·论 著·

稳定过表达 p50 基因细胞株的构建及鉴定

陈 炜[1],高 娜[2],王嘉丽[1],张俊磊[1],田衍平[2],安 静[3] (1.第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;2.第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆 400038;3.首都医科大学基础医学院微生物学教研室,北京 100069)

[摘 要] **目的** 筛选出稳定过表达 p50 基因的细胞克隆株 ECV-p50,为研究 dynei-n-dynactin 复合体在登革病毒逆行性运输中的作用奠定基础。**方法** 将构建的 pRe-p50 质粒稳定转染至 ECV304 细胞,通过间接免疫荧光染色和免疫印迹实验进行鉴定。**结果** 经间接免疫荧光染色和免疫印迹实验验证,稳定过表达 p50 基因的细胞克隆株命名为 ECV-p50。**结论** 成功建立了稳定过表达 p50 基因的细胞克隆株 ECV-p50,为后续研究积累了有价值的实验资料。

[关键词] 病毒;微管骨架;逆行性运输;过表达;p50

[中图分类号] R373.33 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)02-0078-03

Construction and appreciation of p50 gene cells stable overexpression

CHEN Wei, GAO Na, WANG Jia-li, ZHANG Jun-lei, TIAN Yan-ping, AN Jing (Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct stable p50 gene overexpression cells for studying the role of dynein-dynactin in the retrograde transport of Dengue virus. **Methods** ECV304 cells were stable transfected by pRe-p50. Then the stable p50 gene overexpression cells were confirmed by western blot and indirect immunofluorescence assay. **Results** The stable p50 gene overexpression cells were selected and identified, named ECV-p50. **Conclusion** The stable p50 gene overexpression cells have been constructed successful, which lays a base for further study on roles of p50 in virus infection.

Keywords: virus; microtubules; retrograde transport; overexpression; p50

病毒感染宿主细胞必须经过吸附到宿主细胞表面、穿入细胞质或内含体、脱壳、早期病毒蛋白合成、基因组复制、晚期病毒蛋白合成、病毒组装/成熟、释放几个步骤,这实际上是一个病毒与宿主细胞相互作用的过程。为了有效地感染宿主细胞,病毒必须进入宿主细胞,到达细胞内的特定区域才能启动并完成自我复制。目前研究证实,病毒主要利用宿主细胞骨架系统或膜运输系统完成其在细胞内的移行。细胞骨架系统由微丝、微管、中间纤维及其摩托蛋白(motor protein)组成。当病毒利用微管骨架完成其在细胞内的移行时,运输的动力则来自两类摩托蛋白:胞质动力蛋白(cytoplasmic dynein)和驱动蛋白(kinesin)。它们分别介导病毒和病毒蛋白从细胞周边向细胞核方向的逆行性运输,以及从细胞中心向细胞周边区域的顺行性运输[1]。研究显示,多数情况下胞质动力蛋白需要有dynactin 复合体的辅助,二者相连形成的 dynein-dynactin 复合体在逆行性运输过程中起了关键作用[2]。dynactin 复合体至少由 9 种蛋白组成,包括 Arp1、p50、actin-capping protein 等[3],有文献报道过量表达 p50 将会使 dynein-dynactin 复合体的功能受到影响,进而影响到病毒的逆行性运输。登革病毒是否也利用微管骨架在 dynein-dynactin 复合体指导下完成逆行性运输,目前尚未见文献报道。为了研究 dynein-dynactin 复合体在登革病毒逆行性运输中的作用,本研究将构建的真核表达质粒 pRe-p50 稳定转染至 ECV304 细胞后,经筛选得到细胞克隆株,为进一步的实验研究奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和主要试剂

ECV304 细胞、真核表达质粒 pReceiver-M01a 和 pRe-p50 由本室保存,转染采用美国 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂,小鼠抗 p50 单克隆抗体购自 BD 公司,羊抗小鼠 IgG-FITC、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体和 G418 购自美国 Sig-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471552)

[作者简介] 陈 炜(1977-),女,上海市人,实验师,博士,主要从事登革病毒致病机理的研究。电话:(023)68752239

[通讯作者] 安静,E-mail:anjing.2006@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2008-12-08 [修回日期] 2009-01-25

ma 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司。

1.2 稳定过表达 p50 基因细胞株的建立

ECV304 细胞用含 10% 新生小牛血清(fatal calf serum, FCS)的 DMEM 培养基于 37 ℃,5% CO_2 孵箱内培养。转染前 1 d,将对数生长期的 ECV304 细胞以 2×10^3 个/孔接种 96 孔细胞培养板,于 24 h 以内、细胞融合达 80% ~90% 时将 pReceiver-M01a 与 pRe-dyn 质粒转染细胞,pReceiver-M01a 作为对照(根据说明书步骤操作)。将 96 孔细胞培养板的 1 孔细胞传代至 6 孔细胞培养板的 2 孔,稀释约 150 倍,操作时注意避免胰酶过分消化细胞,吹打细胞应轻柔,每孔中加入 2 mL 含 10% FCS 的 DMEM,37 ℃孵育 48 h,以使细胞表达足够量的抗性酶。以含 1 mg/mL G418 和 10% FCS 的 DMEM 2 mL 替换 6 孔细胞培养板中的培养液,进行筛选,时间约为 1 周,其间以含 G418 的培养基换液一次。待镜下观察到有成团的单个细胞克隆生长后,胰酶局部消化,将每个单克隆细胞分别转入 24 孔细胞培养板培养,仍保持 G418 筛选压力,但 G418 浓度降为 0.5 mg/mL。细胞长至 70% ~80% 融合时,传代细胞扩大培养,G418 浓度保持 0.5 mg/mL。得到的稳定表达 pReceiver-M01a 与 pRe-p50 质粒的 ECV304 细胞株,分别命名为 ECV-pRe 和 ECV-p50。

