

森林脑炎病毒基因组 RNA 的分离及其性质的研究

杨佩英 司炳银 黄志尚

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

摘要 本文从森林脑炎病毒感染的鼠脑组织中直接抽提总核酸,经 Sepharose 4B 柱层析,将病毒 RNA 与细胞 RNA 分离。方法简便。分离的病毒 RNA 在 260nm 处有典型紫外吸收光谱,260/280nm 的比值近似 2,对 RNase 敏感,有感染性。

关键词 森林脑炎病毒; RNA 鼠脑 Sepharose 4B

森林脑炎病毒为黄病毒科黄病毒属成员^[1]。黄病毒基因组 RNA 的提取常以组织培养液为材料,经浓缩提纯获得纯化的病毒颗粒,再抽提核酸。鉴于森林脑炎病毒在感染鼠脑中滴度为 10^{10} pfu/ml,比组织培养高 2—3 个滴度。本实验利用感染鼠脑为材料,直接从鼠脑组织中抽提总 RNA (细胞 RNA+病毒 RNA),用 Sepharose 4B 柱层析将病毒 RNA 与细胞 RNA 分离。初步结果报告如下:

材料与 方法

(一) 毒株

森林脑炎病毒森张株,鼠脑第 12 代, 10^{9-10}

pfu/ml。

(二) 试剂

1. 苯酚(重蒸);氯仿(分析纯);异戊醇(分析纯)
2. 缓冲液: STE (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)
TBE (0.089 M Tris, 0.089 M 硼酸, 0.02 M EDTA)
3. Sepharose 4B (pharmacia)

(三) 感染鼠脑总核酸的提取

感染鼠脑 10 只,正常鼠脑 10 只(对照),分别制成 10% 鼠脑悬液。加等量饱和酚抽提 1—2 次,酚、氯仿、异戊醇抽提 2 次,氯仿、异戊醇

1次,吸上清加 0.1 体积 3 M 醋酸钠和 2.5 倍体积冷无水乙醇, -20℃ 沉淀过夜, 10000 r/min 离心 40 分钟, 收集沉淀为总 RNA。

(四) 细胞 RNA 与病毒 RNA 的分离

Sephrose 4 B 装柱, 柱长 1.0 × 90 cm, 以 STE 缓冲液平衡后上样。样品量 1.8—2.0 mg 总 RNA, 体积为 1ml。洗脱液为 STE, 流速 1 ml/5'。LKB 自动分布收集器收集不同洗脱峰, 并用核酸检测仪记录其洗脱曲线。收集洗脱部份 1, 用 3 倍体积乙醇沉淀低温冰箱备用。

(五) 琼脂糖凝胶电泳

电泳缓冲液为 TBE, 琼脂糖浓度为 1.2%, 电压 50—100 V, 电泳时间 4—5 小时。记录实验结果并拍照。

结 果

(一) 感染鼠脑总核酸琼脂糖电泳

正常鼠脑总 RNA 与感染鼠脑总 RNA 同时分别进行琼脂糖电泳 (图 1)。正常鼠脑总

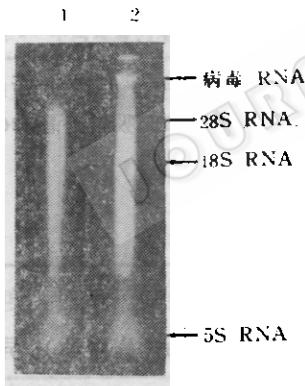


图 1 鼠脑总 RNA 琼脂糖电泳
1. 正常鼠脑 2. 森林脑炎病毒感染鼠脑

RNA 有三个区带。感染鼠脑总 RNA 除具有这三个区带外, 尚有一条分子量较大的区带。为进一步证实此区带, 采用 Sepharose 4 B 柱层析进行 RNA 分离。

