

小鼠腹水瘤病毒 (SRSV) 及其核糖核 酸的纯化和某些性质的研究

单易非 纪宏 吴正泉 吕妹珍 郑葆芬

(上海医科大学生物物理教研室, 上海)

程立 孔宪寿

(上海医科大学病理生理教研室, 上海)

提 要

从感染 NIH 3 T 3 小鼠成纤维细胞上清液中分离小鼠腹水瘤病毒, 用蔗糖密度梯度离心法纯化。从新鲜病毒中取小鼠腹水瘤病毒 RNA, 并用酚-氯仿抽提和蔗糖梯度分离。各组分的沉降系数 (S) 和分子量通过超速离心凝胶电泳分析测定。SRSV RNA 主要由两组分组成, 一是沉降系数约 60~70 S (热处理后约 35S), 还有少量 18 S 和 28 S, 另一是 4~5 S。35S 组分在体外能指导无细胞蛋白的合成。

关键词: 沉降系数 Hind III 内切酶切入 DNA 片段 XC 合体细胞 蔗糖密度梯度离心 兔网织红细胞溶胞产物

肿瘤病毒 RNA 的纯化和理化性质的研究有助于了解肿瘤病毒的复制、病毒的感染以及为细胞转化的影响, 同时也是病毒基因组结构和基因表达研究的需要。一些 RNA 致癌病毒的 RNAs, 例如禽类骨髓母细胞瘤病毒 RNA (AMY RNA)^[1]、小鼠劳斯肉瘤病毒 RNA (RSV RNA)^[2]、施密特-鲁宾病毒 RNA (Schmidt-Ruppin virus RNA)^[3]、鼠白血病病毒 RNA (MLV RNA)^[4] 等已经分离纯化。李氏等曾从小鼠腹水瘤腹水中分离病毒 RNA^[5]。本文从小鼠腹水瘤病毒感染的 NIH 3 T 3 细胞培养液中分离腹水瘤病毒, 进行病毒 RNA 纯化, 并对病毒 RNA 的某些理化和生物学性质作了研究。

材料和方法

一、材料:

1. RPI 1640 培养基: 美国 Life Technologies 公司产品。
2. L-谷氨酰胺: 上海第二军医大学药理学系合成药物研究所产品。
3. N-2-羟基哌嗪-N-2-乙磺酸 (Hepes): Merk 公司产品。
4. 蔗糖: Sigma 化学公司产品。

本文于 1988 年 6 月 8 日收到

本课题由国家自然科学基金委员会资助。

本研究工作得到美国加州大学 Hong Fang 教授的指导和本校离心机室曹式芳副教授的帮助, 在此一并致谢!

5. 酵母 4S 转移核糖核酸 (tRNA) 和酵母 28S 核蛋白体核糖核酸 (rRNA): 由上海中科院生物化学研究所提供。
6. Hind III 内切入 DNA 片段 (Hind III digested DNA fragments): 新英国生物实验公司产品。
7. 蛋白酶 K: Merk 公司产品。
8. 盐酸苯胍: 上海试剂三厂产品。
9. ^3H -亮氨酸: 上海原子核研究所产品。
10. 磷酸肌酸钠盐和肌酸激酶 (兔肌): 上海中科院生物化学研究所产品。
11. 小鼠腹水瘤病毒感染的 NIH3T3 细胞株和 XC 细胞株: 由我校病理生理教研室提供。

二、方法:

1. 病毒感染细胞的培养

SRSV 感染的 NIN 3 T 3 细胞, 在含 10% 热灭活的小牛血清的 RPI 1640 培养液中, 并加谷酰胺 (20mmol/L) 和 HEPES (100 μ /ml), 37°C 5% CO₂/空气中生长, 间隔 24 小时收集培养液, 合并 4°C 保存。

2. 病毒的纯化

SRSV 的纯化按 Kerr 法^[6]略加修改。所收集的含病毒的 NIH 3 T 3 细胞培养液, 1500g, 10 分 4°C 离心除去细胞碎片, 上清液以 100000g 离心 1 小时收集病毒, 悬浮于 0.01mol/L Tris (pH 7.5) 中, 1 ml 病毒悬液铺于 25~45% (w/w) 蔗糖梯度上, 35000r/m 离心 15 小时, 病毒沉降于密度 1.15~1.16g/cm³ (~35%), 吸取病毒带, 用 1 体积 0.01mol/L Tris 稀释, 100000g 离心 1 小时, 病毒沉淀再悬浮于 0.01mol/L Tris 中。

