

# 杆状病毒 *SpMtMNPV* 病毒粒子中存在泛素复合物<sup>\*</sup>

李朝飞, 尹 崇, 何敏儿, 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室 // 昆虫研究所, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 通过间接免疫荧光分析, 发现在斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, *SpMtMNPV*) 感染的 *SI-zsu-1* 细胞的细胞质中存在大量的泛素或泛素复合物。Western 印迹分析表明, 在 *SpMtMNPV* 多角体源病毒粒子与芽生型病毒粒子中均存在相对分子质量为  $30 \times 10^3 \sim 65 \times 10^3$  的泛素复合物。推测 *SpMtMNPV* 在出芽或组装的过程中由感染细胞的胞质中获得泛素复合物。

**关键词:** 斜纹夜蛾核多角体病毒 *SpMtMNPV*; 泛素

**中图分类号:** Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0066-03

泛素 (ubiquitin) 是一种由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质, 广泛存在于各种真核生物的胞质和胞核中。目前所知, 泛素主要通过 ATP 依赖性的泛素—蛋白水解酶复合体通路 (Ubiquitin-proteasomes pathway, UPP) 途径高效并高度选择性地对胞质、胞核内蛋白进行完全或部分降解。此外, 泛素作为分子伴侣参与核糖体的生物发生及其它多种生理功能<sup>[1]</sup>。除了真核生物以外, 昆虫病毒是目前发现惟一编码泛素基因的病毒, 其泛素基因在 C 末端融合有 1~74 个氨基酸残基的延伸肽, 对于这种融合的意义及延伸肽的功能尚不明确。研究发现, 苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, *AcMNPV*) 的泛素蛋白以磷脂键连接于芽生型病毒的囊膜上<sup>[2]</sup>, 缺失该基因并不影响病毒的复制, 但芽生型病毒粒子的滴度明显降低<sup>[3]</sup>。

最近, 我们完成了斜纹夜蛾核多角体病毒 [*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus *SpMtMNPV*] 基因组全序列的测序<sup>[4]</sup>, 发现在该病毒基因组中存在一个泛素融合基因 Uba256。已有的研究结果表明, Uba256 在 *SpMtMNPV* 感染的 *SI-zsu-1* 细胞中加工后形成了泛素与 N 糖基化修饰的几丁质结合蛋白 GP37<sup>[5]</sup>。本文采用免疫印迹方法, 发现在 *SpMtMNPV* 病毒粒子中存在泛素复合物, 并且通过免疫荧光分析, 发现在 *SpMtMNPV* 感染的 *SI-zsu-1* 细胞的细胞质中存在大量的泛素或泛素复合物, 推测泛素参与了 *SpMtMNPV* 的出芽或组装。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

(1) 昆虫与细胞: 斜纹夜蛾幼虫由本实验室养虫室提供, 为人工饲料饲养的健康幼虫, 饲养温度为 28 °C。斜纹夜蛾细胞 (*SI-zsu-1*)<sup>[6]</sup> 培养于 TC100 培养基 (含  $\varphi=10\%$  胎牛血清);

(2) 病毒: 斜纹夜蛾核多角体病毒 (*SpMtMNPV*) G2 株由本实验室分离并保存;

(3) 主要试剂: 蛋白质相对分子质量标准购自 New England 公司; 碱性磷酸酶标记与 FITC 标记的羊抗兔第二抗体购自华美生物工程公司; 丙烯酰胺和 N,N-亚甲双丙烯酰胺为 TaKaRa 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 免疫荧光分析

*SpMtMNPV* 感染 (moi 大约为 0.01) 的 *SI-zsu-1* 细胞培养于 27 °C, 35 mm 培养皿。感染后 96 h, 细胞用  $\varphi=95\%$  乙醇于 -20 °C 固定 15 min 后参考 O'Reilly 等人的方法<sup>[7]</sup> 进行免疫荧光分析。第 1 体为免疫前血清或兔抗 *SpMtMNPV* 泛素多克隆抗体<sup>[5]</sup>, 以 1:500 倍稀释。第 2 抗体为 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 以 1:100 倍稀释。样品在荧光显微镜 (Olympus, BH-RFL-W) 下观察并拍照。

