

辛德毕斯病毒非结构蛋白 nsP2 在细胞内的分布*

梁凤霞 裘 霁 张小青 陈建国 丁明孝 翟中和

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 应用免疫电镜技术,直观地显示出辛德毕斯病毒的 nsP2 蛋白存在于细胞核中以及它在核内的分布。将含有 nsP2 蛋白的一段 SbV 的 cDNA 转染细胞,结果表明,单独表达的 nsP2 仍可进入细胞核中。

关键词 辛德毕斯病毒 (SbV), 非结构蛋白 (nsP2)

辛德毕斯病毒 (Sindbis Virus, 简称 SbV) 是披盖病毒科甲病毒属的一种正链 RNA 病毒。作者曾发现, SbV 所编码的 4 种非结构蛋白(分别称为 nsP1, nsP2, nsP3 和 nsP4), 只有 nsP2 进入细胞核中并与核骨架相结合^[1]。nsP2 进入宿主细胞核中很可能与抑制宿主细胞的 mRNA 的合成^[2]乃至诱导细胞的程序性死亡有关^[3]。因此,这一现象引起了一些学者的关注^[4,5]。研究病毒蛋白是否进入细胞核以及是否与核骨架结合,一般采取匀浆的方法分离细胞核或采用选择性抽提得到核骨架,然后再进行成份分析。然而上述方法抽提得到的细胞核或核骨架往往都会连带一部分细胞质或胞质中的中间纤维成份而影响对结果的分析。为此作者采用电镜免疫标记的方法,直观地证明了 SbV 的 nsP2 蛋白存在于细胞核中,并进一步显示了 nsP2 蛋白在细胞核中的分布。同时将含有 nsP2 蛋白的一段 SbV 的 cDNA 转染细胞,实验结果表明,单独表达的 nsP2 仍可进入细胞核中。上述结果为进一步研究 nsP2 的功能及其与细胞的相互作用关系提供了新的有意义的资料。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒的培养

SbV 及兔抗 SbV 的 E2 蛋白抗体由美国华盛顿大学医学院 Milton Schlesinger 教授惠赠;兔抗 SbV 非结构蛋白 nsP1, nsP2 抗体由美国加州理工学院 Dr. J.H. Struss 提供。

培养病毒所用细胞为 BHK-21 传代细胞系(由中国兽药监察所细胞室提供)。培养细胞所用培养基为 E-MEM 培养基(日本制药株式会社生产)。

1.2 免疫电镜和免疫荧光技术

在病毒感染后 0, 3, 5, 7h, 迅速用 4% 多聚甲醛-二甲砷酸钠溶液 (pH 7.4) 于 0℃ 固定 4h, 0.1mol/L 二甲砷酸钠洗涤后, 梯度甲醇脱水, 于 -30℃ 用 LK4M 进行低温包埋。切片按常规免疫电镜样品制备方法, 分别用兔抗 nsP2 抗体和 SbV E2 蛋白抗体或 nsP1 抗体结合 20nm 胶体金 (Sigma 公司生产) 进行免疫标记, 再用 2% 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色。所有电镜样品均于 JEM-100CX 电镜下观察照相。

* 此研究项目获得国家自然科学基金与国家教委博士点基金资助。
本文于 1994 年 7 月 22 日收到。

接种于盖玻片上的细胞,在病毒感染后用 3% 多聚甲醛于室温下固定 30min, PBS 清洗后用 0.5% Triton X-100 (pH7.4)处理细胞 5min,再用兔抗 SbV 非结构蛋白 nsP2 抗体室温下作用 1h, PBS 洗涤后加入 FITC 偶联的羊抗兔 IgG (军事医学科学院生产) 室温作用 30min, PBS 清洗后封片剂封片,于 Opton 18 型荧光显微镜下观察照相。

1.3 nsP2 基因的克隆和表达

克隆有 SbV 基因组的质粒 pToto 1000 由 C. M. Rice 惠赠。表达载体选用 pMAM-neo。pToto 1000 经 Sac I 和 BamH I 双酶切后回收含 nsP2 基因的 4613bp 片段,与同样经双酶切的克隆载体 pBluescript-SK 连接,得中间载体。中间载体经 Sac I 酶切后, Klenow 补齐粘性末端,再经 Xho I 酶切后电泳回收含 nsP2 基因的 4682bp 片段;表达载体经 Sal I 酶切后, Klenow 补齐粘性末端,再以酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后再经 Xho I 酶切,碱性磷酸酶处理后与 nsP2 基因的片段连接,得其表达载体 pMAM-neo-nsP2。此表达载体转染细胞后可用甾类激素地塞米松诱导 nsP2 基因的表达。

