

AcMNPV 的囊膜形成与囊膜蛋白 gp64 在细胞内的定位*

汪学功 陈建国** 高伟良 丁明孝 翟中和

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 应用电镜观察了重组 AcMNPV 感染的 Sf9 细胞, 结果表明该病毒的囊膜形成至少有两种形式: 一是通过细胞质膜上出芽, 二是在核内被膜结构包围而获得囊膜, 此外通过核膜出芽也可能是病毒获得囊膜的一种方式。应用免疫荧光技术研究了该病毒在 Sf9 细胞内囊膜的形成及其与病毒囊膜蛋白 gp64 间的关系, 结果表明 gp64 主要存在于细胞的质膜与核膜上。该存在方式使得通过出芽而获得囊膜的病毒粒子与核内包被产生的病毒粒子在囊膜成分上有很大差异。

关键词 杆状病毒, 囊膜, gp64

分类号 Q939.4

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multiple nuclear polyhydrosis virus*, AcMNPV) 是杆状病毒科 (*baculoviridae*) 的成员, AcMNPV 的病毒颗粒一般有两种形式, 一种是出芽到细胞外的称为 Extracellular virus (ECV) 或 Budding virus (BV); 另一种在细胞核内被包埋的多角体中称为 Occluded virus (OV)^[1]。ECV 与 OV 在形态与组成上有较大区别。NPV 的囊膜糖蛋白 gp64 是 ECV 的主要囊膜蛋白。gp64 在病毒感染细胞的过程中可能与病毒对宿主细胞识别有关。它可介导病毒囊膜与宿主细胞膜融合, 使病毒的核衣壳进入细胞质^[2]。关于 NPV 囊膜的形成已有许多报道^[1,3,4,5], 一般认为有两种主要方式: ECV 的囊膜来自质膜或核膜, OV 的囊膜则在细胞核内形成^[1]。对于通过细胞质膜出芽成熟的病毒粒子, 其囊膜蛋白在病毒出芽之前就已经镶嵌在细胞质膜上^[6], 但是通过核膜出芽或在核内形成的病毒颗粒上是否有相同的囊膜蛋白还不是很清楚。为此, 我们应用常规电镜技术、免疫荧光技术对 AcMNPV 囊膜的形成方式及 gp64 在细胞内存在的部位进行了研究。

1 材料和方法

1.1 病毒

为了便于观察, 我们采用多角体蛋白基因已被 NF-L 或 NF-L 和 NF-M 蛋白基因所替换了的重组病毒为实验材料, 这种重组病毒在细胞核内不形成多角体, 但不影响病毒增殖及成熟过程^[7]。

*国家杰出青年科学基金资助项目。

**联系人

收稿日期: 1997-01-09

1.2 细胞培养与病毒感染

Sf9 细胞系来源于秋行军虫 (*Spodoptera frogiperda*) 的卵巢细胞。用 TNM-FH 昆虫细胞培养基 pH6.2 加 10%FBS 于 27℃ 培养, 细胞生长至适当密度后加入病毒感染细胞。

1.3 电镜样品制备

按常规方法进行制样, 具体操作过程是: Sf9 细胞被病毒感染后 48h 进行电镜样品制备。细胞首先用 0.1mmol / L PBS 冲洗一次, 然后用含 2.5% 戊二醛、2% 多聚甲醛和 5% 蔗糖的 0.1mmol / L 二甲砷酸钠固定液室温固定 30min。再用 1%OsO₄ 在冰上固定 10~15min。经系列酒精脱水后在 1:1 的无水酒精 / EPON812 中抽气渗透过夜, 再用纯 EPON 抽气置换 24~48h, 然后换纯 EPON 于 60℃ 聚合 48h, 样品经超薄切片, 再经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后进行电镜观察。

