

# 轮状病毒 RNA 分离及其制备技术

杨荣鉴 刘红梅

(江西省医学科学研究所, 南昌)

王长安 陈广牧 洪涛

(中国预防医学中心病毒研究所, 北京)

轮状病毒是引起流行性腹泻的重要病原之一。分析研究该病毒 RNA, 从理论探讨、病原发现和疾病的防治研究等方面都颇有价值。我们参照有关文献 [1—4], 并作了某些改进, 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离轮状病毒 RNA 和硝酸银染色, 取得了良好的分辨效果。洪涛等用此方法研究了成人腹泻轮状病毒<sup>[5,6]</sup>; 王长安等用此方法对成人腹泻轮状病毒进行了分子流行病毒调查<sup>[7]</sup>, 以及对不同地区婴幼儿腹泻轮状病毒 RNA 进行了比较分析<sup>[8]</sup>。本工作采取振荡浸泡法回收制备 RNA, 获得了 PAGE 纯 RNA。

## 材料和方法

### (一) 病毒

取自轮状病毒腹泻病人大便。

### (二) 试剂配制

1. TSE: 0.02M 三羟甲基氨基甲烷(Tris)/0.15M 氯化钠/0.002M 乙二醇四乙酸二钠; 用 1N HCl 调 pH 至 7.5。

2. TSE 饱和酚: TSE: 酚 = 20:80(V/V)。酚需重蒸馏。

3. 样品液: 0.5M Tris/HCl (pH6.8) 7.5ml、甘油 2.5ml、溴酚蓝 10mg, 混和溶解。

4. 染色液: 硝酸银 0.187g, 加蒸馏水至 100ml。

5. 显色液: 氢氧化钠 7.5g, 加入蒸馏水 200ml 溶解; 加入 38% 甲醛 1.9ml, 蒸馏水定容至

250ml。

6. 固定液: 10% 乙醇(V/V)/0.5%(V/V) 醋酸。

7. 停影液: 5% 醋酸(V/V)。

8. 溴化乙锭(EB)液: 2.0 $\mu$ g/ml。

9. 硅化剂: 二氯二甲基硅烷/四氯化碳 = 4:96(V/V)。

10. STE: 0.1M 氯化钠/0.02M Tris/0.002M 乙二醇四乙酸二钠; 用 5N HCl 调 pH 至 7.4。

11. STE 饱和酚: STE: 酚 = 20:80(V/V)。酚需重蒸馏。

### (三) 病毒 RNA 提取

沉淀粪渣 0.5—1.0g, 加入 pH7.2, 0.05M 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 0.5—1.0ml, 超声波 (2万 Hz、振幅 8—10 $\mu$ ) 40 秒 $\times$ 2; 离心, 取上清液 0.3ml 置于 Eppendorf 管, 加入 10% SDS 30 $\mu$ l, 56 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟; 加入 TSE 饱和酚 0.3ml、氯仿/异戊醇 (24/1) 0.2ml, 在旋涡器上萃取约 2 分钟, 离心, 吸取上面水相层; 如此反复萃取 5 次, 得到最后水相层; 加入 2.5 倍体积无水乙醇, 充分混和, 置 -20 $^{\circ}$ C 过夜; 高速离心 5 分钟, 弃去上清液, 真空泵抽干, 得到 RNA 沉淀物; 加入样品液 50—100 $\mu$ l, 混和溶解, 置冰箱备用。

### (四) RNA 分离

1. 制备凝胶板: 用垂直板状电泳槽。首先将电泳槽的玻璃板板底端缝隙用 1% 琼脂糖填补齐; 框两边亦覆盖上一薄层琼脂糖。倾入 10% 分离胶 (30% 丙烯酰胺/0.8% N, N'-甲叉双丙

烯酰胺 13.3ml + pH8.8 1.5M Tris/HCl 10ml + 蒸馏水 16.57 ml + TEMED 10 $\mu$ l + 10% 过硫酸胺 0.12ml) 至 15.5cm 高度, 轻轻加入正丁醇约 1.0ml 覆盖分离胶; 约 30 分钟聚合, 弃去正丁醇, 用蒸馏水反复洗涤干净; 倾入 3% 浓缩胶 (30% 丙烯酰胺/0.8% N, N'-甲叉双丙烯酰胺 1.0ml + pH6.8, 0.5M Tris/HCl 2.5ml + 蒸馏水 6.395ml + TEMED 15 $\mu$ l + 10% 过硫酸铵 90 $\mu$ l) 至顶端; 插入样品梳; 约 30 分钟后聚合, 拔去样品梳, 熨制成 14 × 17 × 0.1cm 凝胶板。

2. 加样: 提取的 RNA 电泳样品 60℃ 预热 2 分钟, 加样 2—10 $\mu$ l。

3. 电泳: 电泳液用 pH8.5、0.025M Tris/0.192M 甘氨酸缓冲液, 恒电流 28mA (20mA/cm<sup>2</sup> 横截面积), 电压 120—400V 左右。电泳约 7 小时。

4. 剥胶: 剥取出凝胶板, 切去浓缩胶, 将凝胶板浸泡于无离子水洗涤约 2 分钟。

5. 染色: 凝胶板浸泡于染色液, 水平振荡约 30 分钟, 继而无离子水洗 3—4 次, 去掉游离银离子(洗涤后的水 1ml 加入显色剂一滴, 仅显微黄色即可)。