3. 病毒 RNA 的制备

经超速离心浓缩的病毒悬液加 SDS 至终浓度 1%, 蛋白酶 K 至 100 μ g/ml, NaCl 至 0.1mol/L。37°C 保温 1 小时, 用 2 体积氯仿-酚 (含 1% 异戊醇) 抽提 2 次, 再用 2 体积氯仿-异戊醇抽提 2 次, 置 2 体积乙醇中于 -30°C 过夜。15000r/m 离心 15 分钟使 RNA 沉淀, 沉淀悬浮于缓冲液中, 100°C 加热 1 分钟, 冷却后铺于 15~30% (w/w) 蔗糖梯度 (含 0.1% SDS) 上, 35000r/m, 25°C 离心 4 小时, 以每份 0.5ml 收集梯度组分, 测波长 260nm 的吸光率 (A₂₆₀), 合并 RNA 组分, 加 2 体积乙醇, 35000r/m 离心 90 分钟收集 RNA, 溶于水中, 立即使用或于 -70°C 保存。

4. 兔网织红细胞溶胞产物的抽提和体外 SRSV RNA 的翻译: 体重 2.5~3 kg 的雌性兔, 每日注射 1.5% 盐酸苯胍 1ml, 连续 3 天, 第 5 天心脏穿刺取血, 网织红细胞数在 70% 以上。从兔网织红细胞抽提无细胞抽提物按 Adamson 等法^[7]制备, 只是加水渗透溶胞后于 15000g 20 分离心 1 次所得上清液为溶胞产物, 代替 30000g, 10 分离心 2 次。制备后立即使用或液氮保存。体外保温混合物 44 μ l, 其中含 Tris 缓冲液 (pH 7.57mmol/L, KCl 90 mmol/L, MgCl₂ 4mmol/L, 磷酸肌酸 9 mmol/L, 肌酸激酶 0.35mg/ml, 19 种非标记氨基酸 45~135 μ M, ^3H -亮氨酸 (5 μ Cl/mmol/L) 和无细胞抽提物 32 μ l。样品管加 2 μ g RNA, 对照管以等量水代替。混合物保温 30°C 1 小时。体外合成的蛋白质用三氯醋酸 (TCA) 沉淀后, 液体闪烁计数器测定放射性。

