

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):263-269; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

高效薄层层析-病毒覆盖结合法比较细胞表面神经节苷脂与不同动物源性新城疫病毒结合特性

冯新¹, 宋战昀², 韩文瑜¹, 丁壮^{1*}

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院预防兽医学国家重点学科, 长春 130062)

(² 吉林出入境检验检疫局, 长春 130062)

摘要:【目的】神经节苷脂是新城疫病毒入侵宿主细胞的受体,但不同动物源性的新城疫病毒利用受体的特性是否存在差异尚不明确。以鹅源新城疫病毒 NA-1 株和鸡源新城疫病毒 F48E9 株为研究对象,比较两株病毒受体结合特性的差异。【方法】提取鸡胚和鹅胚成纤维细胞新城疫病毒受体成分——神经节苷脂,用高效薄层层析法比较两种细胞所含神经节苷脂的类型和含量;通过高效薄层层析-病毒覆盖结合法比较两种病毒与不同细胞神经节苷脂的结合特性,最后通过病毒红细胞吸附抑制试验进一步验证神经节苷脂与病毒之间的相互作用关系。【结果】鸡胚和鹅胚成纤维细胞所含的神经节苷脂成分存在明显差异;高效薄层层析-病毒覆盖结合实验结果显示 NA-1 和 F48E9 与神经节苷脂的结合模式不同,NA-1 主要与神经节苷脂 GD1a 结合,即包含双 SA α 2,3Gal 末端的神经节苷脂,而 F48E9 可与更多类型的神经节苷脂结合,从单唾液酸到三唾液酸形式的神经节苷脂如 GM1、GD1a、GD1b、GT1b 等。【结论】鹅源新城疫病毒 NA-1 株和鸡源新城疫病毒 F48E9 株在入侵靶细胞时优先选择利用的受体不同。

关键词: 新城疫病毒;病毒受体;神经节苷脂;薄层色谱;病毒覆盖结合实验

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0263-07

包含唾液酸残基的神经节苷脂是新城疫病毒的受体^[1],细胞表面神经节苷脂类型复杂,包括单唾液酸神经节苷脂 GM3、GM2 和 GM1,二唾液酸神经节苷脂如 GD1a 和 GD1b 以及三唾液酸神经节苷脂如 GT1b^[2]等。Toshihiro ITO^[3]等研究表明不同禽类的新城疫病毒病毒分离株,由于受体特异性的不同而导致血凝等生物学特性的差异。但这种差异的本质尚不明确。不同动物细胞表面唾液酸种类及相对丰度是不同的,这种差异对于病毒的宿主范围和毒力等方面的生物学意义仍然未知^[4]。因此,有必要对新城疫病毒的细胞受体本质进行深入研究,比较不同禽类新城疫病毒原宿主细胞表面受体类型的

异同、确定细胞表面唾液酸种类和相对丰度在病毒入侵宿主细胞中的生物学意义,为进一步从病毒受体的角度揭示不同动物源性新城疫病毒入侵宿主细胞的分子机制奠定基础。

本研究比较了鹅源和鸡源新城疫病毒原宿主细胞所含受体——神经节苷脂类型和含量的差异,使用凝集素确定神经节苷脂中所包含的糖链类型,通过高效薄层层析-病毒覆盖结合法(High performance thin layer chromatography-Virus overlay protein blot assay, HPTLC-VOPBA)比较了鹅源和鸡源新城疫病毒利用神经节苷脂作为病毒受体方面的差异,最后通过病毒红细胞吸附抑制试验进一步验证各种神经

基金项目:国家自然科学基金(30771606)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-431-87836171; E-mail: Ding_zhuang@yahoo.com.cn

作者简介:冯新(1978-),女,内蒙古人,吉林大学畜牧兽医学院讲师,在读博士研究生,主要从事兽医微生物和免疫学研究。E-mail: xinple@163.com