### 1.3 病毒多角体与芽生型病毒的纯化

以  $1 \times 10^8$  *SpMtMNPV* 多角体口服感染四龄斜纹夜蛾幼虫, 感染后不同时间按照王立华等的方法提取和纯化病毒多角体与芽生型病毒 (budded virus, BV)<sup>[8]</sup>。

\* 收稿日期: 2003-10-24

基金项目: 国家重点基础规划 (973) 资助项目 (G2000016209); 中山大学青年教师启动基金资助项目

作者简介: 李朝飞 (1973 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 庞义; E-mail: ls12@zsu.edu.cn

1.4 多角体源病毒粒子的分离

参考文献 [ 8 ] 进行。

1.5 病毒囊膜和核衣壳的分离

参考 Braunagel 和 Summers 的方法<sup>[9]</sup> , 将一定量提纯的 ODV 与 BV 用含  $\varphi=1.5\%$  NP40 的 TBS 悬浮, 冰上放置 30 min, 35 000 r/min, 45 min。将上清 (内含囊膜) 用大于 4 倍体积的冷丙酮洗涤, 35 000 r/min, 35 min, 吸出丙酮, 用适量 0.1×TE 溶解沉淀, -70℃保存备用; 将沉淀 (内含核衣壳) 用 0.1×TE 洗涤, 35 000 r/min, 60 min 离心后, 用适量 0.1×TE 溶解, -70℃保存备用。

1.6 SDS PAGE 与 western 印迹分析

SDS PAGE 参考文献 [ 10 ]。电泳结束后, 凝胶用考马斯亮蓝染色或进行电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜。Western 印迹分析按试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 说明操作。 *SpltMNPV* 泛素抗体以 1:500 用 1× 封闭液稀释。

2 结 果

2.1 *SpltMNPV* 病毒粒子中存在泛素复合物

为了检测泛素或泛素复合物是否存在于 *SpltMNPV* 的病毒粒子中, 以从虫体中提取的 ODV 和 BV 进行 SDS PAGE, 结果如图 1 (a, c)。由图 1 (a, c) 可以看出, ODV 和 BV 的蛋白带型具有较大的差异。其中, ODV 的蛋白条带明显少于 BV, 并且组成 ODV 的主要蛋白相对分子质量分别为  $33\times10^3$ 、 $38\times10^3$  和  $51\times10^3$ , 而组成 BV 的主要蛋白相对分子质量分别为  $70\times10^3$ 、 $43\times10^3$ 、 $40\times10^3$ 、 $31\times10^3$  和  $26\times10^3$ 。Western 印迹分析表明, 在完整的 ODV 上主要存在 3 条相对分子质量分别为  $50\times10^3$ 、 $56\times10^3$ 、和  $60\times10^3$  的杂交带, 其中  $56\times10^3$  和  $60\times10^3$  2 条杂交带分布在囊膜上, 而  $50\times10^3$  的杂交带分布在核衣壳上。此外, 在 ODV 上还还存在  $40\times10^3$  和  $43\times10^3$  2 条相对分子质量较小的杂交带, 这些蛋白带主要分布于囊膜上 (图 1b); BV 上出现的杂交带与 ODV 相似, 除了  $56\times10^3$  和  $60\times10^3$  杂交带外, BV 上还出现了  $63\times10^3$  和  $66\times10^3$  的杂交带, 其中  $56\times10^3$ 、 $60\times10^3$ 、 $66\times10^3$  3 条带主要存在于囊膜上, 而  $63\times10^3$  蛋白带则出现在核衣壳上。与 ODV 的印迹结果类似, 在 BV 上也出现了  $30\times10^3$  和  $43\times10^3$  2 条相对分子质量较小的蛋白带, 它们主要分布于核衣壳上 (图 1d)。

