matrix structure in Tn5B1 cell (15 000 $\times$ )

IF: intermediated filament, L: Lamina. NM: nuclear matrix

## 2.2 AcMNPV 复制早期未对核骨架形态结构产生影响,复制晚期多角体的装配在核骨架上进行

文献曾报道腺病毒对宿主细胞的感染造成细胞核骨架的结构发生改变<sup>[17]</sup>,我们的实验结果却发现在 AcMNPV 复制至极晚期,多角体在细胞核中大量形成以前,感染细胞核骨架的形态结构并未随病毒感染进程出现显著变化。AcMNPV 在感染细胞后 30 min 内即开始极早期基因的表达,在约 6 hpi-18 hpi 期间进行病毒 DNA 的复制<sup>[12]</sup>。然而直至感染晚期 15.5 hpi 时为止,受 AcMNPV 感染的细胞的核骨架结构仍保留得十分完整致密,未出现明显可辨的结构紊乱或重排,也未见核骨架纤维上结合有类似病毒粒子结构状的颗粒,与正常非感染的细胞相比,两者的核骨架形态结构之间不存在明显可辨的差异(图 3)。

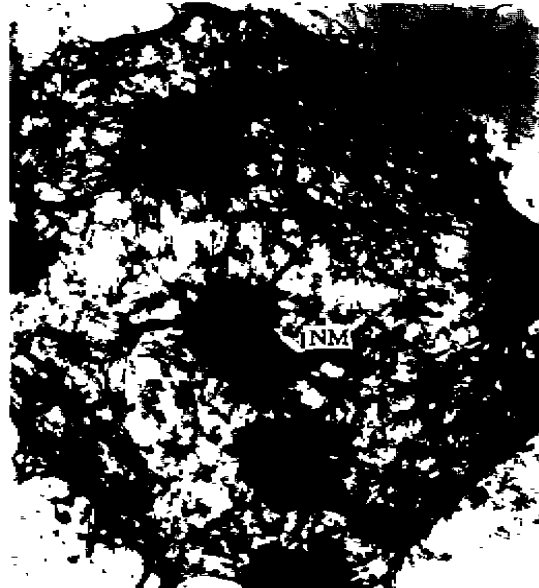


图3 AcMNPV 感染 15.5 hr 的 Tn5B1 细胞的核骨架(8 000 ×)

NM: 核骨架

Fig.3 The nuclear matrix in Tn5B1 cell infected by AcMNPV for 15.5 hr (8 000 ×)

NM: nuclear matrix



图4 AcMNPV 感染 39.5 hr 的 Tn5B1 细胞核骨架

(示大量多角体在核骨架网络中形成)(6 000 ×) PIB: 多角体

Fig.4 The nuclear matrix in Tn5B1 cell infected

by AcMNPV for 39.5 hr (6 000 ×)

PIB: polyhedral inclusion body.

AcMNPV 在复制极晚期开始形成多角体,在感染 39.5 h 的 Tn5B1 细胞中,可见病毒复制大量产生的多角体并未随多步分级抽提溶液流失或散布于细胞质等其它各处,而是十分整齐地局限于细胞核内分布,笼络在残存的核骨架之中(图 4),说明病毒多角体与细胞核骨架之间存在着一种较牢固的特异性结合关系,而非一般的机械粘附。已有的研究结果也表明 AcMNPV 感染晚期多角体蛋白大量结合在核骨架上,而病毒核衣壳也以末端连结的方式与核骨架相结合<sup>[7]</sup>。这些结果从不同侧面提示细胞的核骨架结构很可能参与了病毒多角体的自装配过程,为其形态发生提供空间支架。在产生多角体数目较少的细胞核内,核骨架与核纤层的网络结构仍保持得较为完整(结果未显示),但在多角体大量发生的细胞核内,原来密布核骨架网络的细胞核空间被装配成熟,体积庞大的多角体占据,核骨架的整体网络结构被破坏,原有的

核骨架纤维消失,核边缘的核纤层及核骨架结构局部发生破裂。已有的研究表明多角体的结构组分中并不存在细胞核骨架的蛋白成分,而 AcMNPV 基因组中存在以核骨架蛋白组分之一——肌动蛋白为底物,特异水解肌动蛋白的组织蛋白酶基因 *V-cath*<sup>[13,14]</sup>,因而推测消失的核骨架纤维并非在多角体成熟过程中被包埋,而是在多角体装配的某个阶段被病毒的蛋白酶类成分降解。从放大的图象中似乎可见多角体的边缘与核骨架纤维在空间结构上有直接的物理联系(图 5),但由于透射电镜观察到的仅是平面图象,故不能排除这种联系可能是不同平面两种物体重叠而产生的视角效果。多角体的装配与核骨架之间真实联系的具体状况有待于进一步的研究证明。