收稿日期:2009-08-10; **修回日期:**2009-10-03

节苷脂与病毒之间的相互作用关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:鹅源副粘病毒 NA-1 株本室分离保存;鸡新城疫病毒 F48E9 株购自中国兽药监察所。两株病毒兔多克隆抗体的 IgG 由本室制备。非洲绿猴肾细胞 (Vero) 购自中国药品生物制品检定所。9 日龄朗德鹅胚购自吉林德莱鹅业股份有限公司;11 日龄 SPF 鸡胚购自山东省农业科学院。西门塔尔改良肉牛牛脑购自吉林省长春市皓月清真肉业股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:糖链检测试剂盒 (DIG Glycan Differentiation Kit) 为 Roche 公司产品 (Cat. No. 11210238001);神经节苷脂标准品 GM1、GD1a、GD1b、GT1b、Sephadex G25、间苯二酚均购自 Sigma 公司;DAB 显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品;其他常规化学试剂均为分析纯级。LABCONCO Freezone 2.5 型冷冻干燥机 (美国 LABCONCO 公司);JY92-2D 型超声波细胞粉碎仪 (宁波新芝科器研究所);真空浓缩离心仪 (德国 Christ 公司);GF254 型高效硅胶薄层层析板 (青岛海洋化工厂)。

1.2 总神经节苷脂的提取

1.2.1 样品总脂的提取:分别培养并收集 Vero、鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast cells, CEF) 和鹅胚成纤维细胞 (Geese embryo fibroblast cells, GEF) 约 10^8 个,冷冻干燥机低压冻干;牛脑剥离脑膜及血管,称重,剪碎研磨冷冻干燥机中低压冻干。氯仿、甲醇提取总脂,真空浓缩离心仪将上清液蒸发减少到 1/4 体积。置 -25°C 过夜来沉淀蛋白。在 4°C $750 \times g$ 离心 10 min,小心转移上清液到新的容器内,不要转移沉淀。

1.2.2 神经节苷脂的提取及纯化:总脂中神经节苷脂用异丙醚 (DIPE)/1-丁醇/水相分配法进行,具体参照 Ladish 分配法^[5]和 Rueda^[6]方法进行。微型离心柱法纯化神经节苷脂^[7]:为快速、少量分离纯化神经节苷脂的方法,适合微量组织细胞的神经节苷脂纯化和神经节苷脂组分比较学以及神经节苷脂的代谢研究。Sephadex G25 装柱,离心,收集离心液,得到总神经节苷脂。

1.3 HPTLC 法鉴定神经节苷脂

神经节苷脂的分离是通过 HPTLC 在玻璃层析板上进行,取提取的神经节苷脂,按照中国药典^[8]

薄层色谱法 (2000 年版二部附录 V B) 试验方法进行检测。展开剂为:包含 0.02% 氯化钙的氯仿/甲醇/水 (50: 45: 10, V/V/V)。间苯二酚-盐酸喷雾法检测神经节苷脂,扫描仪扫描结果并用薄层层析分析专用软件 QuintiScan3.0 分析。

1.4 神经节苷脂提取物糖链连接类型的鉴定

参照糖链检测试剂盒说明书进行,所提的神经节苷脂经 HPTLC 后用封闭液 (糖链检测试剂盒封闭液) 4°C 过夜封闭层析板, TBS 漂洗两次,每次 10 min,最后用 Buffer 1 (TBS, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L MnCl_2 , 1 mmol/L CaCl_2 , pH 7.5) 漂洗 10 min。凝集素的孵育:根据层析板面积以 $0.1 \text{ mL}/\text{cm}^2$ 的量分别加入地高辛标记的凝集素工作液室温孵育 1 h。TBS 漂洗 3 次每次 10 min。加入终浓度为 $0.75 \text{ U}/\text{mL}$ 碱性磷酸酯酶标记的羊抗地高辛 Fab 抗体室温孵育 1 h。TBS 漂洗 3 次每次 10 min。NBT/BCIP 显色液,显色 5-8 min,蒸馏水漂洗终止显色反应,室温干燥,拍照记录结果。

1.5 高效薄层层析-病毒覆盖结合试验 (HPTLC-VOPBA)

病毒与神经节苷脂的结合试验参照文献^[9-10]方法进行。所提取的神经节苷脂经 HPTLC 后,封闭液 4°C 过夜封闭层析板。TBS 漂洗 3 次每次 10 min。根据层析板面积以 $0.1 \text{ mL}/\text{cm}^2$ 的量分别用 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (用含 2% BSA 的 PBS 稀释) 纯化的 NA-1 或 F48E9 病毒,室温与层析板孵育 3 h,阴性对照为不含病毒的 PBS。TBS 漂洗 3 次,每次 10 min。加入 1: 1000 倍稀释的兔多克隆抗体 IgG,室温温育 1 h。TBS 漂洗 3 次每次 10 min。用 1: 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 的抗体,室温孵育 1 h。TBS 漂洗 3 次每次 10 min。DAB 避光显色 10 min,室温干燥,拍照记录结果。