质粒的转染用脂质体 lipofectin 介导。转染诱导 48h 后用 nsP2 抗体结合 FITC 免疫荧光染色检测其表达情况。

2 结果和讨论

在 LK₄M 包埋的样品中,可清楚地分辨出细胞核与细胞质乃至细胞核中的核仁以及细胞质中的线粒体,粗面内质网等细胞器结构。用抗 nsP2 蛋白的抗体结合蛋白 A-胶体金进行免疫标记,结果表明,在 SbV 感染 3h 以后,细胞内均存在 nsP2 蛋白(图版 I-1)。为了排除电镜免疫标记样品中出现非特异性的吸附,准确地显示 nsP2 蛋白在细胞中的分布,我们除了设置以血清代替抗体的对照组外,还以非结构蛋白 nsP1 和病毒囊膜蛋白 E2 在细胞内的分布作为对照。实验结果显示, SbV 的囊膜蛋白 E2 仅存在于细胞质中,核内几乎见不到胶体金颗粒。在病毒感染 7h 的细胞中,细胞质及细胞质膜上可观察到大量的标记金颗粒(图版 II-3)。

nsP1 蛋白是一种非结构蛋白,在细胞内表达量较少。免疫标记结果显示, nsP1 也仅存在于细胞质中(图版 I-1)。上述结果说明,对 nsP2 在细胞内定位的免疫标记反应是特异的。实验结果直观地证明了 nsP2 蛋白不仅存在于细胞质中,而且也进入了细胞核内。通过对细胞质与细胞核内的胶体金颗粒计数,结果表明,单位面积细胞质内与细胞核内的 nsP2 含量比例大体相等,一般细胞中,细胞核的体积约占细胞总体积的 5—6%。由此推算出进入细胞核中的 nsP2 蛋白大约占整个细胞内的 nsP2 蛋白的 5—6%。这一结果低于匀浆法分离的细胞核内的 nsP2 的比例(约为 10%)^[1],很可能是由于匀浆法难以分离到纯净的细胞核所致。进一步分析 nsP2 在细胞核内的分布,作者发现, nsP2 并非均匀地分布在细胞核内,而是多集中在核仁区域,特别是核仁的丝状区(图版 I-1a),单位面积的核仁区比核质其它区域的标记金颗粒数多一倍以上。作者曾报道,在 SbV 感染的细胞中, mRNA 的合成被抑制,而 rRNA 的合成并无明显的影响^[2]。那么 nsP2 在核仁丝状区的富集是否与 SbV 对细胞 RNA 合成的选择性抑制有关,尚有待于深入研究。

为进一步探讨 nsP2 进入细胞核内的机制,克隆了一段含有 nsP2 蛋白的 cDNA 并在细胞内得到了瞬时表达,免疫荧光检测的结果表明, nsP2 蛋白特异地进入宿主细胞

核内(图版 II-4)。结果表明,即使在没有任何病毒感染的情况下,单独表达的 nsP2 仍可进入宿主细胞核内,说明 nsP2 进入细胞核内可能不是由于 SbV 感染改变了核孔的通透性,而是 nsP2 本身具有进入细胞核的序列,或具有与某种能进入细胞核的蛋白相结合的特异结构域,通过对 nsP2 氨基酸一级序列的分析,其入核相关的序列可能是 PRKRI^[4]。

与正常 SbV 感染细胞相比,在 nsP2 基因单独表达的细胞内,nsP2 进入核的比例明显增加,即绝大多数的 nsP2 都进入细胞核中。免疫荧光的结果清楚地显示出这一点。其原因可能是:(1)SbV 繁殖的全部过程发生在细胞质中,因此在病毒感染的细胞中,nsP2 蛋白主要在细胞质内参与病毒的代谢过程;(2)细胞质中至少存在通过泛素蛋白等途径可特异地降解某种蛋白。在 nsP2 表达的细胞中,胞质中的 nsP2 部分被降解,而进入核内的 nsP2 得到保留。一般认为,病毒的非结构蛋白在关闭宿主细胞大分子合成中起重要作用。最近发现,SbV 关闭宿主细胞大分子合成,最后使细胞裂解是通过诱导细胞的程序性死亡的过程来实现的^[5]。作者从不同的角度证明,SbV 的 nsP2 蛋白可进入细胞核,这自然使人们联想到,诱导程序性死亡是否通过 nsP2 来完成的,这将是一个十分有意义的课题。作者的结果证明,在细胞中单独表达的 nsP2 蛋白同样可进入细胞核中,从而为研究上述问题提供了一个较为理想的体系。

参 考 文 献

- [1] Wang X Z, Ding M X. *Cell Research*, 1993, 3:27-37.
 [2] 梁凤霞,谢建新,张 琼,等. 微生物学报,1993,33(3): 161-165.
 [3] Levine B, Huang Q, Isaacs J T *et al.* *Nature*, 1993, 361: 739-742.
 [4] Rikkonen M, Peranen J, Kaariainen L. *Virology*, 1992, 189: 462-473.
 [5] Lemm J A, Rice C M. *J Virology*, 1993, 67:1916-1926.

THE DISTRIBUTION OF SbV NONSTRUCTURAL PROTEIN 2 (nsP2) IN HOST CELL

Liang Fengxia Qu Ji Zhang Xiaoqing
 Chen Jianguo Ding Mingxiao Zhai Zhonghe
 (College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The distribution of SbV nsP2 has been observed by means of immunolabelling electron microscopy. The results showed that SbV nsP2 existed both in the cytoplasm and in the nucleus of host cell. When the cDNA of SbV nsP2 was transfected in host cell, the nsP2 also accumulates in the nucleus.

Key words Sindbis virus, Nonstructural protein 2 (nsP2)