(二) Sepharose 4 B 柱层析

感染鼠脑总 RNA 与正常鼠脑总 RNA 分别经 Sepharose 4 B 柱层析 (图 2)。感染鼠脑

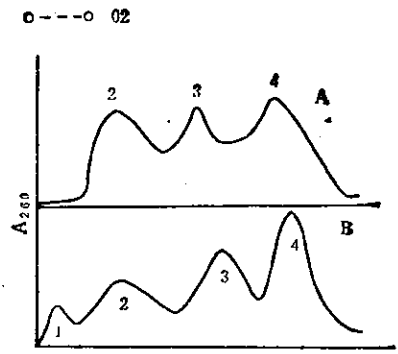


图 2 森林脑炎感染鼠脑与正常鼠脑柱层析洗脱图谱
A 为正常鼠脑, 有 3 个峰 B 为感染鼠脑, 有 4 个峰
第一峰为病毒 RNA, 其它三个峰分别为 28S, 18S, 5S 细胞 RNA。

总 RNA 柱层析分部有四个峰, 第一峰为病毒 RNA, 其余三个峰为细胞 RNA, 分别为 28S, 18S, 5S RNA。正常鼠脑只见细胞 RNA 的三个峰, 未见病毒 RNA 峰。与琼脂糖电泳只有三条带结果是一致的。

(三) 病毒 RNA 基本性质

1. 病毒 RNA 吸收光谱的特性: 病毒 RNA 以 557 型双波长双光路紫外分光光度计测定, 波长 220—300 nm, 获得核酸特有曲线 (图 3)。

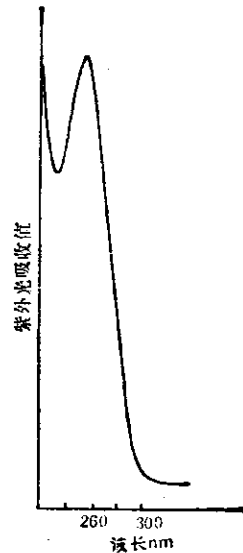


图 3 病毒 RNA 吸收光谱

将不同批次抽提的病毒 RNA 测 260/280 比值

近似于 2 (表 1)。

表 1 病毒 RNA 溶液紫外吸收 260/280 值

实 验	260 nm	280 nm	260/280
1	0.423	0.172	2.45
2	0.460	0.238	1.93
3	0.480	0.240	2.00
4	0.450	0.216	2.14

2. 病毒 RNA 感染性: 将病毒 RNA 10 倍稀释到 10^{-3} , 分别接种 3 日龄乳鼠脑内 0.02 ml/只。分两个组, 一组为病毒 RNA, 另一组为病毒 RNA + RNase。RNase 预先煮沸 10 分钟, 100 μ g RNase/0.1 ml RNA, 37 $^{\circ}$ C 作用 10 分钟后, 接种乳鼠脑内, 观察小白鼠死亡情况。以 LD₅₀ 表示 RNA 致死剂量。表 2 结果

表 2 森林脑炎病毒 RNA 感染性

实验	LD ₅₀ /0.02 ml	
	RNA	RNA + RNase
1	3.0	—
2	3.0	—
3	2.41	—

表明, 经 RNA 酶处理的病毒 RNA 接种小白

鼠未发病。病毒 RNA 直接接种小白鼠使其发病死亡, LD₅₀ 在 3.0 左右。实验重复三次, 仅第 2 次小白鼠发病与死亡时间延长 1 天, 可能 RNA 回收过程中降解所致。LD₅₀ 值未改变。

讨 论

本实验用感染鼠脑抽提总核酸, 经 Sepharose 4B 柱层析分离病毒 RNA, 方法简便, 不需要同位素及超离心技术, 适于推广应用。所分离病毒 RNA 波长 260 nm 有典型紫外吸收光谱, 260/280 比值为 2, 对 RNase 敏感, 具有感染性, 证明为病毒 RNA。该病毒 RNA 的三种形式尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Westway, E. G.: *Interferology*, 24: 183—192, 1985.
- [2] 柳之元等: 微生物学报, 3(3):231, 1962.
- [3] 余力等: 生物化学与生物物理学报, 17(2): 186, 1985.
- [4] 周肇庆: 中国医学科学院学报, 5(4):264, 1983.
- [5] Clayton, W. N.: *J. Viral*, 25: 535, 1978.
- [6] Grahmr, C.: *Virology*, 111: 73—83, 1981.