维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第3期 1991年9月
中国病毒学 VIROLOGICA SINICA
Vol.6 No.3 Sept.1991

牛病毒性腹泻病毒RNA的cDNA合成及其分子杂交的研究

糜克永 王蕾 张方东
（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）
向秀成
（湖南农学院，长沙410128）

提要

BVDV（牛病毒性腹泻病毒）是一类有重要经济价值的病毒，其核酸为单链RNA。该病毒提纯以后，用苯酚-氯仿-异戊醇提取RNA，在提取的BVDV RNA中所含的DNA杂质用DNase I降解除去，然后进一步用oligo dT纤维素柱亲和层析，琼脂糖凝胶电泳等方法纯化。纯化的BVDV RNA在E.coli，poly A聚合酶的催化作用下，在3'羟基末端聚腺化。cDNA在逆向转录酶的作用下，用polyA接尾的BVDV RNA作模板，oligo dT_{12-18}作引物合成。琼脂糖凝胶电泳结果说明它与BVDV RNA相似。该cDNA的探针用斑点杂交方法与BVDV RNA，HCV RNA和酵母tRNA杂交，BVDV RNA和HCV RNA显阳性反应，酵母tRNA显阴性反应，结果说明合成的cDNA为BVDV RNA的cDNA。BVDV和HCV同为披盖科疫病毒属成员，它们具有部分相同的抗原，因此编码病毒蛋白的RNA序列具有同源序列，本研究证实了这种假设。

关键词：牛病毒性腹泻病毒　猪瘟病毒　互补DNA

BVDV属披盖病毒科疫病毒属，它的核酸已鉴定为单链RNA[1]。1980年我国学者从疑似病牛流产的胎儿脾脏中分离到一株病毒，经与美国的BVDV Oregon CV 24标准毒株的交叉中和试验，证明为牛病毒性腹泻—粘膜病毒[2]，1983年中国科学院武汉病毒研究所糜克永等人从内蒙羔羊下痢病样中分离到一株BVDV（BVDV InL株）[3]，并且证明它为内蒙羔羊下痢病有关重要病毒病原之一[4]。对于该病目前尚无有效疗法。当前试产试用的弱毒疫苗，因考虑到在自然界返强的问题，还没有推广使用。鉴于目前疫苗的安全问题，我们以BVDV InL株为出发毒株，研制基因工程的亚单位蛋白疫苗。本研究是这一规划中基础性的研究。本文还略为探讨了一下cDNA探针及核酸分子杂交方法在病毒分类上应用的可能性。

材料和方法

BVDV及HCV RNA材料来源：BVDV病料由湖南农学院提供。毒株为BVDV InL株。HCV RNA由湖北生物制品厂提供的弱毒疫苗材料提取获得，本实验室制备。

本文于1990年4月16日收到，1991年1月21日修回。当量浓度1N＝1mol/L×离子价数。

维普资讯 http://www.cqvip.com

AMV逆转录酶：Sigma产品，27单位/μl。

PolyA聚合酶：GmbH产品，15单位/μl。

病毒的提纯：将感染的BVDV InL株的病牛犊肝脾按体积比加入10倍量的TNE缓冲液（0.01mol/L Tris·HCl，0.1mol/L NaCl，1mmol/L EDTA钠盐），用组织捣碎器匀浆，匀浆经反复冻融三次以后，病毒释放到悬浮液中，以10000r/m，4℃，离心30分钟（离心机GL20A型，NO3转子），弃去沉淀，取上清液，以分子量100000道尔顿的超滤膜柱超滤，除去此分子量以下蛋白、核酸和其它杂质，并将病毒液浓缩。该液在30000r/m，4℃，离心1.5小时（离心机MSE75型，水平转子6×5.5），取沉淀用TNE缓冲液溶解，再以TNE缓冲液配制不同蔗糖密度梯度，分别为69%，55%，35%，15%，将浓缩的病毒液加于梯度液上，4℃，30000r/m，离心2小时（离心机MSE型，水平转子6×5.5），离心以后取出15%与35%，35%与55%之间界面上的乳白色带[3]，继续在30000r/m离心2小时以后，取沉淀，除去蔗糖，以电子显微镜检查沉淀中是否含有提纯的病毒粒子。

BVDV RNA的提取：将二倍体积的苯酚，氯仿，异戊醇（比例为24：24：2）的核酸抽提试剂，加到上述提纯的病毒液中，并连续在冰浴条件下，搅拌5分钟，离心，取水相，用上述试剂反复抽提一次，水相加乙醇及2.2mol/L醋酸钠使BVDV RNA沉淀。沉淀以乙醇漂洗三次后，真空干燥备用，并取少量以蒸馏水溶解，在波长210—300nm范围内测定O.D值，绘出紫外吸收曲线，鉴定核酸纯度。

