Vol.8 No.1 Mar.1991

兔出血症病毒核酸的某些理化性质的研究*

孙松柏 王汉中 杨学楼 罗 经 刘 虹

(中國科学院武汉病義研究所, 武汉430071)

提宴

本文对我国无锡分离的兔出血症病毒 A₂R-3 毒株核酸的某些理化性质进行了研究。采用孚尔根染色、二苯胺反应和核酸酶解实验证实病毒核酸为 DNA 类型。吖啶橙染色、甲醛反应、核酸酶 S₁ 消化和核酸热变性实验表明病毒核酸为单链型。 核酸电泳呈单一组分。电镜观察显示核酸分子链呈线状,平均长度约为2.15 P。计算分子量约为2.1-2.5×10⁶d。核酸碱基组成为 A₂S₃34、T₂S₃37、G₂S₃3.85、C₂S₁43、(G+C) 克分子百 分比值为45.28。结合以前的报道^[1-8]、我们认为: 兔出血症病毒可以归类于细小病毒科。

关键词: 兔出血症病毒 单链 DNA 细小病毒

1984年,在我国江苏无锡首次爆发了一种家兔烈性传染病,经证实该病系由病毒感染所致^[1]。随后, 我们对该病毒原发毒株 A₂R-3 病毒粒子 的形态与结构, 某些生物学性质、血清学性质等进行了研究报道^[1-3]。本文进一步报道了A₂R-3 毒株病毒核酸的某些性质,加上早先关于该病毒其它性质的报道,对该病毒进行了初步分类。

材料与方法

一、病毒与增强;

- (1)毒种: 兔出血症病毒A₂R-3(RHDV-A₂R-3)毒株、由无锡县兽医站提供。
- (2)病毒增殖:参照文献[1]方法进行。

本文中使用的家蚕蜜核病毒(BmDNV)中国镇江株由本所谢天恩教授惠贈、家蚕质型多角体病毒(BmCPV)系作者所分离。

二、病毒的纯化:

基本参照文献^[2]方法进行,即样品经差异离心初步纯化后,再经40-60%蔗糖梯度离心('日立80P型超速离心机)、收集55%处乳白色病毒带,再经40000r/m离心脱糖后用 Sepharose 2B柱层析进一步纯化(柱床体积1×50cm、流速1ml/5min、监测器 X2-85-1 型核酸蛋白流动监测仪、洗脱液0.7mmol/L pB、pH7.2)收集第一个流出峰,经透析脱盐、浓缩后备用。

本文1990年3月14日收到9月29日修回

*本课题部分由国家自然科学基金资助。

致谢:黄文林、吴晰莹、王学兰同志曾参加部分工作。本所电镜室梁世平、袁爱华、邓红等同志协助电镜观 察、照相等,在此一并致谢。

三、病毒核酸的提取:

参照Kelly D C 等的方法讲行[4]。

在抽提核酸之前、病毒粒子悬液预先用 DNase、RNase (终浓度为1 μ g/ml)、37℃处理30-60分钟。 然后在0.7mmol/L低盐溶液中用水饱和**粉提取核酸,抽提液经透析**后加冷乙醇, 置-30℃低温冰箱过夜,离心收集核酸沉淀,溶于0.7mmol/L pB, pH7.2袋冲液中备用,其纯度用紫外分析及凝胶电泳法检查。

四、病毒核酸的定性试验:

- (1) 孚尔根染色:参照文献[5] 进行。
- (2)二苯胺反应: 参照文献[8]进行。
- (3)核酸酶及S₁酶消化试验:基本参照文献^[8·7]进行。

DNase--溶于0.01mol/L Tris-HCl, pH7.2, 0.005mol/L MgSO₄中, 浓度50μg/μl(Sigmo公司产品)。

RNase--溶于磷酸盐--醋酸 缓冲 液中, pH3.8, 浓度 50 µg/µl (Serval Laboratories 公司产品)。

核酸酶 S_1 -溶于 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 50mmol/L NaCl, 0.1mmol/L ZnCl₂中, 浓度50 μ g/ μ l(中国预防医学科学院病毒所一室赠给)。