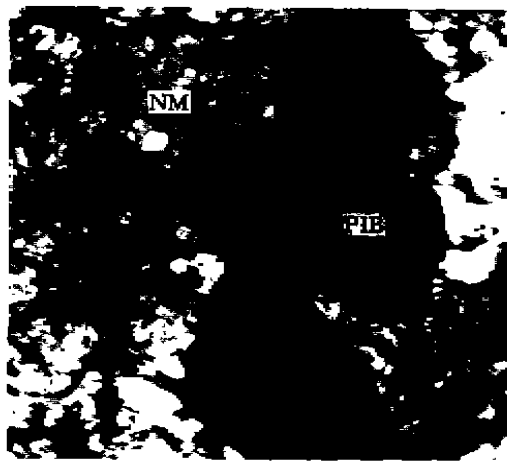


图 5 AcMNPV 多角体结合在 NM 上的放大电镜照片 (12 000 $\times$ )

Fig.5 The magnified electron micrograph of association of AcMNPV polyhedra with the nuclear matrix (12,000 $\times$ )

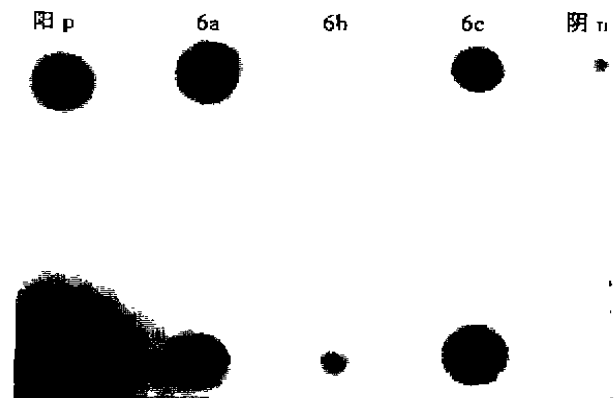


图 6 点杂交分析

上: *poth* 探针 下: *ie-1* 探针

Fig.6 Dot blot analysis

Above: *poth* probe, Below: *ie-1* probe, p: positive control, n: negative control

本文应用整装细胞电镜技术在病毒粒子装配阶段未观察到病毒发生基质、核衣壳或病毒装配亚单位等在核骨架上的结合。这可能是由于整装细胞电镜技术制备的整体核骨架网络过于致密,样品又未经任何特殊的染色处理,因而致使病毒结构难以辨认。

### 2.3 AcMNPV 复制早期, *ie-1* 基因和多角体蛋白基因紧密结合在核骨架上

来自真核细胞 DNA 和腺病毒的报告均表明,正在活跃转录的基因结合在核骨架上,而无转录活性的基因则不与核骨架结合,基因只有结合在核骨架上才能进行转录<sup>[1,3]</sup>。杆状病毒的复制是否同样遵循这一规律? 活跃转录的基因片段与核骨架紧密结合,核酸酶消化时将受到核骨架蛋白的保护;而无转录活性的基因片段以“loop”环的形式突出于核骨架之外,对核酸酶敏感,易被消化而从核骨架上脱落。由此推测病毒 DNA 在复制早期与核骨架的关系可能呈现为以下三种方式:(1)核液中游离的与核骨架不结合的 DNA(组分 c);(2)与核骨架结合不紧密,易被核酸酶切割的 DNA(组分 b);(3)与核骨架紧密结合,不易被酶解的 DNA(组分 a)。*ie-1* 基因和 *poth* 基因分别属于 AcMNPV 的极早期基因和晚期基因。*ie-1* 基因的转录在感染

后立即开始,并持续到晚期<sup>[15]</sup>,多角体蛋白基因在病毒感染细胞 24 h 后大量表达<sup>[12]</sup>。我们在病毒感染早期 6~8 h 取样,以 *ie-1* 基因和 *polh* 基因为探针分别对上述三种与核骨架处于不同结合状态的 DNA 组分进行点杂交分析,结果表明,尽管取样时 *ie-1* 基因正活跃转录,*polh* 基因转录尚未开始,两者却同时被检测存在于与核骨架紧密结合的 DNA 组分中,杂交信号显示强阳性(图 6a)。高浓度的酶切消化仅使极少量含待测基因的 DNA 片段被切割脱离核骨架组分,杂交显示微弱信号(图 6b),说明 *ie-1* 基因、*polh* 基因与核骨架的结合是牢固和特异性的结合。核液中游离的 DNA 中由于含 AcMNPV 全基因组,故也显示强阳性信号(图 6c)。

