

AcMNPV 诱导 sf9 细胞在核内 产生纤维网状基质

陈建国 滕俊琳 翟中和

(北京大学生命科学学院细胞生物学及遗传学系, 北京 100871)

摘要 来源于昆虫卵巢的 sf9 体外传代细胞, 在核内虽存在核纤层却没有哺乳动物细胞核内那样的核基质网络. 当其被 NPV 感染后核内产生纤维网络结构. 快速冷冻-深度蚀刻电镜图象显示这种网络由 8~10 nm 的均一纤维交织而成. 有一些电子致密的物质与未装配好的病毒衣壳存在于网络结构中或周围, 说明核内产生的纤维网络结构可能与 NPV 的复制与装配有关.

关键词 杆状病毒 病毒发生基质 核基质

通常所说的细胞骨架是指存在于真核细胞内的微管、微丝和中间丝 3 种纤维类型, 它们的结构和成分都已基本明确. 就其功能而言, 微管和微丝对真核细胞的生命活动非常重要, 是必需的, 而细胞质中间丝则不然, 某些真核细胞缺乏细胞质中间丝而并不影响其生存. 除上述 3 种细胞骨架类型之外, 近年来在细胞核内又发现了一类由纤维蛋白组成的丝状结构, 从形态学上来讲它们也应属于细胞骨架的范畴, 人们通常按操作方法(即将细胞核内的可溶性成分除去后留下的纤维状结构)来定义, 将它称为核基质(nuclear matrix, NM).

以往有关核基质的研究对象都是脊椎动物细胞, 用选择性抽提法将细胞核内的可溶性成分、DNA 及组蛋白等物质除去后留下的纤维网络结构^[1,2]. 核基质在形态上与核纤层及细胞质中间丝相连, 这种结构可能与染色质结构的装配、DNA 的复制、基因的转录及加工等生命活动过程相关, 但其确切的结构及成分至今尚未确定. sf9 细胞是缺乏内源性中间丝的来源于秋行军虫 *Spodoptera frugiperda* 卵巢的分化程度较低的细胞^[3], 我们在应用杆状病毒表达载体研究神经丝的结构与组装^[3,4]时发现, 由于 AcMNPV 的感染使 sf9 细胞的核内出现了一些纤维状的结构, 现将结果报告如下:

1 材料与方法

() 病毒. 野生型病毒(AcMNPV) DNA 购于 Invitrogen 公司, 与克隆有编码大鼠低分子量及中等分子量神经丝蛋白的 cDNA 的转染载体 PVL1393 或 AcUW51 共同转染 sf9 细胞后形成重组病毒. 该重组病毒编码多角体蛋白的晚期基因或 p10 基因已被 NF_L 或 NF_M 蛋白基因所替换, 因而不表达病毒多角体蛋白和/或 p10 蛋白^[3,4], 并且由于它不再形成多角体而使得对细胞核内的一些结构成分的观察较为容易.

() 细胞培养及电镜制样. sf9 细胞系(购于 Invitrogen 公司)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.

当 sf9 细胞被包含各种 NF 亚基的 cDNA 片段的重组病毒感染后 48~72 h 时, 首先用 0.01 mol/L PBS 洗细胞 2 次, 然后进行选择性的抽提以除去细胞内的可溶性成分、DNA 及组蛋白^[5], 最后留下的不溶性成分用 2.5% 戊二醛固定 30 min, 再用 1% OsO₄ 于冰上固定 30 min. 按常规进行超薄切片及电镜观察.

() 深度冷冻蚀刻. 被重组病毒感染 48~ 72 h 后的细胞用含 0.05% saponin 的 PEM 缓冲液在室温下处理 10 min, 然后用 2% 戊二醛固定 10 min. 冷冻蚀刻方法参照文献[6].

2 结果与讨论

sf9 细胞被重组病毒感染后首先在细胞核内出现由许多纤维构成的网状结构, 在感染初期, 这种纤维网状结构普遍存在于整个细胞核内(图版 iv(a)), 而正常的 sf9 细胞经选择性抽提后在细胞核内除核纤层外则未见其它纤维状的结构存在^[3]. 随着病毒感染的进程, 电子染色较深的非纤维结构出现在纤维网状基质区域, 可能是病毒尚未装配的病毒组成成分, 在其周围有少量正在组装的病毒衣壳与网状纤维结构相连(图版 iv(b)). (34 × 260) nm 的病毒衣壳在感染的早期大都为电子密度较浅的结构, 随着装配的进程, 在局部区域电子密度变深, 暗示网状基质中非纤维状电子染色较深的物质在向病毒衣壳中转移, 以完成病毒核衣壳的装配过程. 快速冷冻-深度蚀刻电镜图象显示网状基质由直径约为 8~ 10 nm 的均一的纤维交织而成, 在纤维的交织处显示较为复杂的结构, 而不象核纤层那样的正交排列, 似乎有纤维的回折或其它物质参与铰链而成(图版 ㊟), 而具囊膜的病毒粒子较多地集中在缺乏网状基质的区域(图版 ㊟).