2.2 免疫荧光分析

分析发现模拟感染的 *Sl zsu-1* 细胞呈现很低的背景荧光 (图 2b)。以免疫前血清作为第一抗体在感染与对照细胞中均没有检测到任何荧光 (图 2c,

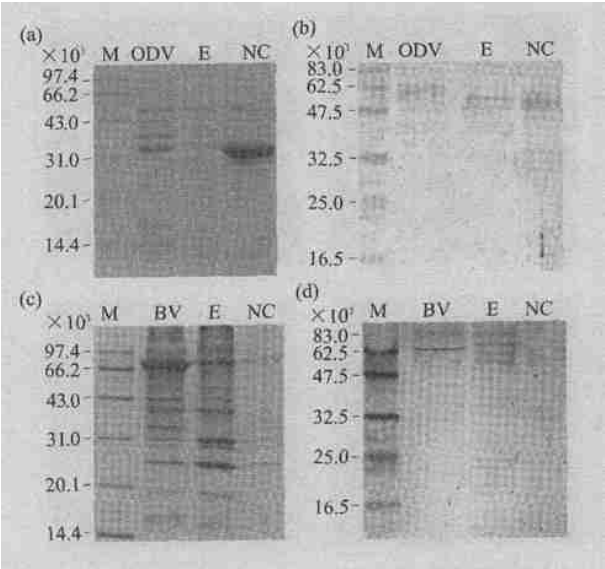


图 1 SDS-电泳与 Western 印迹分析 *SpltMNPV* 病毒粒子中的泛素复合物

Fig 1 SDS-PAGE (a, c) and Western blot (b, d) analysis of ubiquitin-conjugates in *SpltMNPV* particles

M: 蛋白质相对分子质量标准;  
ODV: 多角体源病毒粒子;  
BV: 芽生型病毒粒子; E: 囊膜; NC: 核衣壳

d)。相比较, 感染细胞用泛素抗体处理后, 在细胞质中可看到以环形或半环形分布的泛素蛋白或泛素复合物 (图 2a)。推测 *SpltMNPV* 在出芽或组装的过程中, 由细胞质中获得了泛素或泛素复合物。

3 讨 论

昆虫杆状病毒的核多角体病毒在其复制周期中具有两种类型的病毒粒子。核衣壳在细胞核内形成后, 以两种不同的方式获得包膜。有些核衣壳通过细胞质膜芽生获得包膜, 其包膜来源于细胞质膜。这一类病毒粒子通过细胞质膜芽生释放到细胞外的细胞间质, 称为芽生型病毒粒子 (budded virus, BV); 另一些核衣壳在宿主细胞核内获得包膜。这类包膜也具有脂质双分子层结构, 但其来源尚不确定。这类在细胞核获得包膜的病毒粒子最后被包埋在蛋白质结晶包涵体中, 称为多角体源性病毒粒子 (polyhedron derived virus, PDV)。Guarino 等<sup>[5]</sup>发现纯化的 AcMNPV 芽生型病毒粒子 (BV) 中含有大量游离的泛素, 进一步实验发现, 泛素通过一种新型磷脂锚连接到芽生型病毒粒子包膜的内表面。自 20 世纪 80 年代末以来, 人们先后在一些植物病毒和其他动物病毒的病毒结构中发现了泛素或泛素复合物<sup>[9]</sup>。最近, 大量的研究结果表明, RNA 病毒利用宿主细胞的泛素或泛素介导的蛋白质降解系统