1.6 神经节苷脂对病毒红细胞吸附抑制试验

红细胞吸附抑制试验参照 Iorio 方法^[11]进行。Vero 细胞在 24 孔培养板中培养 12 h 后,分别用 1 moi (multiplicity of infection) 的 F48E9 或 NA-1 病毒接种单层细胞。24 h 后,用 PBS (pH 7.2) 漂洗两次。 37°C 条件下,NDV 感染的细胞分别与 $25 \mu\text{g}$ 各种神经节苷脂标准品及 $25 \mu\text{g}$ Vero、CEF、GEF 细胞总神经节苷脂孵育 30 min。然后加入 2% 鸡红细胞 4°C 孵育 30 min。用 PBS 冲洗两次。 4°C 条件下,将吸附了红细胞的 Vero 细胞在 $50 \text{ mmol}/\text{L}$ NH_4Cl 中作用 5 min。 $3000 \times g$ 离心得到溶胞产物的上清,用岛津 UV-2550 型紫外分光光度计测量 540 nm 处的

吸收值。重复 3 次实验的数据取平均值作为最终结果。

2 结果

2.1 神经节苷脂提取结果

2.1.1 牛脑神经节苷脂 HPTLC 结果: 所提取的牛脑神经节苷脂 HPTLC 结果如图 1 所示, 可见约有 8 条层析条带出现。以神经节苷脂标准品 GD1a (2 μ g) 为迁移参照(第 3 道), 用软件 QuintiScan3.0 分析, 可以判定各条带的神经节苷脂类型分别为: GM1、NA(暂不能确定类型的神经节苷脂)、GD1a、GD2/GT1a、GD1b、GT2、GT1b、GQ1b, 与文献报道^[12] 基本一致, 说明所建立的神经节苷脂提取方法可行。牛脑神经节苷脂 HPTLC 结果各条带的相对含量如表 1 所示, 可见含量最高的是 GD1a 和 GT1a。

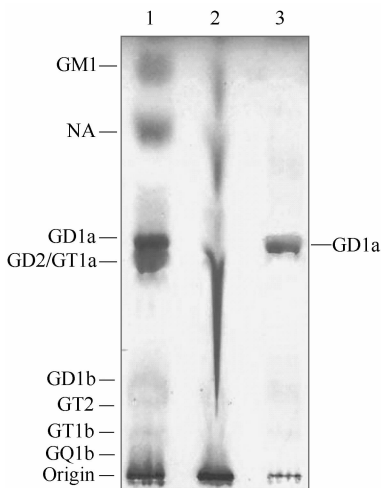


图 1 牛脑神经节苷脂提取物高效薄层层析结果

Fig.1 HPTLC of bovine brain gangliosides. 1: 8 μ g Bovine brain gangliosides; 2: 4 μ g Bovine brain gangliosides; 3: 2 μ g GD1a.

表 1 牛脑神经节苷脂提取物的组成

Table 1 Ganglioside composition of bovine brain

Number of band	Ganglioside assignation	Percentage S. D.
1	GQ1b	8.5 \pm 0.55
2	GT1b	5.3 \pm 0.68
3	GT2	4.7 \pm 0.18
4	GD1b	5.3 \pm 1.49
5	GD2/GT1a	21.3 \pm 2.66
6	GD1a	25.2 \pm 3.33
7	NA	15.7 \pm 1.03
8	GM1	13.7 \pm 3.22

Data are mean \pm S. E. of three independent experiments. NA; Not assigned.

