

兔出血症病毒信使 RNA 的分离纯化及其生物活性的鉴定

龚晓明 杜念兴

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

曹 颀 陈清轩 宋德秀

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100081)

S852.65

A 提要 用液相免疫沉淀法从感染兔出血症病毒(Rabbit Haemorrhagic Disease Virus, RHDV)8小时后的兔肝组织的多聚核糖体中,分离出 RHDV 特异性的多聚核糖体,并由此获得全核酸,经 Oligo(dT)-cellulose 亲和层析,得到 3.4A₂₆₀的 RHDV poly(A)⁺RNA 占全核酸的 3.5%。此 Poly(A)⁺RNA 经甲醛变性琼脂糖电泳,得到 6 条单一的带,其大小分别为 0.95、1.22、1.82、2.40、3.63 和 5.01kb。在兔网织红细胞体外翻译体系中,此 Poly(A)⁺RNA 能促进³H-亮氨酸的掺入,其掺入量为对照组的 6.3 倍。翻译产物经 SDS-PAGE 和免疫转印可得到 6 条带,分子量分别为 64.56、58.88、53.70、51.40、28.44 和 23.98kD。

关键词 兔出血症病毒,信使 RNA,多聚核糖体,免疫沉淀,体外翻译

分离

兔出血症病毒(Rabbit Haemorrhagic Disease Virus, RHDV)是 1984 年我国首先分离到的一种兔的新病毒。在过去的几年中,国内外学者对其形态、形态发生、理化特性、生物学特性、病理发生等方面进行了深入细致的研究^[1]。然而,在该病毒的初期研究中,由于病毒纯化方面的困难和方法的不一致,对病毒核酸和蛋白质的研究存在争论。1988 年后,对 RHDV 核酸,国内遂于确定为单链 DNA^[2];但欧洲的报道认为是单链 RNA,归属嵌杯状病毒科^[3]。

本研究采用液相免疫沉淀技术,旨在分离纯化兔出血症病毒特异性的信使 RNA,并对其生物活性进行鉴定,为进一步合成 cDNA,构建 RHDV cDNA 文库,并从文库中筛选出编码相应的病毒结构蛋白基因提供首要条件;为 RHDV 基因工程疫苗的研究奠定基础。

材料与方 法

- 1 病毒和易感兔** RHDV-南京株由本实验室保存,易感兔由北京农业大学兽医学院微生物室杨汉春先生提供。
- 2 试剂** 兔网织红细胞体外翻译试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。超纯蔗糖(无核酸酶)为 BRL 公司产品, Oligo(dT)-Cellulose 为 Sigma 产品。
- 3. 器皿和溶液的处理** 在分离多聚核糖体和纯化 mRNA 时,为了防止和减少核酸酶的污染,全部玻璃器皿都需经 1%SDS 溶液处理,200℃烘烤 2—3 小时,所有塑料制品和缓冲液在使用前必须高压灭菌。
- 4 抗体的制备** 按文献^[4]进行,用提纯的 RHDV 经冻融裂解后,加佐剂免疫新西兰兔,免疫琼脂扩散效价达

本文于 1994 年 3 月 21 日收到,11 月 7 日修回

64时,取血分离抗血清。

5 抗体的纯化 按文献^[4]进行。抗血清经饱和硫酸铵沉淀, Sephadex-G25 脱盐, SPA-Sepharose-4B 亲和层析, 除去核酸酶。山羊抗兔 IgG 也按文献^[4]纯化, 除去核酸酶。

6 感染 RHDV 的兔肝组织多聚核糖体的制备 按 J. P. Kraus 和 L. E. Rosenberg 的方法^[5]进行。

7 免疫沉淀 RHDV 特异性的多聚核糖体

7.1 分析试验 按 Schechter^[6]的方法进行。实验结果如表 1 所示。

7.2 制备试验 感染 RHDV 兔肝组织总多聚核糖体(约 20ml), 加入 10mg 兔抗 RHDV 抗体, 4℃保温 30 分钟后, 加入 120mg 羊抗兔 IgG 抗体, 4℃保温 60—90 分钟。通过 1mol/L 的蔗糖垫, 2℃离心 12,000r/min (Sorvall SS34 转子)、沉淀用 10ml 多聚核糖体缓冲液悬浮, 37℃保温 30 分钟后, 经酚: 酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)