1.4 免疫印迹反应

方法参见分子克隆实验指南^[8]。病毒感染后 24h 用 PBS 冲洗并将细胞冲下, 1000g 离心 5min 收集细胞, 沉淀加入等体积的 2× 样品裂解液煮沸, 经 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转到硝酸纤维素膜上。用含 1%BSA 的封闭液于室温封闭 1~2h 后与抗 gp64 囊膜蛋白的单克隆抗体 B12D5^[9] (由美国加州大学 Volkman 教授惠赠, 用含 1%BSA 的 PBS 溶液稀释至 1:30 后使用), 于 37℃ 反应 1h, 然后与碱性磷酸酶偶联的羊抗鼠抗体 (Sigma 公司) 于 37℃ 反应 1h, 在 BCIP / NBT 底物溶液中显色约 15min。

1.5 免疫荧光与激光共聚焦

培养在玻片上的 Sf9 细胞生长至适当密度时加入病毒感染。经 24h 用 0.1mmol / L PBS (pH6.8) 冲洗一次, 2% 多聚甲醛 27℃ 固定 25min, 然后用含 0.1%Triton-X100 的 PBS 室温处理 10min。PBS 冲洗 3 次, 3%BSA 封闭 20min 后与抗 GP64 抗体 (1:30 稀释) 于 27℃ 反应 1h, 然后用罗丹明偶联的羊抗鼠 IgG 于 27℃ 反应 1h。PBS 冲洗后封片, 在激光共聚焦荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 AcMNPV 通过质膜出芽、核膜出芽或核内发生途径获得囊膜

采用被重组病毒感染的 Sf9 细胞为材料进行电镜观察。未发现多角体外但具有双层囊膜的多粒包埋型病毒粒子 (OV) 在细胞核内大量形成图版 I-1。部分核衣壳经核膜出芽进入细胞质图版 I-2; 此外有一些核衣壳经细胞膜出芽到细胞外图版 I-3, 这些病毒粒子含有单个核衣壳, 囊膜与核衣壳之间似乎较核内形成的病毒粒子宽松。在病毒核衣壳出芽的细胞质膜内侧可见一些微管束存在, 可能与病毒核衣壳在胞质内的运输有关。

2.2 囊膜蛋白 gp64 存在于质膜和核膜, 但不存在于核内的病毒囊膜上

应用免疫印迹反应检测感染重组 AcMNPV 的 Sf9 细胞出现一条特异的 64kD 的条带 (图 1)。应用免疫荧光与激光共聚焦技术可见重组 AcMNPV 感染的 Sf9 细胞出现两个荧光环, 由此说明 gp64 抗原主要集中在细胞质膜及核膜的部位。细胞质内可见一些散在的荧光斑点, 细胞核内则没有荧光, 说明在核内成熟的病毒粒子的囊膜上没有 gp64 蛋白 (图 2)。

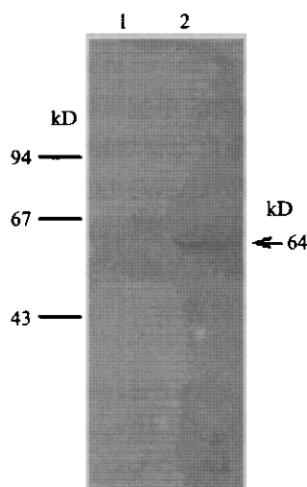


图1 gp64 的免疫印迹反应

1. 正常 Sf9 细胞; 2. 感染后 24h 的 Sf9 细胞显示一条 64kD 蛋白条带。

Fig.1 The westernblotting of gp64 protein

1. normal Sf9 cell; 2. Sf9 cell were infected with recombinant virus (48h P.I.) showed a 64kD band.

