

肌动蛋白在 AcMNPV 向细胞外运输过程中作用的初步研究*

李小青¹, 周蕊¹, 贾蕴丽¹, 贾放¹, 余泽华^{1**}, 陈新文²

(1. 华中师范大学昆虫研究所, 湖北武汉 430079; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Function of Actin in Transportation of the AcMNPV from Nuclear to outside of Cell

LI Xiao-qing¹, ZHOU Rui¹, JIA Yun-li¹, JIA Fang¹, YU Ze-hua^{1**}, CHEN Xin-wen²

(1. Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: To investigate the role of actin in AcMNPV BV transportation from nuclear to cytoplasm, we constructed two recombinant viruses AcMNPV-GFP and AcMNPV-GFP-actin, in which the expression of GFP gene and GFP-actin fusion gene was driven by polyhedrin promoter. Here, we report the expression pattern of GFP in Sf9 cells infected with AcMNPV-GFP and AcMNPV-GFP-actin. Within 24-72 hr after infection, we observed that GFP signal in Sf9 cells infected with AcMNPV-GFP-actin was first concentrated in nuclear and then gradually located to cytoplasm and finally accumulated exclusively at cytoplasmic membrane. In the Sf9 cells infected with AcMNPV-GFP, however, the GFP signal was diffused throughout cell and this expression pattern did not change during the same period of observation. Thus, our results indicated that actin might participate in the transportation of the AcMNPV BV from nuclear to cytoplasm and its exocytosis from the cell.

Key words: Green fluorescent protein; Actin; AcMNPV; Recombinant virus

摘要: 本实验利用 AcMNPV(*Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV)的 bac-to-bac 系统构建了两种重组病毒, 即含 GFP-actin 融合基因的重组病毒 AcMNPV-GFP-actin 和含 GFP 基因的重组病毒 AcMNPV-GFP。用这两种重组病毒分别感染 Sf9 细胞, 以 AcMNPV-GFP 感染的 Sf9 细胞为对照, 用共聚焦激光扫描显微镜观察了绿色荧光在病毒感染过程中的分布情况。由于肌动蛋白和绿色荧光蛋白是共定位的, 所以绿色荧光的分布情况就是肌动蛋白的分布情况。实验中观察发现, AcMNPV-GFP 感染的 Sf9 细胞中的绿色荧光, 在整个感染过程中是弥散分布的, 而 AcMNPV-GFP-actin 感染 Sf9 细胞后 24-72h 这段时间内, 肌动蛋白最初聚集在细胞核内, 随后逐渐由细胞核向细胞质转移, 最后完全聚集于细胞膜。根据实验结果, 推测肌动蛋白可能参与了 AcMNPV 出芽型病毒粒子 (BV) 由细胞核向细胞质运输以及从细胞膜排出的过程。

关键词: 绿色荧光蛋白; 肌动蛋白; 苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核型多角体病毒; 重组病毒

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0632-04

肌动蛋白 (Actin) 是真核细胞中普遍存在的一种高度保守的蛋白质。肌动蛋白单体接近球形 (G-actin), G-actin 装配成纤维状肌动蛋白 (F-actin)。肌动蛋白既遍布于真核细胞的细胞质中也

见于细胞核中^[1]。它与细胞中许多重要的功能活动有关^[1-3]。

在肌动蛋白与杆状病毒相互作用的研究中, 发现肌动蛋白与杆状病毒的侵染、复制、核衣壳的形

收稿日期: 2004-06-07, 修回日期: 2004-08-30

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973 计划) (2002CCCA02800), 国家自然科学基金资助项目 (39870039)。

作者简介: 李小青 (1977-), 男, 湖北武汉籍, 硕士, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 余泽华 (1945-), 男, 教授。Corresponding author, Tel: 027-67867226; e-mail: yuzehua@hotmail.com

