

苜蓿尺蠖核型多角体病毒囊膜蛋白 ODV-E18的核定向转运研究

吴金美¹, 吕鸿声¹, 吴祥甫², S. B. Braunagel³, M. D. Summers³

(1. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏, 镇江 212018; 2. 中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031;

3. Department of Entomology, Texas A & M University, College Station, TX77803)

摘要: 苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcMNPV)在细胞质中合成其囊膜蛋白,但在细胞核内组装并包埋病毒粒子,这些蛋白的核定向转运机制是人们感兴趣的课题。以AcMNPV多角体衍生型病毒ODV(occlusion-derived virus ODV)的一种囊膜蛋白ODV-E18为对象,通过E18与一个标记短肽Flag融合的重组病毒的构建,以免疫荧光法跟踪检测E18蛋白的转运过程及形态,并利用酵母双杂交系统法(yeast two hybrid system),通过蛋白-蛋白相互作用的研究,寻找与E18紧密结合的可能的转运蛋白。研究结果表明,E18是先以核内模结构——微泡(microvesicle)的形式存在于核内的;一个被报道具有核定向转运功能的AcMNPV囊膜蛋白-ODV-E66能与E18形成紧密的复合体,推测E-66可能在E18的核定向转运中起着运载体的作用。

关键词: 杆状病毒; 囊膜蛋白; 核定向转运; 多角体衍生型病毒; 酵母双杂交系统; 免疫荧光

中图分类号: Q965.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-8721(2000)03-0247-05

核糖体是细胞内进行蛋白质生物合成的部位。苜蓿尺蠖核型多角体病毒AcMNPV的多角体衍生型病毒ODV囊膜蛋白的合成位于胞质内质网上的核糖体,而囊膜蛋白包被病毒粒子并最终形成多角体却是在细胞核内进行。那么,这些囊膜蛋白是如何定向地从胞质转运至核内的呢?其实细胞并不是其蛋白质等组成成分的无序混合体,各种蛋白质需要在细胞特定的位置或微环境下才能发挥其功效^[1],这已是科学家们的共识。然而对蛋白的定向转运及定位的机制目前了解较少。利用昆虫病毒来研究膜蛋白的定向转运及定位有其特殊的优点:由于病毒的基因组较小,研究起来相对容易;随着病毒的繁殖,所表达的蛋白的量也随之增多,易于跟踪研究;昆虫细胞也属于真核细胞,它与哺乳动物细胞又有许多相似之处,因此研究昆虫病毒的核定向转运途径及机制,无疑将有助于阐明哺乳动物细胞膜蛋白转运的相关问题^[2]。

AcMNPV在其感染过程中可产生两种子代病毒:芽生病毒(budded virus, BV)及多角体衍生病毒

ODV。BV是当核衣壳从细胞表面出芽时从细胞质膜获得其囊膜;而ODV是在所感染的细胞核的核质内获得囊膜,之后被包埋进多角体蛋白的结晶基质而形成多角体。当感染细胞解体时,多角体释放于环境中,一旦为别的昆虫食下,即可引起原发感染^[3]。AcMNPV ODV-E18是ODV特异的囊膜蛋白之一(E代表囊膜, envelope的英文首字母, 18代表蛋白的分子量kD),其转录、翻译及细胞定位已有报道^[4]。本文以ODV-E18为研究对象,通过构建ODV-E18与标记短肽Flag融合表达的高表达重组病毒,分析重组病毒感染宿主细胞时该囊膜蛋白在胞质及核内的表达时相,以及利用细胞免疫荧光组化法观察其转运的过程及形态,最后用酵母双杂交系统法寻找与其紧密结合的可能的转运蛋白,对其核转运机制进行初步探讨。

材料与方 法

1 材料 质粒pVL-1393和含完整E18基因的质粒pUC-E43NF、大肠杆菌菌株DH5 α 、AcMNPV病毒E2株、秋粘虫细胞株Sf9等,由美国Texas A & M University的M. D. Summers教授实验室保存并提供。昆虫细胞培养基为TNM-FH。DNA测序试剂盒为美国USB公司的产品(Version 2.0)。鼠抗Flag的M2抗体为IBI公司产品;FITC偶联的抗鼠IgG的二次抗体(anti-mouse-IgG-FITC)为