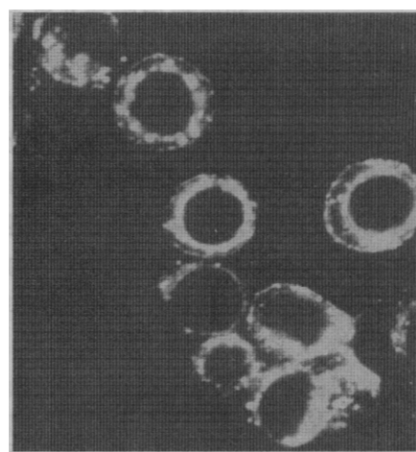


图2 间接免疫荧光反应显示重组病毒感染后 24h 的 Sf9 细胞中 gp64 抗原存在于细胞质膜、核膜以及胞质内。(标尺长度 = 20μm)

Fig.2 Indirect immunofluorescence of the recombinant virus infected Sf9 cell (24h P.I.), gp64 was located on the plasma membrane, nuclear membrane and in the cytoplasm

3 讨论

杆状病毒囊膜的发生是比较复杂的过程, ECV 在质膜上出芽获得囊膜的方式已有许多报道^[4,5,10], Kawamoto 和 Granados 等人观察到病毒在核膜上出芽^[4,11], 推测这仅仅是病毒进入细胞质的一种手段, 在细胞质内核衣壳将已获得的膜结构脱去, 并经细胞质膜获得真正的囊膜。但也有人认为这是病毒获得囊膜的一种方式, 被核膜包被的核衣壳被运至细胞质膜后, 由外层核膜与质膜融合, 内层核膜作为病毒的囊膜包裹着核衣壳从细胞释放^[3]。Volkman 等 (1984) 用酶联免疫电泳的方法检测 AcMNPV 感染细胞的表面抗原, 证明 gp64 存在于质膜上, ECV 在质膜上出芽并获得囊膜蛋白^[6], 但他们由于在电泳制样时没有将细胞膜破坏而不可能使抗体与细胞内部的抗原发生反应。为了检查细胞内部特别是核膜上是否存在 gp64 蛋白, 我们在样品固定后用低浓度的 Triton-X100 处理细胞, 使细胞膜的局部破坏以便抗体进入, 免疫荧光检测的结果表明 gp64 除存在于细胞质膜上外, 还存在于核膜上 (图 2), 在细胞质内存在的一些荧光斑点可能是合成后还没有整合至膜上的蛋白。核衣壳在核膜上出芽与质膜上出芽的状况类似, 多为单个裸露的核衣壳, 其一端与膜内侧接触并逐渐向细胞质内突出 (图 2)。这些现象表明核衣壳在核膜上出芽也同样可获得 gp64 蛋白, 但这种来源于核膜并镶嵌着 gp64 蛋白的膜结构在细胞质内是否被脱去还有待证实, 尽管其他一些核内 DNA 病毒如疱疹病毒 (HSV) 也通过从核膜上出芽获得囊膜^[10]。

在细胞核内形成的病毒粒子的囊膜的来源至今不明, 随着核衣壳的形成, 细胞核内出现一些双层膜结构, 有人认为可能由核膜衍生而来^[3], 但核膜上有 gp64 存在, 而核内并没有见到荧光, 所以这种囊膜来源于核膜的可能性不大; 也有人认为可能是核内从头合成的

(de novo synthesis)^[12],但细胞核并没有合成脂类的能力,只能在细胞质内合成后通过某种目前未知的机制运入。

ECV 的感染力要比 OV 强 1700 多倍^[13~15]。而用抗 gp64 的单抗可中和 ECV 的感染力,使之降到与 OV 类似的程度^[13]。因此 gp64 与 ECV 的感染活力密切相关。gp64 在病毒感染后约 6h 开始合成,至 24h 左右达到高峰,然后迅速下降^[16]。这与 ECV 释放到细胞外的模式相吻合。由于 gp64 在核膜与质膜上的存在,病毒核衣壳在这些部位出芽时都能获得这种囊膜蛋白。在核内形成的膜结构上没有 gp64 存在,所以在核内形成的 OV 颗粒的囊膜上也没有 gp64。这样就造成 ECV 与 OV 在囊膜成份上的差别。