2.1.2 Vero 细胞神经节苷脂 HPTLC 结果: 所提取的 Vero 细胞神经节苷脂 HPTLC 结果如图 2 所示。

用软件 QuintiScan3.0 分析, 可以判定各条带的神经节苷脂类型分别为: NA、GM3、GM3、GM2、GM2、NA、GM1、GM1、NA、GD1a、NA、GD1b、NA, 共计 13 条层析条带, 与文献^[1] 报道结果基本一致。各条带相对含量如表 2 所示。

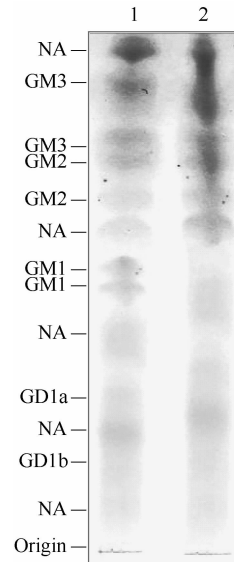


图 2 Vero 细胞神经节苷脂提取物高效薄层层析结果

Fig.2 HPTLC of Vero cells gangliosides. 1: 5 μ g Vero cells gangliosides; 2: 8 μ g Vero cells gangliosides.

表 2 Vero 细胞的神经节苷脂组成

Table 2 Ganglioside composition of Vero cells

Number of band	Ganglioside assignation	Percentage S. D.
1	NA	0.3 \pm 0.56
2	GD1b	3.3 \pm 0.68
3	NA	6.4 \pm 1.18
4	GD1a	3.5 \pm 1.19
5	NA	3.9 \pm 1.66
6	GM1	4.9 \pm 1.70
7	GM1	5.1 \pm 1.56
8	NA	3.5 \pm 1.86
9	GM2	4.2 \pm 0.85
10	GM2	9.7 \pm 3.68
11	GM3	11.7 \pm 3.25
12	GM3	18.2 \pm 1.93
13	NA	24.9 \pm 0.79

Data are mean \pm S. E. of three independent experiments. NA; Not assigned.

2.1.3 GEF 和 CEF 细胞神经节苷脂 HPTLC 结果: 所提取的 GEF 和 CEF 细胞神经节苷脂 HPTLC 结果如图 3 所示。

GEF 和 CEF 细胞神经节苷脂 HPTLC 结果扫描后用软件 QuintiScan3.0 分析, 结果显示 GEF 有 6 条带, 分别为 GM1、GD1a、NA、GD1b、NA、NA, 而 CEF 则只有 5 条带, 分别为 GD1a、NA、GD1b、NA、NA。

各条带的相对含量结果见表3所示。

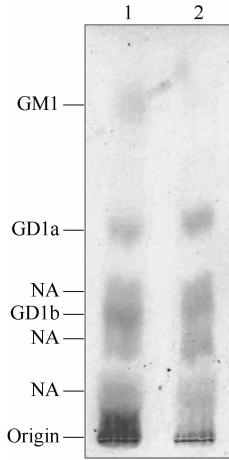


图3 GEF和CEF细胞神经节苷脂提取物高效薄层层析结果

Fig. 3 HPTLC of GEF and CEF cells gangliosides. 1: GEF gangliosides; 2: CEF gangliosides

进一步用QuintiScan3.0软件对两种细胞所含神经节苷脂进行比对分析,结果如图4所示,横坐标为扫描位置,扫描是从层析板的上端即层析终点向下端即层析起点进行的,纵坐标为相对含量值的大小。经比较可较为直观的看出两种细胞所含神经节苷脂类型差异明显。

2.2 神经节苷脂提取物的糖链连接类型鉴定结果

牛脑、Vero细胞、CEF和GEF细胞神经节苷脂提取物的糖链连接类型鉴定结果如图5所示,CEF与SNA凝集素反应可见3条阳性条带,如图5-SNA-3道所示,而GEF与SNA染色未见条带,如图5-SNA-4道所示,表明CEF细胞中包含SA α 2,6Ga的神经节苷脂,而GEF细胞中则不存在包含SA α 2,6Ga的神经节苷脂。MAA染色CEF可见5条带,而GEF只有3条带,可见CEF和GEF细胞包含神经节苷脂的糖链连接类型存在差异。且几种细胞神经节苷脂与PNA、GNA和DSA染色均可见阳性条带,说明存在相应连接形式的聚糖。

表3 GEF和CEF细胞神经节苷脂提取物的组成

Table 3 Ganglioside composition of GEF and CEF

Number of band	GEF		CEF	
	Ganglioside assignation	Percentage S. D.	Ganglioside assignation	Percentage S. D.
1	NA	22.4 \pm 0.85	NA	18.3 \pm 1.95
2	NA	17.1 \pm 1.43	NA	22.8 \pm 0.43
3	GD1b	25.8 \pm 4.18	GD1b	21.1 \pm 0.38
4	NA	14.7 \pm 1.48	NA	20.4 \pm 3.48
5	GD1a	12.7 \pm 2.04	GD1a	17.3 \pm 3.83
6	GM1	7.1 \pm 1.83		

Data are mean \pm S. E. of three independent experiments. NA: Not assigned.