成、装配等过程密切相关。Charlton 等发现 AcMNPV 感染 Sf21 细胞后, 引起细胞内肌动蛋白发生有序变化, 病毒粒子的摄取引起细胞质形成肌动蛋白缆索结构(Actin cables), 位于细胞边缘并伸向细胞质。这种肌动蛋白缆索是由从内吞体中释放出来的核衣壳及其相关蛋白引起的, 缆索的一端结合单个核衣壳^[4,5]。用细胞抽提物进行的体外结合实验也证实了核衣壳能结合 G/F-actin, 引起肌动蛋白缆索的形成^[6]。这些实验结果表明核衣壳及其相关蛋白有引起缆索形成的成分, 这种缆索结构的作用可能是推动核衣壳的向核运输。许多研究表明杆状病毒的感染能导致宿主细胞核内肌动蛋白的水平增加^[7,8], 1991 年 Charlton 等发现核内 F-actin 的形成需要病毒 DNA 的复制或某些晚期基因的表达^[4]。1993 年, Young 等发现病毒发生基质中心也有 F-actin 的存在^[9]。2002 年, Ohkawa 等鉴定出了六个引起 G-actin 核定位的早期基因, 这些基因的表达能引起核内 G-actin 的积累^[10]。这些研究表明, 肌动蛋白可能参与了杆状病毒 DNA 的复制和表达。1988 年 Volkman 用 CD (Cytochalasin D, CD) 处理 AcMNPV 感染的 Sf21 细胞后, 发现核衣壳发生了异常的装配^[7]。1998 年, Lanier 等发现在离体情况下, AcMNPV 出芽型病毒 (BV) 的核衣壳特异地结合到肌动蛋白微丝的一端, 还加速了肌动蛋白的聚合^[11]。1999 年, Ohkawa 等验证了 F-actin 对病毒核衣壳的形态发生是必需的^[12]。说明病毒粒子产生及核衣壳的装配与肌动蛋白密切相关。以上的研究主要集中于病毒侵染和感染的前期, 但在病毒感染的后期, 特别是在子代病毒粒子由细胞核向细胞质的运输以及从细胞内排出过程中, 肌动蛋白的分布及其作用还不清楚。

本实验发现随着病毒感染时间的推移, 在病毒感染的后期, 肌动蛋白由细胞核转移到了细胞质, 并在细胞膜聚集。提示肌动蛋白可能参与了子代病毒粒子由细胞核向细胞质的运输以及从细胞膜的释放过程。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒 pEGFP-C3 购自基因有限公司; 质粒 pAcEcoR1-I (含果蝇 5C-actin 全长基因) 由美国 California 大学的 Volkman 教授惠赠; 转座子载体 pFastABac1 和受体菌 *E.coli* DH10 Bac 购自于 GIBCO/BRL 公司; 大肠杆菌 DH5a 由本实验室保存; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE 克隆分离株 9 (Sf9) 细胞, 本实验室保存。

限制性内切酶 *Hind*III、*Pst* I、*Nhe* I、*Kpn* I, T4 连接酶, DNA Marker 及 PCR 扩增试剂均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Lipofectamine 2000 Reagent 转染试剂, 购自武汉原平皓生物技术有限公司; Grace's 粉剂, 胎牛血清购自 GIBCO 公司。

1.2 重组质粒 pEGFP-actin 的构建

分别合成含 *Hind*III 和 *Pst* I 酶切位点的上下游引物 P1: 5'-CCCAAGCTTATGTGTGACGAAGAAGTT-3'; P2: 5'-AACTGCAGTTAGAAGCACTTGCGGT-3', 以 pAcEcoR1-I 质粒为模板, P1 和 P2 为引物, 扩增目的片段, 酶切后连接到 pEGFP-C3 质粒上, 转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 得到阳性克隆 pEGFP-actin 经酶切及测序验证。

1.3 重组转座载体的构建

重组质粒 pEGFP-actin 和质粒 pEGFP-C3 分别经 *Nhe* I/*Kpn* I 双酶切消化, 低熔点琼脂糖凝胶回收法回收 1.8 kb 的 GFP-actin 融合基因 DNA 片段和 0.7 kb 的 GFP 基因 DNA 片段。分别连接到经 *Xba* I/*Kpn* I 双酶切消化的转座载体 pFastABac1 上, 转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 得到阳性克隆 pFastA-GFP-actin 和 pFastA-GFP, 进行酶切鉴定。

