

家蚕细胞质多角体病毒的研究

V. 多聚酶与感染活力的关系

巫爱珍 戴仁鸣 沈学仁 沈菊英 孙玉昆

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

胡雪芳 钱元骏

(中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江)

纯的家蚕细胞质多角体病毒(以下简称 CPV)含有以双链 RNA 为模板的 RNA 多聚酶。家蚕 CPV 经氯仿, 30% 乙醇, pH3.8 等处理, 其 RNA 多聚酶活力显著降低, 感染能力也随之相应下降。用 Triton X-100 处理家蚕 CPV, 其多聚酶活力提高约 27%, 感染活力也相应提高。这些结果说明, 在病毒的复制增殖过程中, 家蚕 CPV 所含的以双链 RNA 为模板的 RNA 多聚酶是必需的。

同时, 对经不同条件处理的家蚕 CPV 颗粒的形态进行了电镜观察。

迄今已知家蚕细胞质多角体病毒、呼肠病毒、水稻普通矮缩病毒等病毒颗粒中带有 RNA 多聚酶。Kawase 报道了从家蚕 CPV 中抽提感染性核酸^[1], 但 Lewandowski 等人先后报道了从家蚕 CPV 中抽提感染性核酸均未成功^[2]。为了搞清双链 RNA 病毒如家蚕 CPV 感染时, 是否需要病毒颗粒所带的 RNA 多聚酶的参与? 还是只要有双链 RNA 基因即可感染。我们研究了不同试剂对 RNA 多聚酶活力的影响, 以及 RNA 多聚酶活力与感染能力之间的关系。结果说明, 家蚕 CPV 颗粒中的 RNA 多聚酶与感染能力之间存在着平行关系。

方法和结果

(一) 用不同条件处理家蚕细胞质多角体病毒

本文所用的家蚕 CPV 制剂系经分子筛凝胶柱层析分离纯化^[3]。

1. 氯仿处理: 取一定体积纯的家蚕 CPV 制

剂, 加等体积经 0.01M, pH 7.8 磷酸缓冲液饱和的氯仿, 在 30℃ 下振摇 15 分钟, 3,500 rpm 离心 5 分钟, 氯仿相与水相之间的界面有大量白色的沉淀析出, 收集含病毒的水相, 用水泵抽真空除去残留的氯仿, 测定 RNA 多聚酶活力及病毒的感染活性。

2. 30% 乙醇处理: 在 1.05 毫升纯的家蚕 CPV 制剂中加入 0.45 毫升无水乙醇, 使 CPV 溶液含乙醇的量达 30%, 在 30℃ 下振摇 30 分钟, 用油泵抽真空除去乙醇, 测定 RNA 多聚酶活力及病毒感染活性。

3. pH 3.8 处理: 在 0.3 毫升纯的家蚕 CPV 溶液中加入 0.15 毫升 0.05M, pH 3.8 柠檬酸缓冲液使 CPV 溶液的 pH 达 3.8, 在 30℃ 下保温 30 分钟, 加 0.05 毫升 1.0M, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 将 CPV 溶液的 pH 调至 8.0, 测定 RNA 多聚酶活力及病毒感染活性。

4. Triton X-100 处理: 加 0.15 毫升 1% Triton 溶液于 1.35 毫升纯的家蚕 CPV 溶液中,

本文于 1979 年 10 月 20 日收到。

感谢曹天钦教授对这一工作的关怀和指导。

在 30℃ 下保温 30 分钟,测定 RNA 多聚酶活力及病毒的感染活性。

(二) 经不同条件处理的家蚕 CPV 颗粒的电镜图谱

家蚕 CPV 是球状的颗粒,在电镜下观察有清晰可见的突起^[3],如图版 1-1 所示。

用电镜观察经氯仿,30% 乙醇,pH3.8,Triton X-100 处理后的家蚕 CPV 的形态,见图版 1-2—5。家蚕 CPV 经氯仿处理后,其表面的突起受到明显可见的损伤,甚至有部分病毒颗粒中的核酸由于外壳蛋白的破损而流失形成了空壳;在 30℃ 下,经 30% 乙醇处理 30 分钟的家蚕 CPV 颗粒的外壳破裂更为严重,完整的病毒颗粒已所剩无几;家蚕 CPV 在 30℃ 下经 pH3.8 处理 30 分钟,病毒颗粒已经崩解,轮廓模糊不清;而经 Triton 处理后的家蚕 CPV 颗粒的外形没有发生变化,却整整齐齐地排列在一起。