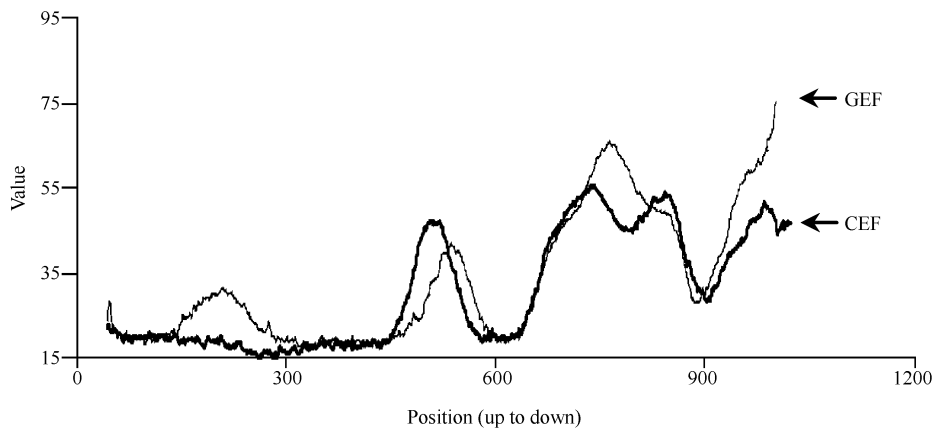


图4 GEF和CEF细胞神经节苷脂HPTLC薄层扫描比对分析结果

Fig. 4 Comparison between GEF and CEF cells gangliosides HPTLC Scanning.

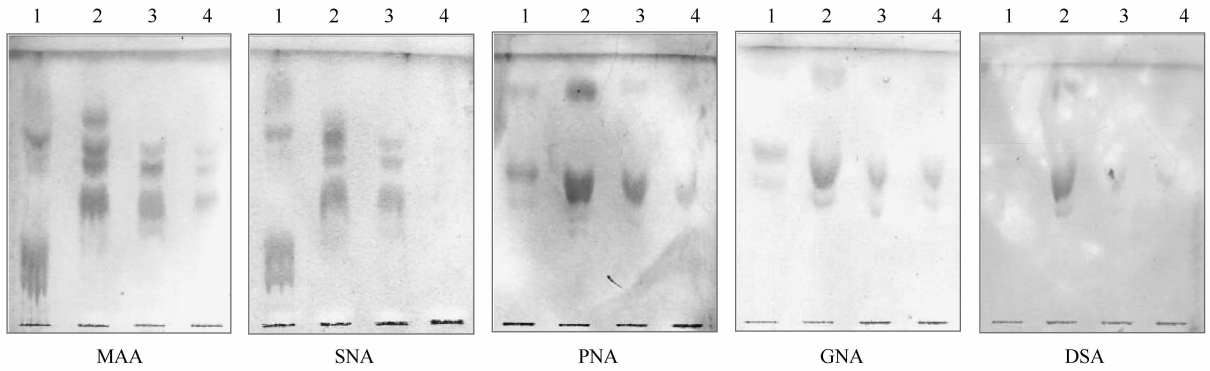


图5 神经苷脂提取物的糖链连接类型的鉴定结果

Fig. 5 Lectin Immunohistochemical localization Ganglioside HPTLC. 1: Bovine gangliosides; 2: Vero cells gangliosides; 3: CEF cells gangliosides; 4: GEF cells gangliosides.

MAA (Maackia amurensis agglutinin): recognizes sialic acid linked (2-3) to galactose; SNA (Sambucus nigra agglutinin): recognizes sialic acid linked (2-6) to galactose; PNA (Peanut agglutinin): recognizes the core disaccharide galactose (1-3) Nacetylgalactosamine and is thus suitable for identifying O-glycosidically linked carbohydrate chains (with exception of yeast glycoproteins); GNA (Galanthus nivalis agglutinin): recognizes terminal mannose, (1-3), (1-6) or (1-2) linked to mannose; DSA (Datura stramonium agglutinin): recognizes Gal-(1-4)GlcNAc in complex and hybrid N-glycans, in O-glycans and GlcNAc in O-glycans.

