

Sindbis 病毒基因组的寡核苷酸指纹图

秦鄂德 于曼 黄祥瑞 杨佩英 陈建龙 司丙银 李红 黄志尚 肖继河

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

迄今,医学上重要病毒病的诊断和流行病学的研究,仍依赖血清学和生物学(表型特征)

的检测方法。由于这些方法主要是针对一小部分病毒蛋白或少数基因功能的；加之有些病毒易发生抗原漂移，表型标志不稳定，因此，对亲缘关系较近毒株的鉴别，对探讨病毒(型或亚型内)遗传学和流行病学关系，推断病毒流行传播途径等几乎是不可能的。因而给病毒病的诊断和防治造成一定困难。七十年代初发展起来的用于分析病毒基因组的寡核苷酸指纹技术，为解决上述问题提供了极为灵敏有效的手段^[1-3]。

A组虫媒披膜病毒是一类重要的动物病毒，它包括关系较为密切的20几个成员；在Baltimore分类系统中归于第四类——正股RNA病毒。我们对这类病毒的代表株——Sindbis(SIN)病毒的基因组进行了研究。首先，测定了基因组RNA的感染性，并用丙烯酸胺-琼脂糖大孔胶在变性条件下对³²P-前标记和¹²⁵I后标记的基因组进行了分析；最后，分别对这两种标记的RNA作了寡核苷酸指纹分析和比较。

材料与方 法

(一) 材料

SIN病毒(Souche株)，卫生部药品生物制品检定所提供。磷-32(无载体)及Na¹²⁵I(无还原剂)，中科院原子能研究所产品。核糖核酸酶T₁和三氯化铈系E. Merck产品；核糖核酸酶和放线菌素D系Sigma产品。苯酚、丙烯酸胺和脲用前纯化。酵母RNA为上海生化所东风试剂厂产品，使用前经酚/氯仿/异戊醇抽提纯化(A_{260nm}/A_{280nm} = 2.1)。医用X-光片(I型)是天津感光胶片厂产品。制备核酸用的玻璃器皿，均经硅化处理，140—160℃烘烤2—3小时。

(二) 方法

1. 病毒的培养与纯化：病毒在原代鸡胚纤维母细胞上的培养和聚乙二醇及蔗糖密度梯度离心纯化见文献[4]。

病毒的³²P-体内标记和分离纯化：原代鸡胚纤维母细胞长成单层后，用Hank's液冲洗3次；接种乳鼠脑病毒悬液(最终浓度为10⁻⁴)。37℃吸附1.5小时后，于同样温度下在含有5%透析小牛血清、1%放线菌素D和³²P(100—250

μCi/ml)的无磷酸盐的MEM中培养16小时。标记病毒的分离纯化方法同文献[4]。病毒经蔗糖密度梯度离心纯化后，分别收集，测量各管放射性，合并峰管(25 × 10⁷cpm)。

2. 基因组RNA的制备：把纯化的病毒溶于TNE(0.01M tris-HCl pH8.8, 0.1M NaCl, 2mM EDTA, 0.5% SDS, 1% 2-巯基乙醇)中，与等体积抽提混合物(0.01M tris-HCl pH8.8饱和的酚/氯仿/异戊醇 = 25/24/1, v/v)抽提3次。离心收集的上层水相，再用等体积的氯仿/异戊醇(24/1)抽提2次；乙醚处理3次并通氮气除去水相中残存的乙醚，此时的水相(含RNA)即可进行感染性测定。向水相(冰浴中)加入0.2体积1M醋酸钠及3体积的无水乙醇(-20℃)，于-20℃放置过夜，10000g离心(4℃)20分钟，收集沉淀。重复乙醇沉淀一次；收集的沉淀用水溶解(即可测定紫外吸收光谱)后，冰冻干燥，-70℃保存。

³²P-体内标记基因组RNA的制备：向纯化的³²P-标记的病毒峰管中，加入2μl载体酵母RNA(98μg/ml)和1/4体积5 × TNE，充分混匀。按上述程序制备³²P-RNA(冰冻干燥后，计数)。

