

## 双链核糖核酸病毒的研究

### IV. 家蚕细胞质多角体病毒 mRNA 的体外合成

巫爱珍 戴仁鸣 沈学仁 孙玉昆

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

本文报道以四种核苷三磷酸为底物, 在磷酸丙酮酸、丙酮酸激酶、皂土及 S-腺嘌呤核苷-L-甲硫氨酸(以下简称 SAM) 存在下, 在体外复制家蚕细胞质多角体病毒(简称 CPV) mRNA, 用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离复制产物。并对体外合成的 mRNA 的性质进行了研究, 表明是单链大分子的 RNA。用电镜观察经复制后的家蚕细胞质多角体病毒, 仍是含有核酸的颗粒。

家蚕细胞质多角体病毒像其他双链 RNA 病毒, 如呼肠病毒、水稻普通矮缩病毒等一样, 在病毒颗粒中含有以双链 RNA 为模板的 RNA 复制酶<sup>[1-4]</sup>。一般测定 CPV 的 RNA 复制酶的活力均采用以放射性同位素标记的核苷三磷酸为底物, 反应后测定酸不溶物的放射性强度的方法。在复制产物的分离方面, Shimotohno 等<sup>[2,5]</sup>加 SDS 终止酶反应, 反应液经超离心, 用酚从上清液中抽提得到核酸<sup>[6]</sup>, 通过 Sephadex G-200 柱层析除去小分子物质, 再经过纤维素柱层析将双链 RNA 和复制的 mRNA 分开, 过程较为繁琐。由于 mRNA 较容易降解, 因此寻找一种简便迅速的测定和分离 mRNA 的方法, 对于研究以双链 RNA 为模板的 RNA 复制酶的功能以及研究家蚕 CPV 的复制机制都是必要的。本文报道用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离纯化体外复制的 CPV-mRNA 的方法, 同时还研究了家蚕细胞质多角体病毒的 RNA 复制酶和体外复制的 mRNA 的性质。

### 方法和结果

#### (一) 家蚕细胞质多角体病毒的纯化

按前报<sup>[7]</sup>制备纯的家蚕 CPV 制剂。

#### (二) 家蚕细胞质多角体病毒 mRNA 的体外合成

##### 1. CPV-mRNA 的体外合成体系

体外合成体系 A: ATP 2.5 毫克, GTP、CTP、UTP 各 1.5 毫克, 烯醇式磷酸丙酮酸 0.15 毫克, 丙酮酸激酶 0.5 毫克, 1.0 M, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液 0.25 毫升, 皂土 0.5 毫克, SAM (2.1 微克分子/毫升)<sup>[8]</sup> 0.05 毫升, 0.05M MgCl<sub>2</sub> 0.15 毫升, 纯的家蚕 CPV 制剂 180 微克, 加重蒸水使反应液最终体积为 1.5 毫升, 在 30℃ 下保温 18 小时。

体外合成体系 B: 按体外合成体系 A 放大一倍, 加 <sup>3</sup>H-UTP (1 毫居里/毫升) 50 微升, 反应液的最终体积 3.0 毫升, 于 30℃ 保温 18 小时。

本文于 1979 年 7 月 31 日收到。

感谢曹天钦教授对我们工作的关怀和指导。

感谢龚祖坝、沈菊英同志拍摄 CPV 电镜照片。

## 2. 体外合成 mRNA 的分离

(1) 体外合成体系为 A 的反应液, 反应 18 小时后, 离心 (3,500 rpm) 5 分钟, 将上清液加到 DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia 进口产品, 氯型) 柱 (0.5 × 29 厘米) 上, 用 0.5 M NaCl 洗涤除去病毒颗粒及未反应的底物, 然后用 1.0 M NaCl 洗脱产物 mRNA, 分部收集, 测定 260 毫微米的光密度。从图 1 可见, 用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析, 可将体外合成的 CPV-mRNA 与底物分开, 得到不含病毒颗粒及病毒双链 RNA 的 mRNA。

(2) 于体外合成体系 A 中加猪肝 RNA (A<sub>260</sub> = 0.60) 作对照, 反应时间为零时, 立即将清液加至 DEAE-Sephadex A-25 (氯型) 柱上 (0.5 × 29 厘米), 用 0.5 M NaCl 洗涤除去所有未反应的底物及 CPV 颗粒, 然后用 1.0 M NaCl 将猪肝 RNA 洗脱下来 (回收率达 90%), 层析图谱与图 1 相似,