结 果

(一) SRSV 的体外检测

为了证实我校病理生理教研室提供的病毒感染细胞株确已感染 SRSV, 并检测感染

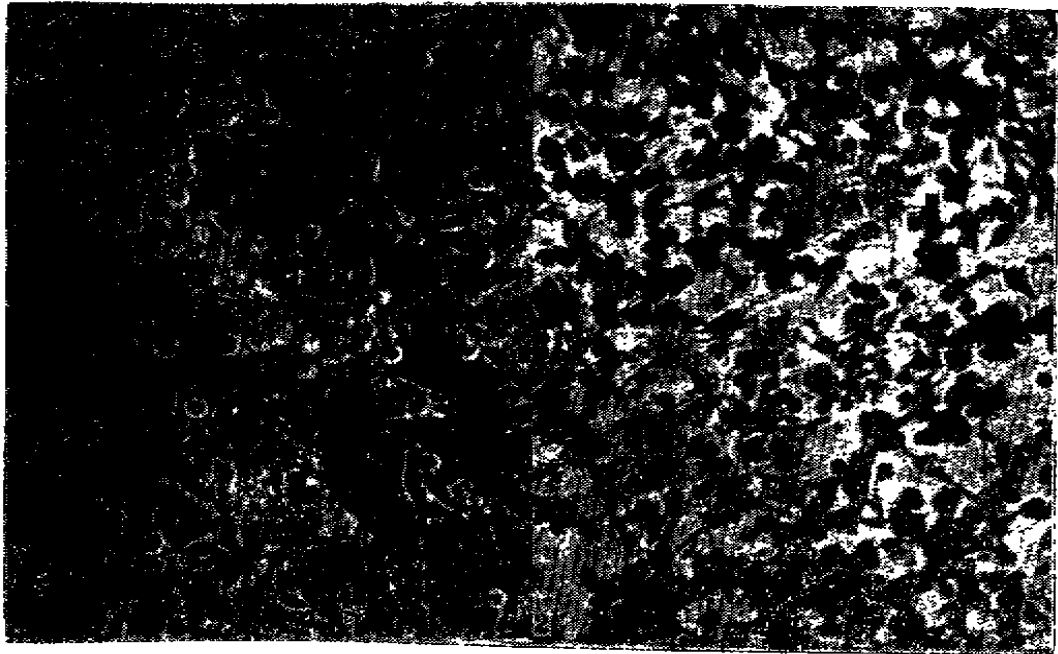


图1 SRSV感染3T3细胞的群落形成

Fig 1 Colonies formation of SRSV-infected
3T3 cells

图2 SRSV XC 合体细胞斑的产生

Fig 2 Production of XC Syncytial plaques
of SRSV

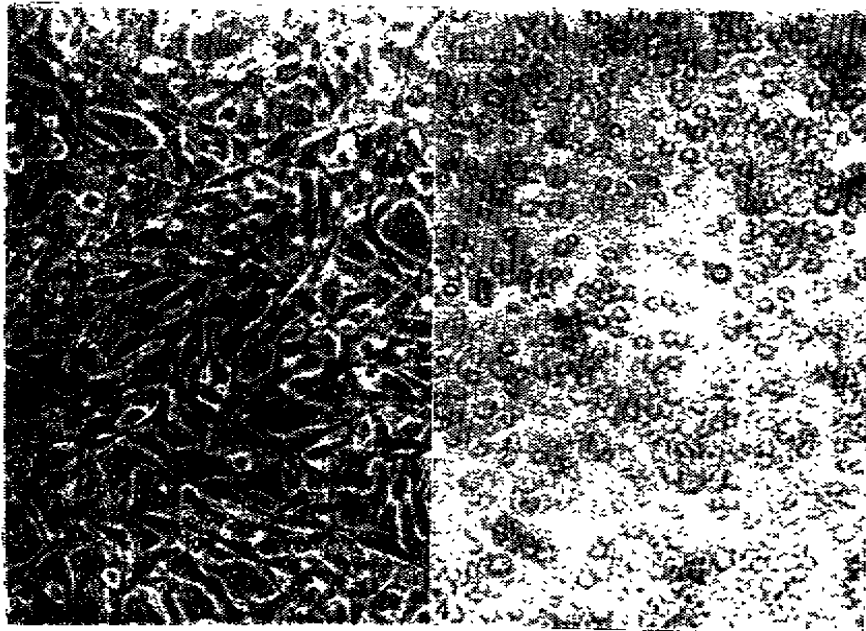


图3 正常NIH3T3细胞

Fig 3 Normal NIH 3T3 cells

图4 XC细胞

Fig 4 XC cells

细胞病毒的产生, 本文对病毒感染细胞的 SRSV 生长情况进行了观察, 发现正常 3 T 3 细胞生长至汇合后, 因细胞分裂的高度接触抑制而生长停止, 形成单层, 而病毒感染的 3 T 3 细胞, 在单层背景上形成多层生长的群落 (Clonies)。这是病毒核酸参入到细胞中未复制的基因组中形成新的病毒颗粒, 也改变了细胞特性, 一些逆转录病毒能引起细胞病理改变 (Cytopathic effects) 或形成合体细胞多核巨细胞 (Syncytium, multinucleated giant cell)。把 SRSV 感染的 3 T 3 细胞与 XC 细胞 (RSV 转化的大白鼠肿瘤细胞) 联合培养, 引起细胞病理改变, XC 细胞发生融合, 形成合体细胞斑 (XC syncytial cell plaque)。因此本实验的病毒感染的细胞群落形成分析和 XC 合体细胞斑检测都呈阳性结果。图 1, 2 分别显示病毒感染的 3 T 3 细胞群落形成和 XC 合体细胞斑的产生, 图 3, 4 各为正常 NIH 3 T 3 细胞和 XC 细胞。