3. 基因组RNA感染性的测定(空斑法)：原代鸡胚纤维母细胞按常规培养48小时后，分别用PBS和0.5M NaCl冲洗一次。去除剩余液体，接种不同稀释度的病毒RNA溶液(用高压灭菌的1M NaCl作稀释剂)各0.2ml，室温吸附40分钟；用0.5M NaCl(高压灭菌)冲洗一次以除去游离的RNA。同时，以核糖核酸酶处理的RNA(0.1%核糖核酸酶，在0.01M tris-HCl pH7.4条件下，室温反应20分钟)和完整病毒分别作对照。按常规加营养琼脂(含透析小牛血清)，保温、染色并计算PFu(空斑形成单位)/ml。

4. 基因组RNA的¹²⁵I标记^[5,6]：标记反应在硅化尖底玻璃管中进行，反应混合物含1mCi Na¹²⁵I(无还原剂)，2μl KI溶液(10mg/100ml水)，15μl TlCl₃(1.6mM，用0.15M醋酸钠pH4.5新鲜配制)和10—20μg RNA(1mg/ml 0.1M醋

酸钠 pH4.5)。用 2M 冰醋酸调 pH4.5 后, 70℃ 水浴 10 分钟。加 SDS 缓冲液 (0.01M tris-HCl pH7.5, 0.12M NaCl, 0.1% SDS 和 1mMEDTA) 至 0.5ml 终止反应。再于 70℃ 保温 10 分钟后, 加入 1ml -20℃ 的无水乙醇, 干冰中放置 1 小时, 3500rpm (4℃) 离心 30 分钟, 收集沉淀。用冷的 80% 乙醇冲洗 6 次, 然后将沉淀干燥, 计数 (cpm)。

5. RNA 的纯度分析: ^{32}P 和 ^{125}I 标记的基因组 RNA 在 1.8% 丙烯酰胺-0.6% 琼脂糖-6M 脲凝胶管中进行纯度分析, 胶长 12cm, Loening 缓冲系统 (36 mM tris-30 mM NaH_2PO_4 -10 mM EDTA, pH7.8) 为电极缓冲液, 5mA/胶条, 电泳 4 小时。胶条取出后于 4℃ 对 X-光片曝光 3-4 天 (加增感屏)。

6. 寡核苷酸指纹分析: 放射性同位素标记的基因组 RNA (10^5 - 10^7 cpm) 用 20 μl 10mM tris-HCl pH8.0 2mM EDTA 溶解后, 加入 2 μl 核糖核酸 T₁ 酶 (10u/ μl), 37℃ 30 分钟。将 60 μl 9M 脲, 40 μl 50% 甘油-50% 饱和的溴酚蓝和 150 μg 载体酵母 RNA 加入, 混匀后按 Lec⁽⁶⁾ 等的方法 (稍有改动) 进行双向聚丙烯酰胺凝胶电泳。第一向胶 (46 × 12 × 0.2cm) 含 8% 丙烯酰胺-0.1% 甲叉双丙烯酰胺 (用 6M 脲配制, 并以饱和柠檬酸调 pH 3.5)。每个样品孔加 10^5 - 10^6 cpm 的 RNA 酶解产物, 以 25mM 柠檬酸 pH3.5 (5M NaOH 调 pH) 作为电极缓冲液, 500v 1.6 mA, 溴酚蓝移动 22cm (^{125}I -RNA 则移动 24cm), 停止电泳。切下含放射性同位素的胶条 (32 × 2 cm, 包括溴酚蓝标志), 并转移到第二向玻璃板上, 按 Lec 的方法制备第二向胶 (43 × 35.5 × 0.1cm): 21% 丙烯酰胺-1.4% 甲叉双丙烯酰胺 (由 0.04M tris-硼酸 pH 8.1 电极缓冲液配制)。500v, 16mA/块胶, 电泳方向由底部 (负极) 向顶部。溴酚蓝移动 28cm 时, 停止电泳。胶板对 X-光片曝光 (4℃)。

结果与讨论

(一) SIN 病毒基因组 RNA 感染性分析

SIN 病毒在原代鸡胚纤维母细胞上培养 16

小时后, 经差速离心和聚乙二醇初步纯化后, 用酚/氯仿/异戊醇混合物及氯仿/异戊醇抽提, 所制备的基因组 RNA 制剂具典型的核酸紫外吸收光谱的特征, 最大光吸收在 260nm 处, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1.9$ (见图 1)。我们采用高渗法测定了 RNA 的感染性。在培养 48 小时的原代鸡胚纤