DNase 1酶解DNA杂质：BVDV RNA在cDNA合成以前进行纯化处理，BVDV RNA样品中含有DNA杂质，首先用DNase 1降解除去。具体作法是：将含约330μgBVDV RNA的干燥样品溶于6.0ml，83mmol/L醋酸缓冲液（pR5.0）和4.2mmol/L $MgSO_4$的反应缓冲液中，再加入100单位的DNase 1，在25℃反应30分钟。反应完毕以后，加入苯酚、氯仿，异戊醇试剂，除去酶蛋白，并提取BVDV RNA。DNA被酶解为小分子核酸或单核苷酸后，不易被2倍乙醇沉淀，因而被除去。乙醇沉淀的BVDV RNA，用乙醇漂洗三次，真空干燥备用。

Oligo dT纤维素柱亲和层析：上述BVDV RNA干燥样品含有RNA的杂质，其中含有polyA尾端的m RNA等核酸杂质，被dT以共价键形式吸附，不易被洗脱下来，而BVDV RNA由于不含polyA尾端[5]，所以不能被吸附，而极易洗脱出来，从而分开这两种核酸，而达到提纯目的。具体做法是：取1ml注射器针管，装入已活化处理的oligo dT的纤维素，以载样缓冲液（20mmol/L Tris·HCl，0.5mol/L NaCl，1mmol/L EDTA钠盐，0.1%SDS，pH7.6)将BVDV RNA干燥样品溶解，并加入纤维素柱，以洗脱液（10mmol/L Tris·HCl，1mmol/L EDTA钠盐，0.05%SDS）洗脱后，可以收集到两个波长260nm光吸收峰的洗提液，首先洗脱出来的为含BVDV RNA的B峰，以凝胶电泳检查BVDV RNA。

琼脂糖平板凝胶电泳纯化：将B峰的BVDV RNA加乙醇沉淀，沉淀以TBE电泳缓冲液（89mmol/L Tris-硼酸，0.025mmol/L EDTA钠盐）溶解，加样在1.3%琼脂糖凝胶上电泳，电泳完毕以后，用吖啶橙染色，在紫外光下，因BVDV RNA是单链核酸而呈红色，且处于A.F.Purchio等人[6]所描述的电泳带的位置。将该含BVDV RNA凝胶带加入TNE缓冲液，于4℃浸泡过夜，然后于10000r/m，4℃离心20分钟（离心机GL20A型NO3转子），弃去凝胶微粒，BVDV RNA溶液加乙醇及醋酸钠，在−20℃，静置2小时以后，取出于10000r/m，离心20分钟（离心机GL20A型，NO3转子），弃去上清液，沉淀以无水乙醇漂洗三次，真空干燥备用。

BVDV RNA聚腺化：按L.W.Cashdollar等人方法进行[4]，取BVDV RNA约150μg，将反应混合物（50mmol/L Tris·HCl，pH7.9，10mmol/L $MgCl_2$，250mmol/L NaCl，40μg tRNA，2.5mmol/L $MnCl_2$，0.25mmol/L ATP）200μl加到盛有BVDV RNA的Eppendorf管中，再加

维普资讯 http://www.cqvip.com

入 50μg 小牛血清和 5 单位的 polyA 聚合酶，在37℃，反应10分钟，然后将聚腺化的 BVDV RNA 用苯酚-氯仿抽提，并用乙醇沉淀，沉淀用乙醇漂洗三次，真空干燥备用。

BVDV RNA 的 cDNA 合成：cDNA 合成按照麋克永等人改良的方法进行[7]，取 30μl 含100μg BVDV RNA 加入25μl 反应混合物（500mmol/L NaCl，15mmol/L KCl，15mmol/L $MgCl_2$，40 mmol/L DTT，3.3mmol/L dATP，dGTP，dTTP，225mmol/L Tris·HCl，pH8.3，50μg/ml 线菌素放D）、及100μci 的 α-^{32}p-dCTP，2μl 的AMV逆转录酶(500单位/10μl)在37℃反应 2 小时，然后加入10%SDS 2.5μl，3N NaOH 12μl，在37℃反应 3 小时，以此除去模板，加入6N HCl 6μl 中和碱性，备用。

cDNA电泳：以 α-^{32}P-dCTP 标记的 cDNA，用1.3 %琼脂糖凝胶平板电泳，电泳缓冲液为 TBE。待二甲基胺兰染料带迁移至平板长度70%左右位置时，停止电泳，取平板凝胶，放射自显影 4 天后，进行X光片的显影，定影处理，观察 cDNA 电泳图谱。

