

[研究快报]

一种脊髓灰质炎病毒侵染过程的 实时动态研究新方法

王平翠, 谢海燕, 周希焯, 王 洋
(北京理工大学生命科学院, 北京 100081)

关键词 量子点; 病毒; 侵染; 实时; 动态

中图分类号 O657; Q2-33

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)04-0629-03

掌握病毒侵染宿主过程中关键事件的信息对于了解病毒的致病机理及病毒病的防治至关重要. 脊髓灰质炎病毒(Poliomyelitis virus, PV)是研究动物非囊膜病毒的模式病毒之一. 关于它的侵染机制一直存在争论, 早期的研究结果^[1-5]认为, PV 通过网格蛋白介导的胞饮作用入胞, 脱壳则依赖于早期溶酶体的酸化作用. 但后人^[6-8]却对它入胞是否需要溶酶体酸化作用以及是否是网格蛋白依赖的胞饮途径等提出了质疑. 有人^[8]甚至认为并不需要完整病毒跨膜转运, 其脱壳过程或许发生在细胞表面. 2007年, Brandenburg等^[9]通过单分子检测技术研究了PV侵染Hela细胞的机制, 结果发现, PV以完整病毒的形式快速进入细胞, RNA在胞内靠近细胞质膜的小泡内释放, 病毒进入和RNA释放是一个能量、肌动蛋白和酪氨酸激酶依赖的过程, 但并不依赖于网格蛋白、小窝蛋白或微管. 同年, Coyne等^[10]研究了PV进入人脑微血管内皮细胞(HBMECs)的过程, 发现病毒也是在进胞后脱壳的, 但病毒入胞是通过病毒受体诱导的信号激活的小窝蛋白依赖的胞饮作用. 上述结果表明, PV进入细胞的机制仍然很不明确. 目前, 利用单分子、单细胞检测技术可以从单颗粒病毒水平获取侵染过程的信息, 能够更本质、更直观地研究病毒的侵染机制及致病机理. 而量子点(QDs)稳定的荧光性质为这一检测技术的发展提供了新的契机^[11]. 本文将转盘式共聚焦活细胞成像系统和QDs结合, 实现了QDs对PV的标记, 建立了一种可用于研究病毒侵染细胞及其运动特征的长时间实时动态成像新方法. 对PV侵染Vero细胞过程的研究结果表明, PV以完整的颗粒形式进入细胞的过程是一个肌动蛋白依赖的快速过程, 病毒入胞后集中在细胞膜的内侧周边.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 Vero细胞与脊髓灰质炎病毒(Sabin1型)由中国科学院武汉病毒所崔宗强老师友情提供; DMEM培养基及胎牛血清(Gibco公司, 美国); 生物素修饰磺酸化N-羧基琥珀酰亚胺酯(Sufo-NHS-LC-Biotin, Pierce公司, 美国); 辣根酶链霉素亲和素(北京中杉金桥生物技术有限公司); 量子点标记的链霉素亲和素-605(QDs-SA, 武汉珈源量子点技术开发有限公司); 细胞松弛素D(CytoD, Sigma公司, 美国).

Thermoforma 3111型CO₂恒温培养箱(Thermo公司); XL-100K型超高速离心机(Beckman公司); TECNAI G2型透射电镜(FEI公司); 凝胶电泳仪(Bio-RAD公司), 转盘式激光扫描共聚焦显微成像系统(Andor Revolution XD, 英国; Olympus 1×81, 日本).

1.2 实验过程 (1) 脊髓灰质炎病毒生物素化修饰. 通过Vero细胞在33℃条件下大量增殖病毒, 利

收稿日期: 2009-12-28.

基金项目: 国家“九七三”计划项目(批准号: 2006CB933100)、国家自然科学基金(批准号: 20975013)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(批准号: NCET-08-0046)、卫生部科技重大专项(批准号: 2009ZX10004-107)和北京理工大学优秀青年教师资助计划择优二次资助基金(批准号: 2007YS0603)资助.

联系人简介: 谢海燕, 女, 博士, 副教授, 主要从事生物医学分析与传感研究. E-mail: hyanxie@bit.edu.cn

用蔗糖密度梯度离心法(梯度为 30%, 25%, 20% 和 15%) 进行纯化, 以 1 mg/500 μ L 病毒液(滴度 $10^7 \sim 10^8$ 个 TCID₅₀/mL) 的比例称取适量 Sulfo-NHS-LC-Biotin, 混匀, 室温振荡孵育 1 h; 50 K 超滤管反复超滤 3 次除去多余生物素, 用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法对生物素化结果进行检测。

(2) 量子点标记生物素化病毒. 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 先将生物素化后的病毒与 Vero 细胞孵育 15 min, 用牛血清白蛋白进行封闭后, 加入 10 nmol/L QDs-SA 孵育 30 min, PBS 洗去未结合的 QDs-SA; 同时设置对照实验组。

