

C6 / 36 细胞上登革 2 型病毒受体的免疫共沉淀*

刘美德, 赵彤言**, 董言德, 陆宝麟

(军事医学科学院微生物流行病学研究所全军媒介生物重点实验室, 北京 100071)

Immunological Co-sedimentation of Dengue 2 Virus' Receptor
on the C6/36 Cells

LIU Mei-de, ZHAO Tong-yan**, DONG Yan-de, LU Bao-lin

(Key laboratory of vector biology and control, Institute and Microbiology of Epidemiology, AMMS, Beijing 100071, China)

Abstract: In this paper, based on the especial interaction among purified Dengue 2 virus, monoclonal antibody against Dengue virus, virus receptor, and Protein-G-Agrose; one non-glycoprotein, which molecular weight is approximately 35kDa, has been identified to be the receptor of Dengue 2 virus on the C6/36 cells by the method of immunological co-sedimentation. The glycoprotein nature of this receptor is also denied through glycoprotein stain procedure.

Key words: Dengue 2 virus; C6/36 cells; Receptor; Immunological co-sedimentation; glycoprotein

摘要: 本文利用差速离心方法提纯的登革 2 型病毒、抗登革病毒单抗、病毒受体、耦合有 G 蛋白的琼脂糖珠之间特异性结合的作用, 利用免疫共沉淀方法从 C6/36 细胞中分离鉴定出分子量约为 35kDa 受体蛋白; 并用糖蛋白染色方法否定了此蛋白的糖基化特征。

关键词: 登革 2 型病毒; C6/36 细胞; 受体; 免疫共沉淀; 糖蛋白

中图分类号: R373.33

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152-(2004)-03-0217-03

登革热是由登革病毒引起的重要虫媒传染病, 白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 是重要传播媒介之一^[4]。C6/36 细胞是白纹伊蚊 (*Ae. albopictus*) 的体外细胞系, 分离与鉴定 C6/36 细胞上登革病毒的受体有助于对白纹伊蚊传播登革热机理的研究。本文用免疫共沉淀方法分离 C6/36 细胞上能与登革 2 型病毒结合的受体蛋白, 并通过糖蛋白染色法鉴定受体蛋白的糖基化性质。

1 材料与方 法

1.1 登革 2 型病毒的差速离心法纯化与保存

参照文献^[1]方法以感染复数 MOI=3 鼠脑登革 2 型病毒 (新几内亚 B 株引自军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验中心) 接种 Vero 细胞, 于 2% 胎牛血清的 DMEM 培养至 72h。收集培养上清,

第一次离心 (4℃, 10,000×g, 30min) 后收集上清, 加入 PEG6000 和 NaCl 使其终浓度分别为 66g/L 和 25g/L, 4℃ 静置过夜。4℃, 10,000×g 离心, 30min, GTNE 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCL, 20mmol/L Glycine, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH 7.5) 重悬沉淀, 4℃ 静置过夜后。4℃, 100,000×g 离心 3.5h, GTNE 缓冲液重悬沉淀病毒, 加装 30% 的小牛血清, 冻存液氮中备用。

1.2 C6/36 细胞蛋白的制备

取生长良好的满单层 C6/36 细胞, 用含 PMSF 的 PBS 洗涤细胞三次, 再用 Ieupeptin 和 Aprotinin 的 RIPA (1% Triton-x 100, 1g/L SDS, 10g/L DOC, 150mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 50mmol/L Tris, pH 7.4) 重悬细胞沉淀, 置冰浴 30~40min。 (4℃, 10000×g, 离心 10min) 收集上清,

收稿日期: 2003-11-21 修回日期: 2003-12-18

* 基金项目: 中国人民解放军总后勤部“九五”医学杰出中青年基金课题

作者简介: 刘美德 (1973-), 男, 博士生, 研究方向为虫媒病毒与虫媒的关系。

** 通讯作者: 赵彤言 (1964-), 女, 研究员。Corresponding author. Tel:010-66948540, E-mail:pipiens@sohu.com

再用 Microcon YM-10 (Millipore42407) 把蛋白缓冲液换成 1×PBS。

1.3 感染病毒的细胞蛋白的制备

C6/36 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 中 28℃ 培养至满单层, 以感染复数 M.O.I=3 的鼠脑病毒接种细胞, 于 2%胎牛血清的 DMEM 培养至 48h。用含 PMSF 的 PBS 洗涤细胞三次, 用 RIPA 重悬细胞沉淀, 冰浴 30min~40min 后 4℃, 10000×g 离心 10min, 上清即为感染有登革 2 型病毒的 C6/36 细胞蛋白。