表 1 RHDV 多聚核糖体液相免疫沉淀的分析性试验

Table 1 Analytical immunoprecipitation of polysomes by the double antibody Technique

	管号 Tube No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
反应组分 ^①										
Reaction Components ^①										
多聚核糖体 ^②	200	200	200	200	0	0	0	0	200	200
Polysomes ^②										
补加溶液 C ^③	110	106	102	98	310	306	302	298	390	114
Solution C Supp ^③										
纯化 RHDV 抗体 ^④	4	8	12	16	4	8	12	16	10	0
Pu. Ab. to RHDV ^④										
纯化抗兔 IgG 抗体 ^⑤	286	286	286	286	286	286	286	286	0	286
Pu. Ab. to Rabbit-IgG ^⑤										
结果										
Results										
A ₂₆₀	1.74	2.63	3.96	3.87	0.96	1.71	1.98	1.47	2.28	
A ₂₈₀	1.43	2.14	3.02	2.86	0.83	1.00	1.47	1.50	0.82	2.27
* A ₂₆₀	0.85	1.67	2.25	1.89						
* A ₂₈₀	0.60	1.14	1.55	1.36						
沉淀多聚核糖体的百分比 ^⑥										
Polys. Precip. From(%) ^⑥										
* A ₂₆₀	4.25	8.35	11.3	9.45						
* A ₂₈₀	4.01	7.60	10.3	9.06						

①加入反应的微升数。

②兔肝总多聚核糖体量(100A₂₆₀单位/ml)。

③溶液 C (0.25M 蔗糖, 0.2mg/ml 肝素, 1μg/ml 环己酰亚胺和 0.1%NP-40)。

④10mg/ml 的纯化兔抗 RHDV 抗体。

⑤5.6mg/ml 的纯化羊抗兔 IgG。

⑥从兔肝总多聚核糖体悬液中沉淀 RHDV 多聚核糖体的百分比。

①Numbers represent μl of reactant added.

②Suspension of the total polysome from rabbit liver, 100A₂₆₀ units/ml.

③Solution C supplemented with 0.25mol/L sucrose, 0.2mg/ml heparin, 1μg/ml cycloheximide and 0.1%NP-40.

④10mg/ml of purified rabbit anti-RHDV antibodies.

⑤5.6mg/ml of purified goat anti-rabbit IgG.

⑥Percentage of precipitated polysome * A₂₆₀ and * A₂₈₀ values with the corresponding absorbance of the original polysome suspension, multiplied by 100.

提取 RNA 用 2.5 倍体积预冷无水乙醇-70℃ 沉淀 1 小时, 12,000r/min 离心, 沉淀用 70% 乙醇洗后, 干燥, 溶于 TE(pH7.5) 中。

8 RHDV Poly(A)⁺RNA 的纯化 参照 T. Maniatis 等^[7]的方法进行。

9 RHDV Poly(A)⁺RNA 的大小鉴定 采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 按 Lebrach^[7]等人的方法进行。

10 RHDV Poly(A)⁺RNA 生物活性的鉴定 RHDV Poly(A)⁺RNA 在兔网织红细胞体外翻译体系中的活性测定, 参照试剂盒说明书进行。

11 RHDV Poly(A)⁺RNA 翻译产物的鉴定 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析参照李永兴等^[8]方法进行。

结 果

1 兔出血症病毒及其抗体的纯化

取感染 RHDV 48 小时或死于 RHDV 的病兔肝组织, 经匀浆、反复冻融、氯仿处理、PEG 沉淀和蔗糖密度梯度离心后, 得到的病毒悬液再经 Sepharose-4B 柱层析, 可得到纯度较高的 RHDV (图 1); 此病毒悬液经琼脂糖电泳鉴定可得到一条清晰的病毒带。用纯化的 RHDV 免疫新西兰兔获得兔抗 RHDV 血清, 经 SPA-Sepharose-4B 亲和层析得到纯化的 RHDV 抗体, 再经双向免疫琼脂的扩散鉴定, 可得到清晰的沉淀线, 效价为 64。

