

流感病毒复制过程中神经氨酸酶的免疫荧光特点

林 乔 冯玲玲 何 敏 王懋梁*

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉)

提 要

用二种抗甲型流感病毒神经氨酸酶的单克隆抗体研究流感病毒在猴肾细胞内复制过程中病毒神经氨酸酶的免疫荧光特点, 结果阐明了神经氨酸酶的细胞内过程及其发生的构象改变, 并观察了抗神经氨酸酶单克隆抗体对病毒穿入细胞的影响。

流感病毒有血凝素和神经氨酸酶二种表面抗原。病毒依靠血凝素结合在靶细胞含唾液酸的受体上, 并参与膜融合过程, 使病毒核衣壳进入细胞质而引起感染。神经氨酸酶可能参与病毒从宿主细胞表面的释放, 但对其在病毒复制过程中的确切作用尚不清楚。目前对血凝素在病毒穿入、脱衣壳和释放等各阶段中的行为和构象改变已有不少研究^[1-3], 但对神经氨酸酶在病毒复制过程中的情况了解很少。

本文用抗甲型流感病毒 A/上海/13/85 神经氨酸酶单克隆抗体研究流感病毒在猴肾细胞 (BGMK) 复制过程中病毒神经氨酸酶的免疫荧光特点, 以阐明病毒神经氨酸酶的细胞内过程及构象改变。

材料与方 法

1. 病毒 甲型流感病毒 A/上海/13/85, 接种于11日龄鸡胚尿囊液, 33℃温育48小时后, 收取尿囊液, 用常规方法测定病毒血凝单位 (HAU), 并浓缩到 1,000 HAU/毫升。

2. 细胞 传代猴肾细胞 (BGMK) 37℃下在含 2% 小牛血清的 Eagle 培养基中培养。细胞在 18 × 18 毫米盖玻片上长成单层后, 接种 50 HAU 流感病毒。在 0℃ 放置 30 分钟后, 用 PBS 洗涤三次, 再转移到含有 1/50 稀释的单克隆腹水抗体的 Eagle 培养基中。经 37℃ 温育 30、60、120、180 和 360 分钟后, 分别取出一张盖玻片进行免疫荧光检查。

3. 抗体 抗 A/上海/13/85 病毒神经氨酸酶的单克隆抗体的制备及性质见文献^[4]。本研究选用二株单克隆抗体 NC6B 和 NC29B, 其中 NC29B 结合于酶活性部位附近的抗原表位, 而 NC6B 结合于远离活性部位的抗原表位。异硫氰酸盐荧光素标记的兔抗鼠 IgG 抗体由本所自行制备, 其效价为 1:20。

4. 免疫荧光试验 受病毒感染的细胞单层载玻片经不同时间温育后取出, 用冷 Eagle

本文于1987年3月26日收到。

* 本文联系人。

培养基洗涤三次, 再在冷丙酮内固定10分钟。固定后, 用PBS洗涤三次。滴加荧光素交联的兔抗鼠IgG抗体50微升, 再在37°C下温育1小时。经PBS洗涤后用50%PBS缓冲甘油封片, 用日产Olympus荧光显微镜观察结果。

结果与讨论

一、流感病毒神经氨酸酶的细胞内过程



图1 流感病毒A/上海/13/85感染BGMK细胞后, 单克隆抗体29B和6B检出的病毒神经氨酸酶的免疫荧光。A—F: 感染后0、30、60、120、180和360分钟。

Fig 1 Immunofluorescence of viral neuraminidase detected with monoclonal antibodies 29B and 6B in the BGMK cells infected with influenza A virus A/Shanghai/13/85. A—F: 0, 30, 60, 120, 180 and 360 min p.i..

在 0 °C 用流感病毒 A/上海/13/85 (50HAU) 感染猴肾细胞后, 病毒吸附在细胞表面, 整个细胞表面呈现大片荧光(图 1 A)。接种病毒半小时后, 吸附的病毒进入细胞, 表现为细胞表面荧光减少, 并向核周集中。核周小空泡是溶酶体的特征^[6], 说明病毒粒子已被转移到溶酶体中(图 1 B)。感染后 1—3 小时, 核膜及核周小范围内荧光逐渐扩大, 强度也逐渐增强。这些部位系细胞内质网所在, 说明同血凝素一样, 神经氨酸酶的生物合成也与细胞内质网有关(图 1 C、D、E)。感染后 6 小时, 细胞表面又重新遍布荧光, 提示此时大量新复制的病毒已出现在细胞的表面(图 2F)。



图2 培养基中存在(A)和不存在(B)氯化铵的情况下病毒感染180分钟时抗体 29B 检出BGMK细胞中的免疫荧光。

Fig 2 Immunofluorescence of viral neuraminidase in the BGMK cells at 180 min p.i. in the absence (B) and presence (A) of ammonium chloride detected with monoclonal antibody 29B.