1.4 重组 Bacmid 的构建

用重组转座载体 pFastA-GFP-actin 和 pFastA-GFP 转化大肠杆菌 DH10 Bac 感受态细胞, 37 °C 150 r/min 震荡培养 6 h 后, 涂布于含 X-gal、IPTG、卡那霉素、庆大霉素和四环霉素的 LB 平板筛选白色菌落, 37 °C 培养过夜, 碱裂解法小量提取重组病毒 DNA (Bacmid)。

1.5 细胞培养与转染

Sf9 细胞为贴壁培养, 按常规方法进行传代培养。传代 24 h 后, 分别用重组有 GFP-actin 融合基因和 GFP 基因的 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞, 转染方法参照 Lipofectamine 试剂操作指南。转染 2 d 后分别收集上清, 该上清中含有重组病毒 AcMNPV-GFP-actin 和 AcMNPV-GFP, 再以病毒上清对 Sf9 细胞进行二次感染表达。

1.6 表达产物的荧光检测

用重组病毒二次感染 48 h 后, 用 Nikon 荧光显微镜对表达情况进行荧光检测。

1.7 肌动蛋白分布情况的观察

用 LEICA (TCS-SP) 共聚焦激光扫描显微镜观察肌动蛋白在细胞中的分布情况。

2 结果

2.1 重组质粒 pEGFP-actin 的酶切及序列鉴定

以 pAcEcoR1-I 质粒为模板, 扩增 actin 基因的编码区, 酶切后连接到 pEGFP-C3 质粒上, 得到阳性克隆 pEGFP-actin, 经酶切鉴定正确 (图 1)。测序分析插入序列完全正确。

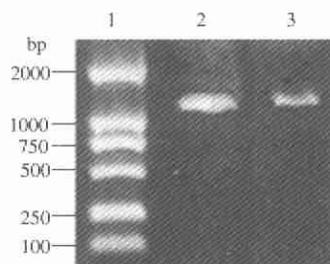


图 1 pEGFP-actin 的酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid by restrict endonucleases digestion

1, DL2000 Marker; 2, PCR product of actin; 3, pEGFP-actin by *HindIII/Pst I*

2.2 重组转座载体 pFastA-GFP-actin 和 pFastA-GFP 的构建及酶切鉴定

质粒 pEGFP-actin 和 pEGFP-C3 经 *Nhe I/Kpn I* 双酶切消化, 分别与经 *Xba I/Kpn I* 双酶切消化的 pFastABac1 连接, 得到重组转座载体 pFastA-GFP-actin 和 pFastA-GFP。经酶切鉴定正确 (图 2)。

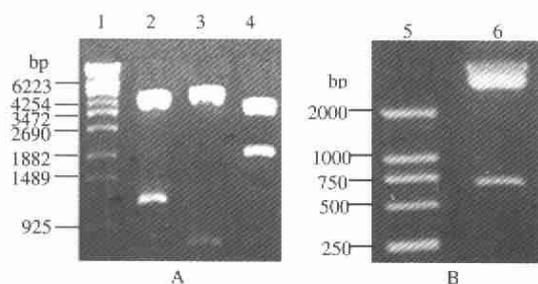


图 2 重组转座载体的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by restrict endonucleases digestion

A: pFastA-GFP-actin. B: pFastA-GFP. 1, λ -EcoT14 I marker; 2, pFastA-GFP-actin by *HindIII*; 3, pFastA-GFP-actin by *EcoR I/Sac I*; 4, pFastA-GFP-actin by *EcoR I/Kpn I*; 5, DL2000 Marker; 6, pFastA-GFP by *Nhe I/Kpn I*

2.3 重组病毒的获得

用重组转座载体 pFastA-GFP-actin 和 pFastA-GFP 转化大肠杆菌 DH10 Bac 感受态细胞。转座质粒在辅助质粒提供的转座酶的作用下发生转座, 得到重组 Bacmid。用重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞, 2 d 后分别搜集上清, 该上清中即分别含有重组病毒 AcMNPV-GFP-actin 和 AcMNPV-GFP。