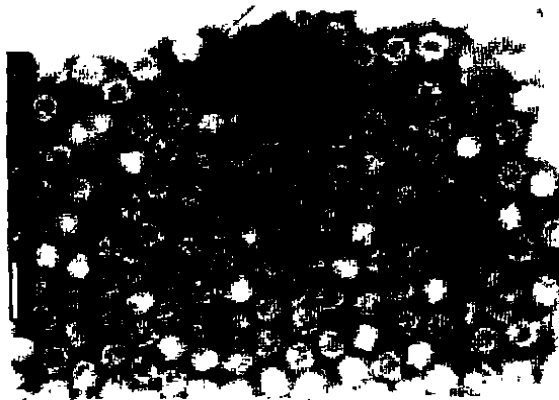


图 1 纯化兔出血症病毒颗粒电镜图

Fig 1 Electron microscopy of purified virions after negative staining with 1% uranyl acetate

2 多聚核糖体免疫沉淀分析试验

特异性多聚核糖体间接免疫沉淀取决于第一抗体对转译的新生肽链的识别, 以及第二抗体与第一抗体充分结合物的浓度。通过免疫沉淀分析试验, 测定沉淀 RHDV 特异的多聚核糖体的最佳条件。图 2 是用不同浓度的兔抗 RHDV 抗体所沉淀的 RHDV 特异的多聚核糖体百分比柱状图。实验表明, 在加入 1.5mg 羊抗兔 IgG 的条件下, 当兔抗 RHDV 抗体量达 120μg 时, 沉淀的多聚核糖体百分比最大 (约 11%)。

3 RHDV Poly(A)⁺RNA 的分离和纯化

用不连续蔗糖密度梯度超离心方法, 从 60g 感染 RHDV 8 小时后的兔肝组织中, 获得约 1800A₂₆₀ 单位的多聚核糖体。按分析实验的条件, 用双抗体免疫沉淀法, 从 1800A₂₆₀ 的肝组织多

聚核糖体中得到 191A₂₆₀ 的 RHDV 特异的多聚核糖体,得率为 10.6%。此多聚核糖体经抽提,获得 97A₂₆₀ 的全核酸, $A_{260}/A_{280}=2.0$, 此核酸经 Oligo(dT)-cellulose 亲和层析,获得 3.4A₂₆₀ RHDV Poly(A)+RNA, 如图 3 所示,占全核酸的 3.5%。

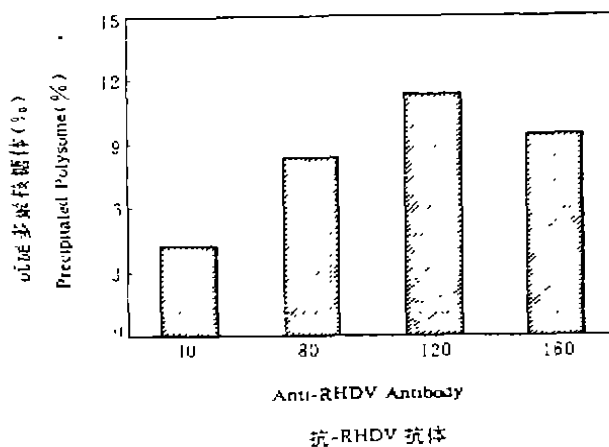


图2 不同浓度的兔抗 RHDV 抗体沉淀 RHDV 特异的多聚核糖体百分比柱状图

Fig 2 Precipitation bars of RHDV polysomes as a function of antibody concentration. Constant amounts of RHDV polysomes (20A₂₆₀ units per tube) were reacted with increasing amounts of rabbit anti-RHDV antibody and then with goat antibody (1.6 mg).