二、在病毒复制过程中神经氨酸酶的构象改变

抗体 6 B 和 29B 在病毒复制过程中所检出的神经氨酸酶的免疫荧光呈现完全不同的二种类型(图 1 6 B和29B)。开始时, 6 B和29B均结合于细胞表面的病毒, 但是6B 检出的免疫荧光强, 而29B检出的免疫荧光较弱。温育30—60分钟, 吸附的病毒进入细胞内。此时, 6B的荧光减弱, 而29B的荧光却逐渐增强, 说明病毒进入细胞溶酶体后, 神经氨酸酶发生了明显的构象改变, 使NC6B不易与内在化的病毒神经氨酸酶结合, 而NC29B更易与内在化的神经氨酸酶结合。而培养基中存在氯化铵(2mmol/L)情况下进行温育时, 病毒进入细胞后, NC29B检出的免疫荧光不再增强。据认为, 加入氯化铵后, 溶酶体内 pH 增高^[7], 神经氨酸酶不能发生构象改变, 因此NC29B也不再能与其相结合(图 2)。随着温育时间的延长, 29B 检出的免疫荧光逐渐增强, 进一步说明29B 较易结合于与内质网有关的或不成熟的内在化病毒。感染 6 小时, 病毒到达细胞表面后, 29B 检出的免疫荧光又明显减弱, 而此时6B检出的免疫荧光又重新增强, 说明 6 B 识别的抗原决定簇是感染后期产生的抗原决定簇。

三、抗神经氨酸酶单克隆抗体对病毒穿入细胞的影响

流感病毒A/上海/13/85 (100HAU) 与等量抗体NC6B或NC29B (1:50稀释) 混合, 在37°C温育30分钟后, 再感染猴肾细胞。感染后 2 小时内, 二种抗体检出的免疫荧光始

终布满整个细胞的表面,不再向核周集中。说明这二种抗体与病毒神经氨酸酶的结合部位尽管相距甚远,但是均能有效地阻止病毒进入细胞。以往认为,抗神经氨酸酶血清抗体不能通过阻断病毒附着和复制来中和病毒的感染性^[8]。Webster等近来通过在抗神经氨酸酶抗体存在下选择出神经氨酸酶抗原突变株,表明抗神经氨酸酶单克隆抗体能有效地中和病毒^[9]。本研究则进一步证实抗神经氨酸酶单克隆抗体中和病毒的机理之一是阻止病毒进入细胞。

参 考 文 献

- [1] Herrero-Urbe, L. et al., 1983, *J Gen Virol* 64:471-475.
- [2] Matlin, K.S. et al., 1981, *J Cell Biol* 91:601-613.
- [3] Yoshimura, A. et al., 1984, *J Virol* 51:497-504.
- [4] 王懋梁等, 中华微生物学和免疫学杂志, 待发表。
- [5] Helenius, A. et al., 1980, *J Cell Biol* 84:404-420.
- [6] Green, J.C. et al., 1981, *J Mol Biol* 152:663-698.
- [7] Yewdell, W.J. et al., 1983, *J Virol* 48:239-248.
- [8] Kilbourne, F.D. et al., 1968, *J Virol* 2:281-288.
- [9] Webster, R.G. et al., 1982, *Virology* 117:93-104.

Immunofluorescence of Viral Neuraminidase in the Replication of Influenza Virus

Lin Qiao Feng Ling-ling He Min Wang Mao-liang

(Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan)

Immunofluorescence of viral neuraminidase in the replication of influenza virus in the BCMK cells was studied with two monoclonal antibodies against neuraminidase of influenza A virus A/Shanghai/13/85. The results showed intracellular behavior and conformational changes of viral neuraminidase and the effect of monoclonal antibodies against neuraminidase on the entry of influenza virus into cells.