RNase 需预先在80-90℃水浴中处理10分钟以纯化可能混入的杂酶。

反应条件:各酶反应浓度为5-10μg酶/μg核酸,37℃保温1-3小时,经琼脂糖聚胶电泳分离后,用EB 染色,在紫外灯下检测。

五、核酸链型的分析:

- (1) 吖啶橙染色试验: 参照 Braaley $D.E^{[7]}$ 等方法进行。直接用病毒粒子经 0.01% 吖啶橙染色后,在紫外灯下观察颜色反应。
 - (2) 甲醛反应:基本参照 Yu-chan chao [8]、郝虹 [8] 等人的方法进行。
- (3)热变性温度吸收曲线特征的测定: 参照 D.C.Kelly^[7] 等测定细小病毒单链型核酸的方法进行。测定已知的单链核酸和RHDV核酸在 O.D.260am 波长的吸收值变化趋势。使用仪器: 日本岛津 uv-300(核酸溶于 0.7mmol/L PB, pH7.2中, 在密封附件中,自 40℃ 起顺序升温,每升温 2℃,平衡1-2分钟后读数)。
- (4)碱基组成的测定: 多照蔡城武^[6]等方法进行。取定量核酸加适量 HC104 密封,置100℃排水溶中水解1小时后用6N* KOH 中和至 pH7.0-8.0,离心,取上清点样于华特曼层 析纸上,在异丙醇: 氨水:水(6:3:1)系统中进行室温上行展层16~20小时,以标准碱基为对照则定纸点位置,样点经0.1N HC1浸泡,洗脱后,置岛津uv-300以则其0.D.值、计算克分子百分含量。

六、被酸的电镀现察:

采用徐有成^[10] 等介绍的甲 酰胺 法进行。 展层液上 相为 0.1 mol/L Tris-0.01 mol/L Na₃ EDTA, pH8.5, 细胞色素C 0.05—0.1 mg/ml, 甲酰胺40%。下相为 0.01 mol/L Tris—1 m mol/L Na₃EDTA, 甲酰胺 10%(或用无离子水)。染色、投影均按常规方法,用0.1% 磷钨酸染色10—30秒,自然干燥后置 JEE-48 型真空喷镀仪中投影。用日立JEM-100²型透射电镜观察。

结 果

经蔗糖梯度离心, Sepharose 2B 柱层沂进一步纯化、浓缩后获得的病毒 血凝效价

[•] IN = (µmol/L) × 离子价数

可达2×10⁻¹¹, 在电镜下观察病毒粒子形态完整^[1-2]。

绝化的核酸经紫外扫描测得最高吸收峰在 260nm、最低吸收峰在 232nm,其 O.D. $260/O.D.280 \approx 1.87$ 。 凝胶电泳检查呈单一组分, 证明所获病毒 核酸较纯(见图 1A、B)。

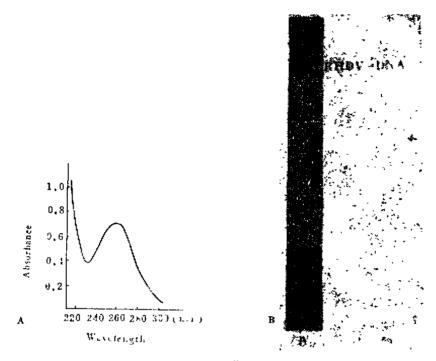


图 1 A.兔出血症病毒核酸的紫外吸收曲线
B.兔出血症病毒核的凝胶电泳
Fig.1.A.UV absorption spectra of RHDV-DNA
B.RHDV-DNA separated by 1.4% agarese gel

病毒核酸用孚尔根 染色, 二苯胺反应 呈兰色、 核酸能 抵抗 RNase 的作用、 而被 DNase降解(见图版 m2)。 表明 RHDV 核酸属于 DNA 类型。

病毒粒子经吖啶染色后,在紫外光激发下产生火焰红色,而已知的双键病毒核酸(BmCPV ds RNA)为亮绿色。 RHDV DNA与已知的单链病毒核酸(BmDNV ss DNA)均能被核酸 S,消化,而已知的双链核酸 (BmCPV ds RNA)不能 降解(见图版 W3)。