1.4 单抗对感染病毒的细胞蛋白检测

参照文献^[5], SDS-PAGE 分离蛋白, 电泳结束后转印蛋白至硝酸纤维素 (NC) 膜 (Gelman 公司) 上。室温条件下, NC 膜于封闭液 (50g/L 脱脂奶粉, 1×PBS) 振荡封闭 2h。洗涤液 (10g/L 脱脂奶粉, 1×PBS) 洗涤三次后加入抗登革病毒的单抗 (ATCC 公司), 室温作用 1h。洗涤液洗涤 NC 膜三次后, 加入 HRP-羊抗小鼠 IgG (Gibco 公司) 于室温作用 1h。最后按 PIERCE 公司的化学发光试剂盒产品说明书提供的步骤用 X 光片显影。

1.5 细胞上病毒的受体蛋白分子的鉴定与分离

将 C6/36 细胞蛋白与纯化的登革 2 型病毒混合, 4℃ 混合过夜。加入抗登革病毒单抗, 4℃ 混合 2h。再加入 Protein G-agarose (Santa Cruz Biotechnology), 4℃ 混合 2h。离心收集 Protein G-agarose, 用免疫沉淀洗涤液 (0.1% NP-40, 10mmol/L Tris HCL, pH 7.5) 洗涤 3 次。将 Protein G-agarose 用 1×SDS-PAGE 上样缓冲液重悬, 煮沸 5min, 高速离心 5min; 上清 SDS-PAGE 电泳后考马氏亮蓝染色。另设置两个阴性对照, 分别以相同量的 1×PBS 代替免疫共沉淀中的病毒和 C6/36 细胞蛋白。

1.6 受体蛋白中的糖基化水平的鉴定

在同一块 SDS-PAGE 胶板上同时电泳相同的免疫共沉淀样品, 并以预染蛋白分子量标准 (BenchMark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ 公司) 作为蛋白标准电泳。电泳结束后把 SDS-PAGE 切成两半, 一半用以考马氏亮蓝染色, 另一半以阿尔新蓝染色; 比较两种染色结果判断受体蛋白的糖基化水平。

2 结果

2.1 细胞蛋白与登革 2 型病毒免疫共沉淀

为了保证免疫共沉淀反应的特异性, 需要鉴定所用抗体对病毒的特异性以及剔除可能与抗体结合的靶标细胞中非特异性蛋白。从感染和未感染登

革 2 型病毒的 C6/36 细胞蛋白与所用单抗的 Western blot 检测结果 (见图 1) 可以看出: 在感染与未感染登革 2 型病毒的 C6/36 细胞蛋白中都出现了分子量大小约为 80kDa 的阳性条带, 它应是本研究中所用单抗与 C6/36 细胞中蛋白结合所致假阳性结果, 在以后的结果判读中应注意剔除; 在感染有登革 2 型病毒的 C6/36 细胞蛋白的泳道中鉴定出有登革 2 型病毒蛋白 (E 蛋白≈60kDa) 能与本研究中所使用的单抗结合。C6/36 细胞蛋白与登革 2 型病毒免疫共沉淀的结果如图 2 所示, 比较: (1) PBS+C6/36 蛋白+抗体+Protein-G-Agrose, (2) 病毒+C6/36 蛋白+抗体+Protein-G-Agrose, (3) 病毒+PBS+抗体+Protein-G-Agrose 三个样品的 SDS-PAGE 电泳结果, 可以在免疫共沉淀样品 (2) 病毒+C6/36 蛋白+抗体+Protein-G-Agrose 泳道上发现分子量约为 35kDa 的 C6/36 细胞上登革 2 型病毒的受体蛋白分子, 而在两个阴性对照样品的泳道中以及 Western blot 检测实验中没有发现此蛋白的出现。

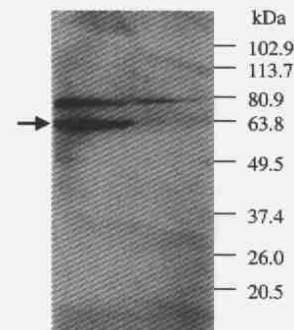


图 1 Western blot 检测

Fig.1 Western blot tes

1, Infected C6/36 cells; 2, Normal C6/36 cells.

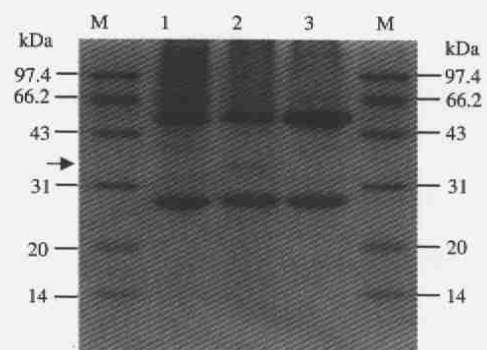


图 2 C6/36 细胞蛋白与登革 2 型病毒免疫共沉淀

Fig.2 Immunology co-sedimentation of Dengue 2 virus with C6/36 cells protein

M, Protein mark; 1, PBS+C6/36 Protein+Antibody+Protein-G-Agrose; 2, irus+C6/36 Protein+Antibody+Protein-G-Agrose; 3, virus+PBS+Antibody+Protein-G-Agrose.