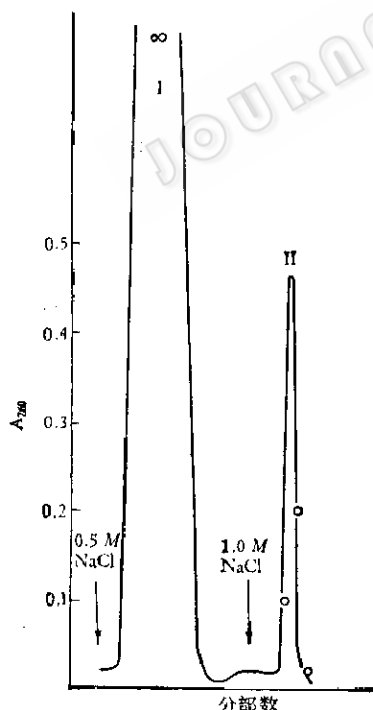


图 1 体外合成的家蚕 CPV-mRNA 的层析图谱  
峰 I: 未反应的底物及 CPV 颗粒  
峰 II: 体外合成的 CPV-mRNA

说明体外合成的家蚕 CPV-mRNA 与猪肝 RNA 在 DEAE-Sephadex A-25 柱上的层析位置相同。

(3) 体外合成体系 B 的反应液在 30℃ 下保温 18 小时, 离心 (3,500 rpm) 5 分钟, 将全部上清液加至 DEAE-Sephadex A-25 (氯型) 柱 (0.5 × 29 厘米) 上, 用 0.5 M NaCl 洗涤柱, 至流出液没有放射性为止。然后用 1.0 M NaCl 继续洗涤, 分管收集流出液, 测定 260 毫微米的光密度。并分别从每管收集液中取 100 微升点在新华 1 号滤纸片上, 烘干, 将滤纸片置于闪烁液中, 用液体闪烁计数器测量产物的放射性强度, 如图 2 所示。图 2 表明, 在上述反应条件下 <sup>3</sup>H-UTP 已参入体外合成的 mRNA 之中, 因此产物 mRNA 的放射性强度与紫外吸收图谱是完全重合的。

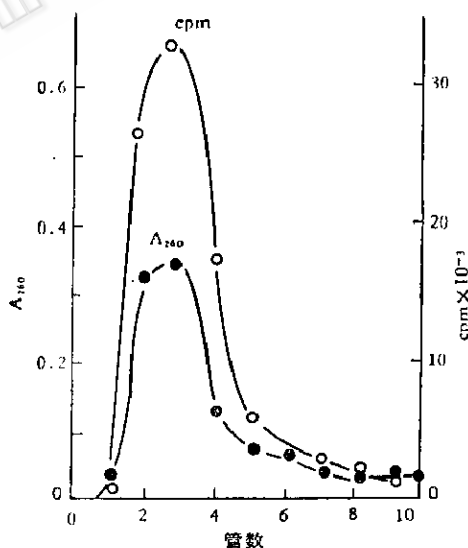


图 2 体外合成的 <sup>3</sup>H 标记的 CPV-mRNA 的紫外吸收图谱及放射性强度曲线

●—● 紫外吸收曲线  
○—○ 放射性强度曲线

## 3. 体外合成 CPV-mRNA 的最适条件

(1) 体外合成 CPV-mRNA 的最适 pH

取六份反应体系为 A 的反应液, 分别加 1.0 M, pH 4 (柠檬酸盐)、pH 5 (柠檬

酸盐)、pH 6 (磷酸盐)、pH 7、8、9 (Tris-HCl) 缓冲液 0.25 毫升, 在 30℃ 下保温 18 小时, 按上述分离 mRNA 的方法处理不同 pH 的反应液, 测量在不同 pH 下合成的 mRNA 的量, 结果如图 3, 由图 3 可以看出以 CPV 双链 RNA 为模板的 RNA 复制酶的最适 pH 是 8。

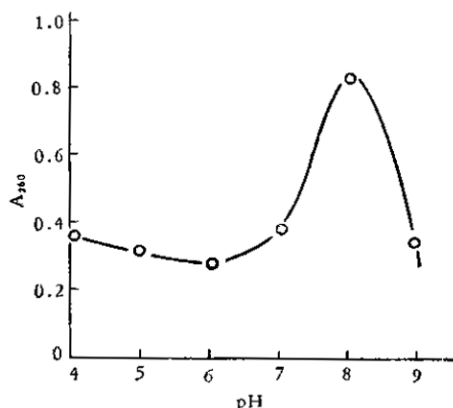


图 3 不同 pH 条件下家蚕 CPV-mRNA 的体外合成

## (2) 体外合成 CPV-mRNA 的反应时间

6 份体外合成体系为 A 的反应液, 在 30℃ 下分别保温 4、8、12、16、20、24 小时, 反应产物的分离同前, 结果如图 4。由图 4 表明 mRNA 合成的量随时间的延