点杂交的结果似乎说明 AcMNPV 的复制并不遵循只有活跃转录的基因片段才与核骨架结合这一规律,这里存在以下几种可能性。首先,病毒复制对基因转录活性与核骨架关系的分析造成了影响。文献报道 AcMNPV 的 DNA 合成开始于感染后 5~8 h,13~18 h 达到最高峰<sup>[12]</sup>。我们在感染后 6~8 h 取样,此时可能已有部分亲代病毒启动了 DNA 复制。病毒 DNA 复制时可能以大部分基因组或全部基因组与核骨架结合,而无转录活性的晚期基因也因此结合在核骨架上。其次,AcMNPV 基因组与核骨架结合的具体方式对实验结果产生影响。病毒 DNA 在进入细胞核后,是以超螺旋状态的全基因组与核骨架相结合,还是局部解螺旋,以某些类似于真核 DNA MAR(matrix associated region,核基质结合区)的锚定序列与核骨架结合,而非结合区域突出形成 loop 环形式?在 AcMNPV 基因组物理结构中,*ie-1* 基因与 *polh* 基因之间至少相隔 *ie-n*、*pe38*、*ptp* 等若干基因及 *hr1* 区<sup>[16]</sup>,这些基因以及 *ie-1*、*polh* 基因侧翼序列与核骨架的结合方式与状态都将影响 *ie-1* 与 *polh* 基因间的 *EcoR* I 酶切位点是否暴露或受到核骨架蛋白的保护。此外,AcMNPV DNA 与核骨架的结合方式也可能随病毒复制处于不同阶段、病毒复制进行不同事件而动态变化。总之,这些问题的深入研究都将有助于阐明 AcMNPV 基因转录活性与核骨架关系的规律。

AcMNPV 早期转录开始后,大量正在转录的 *ie-1* 基因紧密结合在核骨架上,暗示这种结合具有某种生物学意义。在真核细胞研究领域,核骨架为 DNA 复制提供空间支点,而且通过与各种复制必需的酶和蛋白因子的结合将特定反应所需因子募集在一起,促进各因子间相互作用的效率。推测 AcMNPV 基因组进行转录时,一方面正在转录的基因与核骨架结合,通过与核骨架蛋白成份 DNA 拓扑异构酶 II 相互作用而处于有利于转录的特定空间构象(如局部解链);另一方面,转录所需的各种酶和蛋白因子可能在核骨架上装配形成转录复合体,核骨架充当操作平台将各转录因子浓缩,聚集于局部微环境,从而有利于转录的进行。进一步探讨转录基因与核骨架结合的生物学意义将是很有意义的问题。

## 参 考 文 献

- [1] 翟中和主编.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,1995.265-270
- [2] 陈枫.新合成的腺病毒 DNA 是结合在宿主细胞核骨架上[J].实验生物学报,1990,23(2):227-231
- [3] 翟中和、陈枫.腺病毒 DNA 转录活性与核骨架的关系[J].中国科学(B),1988,10:1052-1058
- [4] Zhai Z, Penman S. Adenovirus factory imaged in resin section[C]. XI International for Electron Microscopy, 1986. vol3: 2205
- [5] Bibor-Hardy V M, Pouchlet E S, Pierre M H, et al. The nuclear matrix is involved in herpes simplex virogenesis [J]. Virology, 1982. 121:296-306

- [6] 王小忠,等. 核基质蛋白与核基质结构蛋白研究的进展[M]. 细胞生物学新动态,上海:上海科学技术出版社,1994 85-89
- [7] Wilson M E, Price K H. Association of AcMNPV with the nuclear matrix [J]. Virology, 1988, 167:233-241
- [8] Fraser M J. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures [J]. J ultrastr Mol Res, 1986, 95:189-195
- [9] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京:中国农业科技出版社, 1998. p169
- [10] Fey E G, Krochmalnic G, Penman S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix intermediate filament scaffold: Three dimensional organization and protein composition [J]. J Cell Bio, 1984, 98:1973-1984
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. second edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Chapter 10-11.
- [12] 蒲益龙. 昆虫病理学[M]. 广州:广东科技出版社 1992. 113-116.
- [13] Lanier L M, Slack J M, Volkman L E. Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: The role of virion-associated V-CATH [J]. Virology, 1996, 216(2): 380-388
- [14] Slack J M, Kuzio J. and Faulkner P. Characterization of v-cath, a carboxypeptidase-like proteinase expressed by the baculovirus AcMNPV [J]. J Gen Virol, 1995, 76:1091-1098
- [15] Pulien S S and Friesem P. D. Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of AcMNPV is regulated by DNA sequence within its 5' noncoding leader region [J]. J Virol, 1995, 69(1):156-165
- [16] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J. *et al.* The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. Virology, 1994, 202:586-605
- [17] Zhai Zhonghe, Nikerson J A, Krochmalnic G. *et al.* Alteration in nuclear matrix structure after adenovirus infection [J]. J. Virol. 1987, 61(4):1007-1018

## Studies on Association of the Replication of AcMNPV with the Nuclear Matrix

LIU Xiao-qiong, YU Ze-hua, WANG Jia-kun

YAO Han-chao, GUO Hua-shan, CHEN Qu-hou

(Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** The structure of nuclear matrix in Tn5B1 cell infected with AcMNPV was observed by means of sequential cell fractionation and whole-mount technique of electron microscopy. Whereas early infection of AcMNPV resulted in no dramatic change in the nuclear matrix morphologically, polyhedra formed in the network of the nuclear matrix in the late stage of infection. Results of Dot blotting showed that both *ie-1* gene and polyhedrin gene tightly binded on the nuclear matrix in early stage of infection.

**Key words:** Nuclear matrix; AcMNPV; Replication; Polyhedra assembly; Transcriptional activity