病毒核酸分子斑点杂交：将待试的 BVDV RNA，HCV RNA，以及作对照的酵母tRNA，置 80℃，2分钟，然后置冰浴骤冷，使其变性。用20×SSC（3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，0.2mmol/L EDTA钠盐）浸泡硝酸纤维素膜，将膜取出烘干以后，将上述经变性处理的核酸样品点在膜上并烘干，装入塑料袋，再加入预杂交液，在 55℃预杂交 3 小时以上，取出预杂交液，加入合成的 cDNA 液，在55℃杂交24小时，然后按Thomas.P.S[9]方法进行洗涤及自显影，从X光片观察电泳情况。

结果和讨论

一、BVDV 的提纯：病毒经过超滤，密度梯度离心处理以后，制备电子显微镜样品，以3 %磷钨酸负染并在电子显微镜下观察，可观察到典型的 BVDV粒子[8]，表明样品纯度较高（图版Ⅶ 1 ）。

二、BVDV RNA 的提纯：病毒样品提纯以后，所提取的核酸，在 210，220，230，240，250，260，280，290，300 nm 等波长下，测定 OD值，并绘制紫外吸收曲线。它具有典型核酸紫外吸收特征，且在 260nm的光吸收值为280nm光吸收值的 2 倍，这说明含有较纯的核酸（图2 ）。由于细胞内含有大量 DNA，后者比重有一部分接近病毒，在病毒液中混杂在一起极难除去，所以用DNase1 酶解 DNA，使其为小分子的 DNA 及单分子脱氧核苷酸，在乙醇沉淀时，由于难以沉淀而被除去。BVDV RNA 含有部分 polyA 尾端的 RNA 杂质，通过 oligo dT 纤维素柱亲和层析除去。该柱的 dT 长链对 A，dA 核苷酸序列有很强的亲和吸附能力，由于 BVDV RNA 没有 polyA 尾端及其长序列，所以难被该柱吸附，而含 polyA尾端及长序列 A 的 mRNA 和其 RNA 易被柱吸附，洗脱时比较困难，这样 BVDV RNA 首先被洗脱出来存于 B峰，而杂质核酸（含 polyA 的 RNA）存于 A 峰（图3 ）。B 峰的 BVDV RNA经琼脂糖凝胶电泳及吖啶橙染色，在紫外光下呈三条红色荧光带，且处于 A.F. Purchio 等人[6]描写的电泳带大致相同位置，鉴于该 BVDV RNA 为 ssRNA，吖啶橙染色时呈红色荧光，BVDV RNA 提取的材料为提纯的 BVDV 材料，所以确定该三条为 BVDV RNA 带（图版Ⅶ 4 ），含 BVDV RNA 凝胶经浸泡处理以后，获得纯化的 BVDV RNA。

国外学者在试验中证明 NADL 株 BVDV RNA 无 polyA 尾端[6]，我们在用此 oligo dT 纤维素柱层析试验，除提纯了 BVDV RNA 以外，结果也反过来说明 BVDV InL株

维普资讯 http://www.cqvip.com

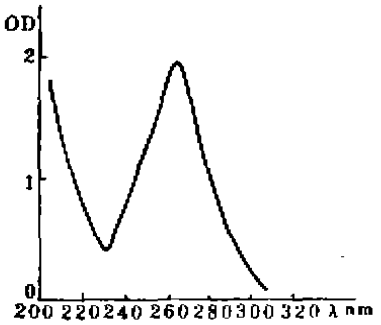

图2 BVDV RNA紫外吸收曲线

Fig 2. The ultraviolet absorption curve of the BVDV RNA

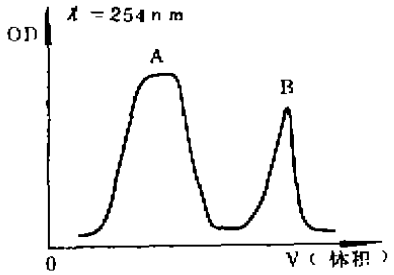

图3 oligo(dT)纤维柱亲和层析核酸洗提液紫外吸收曲线　A峰，不含polyA部分核酸；B峰，含polyA部分核酸

Fig 3 The ultraviolet absorption curve of the eluent acquired by the affinity chromatography of oligo(dT) cellulose column A. no polyA; B. contain polyA

