维普资讯 http://www.cqvip.com

183-186 15976(15)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

棉铃虫核型多角体病毒 mRNA 的快速制备与体外翻译

吴金炉* 刘润忠 张友清
(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

Q965.8 昆虫病毒

关键词 棉铃虫核型多角体病毒,mRNA,快速制备,体外翻译,ELISA

在昆虫杆状病毒 mRNA 的结构与功能研究方面,主要是以 AcNPV 为研究对象[1]。八十年代初,Jun-chuang,Q. Vlak 等相继报道了 AcNPV mRNA 3′-端 poly (A) 接尾与 5′-端的"帽子"结构[2]。另一方面,通过对 mRNA 的转录及翻译研究,已构建了多种类型的基因表达调控模式,但是国内外还未见有关 HaNPV mRNA 的研究报道。本研究以感染 HaNPV 的棉铃虫虫体为实验材料,对 mRNA 的制备方法,mRNA 翻译活性及其特异性检测等方面进行了探讨,取得一定结果,现报道如下:

材料和方法

1 **材料与试剂** 中国棉铃虫及 HaNPV 均由本实验室提供,兔网织红细胞体外翻译试剂盒从 Promega 公司购买。

2 **HaNPV DNA 的制备** 收集感染 HaNPV 的死虫提纯多角体。DNA 的提取参照金明洁[3]的方法,经 $OD_{260/280}$ 值测定浓度和纯度。

3 **总 RNA 的制备** 参照蔡良婉[4]的方法作如下修改:①虫体匀浆时加入 4 mol/L 的异硫氰酸胍(GIT)缓冲液抑制 RNase 活性。②用酸酚法代替 GIT-热酚法抽提 RNA,制备总 RNA。

4 **杂交选择病毒特异性 mRNA** 将提纯的 HaNPV DNA 变性,固定在 NC 膜上,置杂交袋中,加入预杂交液 37 ℃杂交 2 h,去除预杂交液,换入杂交液 37 ℃杂交 8 h 后,不同温度下分四步洗膜[5]每步 3 min、3 次,收集洗脱液,-20℃贮存备用。

5 **mRNA 的体外翻译** 取杂交洗脱后的 mRNA 水溶液,用兔网织红细胞体外翻译试剂盒进行 mRNA 翻译[6],以 ^{35}S-Met 作标记,设无 mRNA 的空白对照。

6 **翻译产物的 ELISA 测定** 以 HaNPV 多角体蛋白和核衣壳蛋白作为混合抗原,按常规方法制备抗血清。以聚苯乙烯微量板作载体,再以翻译样品作为抗原,设阳性、阴性和空白对照进行 ELISA 检测,并在 492 nm 处测各组样品光密度值,每样品取四孔平均值,列表比较。

7 **翻译产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳与放射自显影分析** 用 5% 的浓缩胶,10% 的分离胶进行电泳,考马斯亮兰染色后,在 60 ℃抽真空干燥 2 h 后,照相,然后进行放射自显影,X 光片冲洗后再翻拍照片。

结果与讨论

1 总 RNA 纯化

经分离、纯化所得的总 RNA,$OD_{260/280}$ 为 1.95,表明 RNA 制品达到要求。据 OD_{260} 计算,

本文于 1995 年 3 月 13 日收到,1996 年 3 月 25 日修回

* 现在工作单位:福建省水产研究所病防室,厦门 361012

维普资讯 http://www.cqvip.com

RNA 总量为 1600 μg，即每克感染病毒幼虫可得 800 μg 总 RNA，说明经改良的异硫氰酸胍法制备总 RNA，有较高得率，结果见图 1。

这种改进方法的优点在于：在破碎感染虫体的同时，就对 RNase 进行了抑制，并改变了常规操作的温度和 pH 值，采用快速酸酚法，有效防止了沉淀杂质的电离化作用及酚化合物的进一步氧化。操作时间仅需常规的 1/10，为整体水平 RNA 的制备提供了一条有效途径。

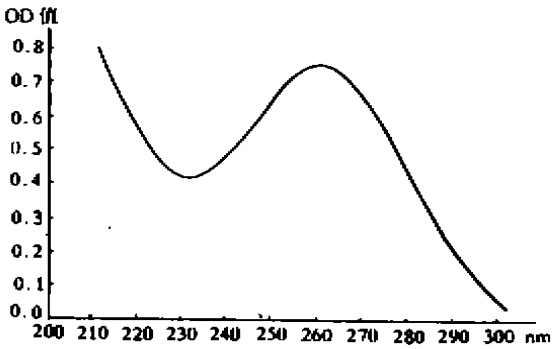

图 1 总 RNA 紫外吸收曲线

Fig1 Ultraviolet absorptive curve of total RNAs

2 **ELISA 测定结果** 将制备的抗血清，经预试验，确定工作浓度为 1:300，对翻译样品抗原作不同倍数稀释，分别测 OD_{492}值，当抗原稀释至 1:400 时，仍有较高 OD_{492}值，比阴性对照高近 10 倍，说明翻译产物与多价抗血清有强免疫活性，结果见表 1。