1.3 间接免疫荧光染色

将盖玻片置于 6 孔板中,将 ECV304、ECV-pRe 和 ECV-p50 细胞悬液(2×10^5 个/孔)接种于 6 孔培养板中的盖玻片上,37 ℃,5% CO_2 孵育 18 ~24 h。取出细胞爬片,PBS 漂洗 2 ~3 遍,4% 多聚甲醛室温固定 20 min。PBS 漂洗后,0.2% Triton X-100/PBS 室温通透 5 min。PBS 漂洗后,加 1% BSA/PBS 室温对非特异性位点封闭 1 h 后加小鼠抗 p50 单克隆抗体,4 ℃孵育过夜。PBS 漂洗 3 ~5 遍,加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,室温孵育 1 h,漂洗、干燥后 40% 甘油封片,荧光显微镜下观察,并拍照。

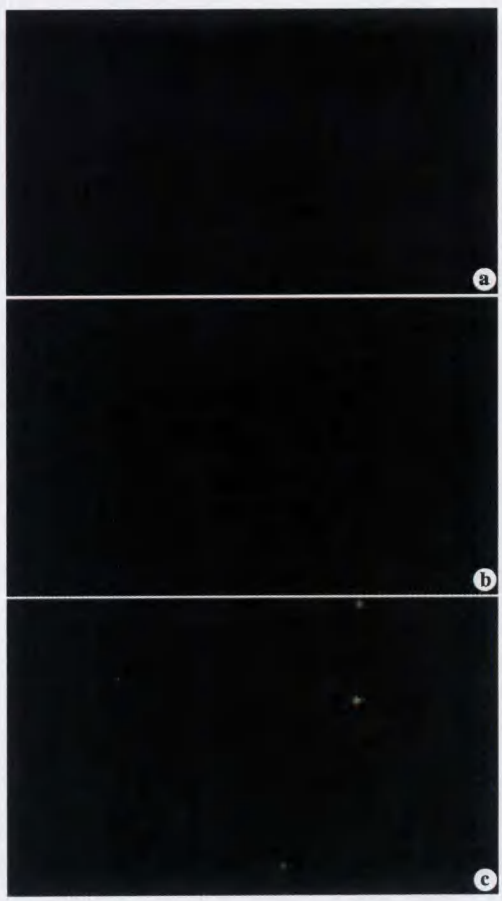
1.4 免疫印迹

将 ECV304、ECV-pRe 和 ECV-p50 细胞悬液(2×10^5 个/孔)接种于 6 孔培养板中,37 ℃,5% CO_2 孵育 18 ~24 h。PBS 洗涤 1 次,加入 2 × SDS 上样缓冲液 50 μL,使用细胞刮子将细胞从 6 孔细胞培养板底部剥离,吸入 1.5 mL 离心管中,沸水浴 5 min,取 15 μL 上样电泳,配制 10% 分离胶,5% 积层胶,行 SDS-PAGE。电泳结束后,采用半干转印仪,以 15 V 恒压转印 30 min,将凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上。NC 膜以含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 室温封闭 2 h;参照蛋白 Marker 的位置,将 p50 和 β-actin 所在部分的 NC 膜剪开,分别与 p50 鼠单抗(工作浓度为 1∶250)、鼠抗 β-actin 单抗(工作浓度为 1∶2 000)4 ℃反应过夜;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度为 1∶1 000)室温反应 1 h;以缓冲液 TTBS 洗涤膜 3 次,每次 10 min。将膜放入显色底物溶液,DAB 显色 10 ~30 min,用 ddH_2O 洗膜,终止反应,观察并拍照。

2 结果

2.1 免疫荧光染色

经筛选得到的 p50 过表达的单克隆 ECV304 细胞株(ECV-p50)、空质粒对照细胞株(ECV-pRe)及 ECV304 细胞进行了间接免疫荧光染色,结果显示,与对照 ECV-pRe 和 ECV304 相比,ECV-p50 细胞内的特异性荧光明显增强(图 1)。

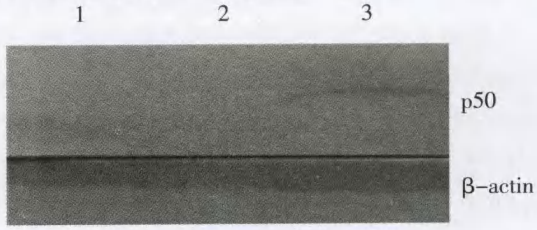


a:ECV;b:ECV-pRe;c:ECV-p50

图 1 免疫荧光染色显示 p50 表达上调(×400)