4 RHDV Poly(A)+RNA 的大小测定

用甲醛变性琼脂糖电泳鉴定了免疫沉淀法提取的 RHDV Poly(A)+RNA, 结果如图 4 所示。制备物在甲醛变性凝胶电泳中呈 6 条单一的带, 其片段大小分别为 0.95, 1.22, 1.82, 2.40, 3.63, 5.01kD。

5 RHDV Poly(A)+RNA 生物活性鉴定

本实验采用兔网织红细胞体外翻译体系测定 RHDV Poly(A)+RNA 和 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 的生物活性, RHDV Poly(A)+RNA 和 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 在这个体系均可促进³H-亮氨酸的掺入。由表 2 可见, 加入 5 μ g RHDV 特异的多聚核糖体 RNA, 其掺入量为对照组的 4.7 倍, 而 1 μ g RHDV Poly(A)+RNA 的掺入量为对照组的 6.3 倍, 据此计算 RHDV Poly(A)+RNA 的翻译活性为 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 的 6.7 倍。

6 RHDV Poly(A)+RNA 体外翻译产物的鉴定

RHDV Poly(A)+RNA 和 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 在兔网织红细胞翻译体系中的翻译产物经 11% SDS-PAGE 分析, 结果显示在 25kD 至 65kD 之间有蛋白带。翻译产物进一步进行免疫转印鉴定, 结果表明 RHDV Poly(A)+RNA 指导的蛋白合成, 经免疫印迹可得到 6 条多肽带, 分子量分别为 64.56, 58.88, 53.70, 51.40, 28.84, 23.98kD, 而 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 仅在 65kD 处显示出 1 条带(图 5)。

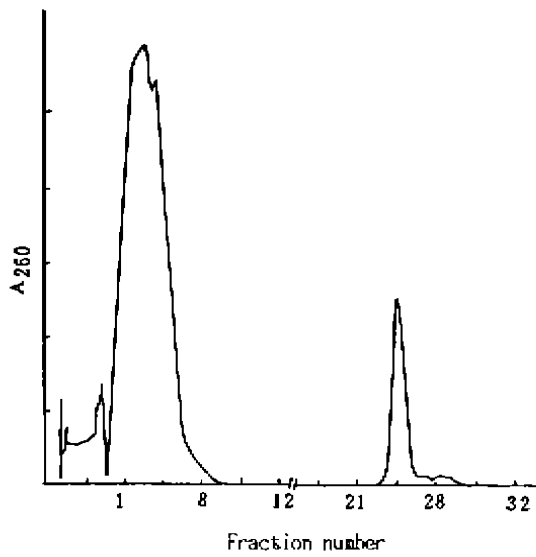


图 3 RHDV 多聚核糖体 RNA oligo(dT)-cellulose 亲和层析图

A 峰:缓冲液 A 洗脱物; B 峰:缓冲液 B 洗脱物。

Fig 3 Oligo (dT)-cellulose Chromatography of RHDV Polysomal RNA.

Peak A, material eluted with buffer A

Peak B, material eluted with buffer B.

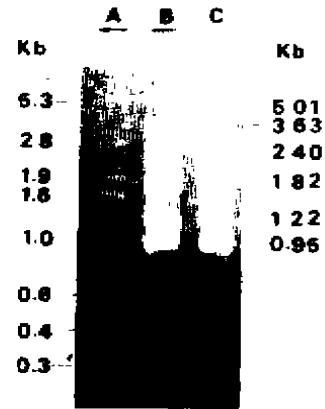


图 4 RHDV Poly(A)+RNA 的甲醛变性琼脂糖电泳图

A:DNA 标记物; B 和 C:RHDV Poly(A)+RNA。

Fig 4 Electrophoresis of the RHDV Poly(A)+RNAs by 1% agarose gel containing formaldehyde.