通过蔗糖梯度离心, 从感染细胞上清液中进行病毒纯化, 并作病毒颗粒的电镜观察, 可见到大量病毒样颗粒, 呈圆形或椭圆形, 直径为 70~80nm, 中央是电子密度较深的拟核, 外围清晰的被膜, 在拟核与被膜之间为透亮的空晕 (Halo), 具有 RNA 致

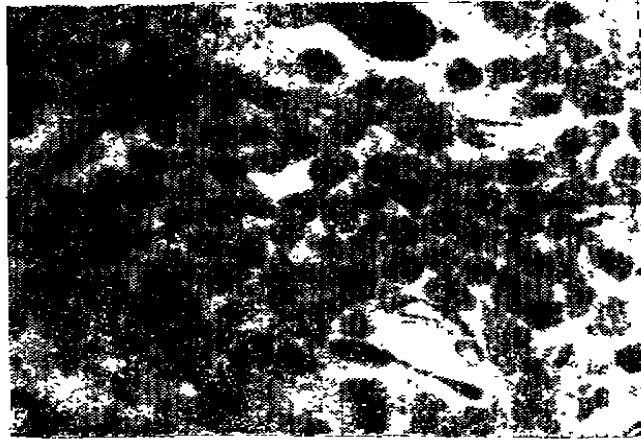


图 5 SRSV 形态的电镜观察

Fig 5 Detection of SRSV by electron microscopy

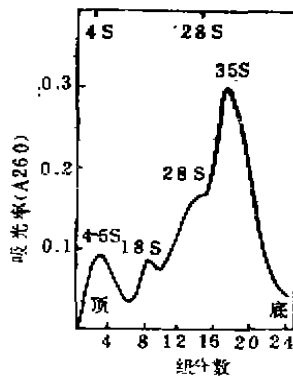


图 6 SRSV RNA 的密度梯度沉降分析

Fig 6 Analysis of density gradient sedimentation of SRSV RNA

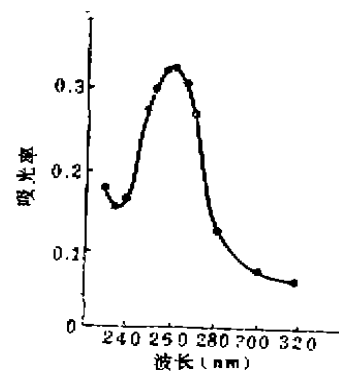


图 7 35S SRSV RNA 的吸收光谱

Fig 7 Absorbance spectrum of 35S SRSV RNA

瘤病毒中 C 型颗粒的形态学特性。病毒颗粒的电镜观察如图 5 所示。

(二) 病毒 RNA 的沉降行为及产率

蔗糖密度梯度离心后, 以每份 0.5ml 收集, 测 260nm 的吸光率 (A₂₆₀), 多数病毒制剂可见到 4 个大小不等的紫外吸收峰, 沉降快的组分其波形宽而不对称, 峰的部尾比头部更宽, 提示分子不均一。图 6 示病毒 RNA 的密度梯度沉降分析。该组分的吸收光谱如图 7 所示, A₂₆₀/A₂₈₀ 约为 2.35。

为了测定 RNA_s 的大小, 以 4S tRNA (分子量为 2.4×10^4) 和 28S rRNA (分子量为 1.4×10^6), 浓度为 500 μg/ml 缓冲液作为吸光参考标志作平行梯度离心, 离心条件严格控制与所分析的病毒 RNA 相同。SRSV RNA 的沉降系数按 Martin 和 Ames 法^[8]计算, 分别为 4~5S, 18S, 28S 和 35S。因此, 占多数的主峰是沉降快的 35S 组分, 慢组分是 4~5S, 其间还有少量 18S 和 28S。用 4S 和 28S 作为分子量参考标志, 据 Spirin's 关系式 $MW = 1550 \times S^{2.1[9]}$ 算出上述 4 个峰的分子量各约为 $2.8 \sim 4.6 \times 10^4$ 、 6.7×10^5 、 1.7×10^6 和 2.7×10^6 ,