2.4 荧光显微镜观察

用重组病毒 AcMNPV-GFP-actin 和 AcMNPV-

GFP 感染 Sf9 细胞。在感染后 24 h 时观察到发绿色荧光的细胞, 此时的荧光很弱, 发荧光的细胞也较少。随着时间的推移, 发荧光的细胞逐渐增多, 荧光强度不断加强。到 72 h 时 90% 以上的细胞均发出较强的绿色荧光。

2.5 肌动蛋白在病毒运输过程中的分布情况的共聚焦显微镜观察

用收集到的重组病毒 AcMNPV-GFP-actin 和 AcMNPV-GFP 感染生长状态良好的 Sf9 细胞, 由于肌动蛋白与绿色荧光蛋白共定位, 绿色荧光的分布即为肌动蛋白的分布。以 AcMNPV-GFP 感染的细胞作为对照, 分别于 24 h、36 h、48 h、72 h 取样用共聚焦激光扫描显微镜观察细胞中荧光的分布情况。AcMNPV-GFP-actin 感染细胞后 24 h, 感染的大部分细胞的细胞核内有较强的荧光分布, 而细胞质中荧光很少。对照组, 即 AcMNPV-GFP 感染的细胞中, 荧光在整个细胞中弥散分布, 细胞质和细胞核中均有荧光且强度一样。感染后 36 h, 实验组细胞中荧光在细胞核和细胞质中均有荧光分布, 且分布有一定的规律, 细胞核核膜处的荧光的强度增强, 细胞质中荧光的强度在增加, 绿色荧光逐渐向细胞膜聚集。而对照组的荧光仍然在整个细胞中弥散分布。感染后 48 h, 实验组细胞细胞核中的荧光的强度已很弱, 细胞质中的荧光强度进一步增强, 且进一步向细胞膜聚集。对照组的荧光呈弥散分布。感染后 72 h, 实验组细胞的细胞核和细胞质中已基本没有荧光分布, 这时绿色荧光几乎全部聚集于细胞膜处。对照组细胞中荧光仍然弥散分布 (见彩版 II 图 3)。

3 讨论

肌动蛋白是真核生物中普遍存在的一种高度保守的蛋白质。来自黏菌、果蝇、哺乳动物的血小板、脊椎动物的肌肉以及植物细胞的肌动蛋白, 在分子大小, 氨基酸顺序, 以及其它许多性状上都是极其相似的^[1]。本实验中所用的果蝇肌动蛋白和 Sf9 细胞的肌动蛋白的具有很高的同源性。另外, 绿色荧光蛋白作为一个优良的标记蛋白, 它不会影响与之融合的蛋白的结构、空间构象和性质^[13]。

许多研究表明肌动蛋白参与了病毒由细胞质向细胞核的运输, 在病毒的复制和核衣壳的形成过程中是必不可少的, 起着非常重要的作用。但是当子代病毒粒子形成后, 由细胞核向细胞质的运输以及从细胞内排出过程中, 肌动蛋白的分布及其作用还不清楚。