(三) 经不同条件处理后的家蚕 CPV 所含的 RNA 多聚酶活力的测定

按前文^[4]的方法测定家蚕 CPV 所含的以双链 RNA 为模板的 RNA 多聚酶活力,每份反应液的最终体积 1.5 毫升,对照反应液中含 pH 7.8 的 CPV 制剂 180 微克,其他反应液中分别加不同条件处理后的家蚕 CPV 180 微克。在 30℃ 下保温 20 小时,置于冰盐浴中停止反应,用 DEAE-Sephadex A-25 (钡型)柱层析分离多聚酶在体外合成的产物 mRNA,测定 mRNA 的光密度值及 ³H-UTP 参入 mRNA 的量,结果见表 1 和图 1。经氯仿,30% 乙醇,pH3.8 处理的 CPV 的 RNA 多聚

酶的体外合成产物 mRNA 的光密度值与 ³H-UTP 的参入并不呈现平行关系,其原因是家蚕 CPV 颗粒经氯仿、30% 乙醇、pH 3.8 处理后,病毒颗粒的外壳受到不同程度的损伤,部份病毒核酸释放,混在测定多聚酶活力的反应产物——mRNA 中,因而产物的光密度值即偏高,实际上 CPV 的 RNA 多聚酶活力的高低应以在体外条件下 ³H-UTP 参入多聚酶的反应产物——mRNA 的多少为准。而经 Triton X-100 处理的 CPV 颗粒没有受到损伤,其多聚酶的反应产物——mRNA 的光密度值与 ³H-UTP 的参入即呈现平行关系。

(四) 经不同条件处理的家蚕 CPV 的感染活力的测定

将上述经氯仿,Triton X-100,pH3.8,30% 乙醇处理的家蚕 CPV,拌合在人工饲料中或涂在

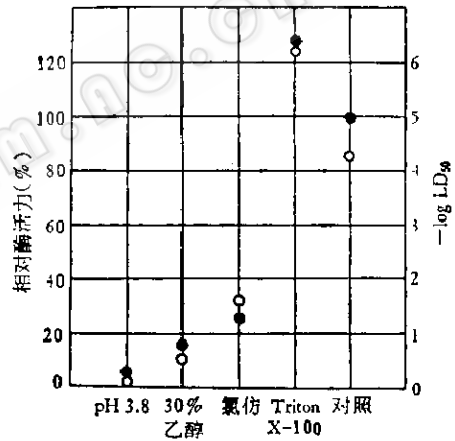


图 1 家蚕 CPV 的多聚酶与感染活力的关系
○——感染力; ●——RNA 多聚酶活力

表 1 经不同处理的家蚕 CPV 的多聚酶活力及感染活力

实 验	处理方法	RNA 多 聚 酶 活 力				感染活力
		产 物 mRNA		³ H-UTP 参 入		
		A ₂₆₀	%	cpm × 10 ⁻³	%	
1	对 照	0.698	100	82.9	100	4.6
	Triton X-100	0.908	130	137.2	127	6.5
	氯 仿	0.38	55	19.9	24	1.57
2	对 照	1.668	100	159.7	100	4.75
	30%乙醇	0.74	44	22.9	14.4	0.38
	pH 3.8	0.87	33	5.2	3	0

供试蚕: 苏,×苏,二龄第一天的家蚕。

桑叶上,给二龄第一天的家蚕添食^[1],每头蚕的食毒量为 0.27—0.3 微克的家蚕 CPV,每区 20 头蚕,各种处理均为二区,饲养至四龄,调查每区蚕的发病率,计算各种条件处理的家蚕 CPV 的感染活力 (LD_{50}),结果如表 I 及图 1 所示。

表 I 的结果表明,家蚕 CPV 在 30℃ 下经 pH 3.8 的条件处理 30 分钟,其多聚酶的活力及感染能力已完全丧失;家蚕 CPV 经 30% 乙醇处理后,其多聚酶活力降低至 14.4%,感染活力趋于零;家蚕 CPV 经氯仿处理后,其多聚酶活力为 24%,感染活力与对照相比约降低 2—3 个数量级;而家蚕 CPV 经 Triton X-100 处理后,其多聚酶活力提高 27%,感染活力也随之提高。上述的结果说明,家蚕 CPV 的感染力与其所含的以双链 RNA 为模板的 RNA 多聚酶的活力的关系是极为密切的,即多聚酶的活力高,病毒的感染活力也高;反之经上述处理影响了 RNA 多聚酶活力,感染能力也随之降低。说明在病毒的复制增殖过程中,家蚕 CPV 所含的以双链 RNA 为模板的 RNA 多聚酶是必需的。