收稿日期: 1999-10-25; 修回日期: 2000-03-01

作者简介: 吴金美(1963-),女,浙江松阳,副研究员,博士,研究昆虫杆状病毒的分子生物学、载体表达系统、杆状病毒生物杀虫剂以及家蚕的生理病理。E-mail: jinmeiwu@pub.zj.jinfa.net

Sigma公司产品。Western 转移膜为 PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore 公司产品)。蛋白分子量标准为 BioRad 公司的产品。AcMNPV 感染的 Sf9 细胞的 cDNA 文库由 Dr. M. D. Summers 教授实验室完成并保存。酵母双杂交系统试剂盒购自 Clontech 公司。

2 含标记短肽 Flag 与 ODV-E18 融合表达的重组病毒 rvPh-E18F 的构建

2.1 pVL1393-E18F 转移载体的构建

其构建策略如图 1 所示。简要步骤如下: 我们以 *Bam*HI 和 *Xba*I 消化 pUC-E43NF 质粒 DNA 和 pVL1393 DNA, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳及纯化, 各得大小约为 500bp 和 9kb 大小的含 E-18F 和 pVL1393 的片段。此两片段以 T4DNA 连接酶在 16℃ 连接过夜, 并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 碱裂解法快速抽提菌落 DNA; 经酶切验证和 DNA 测序分析, 证明 E18F 已正确地插入到 pVL1393 的多角体蛋白的启动子下(图 1)。具体的实验操作方法参见 Maniatis 等的分子克隆操作手册^[5]。

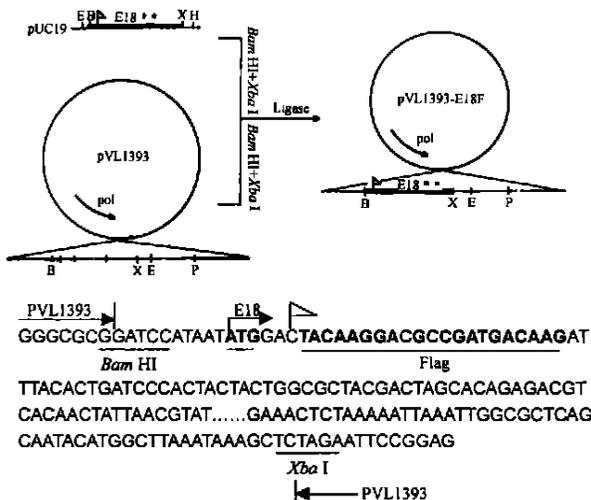


图 1 pVL1393-E18F 转移载体的构建图

Figure 1 Construction of the transfer vector pVL1393-E18F

2.2 测序及 DNA 序列分析

主要参照美国 USB 的 DNA 测序试剂盒(2.0 版本)中的操作手册进行。

2.3 共转染、空斑纯化及重组病毒感染母液的制备

将 pVL1393-E18F 转移载体与 *Bsu*36I 消化的 BacPAK6DNA 以磷酸钙法^[6]共转染秋粘虫 Sf9 细胞; 经两轮空斑纯化, 将挑取的空斑置于 1ml TNM-FH 培养基中, 室温震荡过夜, 使病毒充分释放至培养基中。将此液感染培养于 6 孔板的 Sf9 细胞, 收集感染良好的细胞上清, 一部分用于病毒的进一步扩增感染, 其它分置于冷冻管中于 -80℃ 保存, 此液作为 rvPh-E18F 重组病毒的感染母液 P1。取此 P1 液 400μl 继续感染 T25 细胞培养瓶中的细胞, 收集感染 4~5 天后的感染液作为母液 P2 保存。制备 P3 感染液的方法为: 先利用终点稀释法^[9]测定 P2 母液的病毒滴度, 后以 0.5 的感染复数 (MOD) 感染培养于 200ml 转瓶内的细胞, 27℃ 悬浮培养约 4 天, 待其充分感染后收集上清, 测定滴度, 于 4℃ 作为 P3 保存。