本实验以绿色荧光蛋白基因(GFP)作为标记基因, 利用 Bac-to-Bac 系统构建了两种重组病毒, 即只含 GFP 的重组 AcMNPV 和含有融合基因 GFP-actin 的重组 AcMNPV, 分别由 ph 启动子驱动在极晚期大量表达成为重组病毒 AcMNPV-GFP 和 AcMNPV-GFP-actin。用这两种重组病毒分别感染 Sf9 细胞, 以 AcMNPV-GFP 感染的 Sf9 细胞为对照, 用共聚焦激光扫描显微镜观察了病毒感染过程中, 特别是病毒感染晚期细胞中绿色荧光的分布。由于绿色荧光蛋白和肌动蛋白是以融合蛋白的形式存在的, 所以肌动蛋白和绿色荧光蛋白在细胞中共定位。通过观察发现, 随着病毒感染时间的推移, 在病毒感染的后期, 肌动蛋白由细胞核转移到了细胞质, 并在细胞膜聚集。提示肌动蛋白可能参与了子代病毒粒子由细胞核向细胞质的运输以及从细胞膜的释放过程。这一现象是在以前的研究工作中没有观察到的, 因为以前的工作大都集中于病毒感染的早期。当然, 出现这一现象也可能是以下原因引起的: 由于实验中所构建的重组病毒缺失了多角体蛋白基因, 所以重组病毒感染后不会表达多角体蛋白, 而 Volkman 等发现宿主肌动蛋白合成的关闭和多角体蛋白基因、p10 蛋白基因表达的升高在转录水平上存在明显的负相关性^[14], 超量表达肌动蛋白会使多角体蛋白的合成降低^[15]。说明肌动蛋白和多角体蛋白之间存在着相互作用。所以, 是不是因为没有多角体蛋白的表达而影响了肌动蛋白在病毒感染后期的分布, 还需要进一步的实验证实。另外, 已有研究证明在病毒感染后 20 h 左右, 多角体开始在细胞核内形成时, BV 的产量锐减甚至停止生产^[15]。本实验中所用的病毒为缺失了多角体基因的重组病毒, 在病毒感染的晚期不能产生多角体。实验中, 在病毒感染的后期, 观察到了肌动蛋白分布情况有规律的变化, 推测这种分布的有规律的变化很可能与子代病毒粒子的运输有关。

参考文献

- [1] 翟中和. 细胞生物学[M]. 高等教育出版社, 1995.
- [2] Kackar B. Direct visualization of organelle movement along actin filaments dissociated from characean algae[J]. Science, 1985, 227: 1355-1357.
- [3] Schmit A C, Lamber A M. Microinjected florescent phalloidin in vivo reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells[J]. Plant Cell, 1990, 2: 129-138.
- [4] Charlton C A, Volkman L E. Sequential rearrangement and nuclear polyemeization of actin in baculovirus-infected Spodoptera frugipeda cells[J]. Virol, 1991, 65(3): 1219-1227.
- [5] Charlton C A, Volkman L E. Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB sf21 cells induces actin cable formation[J]. Virology, 1993, 197: 245-254.
- [6] Lanier L M, Slack J M, Volkman L E. Actin binding and proteolysis by the Baculovirus AcMNPV: the role of virion associated V-CATH[J]. Virology, 1996, 216(2): 380-388.
- [7] Volkman L E. *Autographa californica* MNPV nucleocapsid assembly: inhibition by cytochalasin D. Virology, 1988, 163(2): 547-553.
- [8] Volkman L E, Talhouk S N. Nuclear F-actin: a founctional component of baculovirus-infected lepidopteran cells? [J] Cell SCI, 1992, 103: 15-22.
- [9] Young J H C, Mackinnon E A. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of Spodoptera frugiperda cells in vitro infected by *Autographa californica* nuclear polyhdrosis virus[J]. Struct Biol., 1993, 110: 141-153.
- [10] Ohkawa T, Rowe A R, Volkman L E. Identification of six *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin[J]. Virology, 2002, 76(23): 12281-12289.
- [11] Lanier L M, Volkman L E. Actin binding and nucleation by *Autographa califronica* M Nucleopolyhedro-virus[J]. Virology, 1998, 243(1): 167-177.
- [12] Ohkawa T, Volkman L E. Nuclear F-actin is required for AcMNPV Nucleocapsid Morphogenesis[J]. Virology, 1999, 264(1): 1-4.
- [13] Roger Y. Tsien. The green fluorescent protein[J]. Annu. Rev. Biochem, 1998, 67: 509-544.
- [14] Volkman L E. Hyperexpression of baculovirus polyhedrin and p10 is inversely correlated with actin synthesis[J]. Virology, 1992, 191: 42- 48.
- [15] Lee H H, Miller L K. Isolation, complementation and initial characterization of temperature-sensitive mutants of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1979, 31: 240-252.