2.3 HPTLC-VOPBA 结果

NA-1 株病毒与牛脑、Vero、CEF、GEF 提取的神经节苷脂 HPTLC-VOPBA 结果见图 6 所示, A 层析板为 NA-1 株病毒与提取的神经节苷脂 HPTLC-VOPBA 结果, B 层析板为 F48E9 株病毒与提取的神经节苷脂 HPTLC-VOPBA 结果。

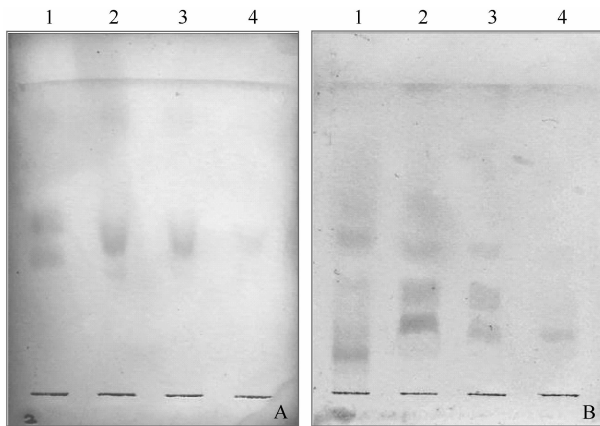


图6 NA-1 和 F48E9 病毒与提取的神经节苷脂 HPTLC-VOPBA 结果

Fig. 6 HPTLC-VOPBA of NA-1/F48E9 with gangliosides. A. HPTLC-VOPBA of NA-1 with gangliosides; B. HPTLC-VOPBA of F48E9 with gangliosides. 1: Bovine gangliosides; 2: Vero cells gangliosides; 3: CEF cells gangliosides; 4: GEF cells gangliosides.

NA-1 与 3 种细胞神经节苷脂 VOPBA 结果显示, 均在同一位置处出现阳性反应条带, 比对神经节苷脂标准品及 HPTLC 染色结果, 判断该处神经节苷脂为 GD1a, 即包含双 SA α 2,3Ga 末端的神经节苷脂。

F48E9 与 3 种细胞神经节苷脂 VOPBA 结果显示, 与 Vero 细胞神经节苷脂有 4 条阳性反应条带,

GM1、GD1a、GD1b 及一条未命名条带。与 CEF 细胞神经节苷脂有 3 条阳性反应条带, GD1a、GD1b 及一条未命名条带。与 GEF 细胞神经节苷脂有 2 条阳性反应条带, GD1a、GD1b。F48E9 与牛脑神经节苷脂反应出现 3 条阳性条带, GD1a、GD1b 及含有三唾液酸的神经节苷脂 GT1b。

2.4 神经节苷脂对病毒红细胞吸附抑制试验结果

提取的各种神经节苷脂和神经节苷脂标准品 GM1、GD1a、GD1b、GT1b 对 NA-1 和 F48E9 两株病毒的红细胞吸附抑制试验结果见图 7, 结果显示不同神经节苷脂均可降低两种病毒和红细胞的结合, 其中神经节苷脂混合物中效果最强的是 Vero 细胞的神经节苷脂提取物, 标准品中则是 GD1a 效果最强, 从图中可见, 细胞神经节苷脂提取物对病毒的红细胞吸附抑制效果表现出种属一致性, 即鹅胚成纤维细胞神经节苷脂提取物对 NA-1 株抑制效果强, 而鸡胚成纤维细胞神经节苷脂提取物则对 F48E9 表现出较强的抑制效果。

3 讨论

高效薄层层析-病毒覆盖结合试验不仅能够有效的对神经节苷脂混合物进行分离, 同时能够进行原位的多种免疫分析。从而能够在高效薄层层析板上检测出在一般薄层层析显色技术不能检测的微量组分。这对于那些具有重要生物功能, 而在组织中含有量甚低或材料来源十分困难的糖脂研究工作是十分方便的。所以它已经成为寻找新的糖脂抗原和检测体液或组织中与疾病相关的微量糖脂成分的重要手段。Suzuki 等^[13]使用 12 种神经节苷脂研究 A 型