3 胞质、核质的制备及 Western blotting 分析

胞质、核质的制备主要参见文献^[7], 略有修改。主要步骤为: 收集在 T25 培养瓶内感染的细胞, 以冷的 PBS 洗后 3 000r/min 离心 5min, 加 300μl ITBN (10mmol/L Tris pH6.5, 140mmol/L NaCl, 3mmol/L MgCl₂, 0.5% NP40) 以及每毫升 500 个单位的蛋白酶抑制剂 aprotinin, 冰上置 30min 后离心, 上清移至新管; 将沉淀悬浮于 50μl RIPA (50mmol/L Tris pH8.0, 100mmol/L NaCl, 3mmol/L MgCl₂, 1% NP-40, 每毫升 500 个单位的蛋白酶抑制剂 aprotinin) 液中, 用注射针筒将此液上下抽吸多次以使 DNA 断裂, 离心, 上清贮存于 -20℃。

Western blot 按常规方法^[5]进行, 略有修改。SDS-PAGE 所用分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶 5%。样品上样前先用 Bradford 法测定样品蛋白浓度^[8], 每孔所加蛋白量为 15μg。所用的一抗为鼠抗 Flag 的 M2 抗体, 二抗为辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG。显色方法参照 Amersham Life Science 的 ECL Western Blotting 操作手册进行。

4 细胞免疫荧光分析

以 20MOI rvPh-E18F 的重组病毒感染 6 孔培养板中每孔细胞初始密度为 1×10⁶ 的 Sf9 细胞。在感染后各设定的不同时间点上收集感染细胞, 转移至无菌的离心管中。1 000r/min 离心 5min, 将细胞悬浮于 Grace 培养基中, 1 500r/min 离心 5min, 去上清, 细胞重新悬浮于 1ml Grace 培养液中。以血球计数器计算细胞密度后加入大约 1.7×10⁵ 个细胞于细胞离心机 (cytofuge) 的玻片上, 2 200r/min 离心 4min。吸去培养基部分, 使细胞自然干燥 5min, 用 3.7% 的多聚甲醛 (1× PBS pH7.2, 3% BSA, 1% 正常羊血清) 400μl 固定细胞, 置于室温 10min。吸去上清, PBS 洗 3 次, 细胞用封闭液 (1× PBS pH7.2) 封闭 1h, 鼠抗 Flag 的 M2 抗体 (1:1000 稀释) 温育过夜, PBS 洗 3 次, 以与 FITC 偶联的抗鼠 IgG 抗体 (anti-mouse-IgG-FITC, 1:128 稀释) 避光温育 1h, PBS 洗 3 次, 加入过滤了的 DAPI (1:10 000 溶于 1× PBS, pH7.2), 作用 5s 后同样以 PBS 洗 3 次, 除去载玻片上的环形套, 滴上一滴玻片样本保存液 (1mg 对苯二胺/ml 1× PBS pH8.5), 盖上盖玻片, 并四周封口, 荧光显微镜观察并摄影。

5 酵母双杂交法

酵母感受态细胞的制备、酵母细胞的醋酸锂 (LiAc) 转化法、酵母菌落的半乳糖苷酶活性分析 (集落提升滤过分析, Colony-Lift Filter Assay)、蛋白间相互作用的验证、酵母中质粒的分离及重新转化大肠杆菌等, 均参照 Clontech 的“Matchmaker Two-Hybrid System2” 中的操作手册进行。AcMNPV 的 cDNA 文库构建于 pGAD10 载体上, E18 基因与酵母 Gal4DNA-BD (binding domain) 融合表达所用的质粒为 pAS2-1。碱裂解法从大肠杆菌中制备的质粒 DNA 经测序所得的序列, 经美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information NCBI) 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 服务器查找同源基因及蛋白。

结 果

1 Flag 与 E-18 融合表达的重组病毒的构建

如图 1 所示。DNA 序列分析表明, E 18F 已正确地插入到 pVL1393 的多角体蛋白的启动子下。编码 Flag 7 个氨基酸短肽的基因位于 E-18 编码的第二个氨基酸之后, 其后仍然保留了读码框正确的其余 E18 基因部分。所构建的转移载体 pVL1393-E18F 与 BacPAK6 DNA 共转染粘虫 Sf9 细胞, 经两轮空斑纯化及病毒的扩增, 得到了滴度为 5.49×10^9 PFU/ml P3 重组病毒液。