RHDV DNA与甲醛作用后,在波长260nm至270nm区间吸收值有一定的增加,而已知的小牛胸腺 dsDNA 在此波长范围内,经甲醛处理前后的吸收值基本无变化。但是,通过热变性获得的单键小牛胸腺DNA和已知的BmDNV ssDNA 在相同条件下与甲醛作用结果与 RHDV DNA 的变化特征非常相似(见图 4),与郝虹⁽⁴⁾等报道的小鹅瘟细小病毒核酸的甲醛反应结果一致。对于这种现象的解释一般认为是甲醛可与单链核酸中未配对的碱基上的氨基作用,而使其紫外吸收值有一定的增加。

RHDV 核酸的温度吸收曲线变化特征的测定结果表明,RHDV核酸在温度升高时,其O.D.260nm 处吸收值变化较小,吸收曲线比较平坦、略呈上升趋势,与BmDNV



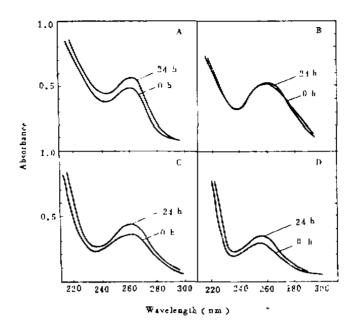


图 4 兔出血症病毒的甲醛反应试验 A.小牛胸腺 suDNA (热变性获得) B.小牛胸腺 daDNA C.家蚕DNV saDNA D.兔出血症病毒核酸

Eig.4 The effect of formaldehyde on the ultraviolet absorption spectum of (A) asDNA (Calf thymus DNA denatured by boiling at 100 °C, 10min.); (B) Calf thymus deDNA; (C) RHDV·DNA; (D) BmDNV DNA. Neutralized formaldehyde was added to the samples in 0.7mmol/L PB, pH 7.2 to final concentration of 1.8%. The absorption spectrum was determined immediately(O h) and incubated at 37°C, determined again at24h after addition.

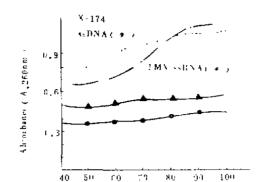
ssDNA 的结果相近似。 与文献记录的 $\phi X174$ ssDNA、TMV ssDNA 的总趋势类似、仅在幅度上有一定的区别(见图 5),这可能是由于不同类型病毒单链核酸分子发夹结构上的差异所致。 它们都不具有典型双链核 酸热变性曲线特征^[11]。上述结果可初步确认RHDV DNA的链型为单链。

为了进一步证明其单链性质,我们测定了RHDV核酸的碱基组成,结果表明RHDV DNA的碱基组成为A25.34, T29.37,G23.85,C21.43,(G+C)克分子%含量为 45.28,其中A+T, G+C, 说明 RHDV DNA 属单链型(见表 1)。

经甲醛胺法展层的核酸在电镜下观察可见 RHDV 核酸分子呈线状,(见图版 m 6) 采用里程计测量一定量核酸分子链长平均约为 2.15μ ,由此推算出该病毒核酸的分子量约为 $2.1-2.5\times10^{9}$ d(见图 7)与周明龙 (12) 等用电镜法测得的 RHDV 南京分离物的核酸分子量 2.3×10^{9} d 相近似。

维普资讯 http://www.cqvip.com

ł



40 511

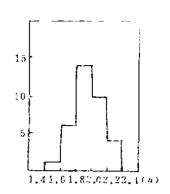


图 5 兔出血症病毒核酸和家蚕密核病毒核酸热变性温度曲线 (*)引自C.A.奈特, 分子病毒学, 方荣祥泽(25) 一・一兔出血症病毒核酸 一△一家蚕密核病毒 核酸 ······· фx17488DNA ···· TMV88RNA Fig.5 Thermal denaturation on RHDV DNA (----), BmDNV DNA(--△---), φx174 esDNA(*) and TMVesRNA(---), from C.A.Knight; Molecular Virology(25).