表 1 ELISA 检测结果

Table 1 The results of ELISA

抗血清 Antiserum	阳性翻译样品(稀释度) Positive translation products(Dilution)				阳性抗原对照(稀释度) Positive antigen control(Dilution)				空白翻译样品(稀释度) Ineffective translation products(Dilution)
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400	1:400
阳性 (Positive)	1.35	1.28	1.19	0.89	1.38	1.33	1.21	0.95	0.09
阴性 (Negative)	0.40	0.38	0.3	0.25	0.35	0.32	0.31	0.31	0.02
PBS 对照 (PBS control)	0.08	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04

3 **翻译产物的 SDS-PAGE 分析** 翻译产物经 SDS-PAGE，能观察到许多蛋白带，见图 2。从图中可以看出：用考马斯亮兰染色，无论在 A 组和 B 组，只能观察到翻译系统自身的蛋白组成，无法看到新合成的蛋白。但经 X 光胶片曝光，至少有 20 种以上的蛋白质被显迹，这些蛋白在合成中被^{35}S-Met 标记，表明是新合成的，为病毒 mRNA 翻译产物(见图 3)。B 中出现的二条带由 S^{35}-Met 中的杂质所引起。

维普资讯 http://www.cqvip.com

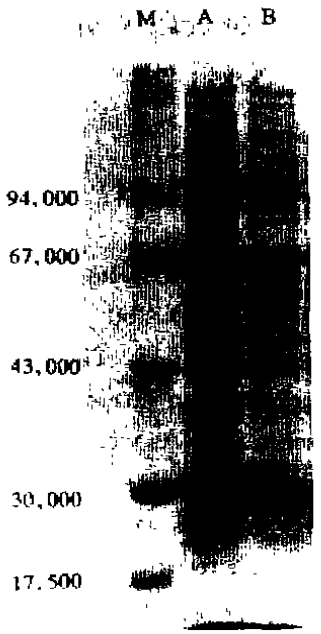

图2　翻译成分SDS－PAGE(考马斯亮兰染色)
M：标准蛋白，A：翻译成份，B：空白对照
Fig2　SDS-PAGE of translation system(stained with Comasie blue dye)
M: Protein marker; A: Translation system (added RNA and translation products)
B: Translation system without RNA

图3　翻译成份SDS-PAGE放射自显影A：标记的翻译产物；B：空白对照
Fig3　SDS-PAGE of translation products detected by X-ray film
A: ^{35}S-labeled translation Products
B: Translation system RNA

在本实验中，以感染虫体为实验材料，具有成本低廉、省时省力的优点。而且由mRNA这一中心环节来研究基因的时相表达，将有利于目的基因表达产物的回收、纯化。但对各种蛋白出现的时相、数量及功能还有待今后作进一步的研究。

参　考　文　献

1　胡裕文，智刚．杆状病毒的分子生物学研究进展．病毒学报，1988；4(2)：181～184
2　Smith G E, Vlak J M., Summers M D. *In vitro* translation of *Autographa californic* nuclear polyhedrosis virus early and late mRNA. J Virol, 1982;44(1),199～208
3　金明洁，蔡宜权．七株昆虫核型多角体病毒基因组同源性的测定．病毒学报，1985；1(4)：370～377
4　蔡良婉．核酸研究技术(上册)．北京：科学技术出版社，1987：121～132
5　Mcgrogran M, Spector D J, *et al*. Purification of specific adenovirus 2 RNA by preparative hybridization and selective thermal elution. Nucleic Acide Res, 1979; 6:593－606
6　Pelham H R B, Jackson R J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem, 1976; 67:247～256

维普资讯 http://www.cqvip.com

Rapid Purification and *in vitro* Translation of *Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus mRNA

Wu Jinlu Liu Runzhong Zhang Youqing

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

Total RNAs were isolated from *Heliothis armigera* larvae infected with *Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus(HaNPV) late after infection(60 h postinfection), 800 μg total RNAs were obtained from 1 g larvae by improved granidinium isothiocgarate methed. The whole viral DNA was purified from HaNPV polyhedra. The DNA was immobilized on nitrocellulose filters and used to select viral specific mRNAs from total RNA. The specific mRNAs were translated *in vitro* in the presence of L-(^{35}S) methionine by using a rabbit reticulocyte lysate system and analyzed on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. At least twenty proteins were obtained. The viral structural proteins were among the translation products which were testified with the experiment of ELISA.

Key words HaNPV, mRNA, Rapid purification, *in vitro* translation, ELISA