RNA亦无polyA尾端。

三、BVDV RNA聚腺化及其cDNA合成：BVDV RNA的cDNA合成需有polyA序列与dT_{12-18}引物配对。BVDV RNA聚腺化以后，在逆转录酶的催化作用下作为模板合成cDNA。合成的cDNA中含有标记的α-^{32}P-dCTP，在进行琼脂糖凝胶电泳以后，以放射自显影方法，在X光片上呈现三条带，其位置与BVDV RNA电泳带位置相似（图版Ⅶ5），上述结果说明经逆转录合成的cDNA为BVDV RNA的cDNA。

国外学者应用polyA聚合酶在Pnemopathic BVDV RNA 3′羟基端接上ATP[8]，说明此病毒RNA 3′为羟基端，我们应用的毒株BVDV InL株亦有同样性质，这为今后开展分子生物学性质的研究提供了资料。

四、病毒核酸分子斑点杂交：以BVDV RNA为模板合成的含α-^{32}P-dCTP的cDNA作为探针，在硝酸纤维素薄膜上与BVDV RNA，HCV RNA及酵母tRNA的核酸分子杂交试验结果表明，前二者为阳性反应，出现斑点；后者为阴性反应，不显现斑点（图版Ⅶ6）。BVDV与HCV同属披盖病毒科瘟病毒属的成员，该成员在血清学上有共同抗原，在免疫双扩散测定中，HCV抗原对BVDV的抗血清能产生免疫沉淀线[3]，进一步推测这两种病毒蛋白的氨基酸序列有部分是相同的，编码蛋白的核苷酸序列也应有部分是相同的。我们获得的核酸分子杂交试验结果，说明这两种病毒的核酸具有同源性，证实了这种假说。

迄今国际上还没有采用核酸分子杂交方法作为分类标准。事实上目前就这种方法作为分类标准，数据还不够充分，但是我们认为目前可以作为分类鉴定中的一个参考数据，将来经过深入的研究，有可能成为分类标准之一。

本研究建立了BVDV RNA分离、纯化、cDNA的合成、核酸分子杂交技术，并确认该毒株的RNA具有3′羟基末端、无polyA尾端的性质，为研制该病毒基因工程疫苗及开展其它分子生物学的研究建立了基础。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕Pritchett.R.et al., 1975, Characterization of bovine viral diarrhea virus RNA, *J.of Virol*, 15：1342-1347.
〔2〕田波. 1986,《病毒与农业》, 科学出版社, 第139页.
〔3〕康克永等, 1987, 牛病毒性腹泻病毒的初步鉴定, 病毒学杂志, 1：69-75。
〔4〕王蕾等, 1989, 内蒙地区羔羊下痢病病毒病原的调查, 内蒙古畜牧科学, 3：31-33。
〔5〕Purchio.A.F, 1983, *J.Virol*, 48：320-324.
〔6〕L.William Coskdoller et al., 1982, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.79：7644-7648.
〔7〕康克永等, 1987, 畜业科学, 13(2)：86-94。
〔8〕Breer.K.V.et.al., 1988, *Can.J.Vet Res*, 52：451-457.
〔9〕Thomas.P.S., 1980, *Proc.Natl Acad, Sci.U.S.A*.77：5201.

cDNA Synthesis of BVDV RNA and the Research of Its Hybridization

Mi Ke-yong Wang Qiang Zhang Fang-dong

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

Xiang Xui-cheng

(*Hunan Agricultural College, Changsha*, 410128)

The BVDV (Bovine viral diarrhea virus) RNA is saRNA. After the virus was purified, the BVDV RNA was extracted by phenol-chloroform-isoamyl alcohl. The DNA contamination in the extracted BVDV RNA was degraded by DNase I. BVDV RNA was further purified by oligo dT cellulose affinity chromotography and agarose gel electrophoresis. The purified BVDV RNA was polyadenylated at the 3′ end under the catalysis of poly A polymerase. cDNA was synthesized with reverse transcriptase using the poly A-tailed BVDV RNA as template and oligo dT_{12-18} as primer. The result of agarose gel electrophoresis of cDNA showed that it was similar to its template of BVDV RNA. The cDNA probe bybridized with BVDV RNA, HCV RNA and yeast tRNA by the dot blot method. The BVDV RNA and HCV RNA were positive and yeast tRNA was negative. These results showed that synthetic cDNA was the cDNA of BVDV RNA. BVDV and HCV are members of the pestivirus in togaviridae.

维普资讯 http://www.cqvip.com

They had some identical antigens, so the sequences of RNA coded for viral proteins had the homologous parts of nucleotide sequences. The studies proved this conjecture.

Key words: Bovine viral diarrhea virus Hog cholora virus Complementary DNA