77

T-mperature

80

94

f0

图 7 兔出血症病毒核酸分子 长度的分布图 Length(um) Fig.7 Distribution of the length of DNA molecules from RHDV, obtained by trestment with 40% formamide,

论 讨

根据以往的一些报道。获知RHDV的一些生物学特性[1,2]及血清学性质[2],在 CsCl 中的浮力密度值为1.30g/cm^[3]发现RHDV与某些细小病毒相似。为此,我们按Kelly^[4]、 Chao Yuchan^[8]、郝虹^[0]等研究细小病毒的方法,提取了RHDV核酸,并证实 RHDV核 酸为DNA类型呈单链构型,单一基因组,分子链长约为2.15 µ,电镜法计算分子量范围 约为 $2.1-2.5\times10^{8}$ d,与文献记录的细小病毒核酸性质相似,其碱基组成与 (G+C) 克 分子%值均在细小病毒核酸碱基组成范围内。

结果表明,兔出血症病毒可归类于细小病毒科。

本文仅从 RHDV 分类的目的出发, 研究了 RHDV 核酸的类型与链型等, 而未对该 病毒核酸在高盐条件下是否可形成双 键及其双链型的核酸性 质的进一步研究。 毫无疑

兔出血症病毒被酸与某些细小病毒被酸的被基组成 Table | Base composition of RHDV DNA and some paryovirus DNAs

Vitus	Adenine	Thymine	Guenine	Cytosine	(G+C)mol%	Ref.
мум	26,5	32,7	19.5	21,4	40,9	(13)
R V	26,8	29,6	20,6	22.9	43,5	(13)
H-1	25,5	29,3	22,6	22,6	45,2	(14)
Parvoviruses	22-26.8	2933,4	1922.8	21,4-22,9	40,9-45,2	(14)
RHDV(w)	25.34	29,37	23,38	21,43	45,28	(*)

^{*}This paper本文

館6巻

问,对这些方面的深入研究,为进一步揭示 RHDV 的本质以及它与某些细小病毒之间的分子生物关系也是极其重要的。

参 考 文 献

- (1) 杨学楼等, 1989, 病毒学杂志 2, 188-191。
- 〔2〕 黄文林等, 1989, 病毒学杂志 1, 90-96。
- 〔3〕 周 烦等, 1986, 病毒学报 2(3), 269-270。
- (4) Kelly, D.C.et al., 1977, J. Virol.21(1), 396-407,
- 〔5〕 郑国昌等, 1978, 生物显微技术, 人民卫生出版社, pp106。
- 〔6〕 蔡城武等、1987、生物化学实验技术教程、复旦大学出版社、pp110--11%。
- (7) Bradey D.E. et al., 1965, Nature 25, 1230.
- (8) Chao Yu-chan et al., 1985 J. Inver. Path. 46, 70-82,
- (9) 郝虹等, 1988, 病毒学报 4(1), 28-31。
- 〔10〕 徐有成, 1975, 生物物理与生物化学进展 2, 9-12。
- 〔11〕 方荣祥泽, 1980, 分子病毒学, 科学出版社, pp54-58。
- [12] 周明龙等、1989, 南京农大学报 11(4), 104-107。
- (13) Gunter Siegl 1985, Intervirology 23: 61-73.
- (14) Mogeoch D.J. 1970, J.gen. Virol. 6, 33-40.

Studies on Some Biophysical and Biochemical Characteristics of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) DNA

Sun Song-bai Wang Hang-zhong Yang Xue-lou Luo Jing Liu Hong

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

In present paper, some biophysical and biochemical characteristics of the nucleic acid in the original strain of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) - A,R - 3(separeted from Wuxi, China. 1984) have been studied.

By using Feulgen assay, Diphenylamine reaction test and nuclease digestion sensitivity test, we demonstrated that the nucleic acid of the RHDV was DNA form.

Staining with acridine orange, reaction with diluted formaldehyde, digestion with nuclease SI and determination of the thermal denaturation of the RHDV DNA showed that the RHDV contains single-stranded DNA(ssDNA).

Electron micrograph revealed that the RHDV DNA is linear single-strand DNA molecules with 2.15μ in length, their molecular weight is about $2.1-2.5\times10^6 d$.

The base composition is, A 25.34, T 29.37, G 23.38, C 21.43. The G+C mol% is 45.28.

The results suggested that the RHDV can be classificated into the Parvoviridae and as a member of the Parvoviruses.

Key words, Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) Parvovirus Single stranded DNA(ssDNA)