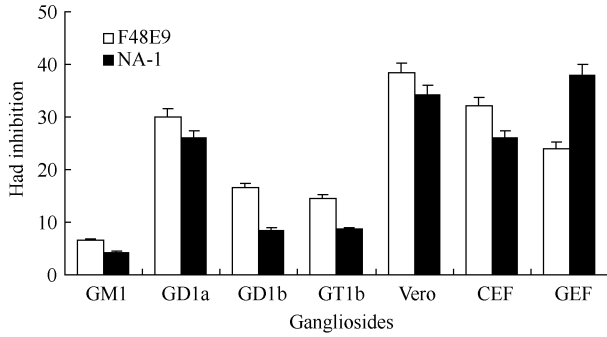


图7 神经节苷脂对病毒红细胞吸附抑制实验结果

Fig.7 Inhibition of virus hemadsorption by gangliosides.

流感病毒的受体特异性时,方便地在高效薄层层析板上鉴定出与 A/PR/8/34 特异性结合的六种糖脂。

在本实验中,而 F48E9 的 HPTLC-VOPBA 结果则出现了多条结合条带,所结合神经节苷脂类型复杂,从单唾液酸神经节苷脂到三唾液酸神经节苷脂均有,如图 6-B 所示。已知鸡源新城疫病毒是能够结合含 SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal 唾液酸类型的神经节苷脂^[1],因此,可以解释为什么其结合条带多。而鹅源新城疫病毒受体类型尚未见报道,本实验结果显示,在同一细胞神经节苷脂提取物上,NA-1 株只与双 SA α 2,3Gal 连接形式的 GD1a 呈强势结合,如图 6-A 所示。推测 NA-1 株病毒可能是只结合 SA α 2,3Gal 连接形式的神经节苷脂,而不与 SA α 2,6Gal 连接形式的神经节苷脂结合。同时,NA-1 株病毒全基因组测序后对病毒受体结合位点的分析及流感病毒受体结合能力变异的研究结果来看^[14],这种差异是可能存在的。神经节苷脂提取物的糖链连接类型鉴定结果显示,如图 5 所示,GEF 细胞神经节苷脂与 SNA 凝集素无阳性反应条带,因此也证实了这种推测,即鹅相应组织或细胞上缺乏 SA α 2,6Gal 类型的受体,为 SA α 2,3Gal 单受体分布。而 CEF、Vero 细胞则同时有 SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal 类型糖链。这些结果也进一步在分子水平佐证了鹅为 SA α 2,3Gal 单受体分布,鸡为 SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal 双受体分布的结论。

神经节苷脂种类多样性或许能解释为什么 NDV 能够感染多种细胞。同时,神经节苷脂作为病毒受体与病毒相互作用的过程中,似乎缺乏特异的模式和规律性的特点,在其它病毒中也有报道,例如狂犬病毒^[15]与 GT1b,GQ1b 和 GD1b 结合特异性较强,而与 GM1 和 GM3 的结合最弱,此外,在流感病毒^[16-17]和 HIV^[18]中也有各自特点。我们通过比较各种神经节苷脂对不同禽源的副粘病毒红细胞吸附抑制试验,结果发现,来源于 Vero 细胞的总神经节苷脂的提取物对两种病毒红细胞吸附抑制效果最强,其次为 GD1a。另外,同种神经节苷脂对两种病

毒红细胞吸附抑制效果存在不同,各种神经节苷脂普遍对鸡新城疫中国标准强毒株 F48E9 的抑制效果强于本研究室分离的鹅源副粘病毒 NA-1 株,这些结果提示两种病毒对神经节苷脂的结合特性存在差异,但这种差异的进一步量化还需要受体结合动力学数据的验证和支持。病毒和细胞表面相互作用是一个复杂的过程,应该是一个多步骤的、涉及很多相互作用的过程,涉及不止一种细胞表面分子。Barton^[19]基于目前对许多囊膜病毒的研究结果提出病毒和细胞作用起始于与一个低亲和力的受体结合,继而启动与一个高亲和力受体发生结合。因此,不同的神经节苷脂在病毒黏附和入侵中起着不同作用,并在多步骤的黏附过程中的亲和力也会不同。我们的试验结果初步确认鹅源新城疫病毒 NA-1 株和鸡源新城疫病毒 F48E9 株在入侵靶细胞时优先选择利用的受体不同。