(3) 脊髓灰质炎病毒进胞过程观察. 于 4 $^{\circ}$ C 孵育实现对病毒的标记后, 转至带有 CO₂ 细胞孵育器的共聚焦系统上进行成像. 激发/发射波长: 561 nm/617 nm; Cyto D 对病毒进胞过程影响的实验方法: 在生物素化病毒与细胞孵育前用 1 mL Cyto D 稀释液处理细胞 1 h, 其它步骤相同。

2 结果与讨论

2.1 脊髓灰质炎病毒的修饰 通过生物素中的羧基与病毒衣壳蛋白中氨基的偶联作用对病毒进行修饰, 得到生物素化的脊髓灰质炎病毒(Bio-PV). 从图 1 中的 SDS-PAGE 电泳以及 Western blotting 表征结果可以看出, 生物素化处理后的病毒蛋白条带的分子量比未经处理的蛋白条带的分子量明显增加. 而且经辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育并显色后有明显的条带, 说明病毒的生物素化修饰是成功的. 对同一批纯化病毒样品在经生物素化处理前后分别进行滴度检测的结果显示, 生物素化处理对病毒样品滴度的影响很小, 修饰后病毒液的 TCID₅₀ 法滴度在 $10^6 \sim 10^8$ 个 TCID₅₀/mL 之间, 可满足下一步研究需要。

2.2 量子点标记脊髓灰质炎病毒 细胞在不同温度下对量子点探针的内吞作用已有报道^[12], 本文利用细胞在不同条件下生命活动能力不同的差异实现量子点对病毒的标记. 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 细胞生命活动受到抑制, 病毒与细胞相互作用时仅吸附到细胞表面但不能入胞. 在此温度下, 先将 Bio-PV 与 Vero 细胞孵育, 然后加入 QDs-SA. 通过生物素-链霉亲和素的亲和作用, 实现 QDs 对吸附在 Vero 细胞表面病毒的标记。

由图 2 结果可见, Vero 细胞依次与 Bio-PV 和 QDs-SA 孵育后能检测到明显的荧光, 而其它两组对照实验中均无荧光信号, 说明这种 4 $^{\circ}$ C 孵育的方法能够实现 QDs-SA 对吸附到 Vero 细胞表面的 Bio-PV 的标记, 形成 QDs-SA-Bio-PV 复合结构, QDs-SA 不会与未经生物素化修饰的病毒发生非特异性吸附, 也没有与 Vero 细胞发生明显的非特异性吸附. 对图 2(A₁) 细胞样品进行 Z 轴扫描成像的结果表明, 被标记的 PV 依然吸附在 Vero 细胞的表面而未进入细胞内. 由于亲和素对病毒衣壳蛋白的修饰是基于蛋白分子中存在的氨基基团, 因此此病毒标记适用于所有具有衣壳或囊膜结构的病毒, 而且方法简单, 快捷, 标记效率高。

2.3 脊髓灰质炎病毒进胞过程的动态成像 将 4 $^{\circ}$ C 低温状态的细胞转移到 37 $^{\circ}$ C 环境中, 细胞的正常生命活动将逐渐恢复. 我们通过具有最小光漂白和光毒性的转盘式共聚焦活细胞成像系统对被标

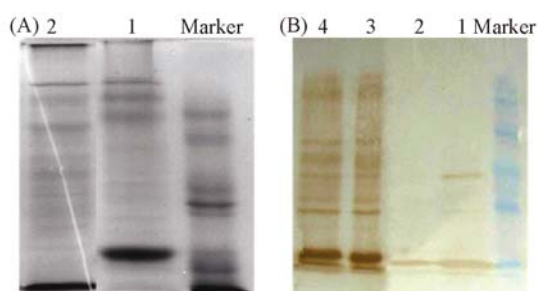


Fig. 1 SDS-PAGE(A) and Western blotting(B) results of the poliovirus capsid protein

(A)-2, (B)-1, (B)-2: Not modified with biotin;
(A)-1, (B)-3, (B)-4: modified with biotin.

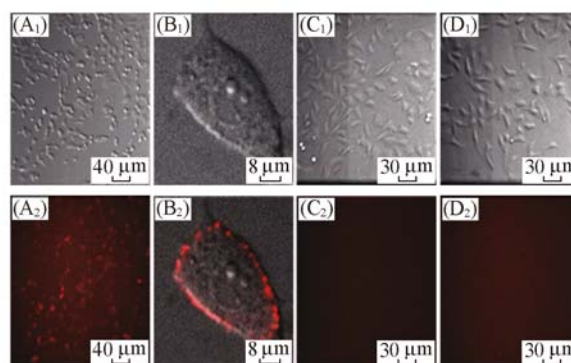


Fig. 2 Fluorescence images of the poliovirus labeled with quantum dots at 4 $^{\circ}$ C

(A₁), (A₂) Vero cells were incubated with Bio-PV first, then with QDs-SA; (B₁), (B₂) DIC and merger of single cell in (A₁) and (A₂); (C₁), (C₂) Vero cells were incubated with PV first, then with QDs-SA; (D₁), (D₂) Vero cells were incubated with QDs-SA. $\lambda_{ex} = 561$ nm; $\lambda_{em} = 617$ nm; exposure time: 100 ms; binning: 1 \times 1; gain: 40.