2 病毒感染细胞在胞质及核质中表达 E18F 融合蛋白的表达时相

如图 2 所示, 在病毒感染后 24h, 重组病毒 rvPH-E18F 在细胞胞质中 E18-Flag 融合蛋白就有一定的合成及表达, 而在核内其量甚微。病毒感染后的 36h、48h 和 72h, 不论在胞质或核内均存在较高量的 E18-Flag 融合蛋白。感染 24h 后核内 E18-Flag 的量明显增多, 意味着 E18-Flag 融合蛋白在此时期已被大量转运至核内, 此时也恰是细胞核内开始形成多角体的时期。

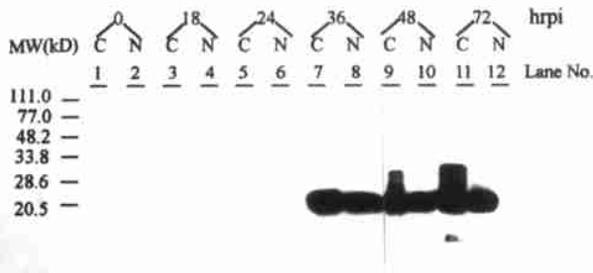


图 2 重组病毒 rvPh-E18F 感染细胞 E18F 融合蛋白的表达时相

Figure 2 Time course of the expression of E18-Flag fusion protein in rvPh-E18F infected Sf9 cells

C. Cytosolic fraction; N. Nuclear fraction; MW. Prestained molecular weight standards; hrpi. Hours post infection.

3 ODV-E18 的细胞免疫荧光分析

利用 Flag 作为跟踪标记的细胞免疫荧光分析表明, 在病毒感染细胞 24h 后, 代表 Flag 及 ODV-E18 所在位置的结合在 Flag 二次抗体上的 FITC 染料, 在荧光显微镜的紫外光激发下发出绿色荧光的部位, 主要位于细胞核内的微泡(图 3)。图 3 显示了绿色荧光在细胞中的相对位置, 图中 A 为感染细胞中发出绿色荧光的部位的照片, B 则为同样的细胞在不同激发波长的激发光作用下所发出的绿光(FITC 产生)和代表细胞核位置的蓝光(DAPI 产生)进行双曝光所产生的照片。整个发出蓝光的部位代表细胞核的范围, 其中间的小亮圆核为核仁部

位。

4 酵母双杂交法研究与 ODV-E18 紧密结合的可能的载运蛋白

我们利用酵母双杂交法在 AcMNPV 感染 24h 的 cDNA 文库中筛选到了一个阳性酵母菌落, 经 Colony-Lift Filter Assay 及酵母交配法(yeast mating)证实了两者间确实存在相互作用。此阳性菌落的细胞悬浮液均含环己酰亚胺(cycloheximide)的 SD/Leu (SD, synthetic dropout, 为酵母转化的基本合成培养基)培养基的选择, 失去了 pAS2-1 衍生而来的质粒, 保存了文库中筛得的质粒部份。将此保存的质粒分离纯化并转化大肠杆菌, 按常规方法测序, 所得序列经 BLAST 的基因库搜索, 找到了 AcNPV 的 79kD^[9] 也即 ODV-E66^[10] 蛋白基因(该两基因其实属于同一基因, 只是研究实验室的不同, 在报道的分子量上有所偏差)为该序列同源性最高的基因, 检索结果见图 4。

讨 论

蛋白转运至核有多种可能的途径: 有的蛋白本身具有核定位序列 NLS^[11] (nuclear localization sequences, 为能将蛋白定向导入于核的一段短肽序列); 有的则通过其它核转运载体的作用转运至核。

利用计算机我们对 ODV-E18 作了多种结构预测和分析, 如已报道的核导向序列的搜索、类似或同源蛋白的寻找、氨基酸二级结构的预测及翻译后可能的加工位点的分析等, 但未能预示可能的 NLS 的存在。我们进而利用酵母双杂交系统寻找其相互作用的可能的转运蛋白。