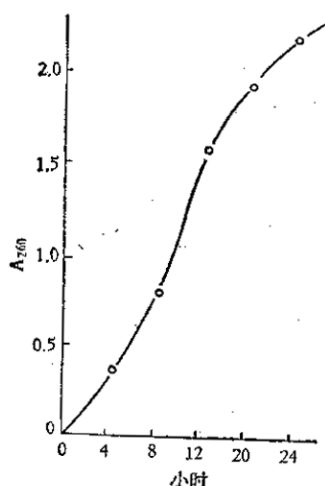


图 4 不同反应时间与体外合成家蚕 CPV-mRNA 量的关系

长而增加, 保温 18 小时后 mRNA 量增加缓慢, 因而以制备 mRNA 为目的时应保温 18 小时为宜。

## (3) SAM 对体外合成 CPV-mRNA 的影响

两份反应液: 一份是体外合成体系 A 作为对照, 另一份缺 SAM, 其他组份与体外合成体系 A 相同。将这两份反应液置于 30℃ 下保温 18 小时, 按上述方法分离产物。结果, 对照反应中合成的 CPV-mRNA 的  $A_{260} = 0.74$ , 而缺 SAM 的反应液中用同样方法测不出有 mRNA 的合成。说明 CPV-mRNA 的体外合成可能是从 5'-末端的甲基化开始的。因此, 如果不加 SAM 则体外合成反应不能进行。

以上结果表明, 按上述体外合成 CPV-mRNA 的方法及其分离条件, 能获得常量的体外合成的 CPV-mRNA。如将反应液按比例地放大 20 倍, 即可得到毫克量的 CPV-mRNA, 为进一步研究家蚕 CPV-mRNA 的结构与功能提供了条件。

## (三) 参加体外合成 CPV-mRNA 后的家蚕细胞质多角体病毒颗粒的电镜观察

在 30℃ 下, 将体外合成体系 A 的反应液保温 18 小时, 对反应中的家蚕 CPV 颗粒进行电镜观察, 结果(图 5)表明, 参加体

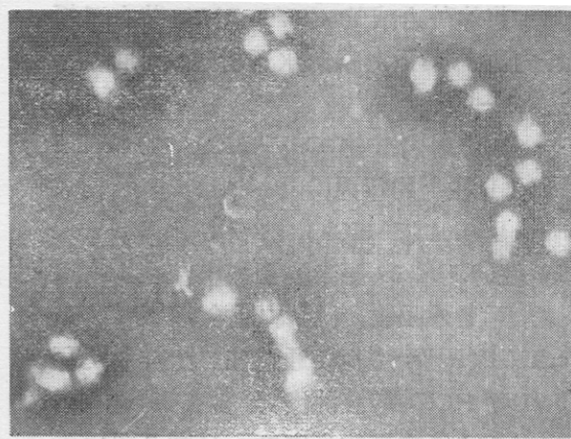


图 5 参加体外合成 CPV-mRNA 反应后的 CPV 的形态 (64,000 倍)

外合成 CPV-mRNA 反应后的 CPV 是含有核酸的完整颗粒。

#### (四) 体外合成的家蚕 CPV-mRNA 的性质

##### 1. 体外合成的 CPV-mRNA 的紫外吸收曲线及光密度比值

体外合成的 CPV-mRNA 具有典型的核酸紫外吸收曲线, 吸收高峰在 260 毫微米, 吸收低峰是 230 毫微米, 见图 6。  $A_{260}/A_{280} = 2.16$ ,  $A_{260}/A_{230} = 2.30$ 。

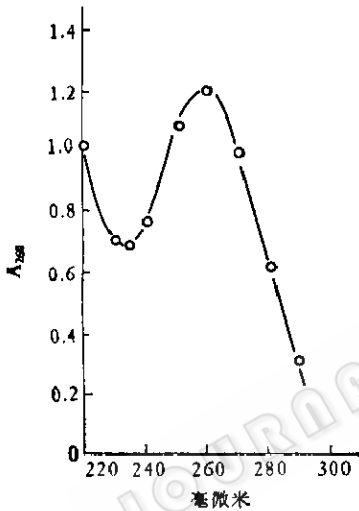


图 6 体外合成的家蚕 CPV-mRNA 的紫外吸收曲线

##### 2. 透析

将体外合成的 CPV-mRNA 装在透析袋内, 在 4℃ 下对重蒸水透析过夜, 回收率达 80—90%。

##### 3. 体外合成的 CPV-mRNA 在 Sepharose 2 B 柱上的行为

用 0.015%  $HClO_4$  溶液平衡 Sepharose 2 B 柱 (0.5 × 29 厘米), 至流出液在 260 毫微米无紫外吸收。将体外合成的 CPV-mRNA ( $A_{260} = 0.60$ ) 通过柱, 上样后仍用 0.015%  $HClO_4$  溶液洗涤, 分管收集流出液, 测定 260 毫微米的光密度, 从图 7 可以看出, 体外合成的 CPV-mRNA 在 Sepharose

2 B 柱的空放体积流出, 回收率达 90%, 说明体外合成的 CPV-mRNA 的分子量是相当大的。

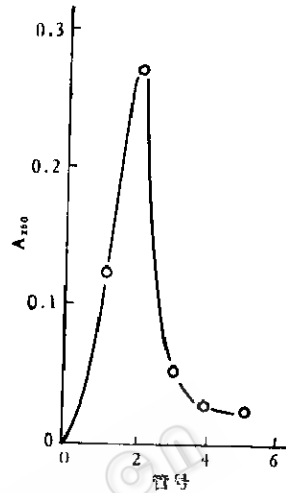


图 7 体外合成的 CPV-mRNA 在 Sepharose 2B 柱上的层析图

##### 4. 用纤维素柱层析分离体外合成的 CPV-mRNA

用 35% 乙醇-STE (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.05 M Tris, pH 6.85) 缓冲液洗涤纤维素 (SERVA 产品) 柱 (0.5 × 11 厘米) 至 260 毫微米无紫外吸收。

将体外合成的 CPV-mRNA 透析去盐后, 冷冻浓缩至小体积, 加乙醇使其含乙醇的浓度达 35%, 然后将此溶液通过已平衡好的纤维素柱, 按 Franklin<sup>[9]</sup> 的方法依次用 35% 乙醇-STE、15% 乙醇-STE、STE 缓冲液分级洗脱, 分管收集流出液, 测定 260 毫微米的光密度, 回收率达 90%。层析图谱如图 8 所示, 用含 35%, 15% 乙醇的 STE 缓冲液洗脱, 得到二部分单链 RNA, 都是在体外合成系统合成的 mRNA, 前者分子量小于后者, 而用不含乙醇的 STE 缓冲液继续洗涤时, 流出液已没有紫外吸收, 说明我们所获得体外合成的 CPV-mRNA 是单链的, 而且不含有病毒双链 RNA。这一点和反应后 CPV 颗粒电镜观察仍然是

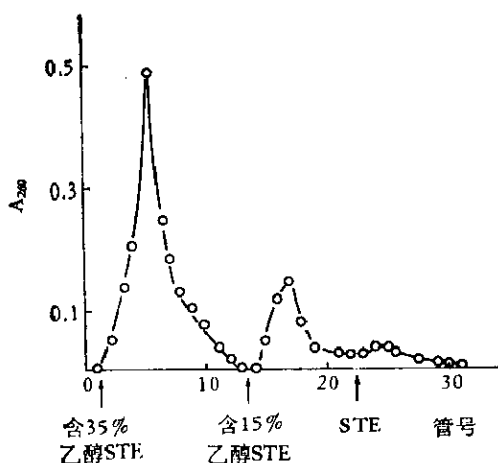


图8 体外合成的 CPV-mRNA 通过纤维素柱的层析图谱  
纤维素柱(0.5×11 厘米), CPV-mRNA 的上柱量  $A_{260}=2.5$ , 回收率 90%

完整相一致的。

### 5. 凝胶电泳

在载玻片上制备 1% 琼脂糖凝胶板, 在二块凝胶板上分别打 4 个小孔, 在 A、B 孔中各加入 10—20 微克从家蚕 CPV 抽提得到的双链 RNA (CPV-dsRNA), 在 C 孔中加入 10—20 微克的酵母 RNA, 在 D 孔中加入 10—20 微克体外合成的 CPV-mRNA。在 0.05 M, pH 8.6 巴比妥钠缓冲液中进行电泳。在凝胶板加样品小孔的一端接负极, 另一端接正极, 通过每块凝胶板的电流为 8—10 毫安。泳动 1 小时, 将凝胶板放入 0.003% 吖啶橙水溶液中染色 1 小时, 放在蒸馏水中漂洗过夜。在 257 毫微米的紫外光激发下, 家蚕 CPV-dsRNA 呈绿色, 酵母 RNA 和体外合成的 CPV-mRNA 均呈红色, 见图版 1。这一结果表明, 体外合成的 CPV-mRNA 是单链的<sup>[10]</sup>。

## 讨 论

家蚕 CPV 颗粒中带有以双链 RNA 为模板的 RNA 复制酶, 在体外以四种核苷三磷酸为底物, 在适当的反应条件下可合

成 mRNA。复制酶的活力与病毒制剂的纯度和新鲜程度, 以及反应液的 pH、反应时间、反应温度等因素的关系极为密切。

mRNA 较易受外界因素的影响而降解, 因此在进行 CPV-mRNA 体外合成、产物的分离纯化、产物性质鉴定等过程中, 必须严防核糖核酸酶的污染, 所用的器皿均经高温处理, 在反应液中加入适量皂土可吸附核糖核酸酶<sup>[11,12]</sup>。

关于 CPV 病毒 RNA 复制酶的研究, 除了缺乏分离 mRNA 的适当方法之外, 看来主要是病毒颗粒所带的 RNA 复制酶活力偏低, 因而借助同位素标记的底物进行专一的参入以提高其检测灵敏度。本文的结果表明, 用  $A_{260}$  毫微米测定 CPV 复制酶活力是足够准确的, 而且处理步骤简便, 可有效地防止 mRNA 降解, 同时能获得毫克量的复制产物 mRNA。因此在纯化 CPV 的过程中不仅要提高病毒的纯度, 而且要注意保持病毒的较高感染力和 RNA 复制酶的活力是很重要的。

另外, 我们用  $^3\text{H}$ -UTP 参入体外合成的 CPV-mRNA 的结果与非标记的体外合成 CPV-mRNA 的结果是吻合的, 进一步说明用 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离纯化所得的 CPV-mRNA 是不含 CPV 双链 RNA 的产物, 因而不需进一步分离纯化。

对参加体外合成 CPV-mRNA 反应后的 CPV 颗粒进行电镜观察的结果表明, CPV 仍是含有核酸的完整颗粒。至于复制反应在病毒颗粒中如何进行? 与不同基因相应的 mRNA 合成后是怎样释放出来的? 对这些问题的研究将是很有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] Skehel, J. J. and W. K. Joklik: *Virology*, 39: 822, 1969.
- [2] Shimotohno, K. and K. Miura: *Virology*,

- 53: 283, 1973.
- [3] Lewandowski, L. J. et al.: *J. Virology*, 4: 857, 1969.
- [4] Nakata, M. and N. Sezuki: *J. Plant Pathol.* 41: 345, 1975.
- [5] Shimotohno, K. and K. Miura: *J. Biochem.*, 74: 117, 1973.
- [6] 下远野邦忠等: 生化学实验讲座(7)タンペ質の生合成(下)(东京化学同人), 372, 1975。
- [7] 巫爱珍等: 生物化学与生物物理学报, 10: 381, 1978.
- [8] Cantoni, G. L.: *Biochemical Preparation*, 5: 58, 1957.
- [9] Franklin, R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 55: 1504, 1966.
- [10] Mehaster, G. K. and G. G. Carmichael: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74: 4835, 1977.
- [11] Singer, B. and C. H. Fraenkel: *Virology*, 14: 59, 1961.
- [12] Fraenkel, C. H. et al.: *Virology*, 14: 54, 1961.

## STUDIES ON DOUBLE-STRANDED RNA VIRUSES

### IV. IN VITRO SYNTHESIS OF THE mRNA OF CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS OF SILKWORM *BOMBYX MORI*

Wu Ai-zhen    Dai Ren-ming

Shen Xue-ren    Sun Yu-kun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The particles of dsRNA viruses, such as reovirus, rice dwarf virus and cytoplasmic polyhedrosis virus, are associated with a dsRNA dependent RNA polymerase. In general, the enzyme activity of RNA polymerase is detected by incorporation of radioactive precursor nucleoside-triphosphate into acid insoluble product and the separation of the RNA replicated in vitro is rather tedious. In this report, we devised a simple and convenient method for the detection of the enzyme activity of replicase and the simultaneous collection of the mRNA of CPV.

The mRNA replicated in vitro could

be effectively separated from the reaction mixture through DEAE-Sephadex A-25 column, so that the enzyme activity of replicase of CPV purified by gel filtration was sufficiently high to be estimated without using radioactive substrates.

The results indicate that the mRNA replicated in vitro are single-stranded RNA and the optimum pH for the replicase is 8.0. Electronmicroscopic observations revealed that the particles of CPV isolated from reaction mixture were intact particles. In the absence of S-adenosyl-L-methionine, the RNA synthesis of replicase of CPV was found to be negligible.