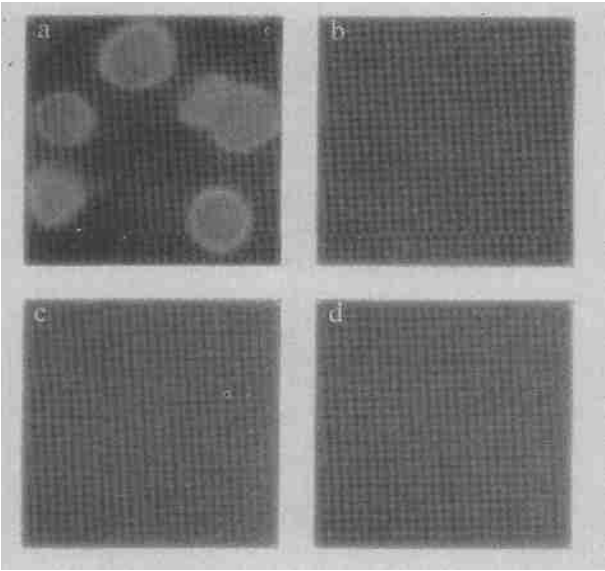


图 2 间接免疫荧光分析 *SpltMNPV* 感染细胞中的泛素蛋白

Fig. 2 Indirect immunofluorescence analysis of ubiquitin proteins in *SpltMNPV*-infected cells

- a: *SpltMNPV* 感染的 *Sl-zsu-1* 细胞用泛素抗体处理;  
b: 未感染的 *Sl-zsu-1* 细胞用泛素抗体处理;  
c: *SpltMNPV* 感染的 *Sl-zsu-1* 细胞用免疫前血清处理;  
d: 未感染的 *Sl-zsu-1* 细胞用免疫前血清处理

逃避免疫系统的监控、促进病毒复制以及进行病毒粒子的组装和释放。间接免疫荧光分析结果表明,在 *SpltMNPV* 感染细胞的细胞质中分布有大量的泛素或泛素复合物。而 Western 印迹结果表明,在 *SpltMNPV* 多角体源病毒粒子 (ODV) 与芽生型病毒粒子 (BV) 中均存在较多的泛素复合物。推测 *SpltMNPV* 在出芽或组装的过程中由细胞质中获得了泛素复合物。关于泛素如何参与 *SpltMNPV* 病毒粒子的组装等问题仍在进一步研究中。

参考文献:

[ 1 ] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system [ J ]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425—479.  
[ 2 ] GUARINO L A, SMITH G, DONG W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor [ J ]. *Cell*, 1995, 80: 301—309.  
[ 3 ] REILLY L M, GUARINO L A. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication [ J ]. *Virology*, 1996, 218: 243—247.  
[ 4 ] PANG Y, YU J, WANG L, et al. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [ J ]. *Virology*, 2001, 287: 391—404.  
[ 5 ] LI Z F, GONG Y X, YIN C, et al. Characterization of a novel ubiquitin fusion gene Uba256 from *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus [ J ]. *Gene*, 2003, 303( 1—2 ): 111—119.  
[ 6 ] 谢伟东, 曲士芮, 庞义, 等. 斜纹夜蛾细胞系的建立及其对核多角体病毒的敏感性 [ J ]. *中山大学学报( 自然科学版 )*, 1988, 4: 113—116  
[ 7 ] O' REILLY D R, MILLER L K, LUCKOW V A. *Baculovirus expression vectors-A laboratory manual* [ J ]. New York: Oxford University Press, 1992.  
[ 8 ] WANG L H, YU J X, YIN C, et al. Characterization of a J domain gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus [ J ]. *Virus Genes*, 2002, 25: 289—295.  
[ 9 ] BRAUNAGEL 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.  
[ 10 ] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [ M ]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Ubiquitin conjugates were Found in *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus Particles

LI Zhao fei, YIN Chong, HE Min er, PANG Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol //School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Insect viruses are the only viruses known to encode ubiquitin. Indirect immunofluorescence analysis indicated that ubiquitin or ubiquitin conjugates were distributed in the cytoplasm of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (*SpltMNPV*) infected *Sl-zsu-1* cells. Western blot analysis revealed that 3 000 ~ 6 5000 ubiquitin conjugates were located in *SpltMNPV* ODV and BV, respectively. It was proposed that the ubiquitin conjugates in *SpltMNPV* structure were obtained in the process of virus budding or assembly.

**Key words:** *SpltMNPV*; ubiquitin