A. RNA molecular weight marker; B. RHDV Poly(A)+RNAs,

C. RHDV Poly(A)+RNAs.

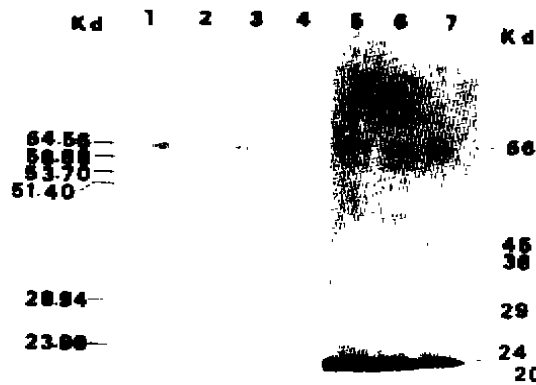


图 5 RHDV Poly(A)+RNA 和 RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 体外翻译产物的 SDS-PAGE 和免疫转印分析

1 和 3:RHDV Poly(A)+RNA; 2 和 4:RHDV 特异性多聚核糖体 RNA 的翻译产物; 5 和 6:SDS-PAGE; 7:分子量参照物。

Fig 5 Analysis of *in vitro* translation products using RHDV mRNA and total RHDV specific polysomal RNA in a Rabbit Reticulo-cyte Lysate Translation System.

Lane 1, 3, 5: translation products of RHDV mRNA. Lane 2, 4, 6: translation products of total RHDV specific polysomal RNA.

Lane

7: marker, the sizes are indicated in kilodaltons.

表2 外源 RHDV RNA 指导的翻译系统³H-亮氨酸的掺入量Table 2 ³H-Leucine incorporation in translation system directed by exogenous RHDV mRNA

RNA	掺入量 Incorporation (cpm/ul)	掺入倍数 Incorporation (-fold)
无外源 RNA(对照) Control RNA	1.3 × 10 ³	1.0
RHDV 特异的多聚核糖体 RNA RHDV specific polysomal RNA (5μg)	6.1 × 10 ³	4.7
纯化的 RHDV mRNA Poly(A)+RNA(4μg)	8.2 × 10 ³	6.3

讨 论

兔出血症病毒的感染性极强,在体内、体外复制很快。大量病理形态发生和抗原发生动态等资料表明,在 RHDV 感染 4—8 小时内,即可在兔肝组织中检测到病毒抗原^[9],并且在细胞中可见大量核糖体颗粒堆积^[10]。感染 8—12 小时后的兔肝组织细胞中可发现病毒粒子,大小为 32—34nm^[10]。RHDV 短时间的形态发生特征必然有赖于病毒基因组的有效转录和大量表达。本实验的结果表明在 RHDV 感染 8 小时内,从兔肝组织中分离到 RHDV 特异的 mRNA 占全核酸的 3.5%。这样高丰度的 mRNA 在编码肝组织的各种结构或功能性的蛋白质中也很少,表明 RHDV 基因组在活体内转录和翻译的速度极快。RHDV 人工感染易感兔时,最急性者 24 小时即可导致死亡,病死兔肝的血凝价可达 10×2^{20} ,推断本病毒在活体内繁殖速度很快,而本实验为这一现象提供了直接证据。

用抗 RHDV 抗体分离到的 RHDV 特异的 mRNAs 是病毒基因组全部编码的信息。这些 mRNAs 分子大小的测定对估测病毒基因组转录状况甚为重要。在变性条件下,显示较为均一的 RHDV mRNA 单带(图 4),其大小在 5.0kb 之间。这一结果提示 RHDV 基因组编码结构和非结构蛋白,但何者编码结构蛋白,何者编码非结构蛋白有待进一步分析。

在兔网织红细胞体外翻译系统中,兔出血症病毒 mRNAs 的特殊比活为对照的 6.3 倍,而且高出免疫沉淀的多聚核糖体 RNA 6.7 倍(表 2),这表明 RHDV mRNA 是完整的,具有生物学活性,其翻译产物经 SDS-PAGE 和免疫转印分析进一步证明免疫沉淀获得的病毒 mRNA 包含 RHDV 蛋白编码信息。由于病毒纯化方法不同,报道的 RHDV 多肽数目也各不相同。F. Parra 等^[12](1990)对氯化铯梯度纯化的病毒进行了 SDS-PAGE 和免疫印迹分析,在 SDS-PAGE 中发现分子量为 60kD 的一条主带,以及 85、56、40、30kD 和小于 20kD 的共 5 条次要多肽,且只有 60kD 和小于 20kD 者能为康复血清识别。同年, Rodak 等^[13]对氯化铯梯度纯化的病毒的多肽分析结果表明,61、52 和 38kD 3 条带很清楚地为 SDS-PAGE 和 Western blot 检出,61kD 为最主要多肽。张全顺等^[1](1991)用单克隆抗体对 RHDV 的结构多肽进行了分析,纯化病毒经 SDS-PAGE 和 Western blot 显示 6 条带,分子量分别为 60、58、55、53、51 和 26kD。但 V. F. Ohlinger 等^[3](1990)报道 RHDV 只有一条主要多肽(60kD)。与上述报道的 RHDV 多肽分析结果相比,