记的 PV 从 Vero 细胞表面进入胞内的过程进行了实时动态示踪(图 3). 结果显示, PV 进入 Vero 细胞是一个快速过程, 约 5 min 后就有很多 PV 进入细胞, 20 min 后几乎全部进入, 胞外基本检测不到标记病毒的荧光信号. 但进胞后的 PV 在近 1 h 内基本都集中在细胞膜的内侧周边, 而没有向细胞质扩散. 将 Vero 细胞用肌动蛋白解聚剂 Cyto D 处理, 在 4 °C 时病毒仍能吸附到细胞表面, 但在 37 °C 下, 病毒与细胞作用 1 h 后仍然不能进胞, 表明 PV 进入细胞的过程对肌动蛋白具有依赖性. 这些结果均与 Brandenburg 等^[9]研究的 PV 进入 Hela 细胞的行为一致. 对照实验结果表明, QDs-SA 既不能结合到未吸附 PV 的 Vero 细胞表面, 又不能进入到 Vero 细胞内. 因此, 图 3 中追踪到的进胞过程确实是由 PV 的侵染所致. 量子点的荧光非常稳定, 连续激发 1 h 未发生光漂白, 这正是量子点标记技术的优势, 也是普通有机染料所无法实现的, 而转盘式共聚焦成像系统可以长时间保持细胞处于正常的生命活动状态, 这为长时间连续示踪病毒的运动过程和研究病毒侵染过程的动态机制奠定了基础.

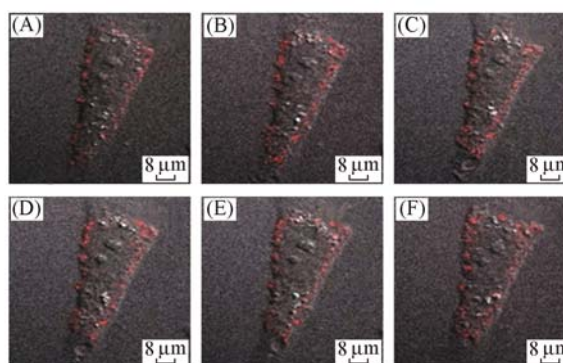


Fig. 3 Dynamic fluorescence imaging of the infection process of the labeled poliovirus

(A)–(F) t/min : 0, 5, 10, 15, 20, 30. $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$; exposure time: 100 ms; binning: 1×1 ; gain: 40.

参 考 文 献

- [1] Zeichhardt H. , Otto M. J. , McKinlay M. A. , *et al.* . Virol. [J] , 1987 , **160**(1) : 281—285
- [2] Zeichhardt H. , Wetz K. , Willingmann P. , *et al.* . Gen Virol. [J] , 1985 , **66**(Part 3) : 483—492
- [3] Madhus I. H. , Olsnes S. , Sandvig K. . EMBO[J] , 1984 , **3**(9) : 1945—1950
- [4] Madhus I. H. , Tonnessen T. I. , Olsnes S. , *et al.* . Cell Phy. [J] , 1987 , **131**(1) : 6—13
- [5] Gromeier M. , Wetz K. . Virol. [J] , 1990 , **64**(8) : 3590—3597
- [6] Perez L. , Carrasco L. . Virol. [J] , 1993 , **67**(8) : 4543—4548
- [7] DeTulleo L. , Kirchhausen T. . EMBO[J] , 1998 , **17**(16) : 4585—4593
- [8] Irurzun A. , Carrasco L. . Biochemistry[J] , 2001 , **40**(12) : 3589—3600
- [9] Boerries B. , Lee L. Y. . PLoS Biol. [J] , 2007 , **5**(7) : 1543—1555
- [10] Coyne C. B. , Kim K. S. Bergelson J. M. . EMBO[J] , 2007 , **26**(17) : 4016—4028
- [11] WANG Yang(王洋) , DENG Yu-Lin(邓玉林) , QING Hong(庆宏) , *et al.* . Chem J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2008 , **29**(4) : 661—668
- [12] Wang H. Q. , Zhang H. L. , Li X. Q. , *et al.* . Biomed. Mater. Res. Part A[J] , 2008 , **86A**(3) : 833—840

New Method for Dynamic Visualization of Poliomyelitis Virus Infection Process

WANG Ping-Cui , XIE Hai-Yan* , ZHOU Xi-Ye , WANG Yang
(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract The propagative polioviruses were modified with biotin firstly and then labeled with quantum dots through biotin-streptavidin system. On the basis of the strong fluorescence intensity and high photostability of quantum dots, a new method for long-term tracking of single-viruses was established with a live-cell confocal microscope imaging system. The results of the real-time dynamic imaging of QDs-labeled poliovirus showed that the entry process of QDs-labeled poliovirus was rapid and actin-dependent. The method is simple and versatile. It can be applied to the study of infectious mechanism of all kinds of enveloped viruses.

Keywords Quantum dots; Virus; Infection; Real time; Dynamic

(Ed. : A, G)