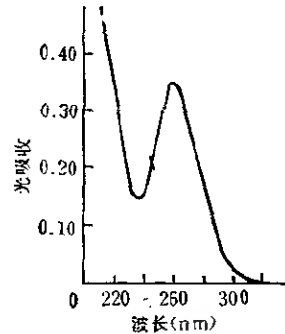


图 1 SIN 病毒基因组 RNA 制剂紫外吸收光谱

维母细胞上, 其空斑滴度为 10^4 PFu/ml。在同样条件下, 经核糖核酸酶处理的基因组 RNA 则完全丧失了这种感染性 (表 1 和图 2), 证明了 RNA 感染性的特异性。病毒 RNA 的感染性依赖其分子结构的完整性, 分子断裂或其 3'-端聚腺苷酸的丢失, 均可导致感染性的丧失⁽⁷⁾。由于核糖核酸酶无所不在, 这就给制备完整的高分子量 RNA (SIN 病毒基因组 RNA 约 13000 个核苷酸) 带来一定的困难。因此, 整个制备过程除防止机械切割作用外, 应特别注意核酸酶的降解作用。

表 1 SIN 病毒基因组 RNA 感染性 (空斑) 测定 (平均值)

样品	空斑效价 (PFU/ml)
RNA	59×10^4
病毒	1.5×10^7
RNA + 核糖核酸酶	0

(二) SIN 病毒基因组 RNA 的纯度分析结果

经聚乙二醇和蔗糖密度梯度离心纯化的 ^{32}P -体内标记和非标记的 SIN 病毒, 用酚混合物抽提和乙醇沉淀分别制备 ^{32}P -RNA 和 ^{125}I -RNA (后标记)。这两种 RNA 在 1.8% 丙烯酰胺-0.6% 琼脂糖-6M 脲凝胶 (Loening 系统) 中,

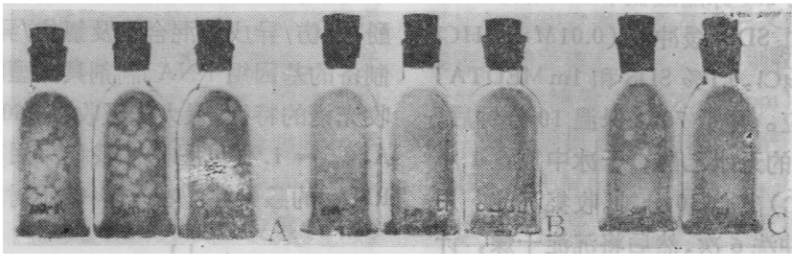


图2 SIN 病毒基因组 RNA 的空斑测定

A: SIN 病毒 RNA, 样品稀释度(自左至右)1:50、1:10²、1:10³。
 B: 核糖核酸酶处理的 RNA, 样品稀释度同 A。
 C: SIN 病毒, 稀释度为 1:10¹、1:10²。

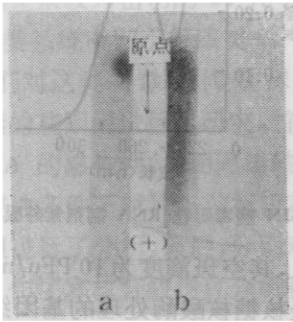


图3 同位素标记的 SIN 病毒基因组 RNA 的凝胶电泳
 (1.8% 丙烯酰胺-0.6% 琼脂糖-6M 脲)
 a. ³²P-RNA b. ¹²⁵I-RNA

均呈单一带条(图3); 而且在这样大孔径凝胶中泳动的距离较短, 表现出大分子 RNA 的泳动特征。说明分离、纯化和标记 RNA 的条件较温和, 保持了 RNA 分子的完整性。

(三) 寡核苷酸指纹分析

³²P 和 ¹²⁵I 标记的基因组 RNA, 经核糖核酸酶 T1 完全消化后, 分别进行双向聚丙烯酰胺凝胶电泳。抗核糖核酸酶 T1 的寡核苷酸的分布, 见图 4 (B 和 D 分别为 A 和 C 在 X-光灯下的临摹图)。在图的上部, 小分子的寡核苷酸按碱基组成和大小排列成行; 下部则是大的寡核苷酸, 是随机分布的, 而且它们是具有特征性的独特顺序, 在一定 RNA 分子中只出现一次^[8]。因此, 不但可作为纯度的指标, 而且也具有诊断意义^[9]。在 ³²P-RNA 的指纹图(图 4, A 和 B)的下方呈带状的斑点是基因组 RNA 3'-端的聚腺苷酸; 用寡核苷酸指纹技术可清楚地检出 A 组虫媒披膜病毒基因组的这种聚腺苷酸顺序^[10]。由图 4 还可看出, ³²P-和 ¹²⁵I-RNA 的指纹图是类

