185—188
6055(14)

第8卷第2期
1993年6月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.2
Jun.1993

草鱼出血病病毒基因组体内转录的研究

张保焰* 柯丽华

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）

S94.41

提 要

本文采用α-[^{32}p]ATP标记物在鱼肾细胞系（CIK）系统中，对草鱼出血病病毒（Grass carp hemorrhage virus, GCHV）基因组进行了体内转录的研究。通过放线菌素D抑制宿主细胞基因组的转录活动，从感染病毒细胞中分离出病毒的mRNA，分别采用液相杂交和Northern blot方法检查病毒mRNA的转录情况。试验结果表明，GCHV含有内源性转录酶，其基因组的转录活动是在病毒感染细胞后4小时开始，由早期基因所转录，8—10小时获得晚期基因的转录产物。这些mRNA的大小、数目大体上与病毒基因组一致。

关键词：草鱼出血病病毒 基因组 体内转录

草鱼出血病的研究已有十余年的历史[1]，而病原的确定则是在八十年代初。1983年，中国科学院武汉病毒所及其协作组从患出血病的草鱼中分离到此病原[2]，经初步研究暂定名为鱼呼肠孤病毒[3]。对病毒的形态结构、基因组与多肽等方面的研究表明，草鱼出血病病毒具有呼肠孤病毒科的主要特征[4,5]。近几年深入而系统的研究揭示，此病毒应为呼肠孤病毒科的新属和新种。

对于呼肠孤病毒的研究，尤其是关于呼肠孤病毒属(Reovirus)和轮状病毒属（Rotavirus），国外已有较深入的工作[4-9]，如病毒复制过程中的mRNA转录、加工、剪接以及分子克隆等[10]的研究。国内在家蚕质型多角体病毒方面也进行过类似的工作。我国对鱼类病毒的研究起步较晚、对草鱼出血病病毒的分子生物学研究刚刚开始，尚未见有关体内转录的研究报道。为了弄清该病毒基因组的体内转录过程，进一步研究病毒的复制和防治出血病，我们对GCHV基因组的体内转录进行了研究，现将其结果报道如下。

材料与方法

一、材料：

1. 病毒：$GCHV_{873}$由本实验室提供。

本文于1991年11月5日收到，1992年9月17日修回。

* 现在地址：中科院上海生化所，上海，200031.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2. 细胞：鱼肾细胞系（CIK）由本实验室提供。

二、细胞培养和病毒增殖：参照本实验室常规方法进行[11]。

三、病毒基因组的SDS-PAGE和琼脂糖凝胶电泳：

按照本实验室常法[4]提出病毒dsRNA，然后采用Laemmli系统[12]进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（凝胶浓度为7%），琼脂糖凝胶电泳所用凝胶浓度为1%。电泳后，凝胶经EB染色，紫外灯下观察试验结果。

四、病毒mRNA的标记与分离：感染了病毒的细胞，在含有放线菌素D的病毒培养液中培养，于不同时间向培养液加入α-[^{32}P]ATP（2.5μci/ml），继续培养2小时。收集细胞，用冷的SSC(0.15mol/L氯化钠,0.015mol/L柠檬酸钠,pH7.4)洗一遍，再溶于低渗溶液RSB（0.01mol/L氯化钠，0.01mol/L三羟甲基氨基甲烷,0.0015mol/L氯化镁，pH7.4)，置0℃ 15分钟，8000g离心3分钟，上清液加入1% SDS和0.2mol/L氯化钠，室温下放置15分钟后用2倍体积无水乙醇沉淀过夜，收集沉淀并悬浮于0.05mol/L醋酸钠，0.01mol/L EDTA（pH5.1）溶液中，再加1%的SDS和0.5mol/L高氯酸钠，充分混匀，以等体积的氯仿-异戊醇（24：1）混合并用力振荡3分钟，置冰浴15分钟，低速离心后之上清液再用氯仿抽提一次，无水乙醇沉淀过夜，然后离心收集沉淀并溶于消毒双蒸水中，再加入4mol/L氯化锂，于4℃过夜[13]。16000r/m离心10分钟，所得沉淀溶于少量双蒸水即为病毒mRNA溶液。

五、杂交试验：病毒mRNA与基因组的杂交试验采用两种方法进行。

1. 液相杂交，参照Watanabe等人的方法[14]进行。病毒基因组dsRNA与标记的mRNA充分混合于0.01mol/L STE(0.01mol/L NaCl,0.01mol/L Tris-HCl pH7.4，0.001mol/L EDTA）中，再加入9倍体积二甲基亚砜(DMSO)，于37℃保温30分钟变性，加4倍体积的无水乙醇一20℃下沉淀过夜，离心收集沉淀并用70%乙醇洗涤两遍除去DMSO，再溶于0.3mol/L STE（0.3mol/L NaCl，0.01mol/L Tris-HCl pH7.4，0.001mol/L EDTA）中，于65℃水浴反应10小时。杂交产物以2倍体积的无水乙醇沉淀并进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

2. Northern blot法，用于琼脂糖凝胶电泳分析的病毒核酸，上样前先经戊二醛和DMSO变性[15]，电泳后直接进行Northern转移[16]，烘干转移后的硝酸纤维素膜（NC）并作预杂交，杂交反应时只需在杂交袋内加入已标记的mRNA，再加10ml 6×SSC溶液，65℃保温24小时，然后真空干燥，经放射自显影后观察试验结果。

六、核糖核酸酶的处理试验：

病毒mRNA及杂交产物的核酸酶处理试验按照Bellamy[17]和蔡良婉[18]方法进行。

结 果

一、病毒基因组的聚丙烯酰胺凝胶电泳与琼脂糖凝胶电泳分析

GCHV基因组在7%的聚丙烯酰胺凝胶电泳中，11条带清晰可见，且大致可分为4组（如图版Ⅲ 1 A），而在1%的琼脂糖凝胶电泳中，只能显示出四条宽带（图版Ⅲ 1 B），相对于病毒基因组的四个组，即使改用3%的琼脂糖也未能取得满意的效果（材料未示）。

二、病毒mRNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳

病毒基因组体内转录产物经SDS-PAGE和放射自显影显示了转录阳性的结果（图版Ⅲ 2A）。而相同产物经10μg/ml RNase 37℃消化30分钟后进行同样试验则呈阴性反

维普资讯 http://www.cqvip.com

应（如图版Ⅲ2B），这是因为转录产物被核酸酶完全消化的缘故，从而说明，标记产物是单链RNA。

三、病毒基因组和病毒mRNA分子杂交试验

1. 液相杂交

病毒感染细胞后4—6小时及8—10小时标记的mRNA分别与病毒基因组杂交，杂交产物经Northern杂交后的放射自显影结果如图版Ⅲ3所示。从该图看出，4—6小时及8—10小时转录产物的杂交结果均显示四组带，对应于病毒基因组的四组（图3、图1），并且杂交产物经10μg/ml RNase消化后仍不消失。从而推断，标记的转录产物和病毒基因组的核苷酸序列互补，形成双链才具有抵抗一定浓度的RNase酶解作用。上述试验表明，标记产物是病毒的mRNA，这两组不同时间区域的mRNA分别为病毒早期和晚期基因转录所致。4小时开始为早期基因所转录，8小时后由晚期基因行使转录功能，与Chang[10]及Silverstein[20]的结果基本一致。

2. Northern印迹杂交

病毒感染细胞8—10小时标记转录产物和NC膜上dsRNA杂交，在X光片上显示出与晚期基因转录产物在液相杂交中的结果相似。但是，Northern blot杂交结果（图版Ⅲ4）能展示出病毒基因组11条转录产物的电泳图谱，而液相杂交试验结果只能显示出相应于基因组四组转录产物的大体位置。此结果说明采用Northern blot方法进行转录产物杂交分析的效果比用液相杂交后电泳的效果好。图4上的带尚不十分清晰，这可能是由于标记物过量，使分子量近似的带相连成片所致。

图1. GCHV基因组的SDS-PAGE模式与琼脂糖凝胶电泳模式的比较（图见后）
Fig 1. Comparison between patterns of GCHV genome in SDS-PAGE and agarose gel electrophoresis A. SDS-PAGE; B. agarose gel electrophoresis.

图2. GCHV mRNA的SDS-PAGE放射自显影
Fig 2. Autoradiograph of SDS-PAGE of GCHV mRNA M. pattern; A. GCHV mRNA before digestion by RNase; B. GCHV mRNA after digestion by RNase.