彩 版 II

李小青, 等. 肌动蛋白在AcMNPV向细胞外运输过程中作用的初步研究 (正文见632页)

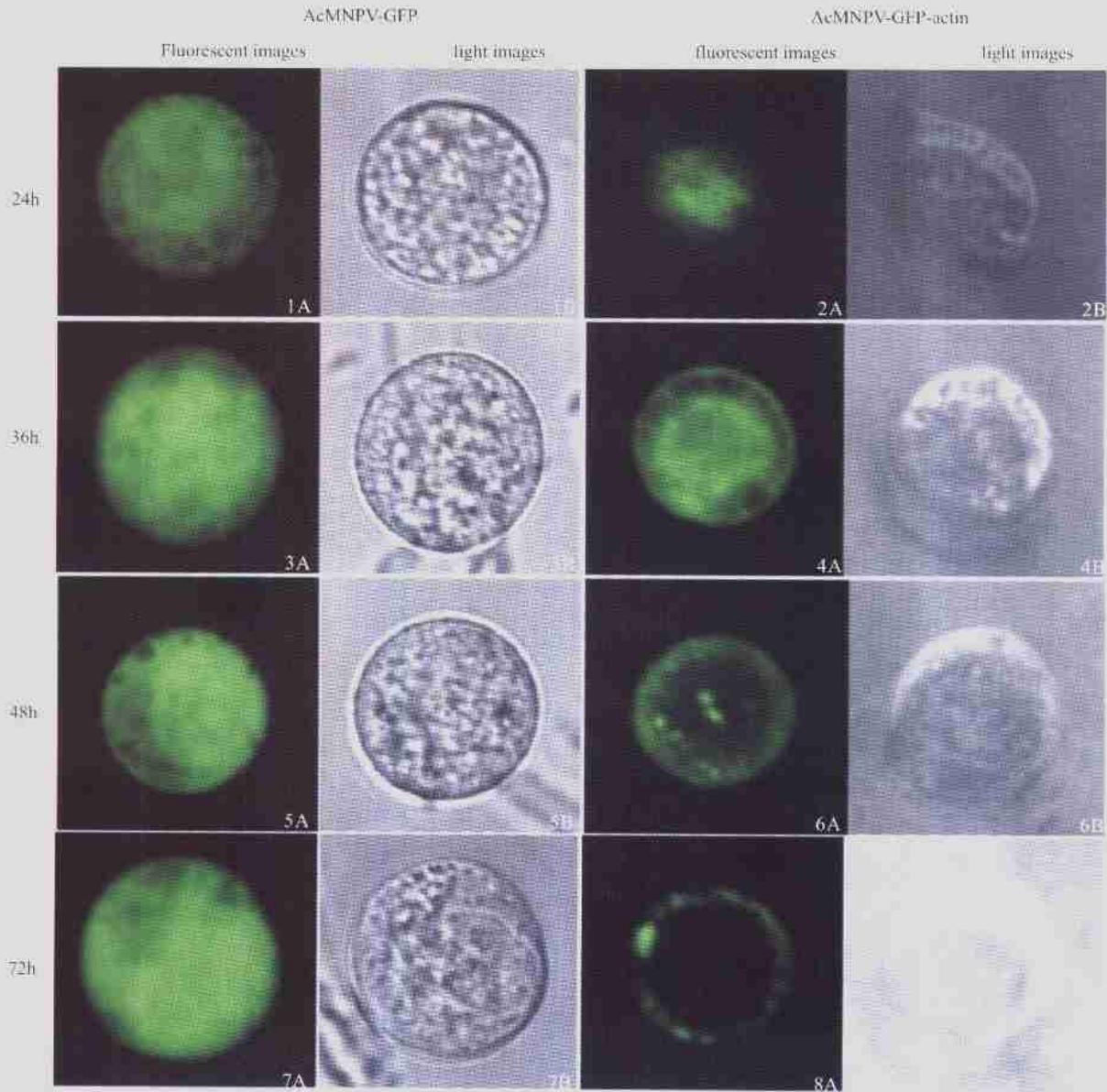


图3 AcMNPV-GFP 和 AcMNPV-GFP-actin感染Sf9细胞后的激光共聚焦荧光和光镜图

Fig.3 The distribution of fluorescence in the progress of the infection was examined under the confocal scanning light microscope