参 考 文 献

- [1] Robert R G, Brain A, Robert F. *The Biology of Baculoviruses*. 1, 1986, 113~116.
- [2] Blissard G W, Wenz R J. *J Virol*, 1992, 66(11):6829~6835.
- [3] 吕鸿生. 昆虫病毒与昆虫病毒病, 北京: 科学出版社, 1982. 220~230.
- [4] Kawamoto F, Suto C, Kumada N et al. *Microbiol Immunol*, 1976, 21(5):255~263.
- [5] Falcon L, Hess R T. *J Invertebr Pathol*, 1977, 29:36~40.
- [6] Volkman L E, Goldsmith P A, Hess R T et al. *Virology*, 1984, 133:354.
- [7] Nekagawa T, Chen J, Zhang Z et al. *J Cell Biol*, 1995, 129(2):411~429.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992. 888~897.
- [9] Keddie B A, Aponie G W, Volkman L E. *Science*, 1989, 243:1728~1730.
- [10] 侯云德. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 1990. 72~96.
- [11] Granados R R, Lawler K A. *Virology*, 1981, 108:297~308.
- [12] Stoltz D B, Pavan C, Da Cunha A B. *J Gen Virol*, 1973, 19:145~150.
- [13] Keddie B A, Volkman L E. *J Gen Virol*, 1985 66:1195~1200.
- [14] Volkman L E, Summers M D, Hsieh C H. *J Virol*, 1976, 19:820~832.
- [15] Volkman L E, Summers M D. *J Invertebr Pathol*, 1977, 30:102~107.
- [16] Javirs L D, Garcia A J R. *Virology*, 1994, 205:300~313.

THE ENVELOPE FORMATION OF AcMNPV AND THE LOCATION OF ENVELOPE PROTEIN gp64 IN HOST CELL

Wang Xuegong Chen Jianguo Gao Weiliang Ding Mingxiao Zhai Zhonghe

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Electron Microscopic study on the recombinant AcMNPV infected Sf9 cell showed that the virus has at least two forms of envelope formation: one is budding from plasma membrane and the other is enveloping in the nucleus by membrane structure. An additional possible pathway is budding from nuclear membrane. The envelope formation of AcMNPV in Sf9 cell line and its relationship with the envelope protein gp64 were investigated by using immunofluorescence techniques. The results showed gp64 was mainly located on the plasma membrane and nuclear membrane of

infected cell. Whereas, there is no gp64 on the envelope of OV virus particles in the nuclei. This pattern cause the differences in envelope composition between the virus particles that budding from plasma membrane and nuclear membrane and those that enveloping in the nucleus.

Key words Baculovirus, Envelope, gp64

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 重组病毒感染 Sf9 细胞后 48h. 箭头示核内形成的多粒包埋型病毒粒子。(标尺长度 = 200nm); 2. 感染后 48h. 箭头示病毒核衣壳经核膜出芽进入胞质。(标尺长度 = 200nm); 3. 感染后 48h. 病毒核衣壳经细胞质膜出芽至胞外(大箭头), 核衣壳由单层囊膜包被。小箭头示核衣壳附近细胞质内的微管束结构。(标尺长度 = 200nm)。

1. Sf9 cells were infected with recombinant virus (48h P.I.), polynucleocapsid occluded virus particles formed in nucleus (indicated by arrows). (Bar = 200nm); 2. Sf9 cells were infected with recombinant virus (48h P.I.), nucleocapsid entry cytoplasm by budding from nuclear membrane (indicated by arrows). (Bar = 200nm); 3. 48h P.I., The recombinant virus nucleocapsid budding from the plasma membrane (big arrow) and the nucleocapsid was coated by single envelope membrane. Some microtubule bundles (small arrow appeared in cytoplasm near the nucleocapsid). (Bar = 200nm).