本实验病毒 mRNA 翻译产物的免疫印迹图谱和张全顺以及 Rodak 等报道的结果基本一致。因此,有理由推测 RHDV 多肽至少由 4 种组成,其中 64—60kD 的主要多肽为目前所确认。在体外翻译系统中,大分子 mRNA 成熟前翻译终止是个重要问题,这样翻译产物分子量与病毒多肽的分子量会有差异,但体外翻译系统可以防止病毒 mRNA 的初级翻译产物(前体多肽)免受细胞内蛋白水解酶作用。因此,可以排除 RHDV 结构多肽由单一病毒 mRNA 编码的可能性。本实验中,RHDV 特异的多聚核糖体 RNA 翻译产物只检测到 64kD 一条多肽。这可能是在体外翻译系统中多聚核糖体 RNA 比 mRNA 翻译效率低的缘故,尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 杜念兴,徐为燕,刘胜江,等.兔出血症研究.中国农业科学,1991;24(1):1-10
- 2 邓瑞堂,杜念兴,徐为燕.兔出血症病毒及其核酸特性鉴定.南京农业大学学报,1987;10(2):110-114
- 3 Ouliger V F, Haas B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J Virol*, 1990;64(7):1333-1336
- 4 Harlow E. Antibodies; A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988
- 5 Kraus J P, Rosenberg L E. Purification of low-abundance messenger RNA from rat liver by polysome immunoprecipitation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980;79:4015-4019
- 6 Schechter L. Use of antibodies for the isolation of biologically pure mRNA from fully functional eukaryotic cells. *Biochem*, 1974;13(9):1875-1885
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning; A laboratory manual. Second edn, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 李永兴.一种半干式免疫转印方法.生物化学和生物物理进展,1991;18(3):242-243
- 9 徐福南,沈维平,刘胜江.兔病毒性出血症的超微结构研究.畜牧与兽医,1985;(6):244-245
- 10 Gong Xiaoming, Ji Chuanyi. Systematic morphogenesis of the viral haemorrhagic disease virus in infected rabbit and indapted cell culture. *Rep Sci Tech Off int Epiz*, 1991;10(2):499-511
- 11 Fara F, Prieto M. Purification and characterisations of a calicivirus as the causative agent of a lethal haemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 1990;64(8):4013-4015
- 12 Rodak L, Granatova L, Valicek I, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J Gen Virol*, 1990;71:1075-1080

Rabbit Haemorrhagic Disease Virus; Isolation of Messenger RNA and Identification of Its Activity

Gong Xiaoming Du Nianxing

(Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Cao Jie Chen Qingxuan Song Desiu

(Institute of Develop Mental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Poly(A)⁺RNAs enriched with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) proteins were isolated from RHDV-infected rabbit liver tissue by polysome immunoprecipitation and purified by oligo (dT)-cellulose chromatography. The purified poly (A)⁺RNA was identified through denatural agarose elec-

trophoresis. Six single narrow bands, 5.01, 3.62, 2.40, 1.82, 1.22 and 0.95 kb respectively, were visualized. The *in vitro* translation products of viral mRNAs have been demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting analysis, proteins with molecular weight of 64, 59, 54, 51, 29, 24 and 20kD were shown RHDV-specific.

Key words Rabbit haemorrhagic disease virus, Messenger RNA, Polysome immunoprecipitation, *in vitro* translation