参考文献

- [1] Ferreira L, Villar E, Munoz-Barroso I. Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,2004,36:2344-2356.
- [2] Taylor ME, Drickamer K. Introduction to Glycobiology. 2th ed. New York: Oxford University Press, 2006: 105-146.
- [3] Ito T, Kawaoka Y, Kameda C, et al. Differences in Receptor Specificity between Newcastle Disease Viruses Originating from Chickens and Waterfowl. *The Journal of Veterinary Medical Science*,1999,61(8):951-953.
- [4] Villar E, Barroso I. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: A minireview. *Glycoconjugate Journal*,2006,23:5-17.
- [5] Ladisch S, Gillard B. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Analytical Biochemistry*,1985,146:220-231.
- [6] Rueda R, Tabsh K, Ladisch S. Detection of complex gangliosides in human amniotic fluid. *Federation of European Biochemical Societies Letters*,1993,328:13-16.
- [7] 王江雁,张卫宁,王仁杰. 微型离心柱法快速分离纯化神经节苷脂. *生物化学与生物物理进展(Progress in Biochemistry and Biophysics)*,1997,24(1):75-79.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京:化学工业出版社,2000,二部附录 V B.
- [9] Karlsson KA, Strömberg N. Overlay and solid-phase analysis of glycolipid receptors for bacteria and viruses. *Methods In Enzymology*,1987,138:220-232.
- [10] Guo C-T, Takahashi N, Yagi H, et al. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology*,2007,17(7):713-724.

- [11] Iorio RM, Field GM, Sauvron JM, et al. Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: Receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. *Journal of Virology*, 2001, 75:1918-1927.
- [12] Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, et al. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, 19, 296(1):160-170.
- [13] Suzuki Y, Nagao Y, Ito T, et al. Structural determination of gangliosides that to influenza A, B and C virus by an improved binding assay. *Virology*, 1992, 189:121-131.
- [14] Xu M, Chang S, Ding Z, et al. Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Archives of Virology*, 2008, 153:1281-1289.
- [15] Superti F, Hauttecoeur B, Morelec MJ, et al. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *Journal of General Virology*, 1986, 67:47-56.
- [16] Suzuki T, Sometani A, Yamazaki Y, et al. Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochemical Journal*, 1996, 318:389-393.
- [17] Matrosovich M, Suzuki T, Hirabayashi Y, et al. Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconjugate Journal*, 2006, 23 (1-2):107-113.
- [18] Bhat S, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F, et al. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88:7131-7134.
- [19] Barton ES, Connolly JL, Forrest JC, et al. Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276:2200-2211.

Comparison of the binding characteristics of gangliosides with Newcastle Disease viruses of different animal species by High performance thin layer chromatography-virus overlay protein blot assay

Xin Feng¹, Zhanyun Song², Wenyu Han¹, Zhuang Ding^{1*}

(¹Animal Science and Veterinary college of Jilin University, Changchun 130062, China)

(²Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Changchun 130062, China)

Abstract: [**Objective**] Gangliosides on the cells surface can act as the Newcastle disease virus receptors, but the differences of receptor specificities between Newcastle disease virus strains isolated from different avian species have not been determined. Accordingly, we attempted to determine the difference of binding specificity to gangliosides between two Newcastle disease virus NA-1 (goose-origin) and F48E9 (chicken-origin). [**Methods**] Gangliosides were extracted from chicken embryo fibroblast cells (CEF) and goose embryo fibroblast cells (GEF). The extracted gangliosides were characterized and quantified by high performance thin-layer chromatography. We performed virus overlay assays and hemadsorption inhibition assays to assess the binding specificity of NA-1 and F48E9 to different gangliosides. [**Results**] The results showed that ganglioside compositions of the CEF and GEF were different. In the thin-layer chromatographic binding assay, we analyzed the binding of the virus to different gangliosides, detecting that NA-1 mainly bound to GD1a, F48E9 mainly bound to GM1, GD1a, GD1b. [**Conclusion**] In conclusion, our results suggest that two viruses used different receptors for entry into different target cells.

Keywords: Newcastle disease virus; virus receptor; gangliosides; HPTLC (High performance thin layer chromatography); VOPBA (virus overlay protein blot assay)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30771606)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-431-87836171; E-mail: Ding_zhuang@yahoo.com.cn

Received: 10 August 2009/ Revised: 3 October 2009