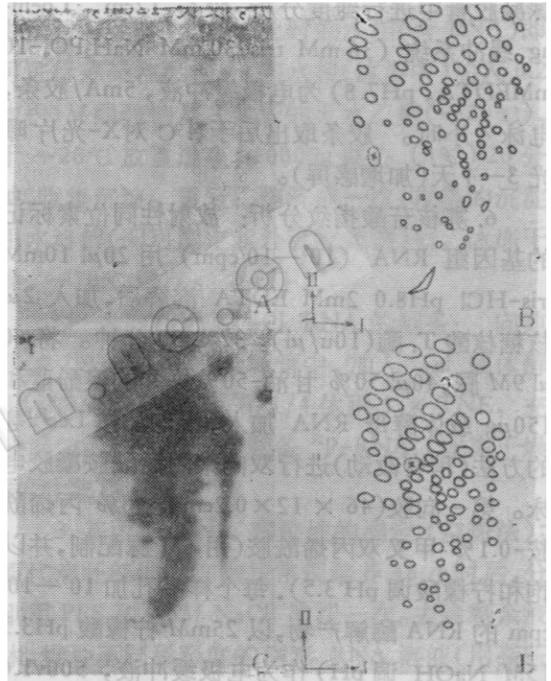


图4 SIN 病毒基因组 RNA 的寡核苷酸指纹图
 A: ³²P 前标记 RNA; C: ¹²⁵I 后标记 RNA。
 B 和 D 分别为 A 和 C 的临摹图。
 I: 第一向电泳; II: 第二向电泳
 ⊗: 溴酚蓝标志

似的, 但后者则缺少一些斑点, 如无聚腺苷酸的带状斑点。这是由于 ¹²⁵I 主要标在胞嘧啶的第 5 位 C 原子上, 因此不含该碱基的寡核苷酸在图谱中则显示不出来。

寡核苷酸指纹技术, 对研究病毒的变异, 毒株的鉴别, 探讨病毒分离物之间的遗传学与流行病学关系^[1-3]和病毒的流行传播方式^[2, 11, 12], 以及病毒的进化史^[13]都是一个非常重要的工具。而且也是 RNA 病毒不同遗传学亚群 (ge-

netic subpopulation)分类的一种独特方法^[2]。特别是近几年来,该技术的方法学日臻完善: RNA 标记由体内发展到体外(包括酶法和化学碘标法);并且寡核苷酸的分辨力不断提高。因此,该技术在敏感性、速度和分析的范围诸方面有了极大改善,应用更加广泛。¹²⁵I 后标记 RNA 具有较高的比放射性,操作简便,不需酶和高比放的同位素(如 γ -³²P-ATP),但这种方法标记大分子 RNA 较为困难。我们采用的方法条件温和,用乙醇冲洗代替 CF-11 纤维素(或 Sephadex G-50)柱层析去除游离的¹²⁵I 简化了程序。改用薄胶(0.5/mm 厚)提高了分辨力,节省了试剂。

参 考 文 献

- [1] Nottay, B. K. et al.: *Virology*, 108: 405, 1981.
- [2] Trent, D. W. et al.: *Virology*, 128: 271, 1983.
- [3] Repik, P. M. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 577, 1983.
- [4] 黄志尚等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1 (2):101, 1981。
- [5] Steinert, G. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 833, 1976.
- [6] Lee, Y. F. et al.: *Anal. Biochem.* 119: 224, 1982.
- [7] Dasgupta, et al.: *Cell*, 19: 423, 1980.
- [8] Lee, Y. F. et al.: *Nucl. Acids Res.* 3: 1647, 1976.
- [9] Nomoto, A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 375, 1976.
- [10] Trent, D. W. et al.: *J. Gen. Viro.* 43: 365, 1979.
- [11] Robson, K. J. H. et al.: *J. Gen. Virol.* 45: 579, 1979.
- [12] Nakajima, K. et al.: *Virology*, 99: 423, 1979.
- [13] El Said, L. H. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: