

流感病毒 RNA 与其多聚酶在试管内重建感染性颗粒的研究

柳元元 夏丽娟 张颖妹 董永坤

(中国医学科学院病毒学研究所生化组, 北京)

1. 本文报道用从流感病毒部分提纯的无感染性的 RNA, 与从病毒感染的鸡胚绒毛尿囊膜的部分提纯的无感染性多聚酶体系, 在试管内重建成为具有感染性的颗粒。将其接种于鸡胚羊膜腔可导致完整病毒的增殖。

2. 重建材料的感染性与流感病毒 RNA 在实验范围内于高渗缓冲液中透析以及在 90°C 加热时间有关, 时间较长者, 感染性也较高。于反应系统中加入用 DOC 裂解的病毒制品, 也可提高感染性。加入 DEAE-葡聚糖则无明显作用。

3. 对试管内重建的感染性颗粒进行了电镜观察。初步阐明了蛋白质在流感病毒生命活动过程中的重要作用。

病毒在适宜的活细胞内增殖的能力——感染性, 是病毒作为最小的生命形态的根本特征。

Maassab 等^[1]和 Portocala 等^[2]曾报道用酚抽提的某些流感毒株的 RNA 能感染鸡胚肾细胞单层培养。但 Ada 和 Lind^[3], Benedict 和 Lee^[4], 以及 Sokol 等^[5]用类似的方法抽提流感病毒 RNA, 则不能感染鸡胚和其它细胞培养。

自 1967 年以来, 相继发现牛痘病毒^[6,7]、呼吸道病毒^[8,9]、流感和副流感病毒^[10]以及水泡性口炎病毒^[11]的毒粒内含有病毒特异的多聚酶, 是病毒毒粒内在结构的一部分。Wildy^[12]将这些病毒归入核酸无感染性的病毒范畴内。Chow 和 Simpson 等提出病毒特异多聚酶是病毒具有感染性所必需的^[13]。

我们认为, 流感病毒 RNA 虽无感染性, 但如将病毒 RNA 与该病毒特异的多聚酶相结合, 则可能重新获得感染性。

本文初步报道用从流感病毒感染的鸡

胚绒毛尿囊膜提取的无感染性的无细胞多聚酶体系与无感染性的病毒 RNA 在试管内重建感染性颗粒的可能性。

材料与 方法

(一) 病毒株

1. 甲. 型——PR8 株。
2. 甲. 型——兰生 601 株(兰州生物制品研究所, 1960 年分离)。
3. 甲. 型——粤防 72/243 株(广东省卫生防疫站, 1972 年分离)。

(二) 病毒的抽提和浓缩

1. 用于抽提 RNA 的病毒材料: 用甲醛处理的来亨鸡红血球^[14]吸附受染鸡胚尿囊液中的病毒。PR8 株、兰生 601 株用 3—3.5% 的红血球, 粤防 72/234 株用 1.5—2% 的红血球。吸附后置 2—4°C 冰箱中过夜, 次日离心, 以冷生理盐生(粤防 72/234 株须预先将生理盐水的 pH 调到 8.0) 洗血球 2—3 次。离心, 向沉下的血球加入相当

本文于 1979 年 1 月 5 日收到。

电镜照片由本所电镜组方肇寅和赵同兴二同志协助拍摄, 特此致谢。

于尿囊液体积的 1/50—1/75 的 0.01M 磷酸钠-0.14M 生理盐水 (PBS pH7.8), 摇匀, 于 37°C 水浴中洗脱。PR8 株、兰生 601 株洗脱 2—2.5 小时, 粤防 72/243 株洗脱 2.5—3 小时, 以 700g 离心 20 分钟, 上清液再以 4,500g 离心 30 分钟。吸出上清, 置 2—4°C 冰箱内备用。成品的 HA 效价一般在 10^5 /毫升以上。

2. 用于制备 DOC 裂解物的病毒材料: 取上述初步纯化和浓缩的病毒悬液 10 毫升, 用 50° 转头以 35,000g 离心 70 分钟, 弃上清。用冷生理盐水洗管壁 3 次, 加入 2 毫升 PBS (pH7.8) 将沉淀冲下, 置玻璃研磨器研化, 再以 4,500g 离心 30 分钟, 吸出乳白色半透明的上清液, 置 2—4°C 冰箱内备用。

上述用红血球吸附提纯之病毒材料, 每毫升含蛋白约 200—400 微克, 每毫克蛋白质约含血凝素 25 万—50 万单位, PR8 株经常略高。经高速离心再次纯化的材料, 其蛋白含量每毫升约为 100—200 微克, 每毫克蛋白质含血凝素约为 50 万—100 万单位。

(三) 病毒 RNA 的抽提

按抽提乙型脑炎病毒 RNA 的方法^[13]。PBS 的 pH 7.8, 用乙醚冲洗 6 次。抽提前, 每毫升病毒悬液加入干烤灭菌的皂土 2.5 毫克, 抽提得的 RNA 溶液用蒸馏水稀释 1:5 后, 其光密度₂₆₀ 毫微米值为 0.2—0.4, 按计算每毫升含 RNA 约 40—80 微克。光密度 260 毫微米/280 毫微米值在 1.6—1.8 之间, 即可应用, 低于上述数值者不适于使用。

(四) 流感病毒感染的鸡胚绒毛尿囊膜无细胞多聚酶的抽提

1. 抽提: 取新鲜收获之尿囊液病毒 (滴度在 512 以上), 不再稀释, 每 6 毫升加入抗菌素母液 0.3 毫升 (母液每毫升含青霉素 1 万单位, 链霉素 1 万微克), 接种于 20 个 10 天龄鸡胚尿囊腔, 每个 0.2 毫升。置 37°C 培养 6.5—7 小时^[14]。用无菌手续取出绒毛尿囊膜, 在培养皿内以冷生理盐水 (含抗菌素母液 1/20) 撕洗 6—7 次至洗液澄清。以 -20°C 冰冻, 剪碎, 再冰冻。次日称重, 每 20 个膜加入 0.1M Tris-HCl 缓冲液 (pH8.1) 60 毫升, 以 10,000 转/分捣碎 5 分钟, 待数分钟后再捣碎 3 分钟。以 700g 离心 10—15 分钟, 吸出上

清, 为受染鸡胚绒毛尿囊膜匀浆, 置 2—4°C, 当日抽提无细胞多聚酶。基本上按照 Singer^[15] 抽提聚核苷酸磷酸化酶的方法。

以上操作, 均在 2—4°C 条件下进行。

2. 去除残余活毒: 取粗制品 2.5 毫升 (含蛋白质约 400—900 微克/毫升), 小心铺置在盛于高速离心管内经灭菌之 25% 蔗糖溶液 (2.5 毫升) 梯层上, 在低温条件下用 50° 转头以 35,000g 离心 70 分钟。小心吸出上层水相, 再铺置另一 25% 蔗糖梯度上, 同样离心。再吸出的上层水相, 即为部分纯化的无细胞多聚酶, 其蛋白质含量在 270—400 微克/毫升范围内。制备后置 2°C 冰箱中, 一星期内使用。

(五) 病毒 DOC 裂解物的制备

取高速离心纯化的病毒悬液 0.8 毫升, 加入 10% 去氧胆酸钠 0.2 毫升, 于 20°C 放置 3 小时, 多次振荡, 吸置灭菌透析囊内。以 1 升 PBS (pH7.8) 于流水温度 (16°C 左右) 下透析 72 小时, 每隔 6 小时换一次 PBS (1 升)。再移置 2—4°C 冰箱内透析 96 小时, 每隔 6 小时换透析液一次, 最后按上述方法以 35,000g 离心 70 分钟吸出上清, 按下法检查余毒。

(六) 制品中残余活毒的检查

向 0.2 毫升病毒 RNA 溶液、无细胞多聚酶或病毒 DOC 裂解物加入含抗菌素母液 1/20 之 PBS 0.6 毫升 (1:4 稀释), 接种于 12 天龄鸡胚羊膜腔内, 每组 3 个胚, 每胚 0.1 毫升。置 37°C 培养 48 小时。按常规收获, 检查各鸡胚尿囊液的 HA 反应, 若其中有一尿囊液呈阳性反应时, 该批制品即不可用。将 HA 反应均为阴性之尿囊液按等量相混合, 再接种另一组 12 天龄的鸡胚羊膜腔。同样检查尿囊液的 HA 反应, 如仍为阴性, 即认为该制品中不含残余活毒。

(七) 试管内重建材料的感染性检查

取试管内重建的材料 0.6 毫升, 加入 PBS 0.03 毫升, 混匀, 接种于 12 天龄鸡胚羊膜腔。置 37°C 培养 48 小时。按常规收获。检查各个鸡胚尿囊液的 HA 反应, 阳性者即认为具感染性。

(八) 蛋白质含量测定

按 Lowry 等^[16]的方法, 用 72 型分光光度计测定样品在显色后, 光密度₅₄₀ 毫微米的数值。

(九) RNA 含量的测定

将 RNA 溶液以蒸馏水稀释成 1:5 稀释度,用日本岛津分光光度计 (OV-50 型) 测定其在 260 毫微米和 280 毫微米波长的光密度。以酵母 RNA 为标准 (每毫升含 10 微克的纯制酵母核酸溶液,其光密度₂₆₀毫微米 = 0.219, 光密度₂₈₀毫微米 = 0.107), 计算 RNA 的绝对含量及光密度 260 毫微米/280 毫微米之比值。

(十) 细菌培养

全部病毒 RNA 和无细胞多聚酶等材料,均以肉汤斜面培养。培养阳性者弃去不用。

结 果

一、流感病毒 RNA 及其无细胞多聚酶在试管内重建为有感染性的颗粒

取病毒 RNA 2 毫升置小透析袋内 (临用前充分煮沸灭菌,并破坏 RNase 的活性),

用高渗缓冲盐水 (0.01M 磷酸钠-0.5M 氯化钠, pH7.8) 透析过夜,吸置试管内,放在 2—4°C 冰箱内备用。

准备煮沸灭菌的小透析囊若干个,按表 1 示意,加入各种实验材料。

将各透析囊 (对照除外) 置于温度为 20°C 的反应液 (0.01 M 磷酸钠-0.001 M EDTA-0.002M MgCl₂-0.14 M NaCl, pH7.8) 中透析 2 小时,连同透析液均置 2—4°C 冰箱中透析过夜。次日,从各透析囊 (内含液体体积用 PBS 补加至等量) 分别吸取 1.6 毫升,各加入抗菌素母液 0.03 毫升,接种于 12 天龄的鸡胚羊膜腔内,每组 3 个胚,每胚接种 0.1 毫升。置 37°C 培养 48 小时。按常规收获,分别检查各个鸡胚尿囊液的 HA 反应,阳性者并滴定其效价。结果见表 2。

表 1 流感病毒 RNA 和无细胞多聚酶实验材料组合方法 (示 意)

毫升 材料	组别 1 2 3			4 5 6			7 8 9			10 11 12			13 14 15		
粤 防 72/243 RNA	0.3	0.3	0.3							0.3					
兰 生 601 RNA				0.3	0.3	0.3				0.3					
PR8 RNA							0.3	0.3	0.3		0.3				
粤 防 72/243 E	0.3			0.3			0.3							0.3	
兰 生 601 E		0.3		0.3				0.3						0.3	
PR8 E			0.3		0.3		0.3								0.3
PBS 或其它	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

注: 病毒 RNA 对照和无细胞多聚酶对照,可先单独进行。

E——表示无细胞多聚酶,下同。

表 2 试管内重建颗粒鸡胚的感染性

材 料	接种鸡胚号	实 验 1		实 验 2	
		尿 囊 液 HA 反应	尿 囊 液 HA 滴度	尿 囊 液 HA 反应	尿 囊 液 HA 滴度
粤防 72/243 RNA + 粤防 72/243 E	1	-	8	-	256
	2	+		+	
	3	-		-	
粤防 72/243 E + PBS	1	-		-	
	2	-		-	
	3	-		-	
粤防 72/243 RNA + PBS	1	-		-	
	2	-		-	
	3	-		-	
兰生 601 RNA + 兰生 601 E	1	+	1024	+	≥1536
	2	-		-	
	3	-		+	
兰生 601 E + PBS	1	-		-	
	2	-		-	
	3	-		-	
兰生 601 RNA + PBS	1	-		-	
	2	-		-	
	3	-		-	

表 3 流感病毒 DOC 裂解物和 DEAE-葡聚糖对试管内重建颗粒感染性的影响

材 料	接种鸡胚号	尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度	材 料	接种鸡胚号	尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度
粤防 72/243 RNA+ 粤防 72/243 E+ PBS	1	-	256	兰生 601 E +PBS	1	-	
	2	+			2	-	
	3	-			3	-	
粤防 72/243 RNA+ 粤防 72/243 E +粤防 72/243 P*	1	+	1536	兰生 601 RNA +PBS	1	-	
	2	-			2	-	
	3	+			3	-	
粤防 72/243 RNA+ 粤防 72/243 E +DEAE-葡聚糖	1	-	≥1536	兰生 601 P* +PBS	1	-	
	2	+			2	-	
	3	-			3	-	
粤防 72/243 E +PBS	1	-		PR8 RNA+ PR8 E +PBS	1	-	1024
	2	-			2	+	
	3	-			3	-	
粤防 72/243 RNA +PBS	1	-		PR8 RNA+ PR8 E +PR8 P*	1	+	≥1536
	2	-			2	-	
	3	-			3	+	
粤防 72/243 P* +PBS	1	-		PR8 E +PBS	1	-	
	2	-			2	-	
	3	-			3	-	
兰生 601 RNA+ 兰生 601 E +PBS	1	+	1024	PR8 RNA +PBS	1	-	
	2	-			2	-	
	3	-			3	-	
兰生 601 RNA+ 兰生 601 E +兰生 601 P*	1	-	24 1024	PR8 P* +PBS	1	-	
	2	+			2	-	
	3	+			3	-	
兰生 601 RNA+ 兰生 601 E+ DEAE-葡聚糖	1	-	≥1536	-	-	-	-
	2	+					
	3	-					

注: P*——DOC 裂解的病毒材料。

表 2 结果表明,用实验组材料接种的鸡胚有 1—2 个受染,而所有对照组则不呈 HA 反应。用对照组的尿囊液混合后盲目传代的鸡胚尿囊液亦不呈 HA 反应。

二、病毒 DOC 裂解物和 DEAE-葡聚糖对试管重建颗粒感染性的影响

在上述反应物中加入 0.3 毫升病毒 DOC 裂解物或 0.3 毫升 DEAE-葡聚糖 (500 微克/毫升),对照组则代以 0.3 毫升 PBS。反应条件同上。结果见表 3。病毒 DOC 裂解物提高感染性一倍,DEAE-葡聚糖则无明显影响。

三、病毒 RNA 在高渗缓冲液中放置的时间对重建颗粒感染性的影响

病毒 RNA 在高渗盐水中透析后,再在 2—4℃ 冰箱中放置 7 天、28 天,然后进行实验。结果表明,放置时间较长者,明显提高感染性(表 4)。

四、病毒 RNA 在 90℃ 加热的对重建颗粒感染性的影响

取经高渗盐水透析后,于 2—4℃ 冰箱内放置 7 天的病毒 RNA 溶液,分置若干小

表 4 病毒 RNA 在高渗缓冲液中放置的时间对试管内重建颗粒感染性的影响

材 料	放置时间 (天)	接种鸡胚号	实 验 1		实 验 2	
			尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度	尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度
兰生 601 RNA + 兰生 601 E	16 小时	1	+	1024	-	
		2	-		+	≥1536
		3	-		-	
兰生 601 RNA + 兰生 601 E	7	1	+	≥1536		
		2	-			
		3	+	≥1536		
兰生 601 RNA + 兰生 601 E	28	1	+	≥1536	+	1280
		2	+	≥1536	+	512
		3	+	1024	+	512
兰生 601 E + PBS		1	-		-	
		2	-		-	
		3	-		-	
兰生 601 RNA + PBS	10	1	-		-	
		2	-		-	
		3	-		-	
兰生 601 RNA + PBS	28	1	-		-	
		2	-		-	
		3	-		-	

表 5 流感病毒 RNA 在 90°C 加热的时间对试管内重建感染性颗粒的影响

RNA 来源	加热时间 (分)	接种鸡 胚 号	尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度	RNA 来源	加热时间 (分)	接种鸡 胚 号	尿囊液 HA 反应	尿囊液 HA 滴度
兰生 601 株	2	1	+	64	PR8 株	2	1	-	
		2	-				2	-	
		3	+	64			3	-	
	5	1	+	≥6144		5	1	-	
		2	+	96			2	-	
		3	-				3	-	
	10	1	+	768		10	1	+	≥5120
		2	+	14			2	-	
		3	+	768			3	-	
	30	1	+	24		30	1	-	
		2	+	2048			2	+	16
		3	+	1024			3	+	24

试管内,每管 0.3 毫升。用纯氮驱除管内空气,轻轻塞好橡皮塞,使管内膨胀的气体逸出,塞紧橡皮塞。在 90°C 水浴中分别加热 2、5、10 和 30 分钟后,立即移置 60°C 水浴中 10 分钟,并不断振荡。再置于冰浴中急速冷却,置冰箱中过夜。

次日,向每试管加入病毒无细胞多聚酶 0.3 毫升, PBS 0.6 毫升。移入充分煮沸灭菌的小透析囊内,先于 20°C 的反应液中透析 1.5—2 小时,再置冰箱内过夜。次日,从每个透析囊内分别吸出 0.6 毫升反应物,各加入抗菌素母液 0.03 毫升,接种于 12 天龄鸡胚羊膜腔内,每组 3 胚,每胚 0.1 毫升。按常规培养、收获,进行各个鸡胚尿囊液 HA 检查。结果见表 5。

表 5 说明,在实验范围内,随着 RNA 加热时间的延长,重建颗粒的感染性,也随之增加。

五、试管内重建感染性颗粒的电子显微镜检查

在电子显微镜下观察到含有一种大小与病毒大致相等的圆形结构的颗粒,其边缘可见锥状或弥散状的突出(图版 I-1),可

能是重建的感染性颗粒。图版 I-2 为用细菌鞭毛吸附的提纯的受染鸡胚尿囊液病毒。

讨 论

本实验用硫酸铵分级盐析法从流感病毒感染 6.5—7 小时的鸡胚绒毛尿囊膜提取的、部分纯化的无细胞酶体系(在试管内具有聚合四种三磷酸核苷酸为酸不溶物质的活性,所以主要是病毒多聚酶),虽不能排除某些其它蛋白质的存在,但这种酶体系与无感染性的病毒 RNA 能重建具有感染性的颗粒,在鸡胚内繁殖而生成完整的流感病毒。这初步阐明了病毒蛋白质——病毒多聚酶在流感病毒生命活动过程中所起的重要作用。

在实验范围内,病毒 RNA 在高渗盐水环境中时间较长者,或在 90°C 加热时间略长然后于 60°C 退火者,重建的感染性亦较高。这表明,流感病毒 RNA 在酚抽提过程中,可能遭受一定程度的降解,而大大降低它与无细胞酶体系结合成为感染性颗粒的比例,部分 RNA 分子的链可能重新组合,而恢复了部分活性。

在反应体系中加入无感染性的病毒 DOC 裂解物,可提高感染性。可能病毒的血凝素和某些其它蛋白质亚基,对重建颗粒进入细胞,起了保护作用。此外不能排除 DOC 裂解物中含有少量的病毒 RNA 及病毒的多聚酶参加了作用。

在本文完稿后(1976年6月),我们看到 Rochovansky 和 Hirst^[17]报道,从流感病毒 WSN 株感染的细胞提取 RNP-多聚酶复合体对用 DEAE-葡聚糖和二甲基亚砷处理的 CEF 细胞具有感染性。

参 考 文 献

- [1] Maassab, H. F.: *J. Immunol.*, 90: 265, 1963.
- [2] Portocala, R. et al.: *Acta Virology*, 3:172, 1959.
- [3] Ada, G. L. and P. E. Lind: *Nature*, 184: 360, 1959.
- [4] Benedict, A. A. and D. Lee: *Nature*, 188: 911, 1960.
- [5] Sokol, F. and S. Schramek: *Acta Virology*, 6:373, 1962.
- [6] Kates, J. B., and J. Beeson: *J. Mol. Biol.*, 50:1, 1970.
- [7] Munyon, W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 58:2280, 1967.
- [8] Banerjee, A. K., and A. J. Shatkin: *J. Virology*, 6: 1, 1970.
- [9] Shatkin, A. J. and J. D. Sipe: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 61:1462, 1968.
- [10] Huang, A. S. et al.: *J. Virology*, 7:389, 1970.
- [11] Hutchinson, J. E. and B. W. J. Moshy: *Arch. Virusforsch.*, 37:203, 1972.
- [12] Wildy, P.: *J. Gen. Virology*, 20:1, Symposium. 1973.
- [13] Chow, N. L. and R. Simpson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 68:752, 1971.
- [14] Flick, J. A.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 68:448, 1948.
- [15] 柳元元,詹美云,许兆祥,柳华展,关学勤: *微生物学报*, 8:221, 1962.
- [16] Ruck, A. J. and K. W. Brammer: *Virology*, 39:51, 1969.
- [17] Singer, M. F.: *Polynucleotide Phosphorylase in Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. I(G. Cantoni and D. Davies, eds.), Harper and Row, New York, 1966.
- [18] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [19] Bishop, D. H. L. et al.: *J. Virology*, 14: 139, 1974.
- [20] Rochovansky, O. M. and G. K. Hirst: *Virology*, 73:339, 1976.

IN VITRO RECONSTITUTION OF INFECTIOUS PARTICLES FROM INFLUENZA VIRUS RNA AND INFLUENZA VIRUS POLYMERASE

Liu Yuan-yuan Xia Li-juan Zhang Ying-mei Dong Yong-kun

*(Laboratory of Biochemistry, Institute of Virology,
Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)*

1. In vitro reconstitution of infectious particles from noninfectious influenza virus RNA and noninfectious cell-free enzyme-system extracted from influenza virus infected chorioallantoic membrane was reported. The particles after being injected into the chorioallantoic cavities of 12-day chick embryos, resulted in virus multiplication.

2. Infectivity of the infectious particles was enhanced by prolonging the time of contact of the viral RNA with sodium phosphate buffer, pH 7.8, contain-

ing 0.5 M sodium chloride, or by heating it at 90°C for certain periods. Addition of DOC dissociated noninfectious virus materials also showed improved results, while the addition of DEAE-sephadex showed no beneficial effect.

3. The results obtained in this experiment may, in some measure, illustrate the important role of protein in the life process of influenza virus, and provide a possibility for obtaining variant strains from influenza viruses.