从我们的实验结果可见, 来源于昆虫卵巢的 sf9 细胞在没有被 NPV 感染前在核内除了核纤层结构外没有发现任何纤维状结构存在, 然而随着 NPV 的感染及在细胞核内的增殖, 就可以见到一些纤维状的结构在细胞核内出现, 很显然, 这些结构是由于病毒的感染而诱导产生的. 尽管我们对 NPV 如何诱导产生纤维状结构的机制并不清楚, 但很显然这一结构的出现与病毒的增殖与复制密切相关, 而与细胞正常的生命活动关系不大. 当用选择性抽提法处理其他来源于高等哺乳动物的体外培养细胞时, 在细胞核内除了核纤层外, 通常可见被称为核基质或核骨架的纤维状结构的存在^[1,2], 尽管目前还不知道组成核基质的蛋白的确切成分及其在细胞内的功能, 最近几年大量的实验结果表明它可能与细胞内 DNA 的复制及基因的转录等重要生命活动相关. 另外的一些实验结果还显示核内纤维状蛋白结构参与病毒的复制及装配的过程, 一些正在装配的病毒颗粒存在于精致的核基质网络之中^[5]. 与正常的 sf9 细胞相比较, 可见当 NPV 感染细胞后不久, 细胞核内即出现纤维网状结构, 这种结构的出现可能与病毒 DNA 大量复制及病毒的组装有关, 电镜观察结果也表明确实有一些电子密度较高的物质存在于网状结构的中间, 一些还没有组装好的病毒衣壳存在于网状结构的内部或周围(图版 iv(b)), 但这种网状基质的组成成分及组装方式还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Capco D G, Wan K M, Penman S. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and composition. *Cell*, 1982, 29: 847~ 858
- 2 Mirkovitch J, Mirault M E, Laemmli U K. Organization of the higher_order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 1984, 39: 223~ 232
- 3 陈建国, 滕俊琳, 中川辉良, 等. NF-L 蛋白在 sf9 细胞内表达能单独形成中间纤维样结构. *科学通报*, 1995, 40(16): 1504~ 1507
- 4 陈建国, 滕俊琳, 中川辉良, 等. 神经丝蛋白 NF-M 的功能分析. *科学通报*, 1996, 41(3): 263~ 266
- 5 Zhai Z, Nicholson J A, Krochmalnic G, et al. Alterations in nuclear matrix structure after adenovirus infection. *J Virol*,

1987, 61(4): 1 007~ 1 018

- 6 Hirokawa N. Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the Quick-freeze, deep-etching method. J Cell Biol, 1982, 94: 129~ 142

(1997-03-30 收稿, 1997-08-12 收修改稿)

水解和细菌降解作用对小球藻热模拟烷烃及生物标志物的影响

吴庆余 章冰 宋一涛^④ 盛国英^④ 傅家谟^④

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; ④胜利石油管理局地质科学研究院, 东营 257015;

④中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640)

摘要 研究了水解和细菌降解作用对小球藻热模拟烷烃生物标志物的影响。小球藻热模拟生成的烷烃组分中以正烷烃和类异戊二烯烷烃占绝对优势。水解和细菌降解作用增加了这一优势, 但同时降低了正烷烃的奇偶优势。水解作用明显除去了部分高碳数正烷烃, 使 C_{23}^- / C_{24}^+ 值提高了 5.13 倍。细菌降解作用使正烷烃碳数分布范围缩小, 低碳数正烷烃增加。未经水解和细菌降解作用的小球藻 $Pr / nC_{17} < 1$, 细菌降解作用使 Pr / nC_{17} 值提高至 1.18, 与原油和生油岩中藻类来源有机质的该参数特征更相符合。

关键词 小球藻 水解作用 细菌降解作用 烷烃生物标志物 热模拟

地质历史中古代生物向石油和天然气等有机质的演化过程往往包括原始母质的生物化学降解和热降解两个基本阶段, 除了热演化的成熟度外, 生物母质热演化前的生物化学降解(包括细菌降解、水解和异养转化等)是影响沉积有机质特征的重要因素^[1~3]。近年来国内外开展了一系列藻类热模拟产烃的研究^[4, 5], 但是大部分实验以新鲜的藻体为实验材料, 藻类在死亡沉积过程中发生的水解作用和细菌降解作用往往被忽略。

1 材料与方法

() 材料。实验材料 *Chlorella protothecoides* (原始小球藻) 由美国得克萨斯大学藻种中心提供。按 Grant 和 Hommersand 方法进行小球藻的自养培养^[6], 获浓藻液。将其在 2 000 r/min 下离心 10 min, 经洗涤并同样离心两次后, 沉淀部分取 1/3 置于红外线快速干燥器中低温干燥, 得小球藻细胞干粉。其余 2/3 保存于 -20℃ 冰箱中留作水解和细菌侵染降解实验用。

() 藻类的水解。将藻细胞悬浮于蒸馏水中, 加入玻璃珠, 用德国 853002/0 KAISER 细胞破碎仪破碎 3 次, 每次 30 s。破碎的藻细胞用水洗, 2 000 r/min 离心去除玻璃珠。上清液 10 000 r/min 离心。取沉淀物并用水洗多次, 每次洗涤后离心所得上清液用日本 KONTRON UVIKON 860 紫外分光光度计测 200~ 400 nm 吸收光谱曲线, 直至 260 nm, 280 nm 处无吸收峰, 表明水溶性蛋白和核酸已被去除。将沉淀置于红外线干燥器中低温干燥, 得经水解作用的小球藻细胞干粉。

() 藻类的细菌侵染降解。按前文方法进行^[7]。

() 热模拟降解实验。将未经处理的小球藻细胞干粉, 经水解作用的小球藻细胞干粉