2.2 免疫共沉淀样品的考马氏亮蓝与阿尔新蓝染色

使用糖蛋白特异性的阿尔新蓝染色法对免疫共沉淀样品染色, 并以考马氏亮蓝法染色结果作为对照。从实验结果来看(见图 3)在考马氏亮蓝染色中能显现出来的 35kDa 受体蛋白条带的另一块 SDS-AGE 的 35kDa 处用阿尔新蓝染色不出现相应的条带, 从而否定了本研究中免疫共沉淀下来的 35kDa 受体蛋白的糖蛋白性质。

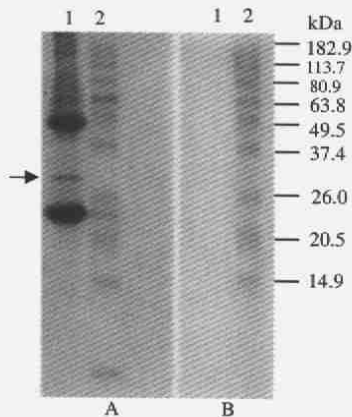


图 3 免疫共沉淀样品检测

Fig.3 The sample of immunology co-sedimentation

A: Coomassie brilliant blue stain; B: Alcian Blue stain. 1, Sample of immunology co-sedimentation; 2, BenchMark™ Prestained Protein Ladder.

3 讨论

免疫共沉淀法分离与鉴定病毒在宿主细胞上的受体蛋白分子是利用耦合有 G 蛋白的琼脂糖珠先与病毒抗体结合, 它们结合的复合体再与病毒结合, 最后利用病毒与病毒受体特异结合把受体耦合出来。本研究中所用抗登革病毒单抗经免疫印迹显示能特异性地与登革 2 型病毒中主要参与受体结合的 E 蛋白结合, 保证了后面的免疫共沉淀反应的特异性。

细胞中病毒受体的含量一般很少, 由蚊虫成体组织或细胞出发对病毒受体的研究受很大的限制, C6/36 细胞是起源于白纹伊蚊的细胞系, 研究 C6/36 细胞上登革病毒的受体可以为白纹伊蚊成体上病毒受体研究打下实验基础。本研究应用免疫共沉淀和阿尔新蓝染色法从 C6/36 细胞中分离并鉴定出登革 2 型病毒受体为一分子量大小约为 35kDa 的非

糖蛋白; 这与本研究室先前用 VOPBA 方法在 C6/36 细胞上鉴定出的登革 2 型病毒受体分子量大小一致^[6], 也有利于对受体本质作进一步的分析。Salas-Benito 等在 C6/36 细胞上鉴定的登革 4 型病毒的受体是分子量为 45kDa 和 40kDa 的两蛋白^[2]; 而且用高碘酸钠 (Sodium Periodate, 专门用来去除蛋白分子上的糖链结构) 处理 C6/36 细胞蛋白以后再做 VOPBA 鉴定实验时, 45kDa 和 40kDa 两蛋白都消失了, 而在 35kDa~37kDa 处出现唯一的受体蛋白, 他们推断 45kDa 和 40kDa 两蛋白是 35kDa~37kDa 处的蛋白由于不同糖基化水平衍生而成的^[2]。本研究中鉴定出来的受体与 Salas-Benito 等研究中的去糖基化后的受体蛋白分子量大小相近, 且为非糖基化; 两者有可能为同一受体蛋白核心, 糖基化可能是受体多样化原因之一。

Yazi Mendoza 等在登革媒介埃及伊蚊的易感组织上能鉴定到病毒受体, 而在不易感组织上则鉴定不到受体; 在埃及伊蚊的中肠上能鉴定到受体, 而非登革媒介淡色按蚊的中肠上则鉴定不到受体, 受体决定了蚊虫个体与组织对病毒的感染特性^[3]; 对蚊虫细胞上病毒受体的研究有助于对蚊虫感染与传播此病毒机制的了解, 进一步切断病毒的传播途径。

参考文献

- [1] Heinz F, C Kunz h. Concentration and purification of tick-borne encephalitis virus grown in suspensions of chick embryo cells[J]. *Acta Virol*, 1977, 21:301-307.
- [2] Salas-Benito J S, Angel R D. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus[J]. *J Virol*, 1997, 71(10): 7246-7252.
- [3] Yazi Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, et al. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 67(1):76-84.
- [4] 陆宝麟. 中国登革热媒介及其防治[M]. 贵阳: 贵阳人民出版社, 1990, 221-257.
- [5] 萨姆希鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M] 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 862-897.
- [6] 刘美德, 赵彤言, 董言德, 等. 登革 2 型病毒在 C6/36 细胞上受体蛋白的鉴定[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2003, 10(4):232-235.