6. 显色: 凝胶板再浸泡于显色液, 轻轻水平摇动。约 5—10 分钟显出棕黄色 RNA 区带。

7. 停影: 用无离子水洗一次, 浸泡于停影液 30 分钟。

8. 固定: 浸泡于固定液保存。进行摄影。

### (五) RNA 制备

1. 取华氏试管, 盛满硅化剂, 约 2 分钟, 收回硅化剂。试管空气干燥, 即成硅化试管。

2. 将剥完好的凝胶板, 浸泡于 EB 液, 约 10—15 分钟; 2537 Å 紫外灯下进行观察, RNA 区带显桔红色荧光。

3. 将显现荧光的 RNA 区带一切下, 分别盛于硅化试管内, 加入 STE 液 0.5—1.0ml 浸泡, 置水平振荡器, 室温振荡 24 小时。

4. 将液体转入 Eppendorf 管, 加入等体积 STE 饱和酚, 旋涡器上萃取约 2 分钟; 离心, 吸取上面水相层, 加入 10M 氯化锂 (最终浓度

0.15M), 混合, 再加入 2.5 倍体积无水乙醇, 混合, -20℃ 过夜; 高速离心 10 分钟, 弃去上清液, 真空泵抽干, 遂得到沉淀的 RNA 纯品。

## 结果和讨论

轮状病毒是具有内外衣壳的双壳球形颗粒, 基因组由 11 个片段线形双股 RNA 所组成<sup>[9]</sup>。衣壳经 SDS 裂解而释放出 RNA。在 pH8.5 条件下, 各 RNA 片段带负电荷; 由于各个 RNA 片段具有不同的电荷和分子量, 所以在电场中具有不同的电泳速度而被分离成 11 条区带。RNA 经硝酸银染色, 银离子与 G-C 碱基对相结合, 被甲醛还原为金属银而显色。灵敏度可达 2ng/区带<sup>[10]</sup>。我们的实验结果, 成人腹泻轮状病毒 RNA 分离成清晰的 11 条区带 (见图 1)。

在电泳过程中要恒定电流, 所以需选择优质稳流电泳仪。电流保持于 20 mA/cm<sup>2</sup> 凝胶横

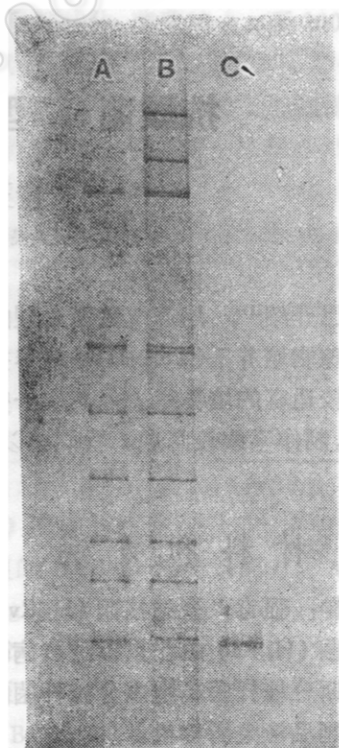


图 1 RNA-PAGE

A: 制备的第 1—11 条 RNA 片段, 经 PAGE 鉴定  
B: 成人腹泻轮状病毒 RNA 电泳图型  
C: 制备的第 11 条 RNA 片段, 经 PAGE 鉴定

截面积,是我们经过多次实验选择出的最佳经验数值。此数值是电泳分辨率的关键之一。另外,电泳时间要足够,这不仅使 RNA 区带拉开需要足够的时间,而且使凝胶板内所含氯离子全部电泳出;否则,当用硝酸银染色时会产生氯化银,而导致凝胶板呈现乳白色,染色失败。

染色后,多余没被结合上的游离银离子必须洗涤干净;否则,残留在凝胶板上的银离子会被甲醛还原而显色,致使底板颜色深。

切下的 RNA 区带凝胶,经振荡浸泡, RNA 被游离出。我们采用此方法的实验结果,经 PAGE 证实,已回收制备得到 PAGE 纯 RNA。见图 1。要注意浸泡的试管硅化,因玻璃会吸附 RNA。

我们曾试用多种回收制备 RNA 的方法,如电泳回收法等<sup>[1,12]</sup>,但都没有用本方法简单方便,而且本方法又可靠。

## 参 考 文 献

- [1] Herring, A. J. et al.: *J. Clin. Micro.*, 16(3): 473, 1982.
- [2] Gaul, S. K. et al.: *J. Clin. Micro.*, 16(3): 495, 1982.
- [3] Floyd, R. W. et al.: *Anal. Biochem.*, 59: 599, 1974.
- [4] Beards, G. M.: *J. Virol. Methods*, 4: 343, 1982.
- [5] 洪涛等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(1): 1, 1984.
- [6] Hung Tao et al.: *Lancet*, 1(8387): 1139, 1984.
- [7] 王长安等: 微生物学报, 25(2): 153, 1985.
- [8] 王长安等: 中华微生物学和免疫学杂志, 5(5): 308, 1985.
- [9] Arias, C. F. et al.: *J. Virol.*, 41(1): 42, 1982.
- [10] Whitton, J. L. et al.: *J. Virol. Methods*, 7(4): 185, 1983.
- [11] 梁业楷等: 微生物学通报, 10(4): 184, 1983.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the U. S. A., p. 164, 1982.