合并 35S 组分, 通过测定样品的 A₂₆₀, 测定病毒 RNA 的产率, 蔗糖经活性炭处理后仍含有少量紫外吸收物质, 经测定, 在 15~30% 蔗糖梯度范围内, 波长 260nm 所引起的吸光率不大于 0.1, 扣除后得总收率。表 1 是 3 批病毒感染细胞培养中病毒 RNA

表 1 SRSV RNA 的产率
Table 1 Yield of SRSV RNA

批号	培养液体积 (ml)	扣除蔗糖吸光 率后的 A ₂₆₀	病毒 RNA 总收率 (μg)
1	1140	0.321	14.45
2	2470	0.753	33.89
3	3620	1.358	61.11

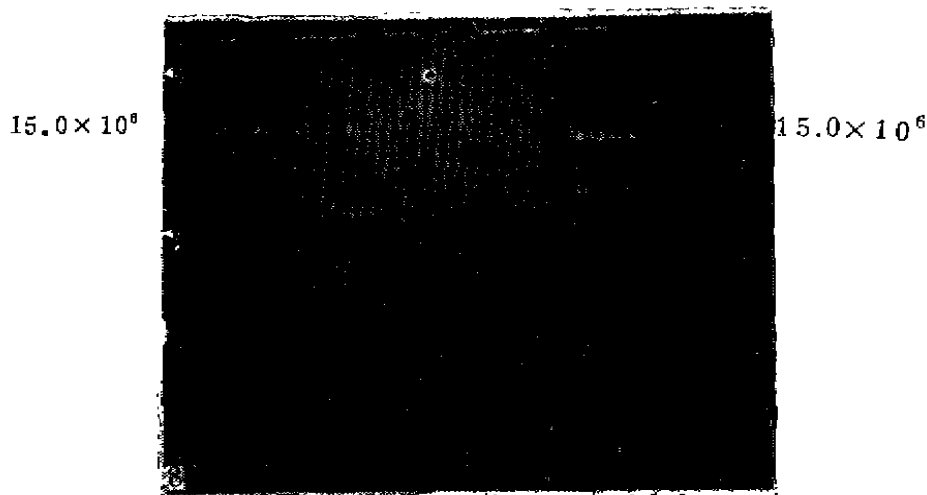


图 8 天然 SRSV RNA 的凝胶电泳分析
Fig 8 Analysis of natural SRSV RNA on gel electrophoresis

的产率。

(三)腹水瘤病毒的基因组 RNA 经酚~氯仿抽提的病毒 RNA, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上分离检测其大小, 以 Hind III 酶切的 λ DNA 片段作分子量参考标志。天然 SRSV RNA 的凝胶电泳分析如图 8 所示。图中右两列是 Hind III 酶切 λ DNA 片段, 左两列是天然 SRSV RNA 的电泳带, 呈单一条带, 分子量约为 15×10^6 。从 -30°C 保存 2 个月的培养液中提取的病毒 RNA, 电泳中也得到同样结果, 未见有明显的降解现象。

天然 SRSV RNA 经 100°C 加热 1 分钟, 并经 15~30% 蔗糖梯度离心, 分析所得的 35S 组分在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上电泳, 发现电泳和梯度离心结果基本相符, 即梯度离心的 35S 组分在电泳中有明显的分子量为 3.5×10^6 的电泳带。图 9 是蔗糖梯度离心的 35S 组分的凝胶电泳图, 1 是入 DNA 酶切片段; 2 是蔗糖梯度离心的 35S 组分。

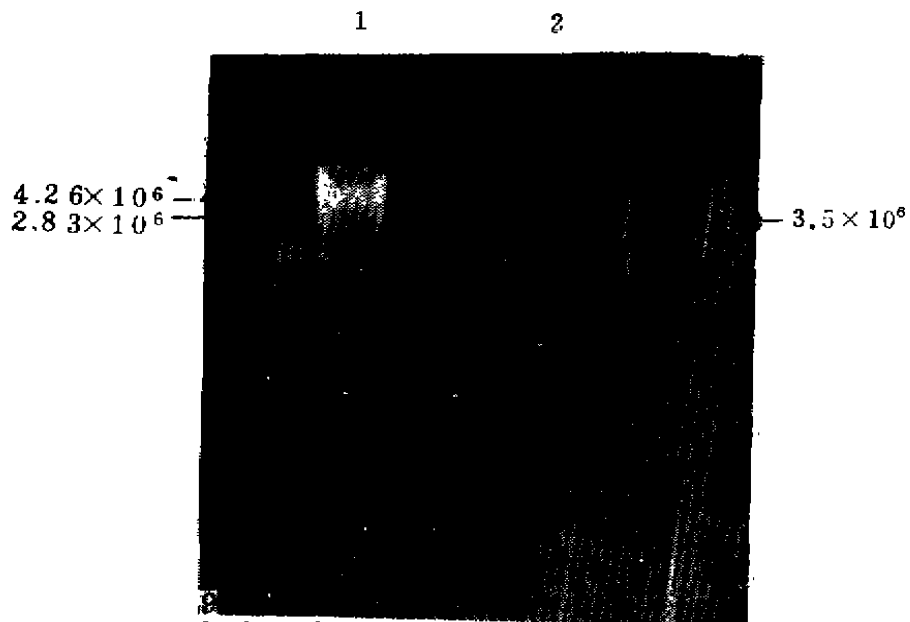


图9 35S 组分的凝胶电泳分析

Fig 9 Analysis of 35S fraction on gel electrophoresis

我们也在琼脂糖凝胶电泳上检测蔗糖梯度离心的 4~5 S 组分, 发现电泳中形成的电泳斑点分子量约为 5×10^4 (图上未显示出)。

从 SRSV RNA 热处理前后的电泳行为可见, 天然 SRSV RNA 分子量约为 15×10^6 , 热处理后为 3.5×10^6 , 提示天然 SRSV RNA 是由数个分子量较小的亚基组成的聚集体, 热处理时解聚。

(四) 35S SRSV RNA 在体外对蛋白质合成的影响

表 2 显示 35S SRSV RNA 在体外兔网织红细胞溶胞物系统中 3 次翻译实验的结果。据 ^3H -亮氨酸参入 TCA 沉淀的蛋白质中放射性的计算, SRSV RNA 刺激多肽合成约为不加 RNA 对照的 2~3 倍, 表明病毒 RNA 具有体外病毒蛋白合成能力。35S 组

分的信使功能反映了病毒基因组活性。

表2. 35S SRSV RNA在兔网织红细胞溶胞产物系统中对

^3H -亮氨酸参入的刺激作用

Table 2 Stimulation of ^3H -leucine incorporation by 35S
SRSV RNA in a rabbit reticulocyte lysates

序 号	在酸沉淀物中 ^3H -亮氨酸 的参入 (cpm)	
	对 照	加RNA
1	3572	7858
2	3051	7628
3	3246	10053

讨 论

体外检测和分析白血病病毒的方法之一是病毒转化细胞的群落形成和XC合体细胞斑的产生^[10]。前者是病毒感染引起成纤维细胞转化，进而形成群落；后者是XC细胞（RSV转化的大白鼠肿瘤细胞）与病毒感染的细胞一起培养，发生融合，形成合体细胞斑，提示细胞受病毒感染。本实验的两个实验都呈阳性结果，因而，我们用作病毒分离的细胞确是已感染SRSV的3T3细胞。

从组织培养液中浓缩病毒。在蔗糖溶液中受等密度梯度离心，使病毒颗粒停留在浮力密度1.16g/ml处，该密度用折光仪测定蔗糖浓度来确定。浮力密度1.15~1.16g/ml（蔗糖浓度约35%）是从培养液中得到的C型病毒的特征。电镜观察具有RNA肿瘤病毒中C型颗粒的形态学特征，也表明该病毒的核酸是RNA。

本文采用蔗糖梯度平衡沉降法从小鼠腹水瘤病毒感染细胞的培养液中进行病毒分离，通过15~30%蔗糖梯度速率-区带沉降法进行病毒RNA的纯化。与从腹水瘤小鼠腹水中分离病毒RNA相比，用本方法制备病毒RNA可大量处理培养液，杂质少且分辨率高，并且由于在变性条件下制备，可更精确测定RNA分子的大小。为了防止RNase的降解，所有使用器皿必须按提取要求严格处理，并在抽提中使用SDS、蛋白酶K等酶抑制剂，消除或减少核酸酶的影响。

Weiss报道^[11]，纯化的逆转录病毒核酸的酚抽提，主要得到两种RNA，即60~70S RNA（分子量约为 10×10^6 ）和4~5S RNA（分子量约为 3×10^4 ）。60~70S是病毒基因组，4~5S tRNA是病毒DNA合成的引物，此外还含有少量18S和28S rRNA和微量的mRNA及DNA。在本实验中，超速离心沉降分析的35S组分，分子量约为 2.7×10^6 ，凝胶电泳法测出为 3.5×10^6 ，因而其大小在 $2.7 \sim 3.5 \times 10^6$ 之间，即约 3.1×10^6 ，热处理后从大分子RNA中解离出的小分子RNA，大小约 3.6×10^4 ；超速离心沉降分析的4~5S组分（分子量为 $2.8 \sim 4.6 \times 10^4$ ），电泳法测出其大小约为 5×10^4 。在梯度离心分析中也见到少量18S和28S RNA。因此，本实验所得结果与Weiss所报道的结果基本一致，梯度离心分析和电泳分析都表明所分离的SRSV RNA

符合肿瘤病毒 RNAs 的共同特征, 是一个不均一分子, 含有较多的 35S 和 4~5S, 还含有少量的 18S 和 28S。在天然情况下, 60~70S 的大分子, 分子量约 15×10^6 , 可能是由 3~4 个 35S 组分, 每组分约为 3×10^6 的亚单位藉助于氢键联结在一起所构成的聚集体 (aggregate), 在加热时解离。本实验还初步证实从 SRSV 抽提的高分子 RNA (35S 组分) 在体外能指导无细胞蛋白的合成, 因而, 高分子 RNA 是病毒基因组。

参 考 文 献

- (1) Paterson, B.M. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 4951-4954.
- (2) Duesberg, P.H. et al., 1968, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 1511-1519.
- (3) Erikson, E. et al., 1971, *Virology* 8: 254-256.
- (4) Bader, J.P. et al., 1969, *Virology* 4: 454-459.
- (5) 李其翔等, 1987, *生物化学与生物物理学报* 19 (2): 87-93.
- (6) Kerr, I.M. et al., 1976, *J. Virol.* 18: 627-635.
- (7) Adamson, S.D. et al., 1968, *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 671-683.
- (8) Martin, R.G. and Ames, B.N., 1961, *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379.
- (9) Spirin, A. S., 1963, *Some problems concerning the macromolecular structure of nucleic acids*, In *Progress in Nucleic Acid Research* vol 1, Acad. Press N.Y. & London p.301-312.
- (10) Dulbecco, R. et al., 1969, *RNA-containing tumor viruses: retroviridae*, In *Virology*, Cambridge, Harper & Row, P.1243-1260
- (11) Weiss, R. et al., 1982, *Structure of the retrovirus genome*, In *RNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., P.281-359.

The Purifications of Mouse Ascitic Tumor Virus(SRSV) and Viral Ribonucleic Acid(SRSV RNA)and Investigation of Some Properties

Shan Yi-fei Ji Hong Wu Zheng-quan Lu Mei-zhen
Zheng Bao-fen Cheng Li Kong xian-shou

(Department of Biophysics and Pathophysiology, Shanghai Medical
University, Shanghai)

SRSV was obtained from the supernatant of infected NIH 3T3 mouse fiblasts and purified by sucrose density gradient centrifugation. SRSV RNA was prepared from fresh viral pellets and extracted with chloroform-phenol and fractionated on sucrose gradients. The RNAs of various fractions were determined by sedimentation coefficient(s) and followed by gel electrophoresis. The component of

SRSV RNA contains two main fractions, one sedimenting at about 60-70s (after treatment with heat at about 35S), plus small amounts of RNA sedimenting in the 18S and 28S areas, and the other at 4—5 S. High molecular weight RNA (35S) isolated from SRSV can direct the cell-free protein synthesis.

Key Words, Sedimentation coefficient Hind III digested DNA fragments XC syncytial cell plaque Sucrose density gradient centrifugation Rabbit reticulocyte lysates