讨 论

家蚕 CPV 颗粒所带的 RNA 多聚酶的最适 pH 为 8.0^[4],在 pH 3.8 的缓冲液中,在 30℃ 下保温 30 分钟, RNA 多聚酶活力及感染能力均丧失,电镜图谱表明病毒颗粒已经崩解,而呼肠病毒却有广泛的 pH 适应性,虽皆属双链 RNA 病毒,但不尽相同。

另外, Danil^[5] 曾综述多种双链 RNA 病毒的性质,认为双链 RNA 病毒对有机溶剂有一定稳定性。但本文结果表明家蚕 CPV 于 30% 乙醇中,在 RNA 多聚酶活力丧失的同时,感染能力也随之消失。表明不同的双链 RNA 病毒既有共性,也有特性。30% 乙醇和 pH 3.8 处理家蚕 CPV 的结果,除了阐明 RNA 多聚酶的功能外,在实际生产中可用于家蚕 CPV 的灭活,对于家蚕软化病病毒 (FV) 的研究中排除 CPV 的污染也是一项有效的措施。

氯仿处理家蚕 CPV,除去了很多病毒蛋白, CPV 颗粒所带的 RNA 多聚酶活力降低了,感染能力也随之而减弱。

Shimotohno 报道过用 Diflon 处理家蚕 CPV 能提高其多聚酶的活性,但未测定病毒的感染活力。本文实验中用 0.1% Triton 处理也能提高家蚕 CPV 的 RNA 多聚酶于体外合成 mRNA 的能力,同时也提高了其感染能力,在电镜下可观察到病毒颗粒除聚集之外,外壳无明显变化。

经过 pH 3.8, 30% 乙醇及氯仿处理的 CPV 病毒颗粒解体,模板 RNA 裸露,因此用前文^[4]所提供的方法,从 DEAE-Sephadex A-25 柱分离、测定 RNA 多聚酶活力的反应产物时,所获得的产物 (mRNA) 混有裸露的病毒双链 RNA,结果产物的 A_{260} 值偏高。实际上应以 ^3H -UTP 参入体外合成的 mRNA 的量来衡量家蚕 CPV 所带的 RNA 多聚酶的活性较为适当。当然,在病毒的感染过程中要求病毒颗粒有一定程度的完整性,上述处理条件除了影响家蚕 CPV 的 RNA 多聚酶的活性外,还影响到病毒颗粒的完整程度,因而影响了病毒的感染活力。除此之外,在病毒的复制过程中,这些处理条件到底影响哪一个环节仍待深入研究。

上述结果表明,家蚕 CPV 颗粒带有 RNA 多聚酶,在病毒感染复制过程中,利用其自身的 RNA 多聚酶复制病毒核酸,而不是利用寄主的多聚酶,即是说家蚕 CPV 颗粒所带的 RNA 多聚酶是感染所必需的,只用从病毒中抽提得到的病毒核酸进行感染实验是不能成功的,这可能是含有 RNA 多聚酶的双链 RNA 病毒的共性。

参 考 文 献

- [1] Kawase, S. and S. Miyajima: *J. Invert. Pathol.*, 11: 63, 1968.
- [2] Lewandowski, L. J. et al.: *J. virol.*, 4: 857, 1969.

- [3] 巫爱珍等: 生物化学与生物物理学报, **10**:381, 1978 年.
- [4] 巫爱珍等: 微生物学报, **20**(3):257, 1980 年.
- [5] Danil, W. V.: *Prog. Med. Virol.*, **12**: 192, 1978.
- [6] Shimotohno, K. and K. Miura: *J. Biochem.*, **74**: 117, 1973.

STUDIES ON CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS OF SILKWORM *BOMBYX MORI*

V. RELATIONSHIP BETWEEN THE RNA-POLYMERASE AND INFECTIVITY

Wu Aizhen Dai Renming Shen Xueren Shen Juying Sun Yukun
(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai*)

Hu Xuefang Qian Yuanjun

(*Institute of Sericulture, Chinese Academy of Agricultural Science, Zhen jiang*)

The cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm, *Bombyx mori* was treated with chloroform or 30% alcohol, both the activity of RNA-polymerase associated with the virion of the CPV and the infectivity decreased. When the CPV was incubated at pH 3.8 both the activity of RNA-polymerase and the infectivity disappeared. When it was treated with Triton x-100 both the infectivity and the enzymatic

activity of RNA-polymerase are increased by an amount of 27%. The electron micrographs showed that when the CPV was treated with 30% alcohol or incubated at pH 3.8 the particles of CPV were mostly empty shells some of which were broken. It appears that the activity of RNA-polymerase associated with the virion is closely connected with the viral infectivity.