图3. GCHV mRNA与基因组液相杂交产物的放射自显影
Fig 3. Autoradiograph of the hybridization products in liquid phase of GCHV genome to its mRMA. A. Hybridization products 4—6h after infection. B. 8—10h after infection.

图4. GCHV基因组与mRNA的Northern blot杂交产物的放射自显影
Fig 4. Autoradiograph of the Northern blot hybridization products of GCHV genome and its mRNA

讨　论

呼肠孤病毒基因组的体内转录，通常分为两个时期即早期和晚期，早期是RNA聚合酶以感染细胞的病毒dsRNA为模板进行转录，晚期则是以子代病毒基因为模板进行转录[18,19]，两者的转录并无大差别，只是转录模板来源不同而已。本实验在两个时间分离到的信使RNA分别代表着早期和晚期基因的转录产物。对于mRNA在体内何时出现，各个报道不一，Bellamy等人[18]用呼肠孤病毒三型进行研究，认为病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

mRNA 出现是在感染细胞后 5 — 6 小时。Zweerink 和 Joklik[21] 在病毒感染细胞后 2 小时即检测到它的 mRNA。本研究也曾在病毒感染细胞后 2 — 4 小时进行分离，但未获得转录产物。因此，我们初步认为，草鱼出血病病毒基因组的体内转录是在病毒感染细胞 4 小时后开始。

参 考 文 献

〔1〕 中国科学院水生生物研究所第三研究室病毒组，1978，水生生物学集刊，6(2)：321—328 。
〔2〕 中国科学院武汉病毒研究所，中国水产科学院长江水产研究所沙市分所，1983，淡水渔业，(3)：39。
〔3〕 中国科学院武汉病毒研究所，中国水产科学院长江水产研究所沙市分所，1984，淡水渔业，(4)：7—9。
〔4〕 柯丽华等，1990，水生生物学报，14(2)：153—159。
〔5〕 王炜等，1990，病毒学报，6(1)：44—49。
〔6〕 Shatkin, A. J. 1965a, *Biochem. Biophysi. Res. Common.*, 19：500—510.
〔7〕 Shatkin, A. J. 1965b, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54：1721—1728.
〔8〕 Watanabe Y. et. al, 1967b, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58：1040—1046.
〔9〕 Bellamy, A. R. and Joklik, W. K. 1969a, *J. Mol. Biol.* 29：19—26.
〔10〕 Vechiel Becker., 1985, Viral Message RNA, Mrtinus Nijhoff Publishing.
〔11〕 方勤等，1989，病毒学杂志，4(2)：20—23.
〔12〕 Loemmli H. K., 1970, *Nature*, 227：680—685.
〔13〕 David Balfimore., 1966, *J. Mol. Biol.* 18：421—428.
〔14〕 Watanabe, Y. et al, 1967, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55：1040.
〔15〕 McMaster, Gik and Carmichael G. G., 1977, *Proc. Natl. Acad.Sci., U.S.A.* 74：4835.
〔16〕 Thomas D. S. 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 77：5201.
〔17〕 Bellamy A. R. et al., 1967, *J. Mol. Biol.*, 29：1—17.
〔18〕 蔡良婉，1978，核酸研究技术，科学出版社。
〔19〕 Chang C. T. and Zweerink H. J. 1971, *Virology* 40(3)：544—550.
〔20〕 Silverstein et al. 1972, *Virology* 47(3)：797—806.
〔21〕 Zweerink H. J. and Joklik W. K. 1970, *Virology*, 41：501—508.

Studies on in Vivo Translation of Grass Carp Hemorrhage Virus Genome

Zhang Baoyan Ke Lihua

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

Studies on grass carp hemorrhage virus (GCHV) genome transcription in vivo have been carried out. Viral mRNA labeled with α-^{32}p ATP was extracted from infected cells treated with actinomycin D and detected by means of liquid phase hybridization and Northern blot hybridization. The results showed that the early and late stage mRNA were transcribed at 4hr and 8hr after infection and roughly divided into four groups, among which each one corresponds to the relative viral genome segment.

Key words: Grass carp hemorrhage virus Viral genome In vivo transcription