组成 AcMNPV 的囊膜蛋白有多种, 如 ODV-E66、ODV-E25、ODV-E18、ODV-E35、ODV-E56 等, 蛋白的结构不尽相同^[12], 部份蛋白核转运的报道是近几年的事。1997 年, T. Hong 等报道 ODV-E66 和 ODV-E25 的 N 端序列(分别为 23 和 24 个氨基酸)足以将报告蛋白运送至核膜、核内微泡及 ODV 的囊膜^[2]。另外, Beniya 等^[13] 的研究证明, AcMNPV 的 BV/ODV-E26 在其转运过程中能与 AcMNPV 的 FP25k 蛋白及细胞的肌动蛋白形成复合物, 从而有利于蛋白的定向转运。

有关 ODV-E18 的核转运研究尚未见报道。本研究中 ODV-E18 与 Flag 融合表达的重组病毒的作成, 使我们利用标记短肽 Flag 来跟踪观察 ODV-E18 的中间转运过程或形态成为可能。我

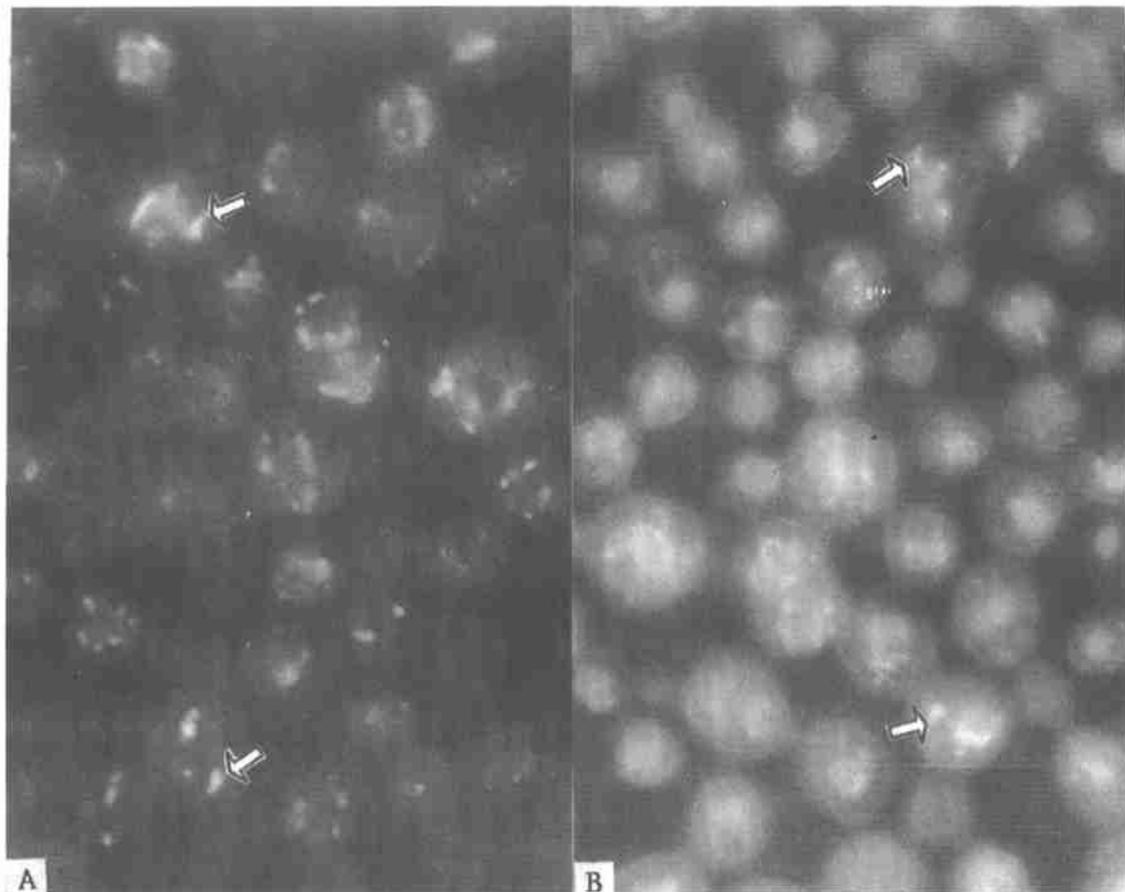


图 3 rvPh-E18F 感染细胞的间接免疫荧光定位分析

Figure 3 Indirect immunofluorescence localization of rvPh-E18F infected cells

A: The green fluorescence was emitted by FITC, arrow shows the intranuclear microvesicles;