2.2 免疫印迹

将 ECV-p50、ECV-pRe 及 ECV304 细胞进行了免疫印迹,结果显示,与对照 ECV-pRe 和 ECV304 相比,ECV-p50 细胞中的 p50 蛋白的含量明显增加(图 2)。



1:ECV304;2:ECV-pRe;3:ECV-p50

图 2 免疫印迹检测 p50 表达上调

3 讨论

病毒具有严格的细胞寄生性,病毒感染宿主细胞,

必须经过吸附、穿入/脱壳、大分子生物合成及组装、释放这样一个完整的复制周期。已知真核细胞中充满的细胞器和由微丝、微管、中间纤维组成的细胞骨架，限制分子量大于500 kD分子的自由扩散，若不借助细胞的运输体系，病毒颗粒难于通过粘滞的、半流体的细胞质到达特定目的地。因此只有在宿主细胞内某种运输体系的参与下，病毒运动才能保持一定的目的性和方向性。大量实验证明，病毒颗粒的分布与微管骨架关系密切，病毒利用微管骨架完成其在细胞内的移行。

微管(microtubule, MT)广泛存在于各种真核细胞中，与维持细胞形态、细胞运动、细胞分裂有关。微管以靠近核周的微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)为"－"端，向外周呈辐射状分布。研究表明，微管与病毒和病毒蛋白的胞内运输有关[4-6]，为运输物质提供轨道并对运输方向具有指导作用，而运输的动力则来自作为摩托蛋白的胞质动力蛋白和驱动蛋白。胞质动力蛋白由2条重链、2条中等链、2条轻中等链和数目可变的轻链组成，ATP和微管结合区域位于重链，而运输货物的特异性与中等链和轻链有关。胞质动力蛋白介导从细胞周边向细胞中心的逆行性运输，驱动蛋白介导从细胞中心向细胞周边区域的顺行性运输。近年来，大量研究显示胞质动力蛋白需要有Dynactin复合体的辅助，dynein的中等链与dynactin相结合，形成dynein-dynactin复合体，在逆行性运输过程中发挥关键作用。dynactin复合体至少由9种蛋白组成，p50是dynactin复合体中含量居第2位的亚组分，过量表达p50使dynein-dynactin复合体的功能受到影响，进而影响到病毒的逆行性运输。Suikkanen等[7]的实验显示，过量表达p50使dynein-dynactin复合体的功能受到影响，使大量的病毒颗粒不能运输到微管组织中心区域而弥散在细胞质中。Aspasia Ploubidonz等[8]在痘苗病毒的研究中亦得到了类似的结果。

登革病毒(dengue viruses, DV)是黄病毒属(Flavivirus)的单股正链RNA病毒，引起人类登革热(classical dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合征(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, DHF/DSS)[9-11]。目前，关于登革病毒与靶细胞相互作用的分子机制尚不十分清楚，登革病毒是否也利用微管骨架在dynein-dynactin复合体指导下完成逆行性运输，尚未见文献报道。因而，为了研究dynein-dynactin复合体在登革病毒逆行性运输中的作用，本研究将构建的真核表达质粒pRe-p50稳定转染至ECV304细胞后，经筛选得到细胞克隆株，通过间接免疫荧光法和免疫印迹检测，结果显示稳定表达细胞株中的p50蛋白表达明显上调。由此可见，本实验成功构建了稳定过表达p50基因的细胞株ECV-p50，为进一步的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Chen W, Gao N, Wang JL, et al. Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process [J]. Arch Virol, 2008, 153(9):1777－1781.

[2] Hamm-Alvarez SF, Sheetz MP. Microtubule-dependent vesicle transport: modulation of channel and transporter activity in liver and kidney [J]. Physiol Rev. 1998, 78(4):1109－1129.

[3] Dohner K, Wolfstein A, Prank U, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport[J]. Mol Bio Cell, 2002, 13(8):2795－2809.

[4] Sanjuan N, Porras A, Otero J. Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus[J]. Virology, 2003, 313(1): 105－116.

[5] Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of Incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus[J]. J Cell Biol, 1997, 136(5):1007－1021.

[6] 陈 炜,王嘉丽,彭 涛,等. 微管骨架在登革病毒感染ECV304细胞中作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(7):628－631.

[7] Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, et al. Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus[J]. J Virol, 2003, 77(19):10270－10279.

[8] Ploubidou A, Moreau V, Ashman K, et al. Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function[J]. EMBO J, 2000, 19(15):3932－3944.

[9] McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology[J]. Microbes Infect, 2000, 2(9):1041－1050.

[10] Zhang JL, Wang JL, Gao N, et al. Up-regulated expression of beta3 integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(3):763－768.

[11] 冯嘉瑜,张艮甫. 器官移植中的基因治疗[J]. 局解手术学杂志, 2004,13(2):124－125.

(编辑:雷 艳)