B: Double exposure of FITC and DAPI. The blue fluorescence was emitted by DAPI, indicating the nuclear area of infected cells. A

and B: Twenty-four hours post infection.

```

Que TTACGTAAC GTGGCAAC GGCAGTAAGC CGT...GGTAAT
79kD ***T***** *****CG *CGTTA**** *C*...***** 3162
Que GGTCAAAGAT AACAGTGTCT TTCATGTCCG CTAACGAAGA
79kD *****A **T***** ***** 3202
Que CACTACTATA CCATTTAGCG TTATAATGAA TTCCTTCACC
79kD ***** ***** ***** 3242
Que TCTATCAG
79kD *****G* 3250

```

图 4 酵母阳性克隆株 AcMNPV cDNA 文库质粒的部份序列与 AcMNPV 79kD 基因同源性的比较

Figure 4 Homology comparison of part of the inserted gene sequence in the plasmid of the positive E18-interacting yeast clone from AcMNPV cDNA library with that of AcMNPV 79kD gene (The identical nucleotide is indicated with * - Que: Query.)

导产生的宿主细胞核内的特异膜结构形式;并用酵母双杂交系统法找出了与 E18 紧密结合的具有 N 端 23 个氨基酸核导向功能²¹的另一个 AcMNPV 的膜蛋白-ODV-E66,认为 ODV-E18 的转运是可能通过与 ODV-E66 的结合而转运至核的。值得一提的是,我们曾用多种方法及途径试图在 AcMNPV 病毒中原位缺失 ODV-E18 基因,均未能取得成功,表明该基因对病毒的扩增和繁殖同时也起着某种重要的作用。更详细的 ODV-E18 的核转运机理及该基因对病毒复制的可能影响有待于今后进一步的研究。

参考文献:

[1] Lewin B. Genes VI [M] . New York; Oxford University Press, 1997.

[2] Hong T, Summers M. D, Brounagel S.C. N-terminal sequences

们利用荧光免疫分析法证明了 ODV-E18 的转运经过了核内微泡(microvesicle)这种病毒感染后所诱

- from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion-derived virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4050-4055.
- [3] 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.
- [4] Braunage S C, He H, Summers M D. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-E27 [J]. Virology, 1996, 222: 100-114.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures [M]. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, 1987.
- [7] Jarvis D L, Bohlmeier D A, Garcia A. Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection [J]. J Virol, 1992, 66: 6903-6911.
- [8] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] Crawford A M, Miller L K. Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. J Virol, 1988, 62(8): 2773-2781.
- [10] Hong T, Braunage S C, Summers M D. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. Virology, 1994, 204(1): 210-222.
- [11] Pugsley A P. Protein Targeting [M]. San Diego: Academic Press Inc., 1989.
- [12] Braunage S C, Summers M D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles [J]. Virology, 1994, 202: 315-328.
- [13] Beniya H, Braunage S C, Summers M D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes [J]. Virology, 1998, 240(1): 64-75.

Studies on the Transporting and Targeting of *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus ODV-E18

WU Jin-mei¹, LU Hong-sheng¹, WU Xiang-fu², S. B. Braunage³, M D Summers³

(1. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China;

2. Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China;

3. Department of Entomology, Texas A & M University, College Station, TX77803)

Abstract: The envelope proteins of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) occlusion-derived virus are synthesized in cytosolic plasma of their host cells, transported and assembled in the nuclei of the cells. The mechanism of protein transporting and targeting is of quite interest to us. In this study, a recombinant virus expressing the fusion protein of E18 and Flag marker peptide under AcMNPV polyhedrin promoter was constructed. Immunofluorescence was used to localize E18 in the recombinant virus infected cells and yeast two hybrid system was employed to find out the possible transporting protein which binds with E18. Our preliminary results showed that E18 existed first in the nuclei in the form of microvesicle—the intranuclear membrane structure and it might be transported into the nuclei through the interaction with another AcMNPV envelope protein—ODV-E66, the latter has been reported containing a 23-amino-acid sequence which is sufficient to direct reporter proteins to nucleus.

Key words: baculovirus; envelope protein; nuclear transporting and targeting; occlusion-derived virus; yeast two hybrid system; immunofluorescence