

人类轮状病毒 RNA 在麦胚无细胞蛋白合成系统中的翻译

李明 陈家芳

(第一军医大学南方医院传染科, 广州)

本文描述了筛选 HRV 阳性粪便样品的方法,并分离纯化有模板活性的 HRV ss RNAs,然后在麦胚无细胞蛋白合成系统中进行翻译,每毫克 HRV ssRNAs 能合成 3.5×10^4 cpm 不溶于 TCA 的 HRV 各类多肽。经凝胶电泳分析,在 1.1×10^4 cpm 的各种多肽中,相当于 McCrae 等人报道的 VP1—VP4 四种多肽位置的放射性有 5.4×10^4 cpm, 相当于 VP5—VP12 八类多肽位置放射性有 5.3×10^4 cpm 左右,其数量的分布趋势与上述报道相似。

关键词 人轮状病毒 (HRV); HRV dsRNA 电泳; HRV ss RNA 在试管里的翻译和翻译产物的分析

人轮状病毒(HRV)是人类腹泻疾病的重要病原^[1],其衣壳蛋白和壳包核酸 (Viron) 11 段双链 (ds) RNA 所组成的基因组与寄主的分化肠细胞 (differentiated enterocytes) 之间的相互作用,构成急性胃肠炎的发病原因^[2,3]。鉴于目前国内尚未开展 HRV 分子生物学的研究,本实验旨在从患者粪便中直接筛选出强阳性 (HRV) 样品,并从中分离纯化出有模板活性的 HRV RNA,然后在试管里翻译出³H-HRV 各类多肽,为进一步揭露这种病毒致病的本质提供依据。

实验方法

(一) HRV 阳性粪便样品的筛选

从 1983 年 12 月来我院小儿科住院的婴幼儿急性胃肠炎病人的水样腹泻粪便中,取出 5ml 标本,加 5ml $2 \times$ TBS (2×10 mM Tris-HCl pH 7.6; 2×150 mM NaCl), 再加两滴乙醚,匀浆,于 4000 转/分离心 30 分钟;取上清液,然后加固体 SDS 直到浓度达 0.5—1.0%, 并和 10ml 苯酚氯仿异戊醇混合液 (25:24:1) 一起,经 87°C 处理 (不停地摇动) 5 分钟,按 1979 年李明报道的方法^[4]抽提

RNA, 取出相当于粪便样品 1—2ml 里的 HRV dsRNA 溶液, 加到 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶管 ($\phi 6 \times 120$ mm) 上,采用 TEA 缓冲液 (5mM Tris-HAc, 20mM NaAc, 2mM EDTA- Na_2 , pH 8.0; 18mM NaCl), 电压 100V, 电泳 17 小时, EB 染色, 紫外 (254nm) 观察。筛选出具有典型的 HRV dsRNA 电泳图谱的腹泻粪便样品,分离纯化 HRV 与制备供翻译用的 HRV ss RNA。

(二) 分离纯化 HRV ss RNA

取 HRV 强阳性病人的腹泻粪便 20ml, 加水 10ml, 再加 60ml TSC (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 1M NaCl, 1mM CaCl_2); 匀浆, 根据 Buitenerf 等人^[5]的方法, 经过低速离心, PEG 沉淀, 高速离心收集 HRV, 然后将其悬浮在 10ml TSC 中, 加 SDS (最终达到 0.5—1%) 和 EDTA- Na_2 (最终达到 0.01M), 40°C 处理 20 分钟, 再加等体积的苯酚氯仿异戊醇, 根据以前报道^[4]的方法抽提出 HRV dsRNA, 再用 4M LiCl 洗涤三次, 取少量溶于 TBS (pH 7.6), 作凝胶电泳与全波分析; 其它大部分用 90% 二甲亚砜 (DMSO) 于 70°C

本文于 1984 年 9 月 12 日收到。

本院小儿科谢孟坤同志等提供材料, 本校生化教研室彭朝晖同志提供小麦与有关试剂, 张肇和教授对本文仔细审改, 特此致谢。

处理 3 分钟, 突然冷却, 于 260nm 测定含量 (25 O.D./mg RNA), 然后贮存于 -20°C , 待翻译用。

(三) HRV ss RNA 在试管里的翻译

根据文献^[6]描述的方法制备陕西 4732 小麦胚 (S30) 抽提液, 按 Smith 等人^[7]稍加改良的方法进行翻译。合成蛋白反应混合液中含有 20mM Hepes-KOH, pH 7.6; 2mM 二硫苏糖醇, 1mM ATP, 20mM GTP, 8mM 磷酸肌酸; 磷酸肌酸激酶 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 80mM KCl, 3mM MgCl_2 , 10 $\mu\text{c}/50\mu\text{l}$ DL- ^3H 亮氨酸, 19 种未标记的氨基酸(每种 25 μM), S30 麦胚抽提液约 50O.D./ml, HRV ss RNA 2—8 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ (对照组用水代替 RNA, 其它皆同), 摇匀后, 于 29°C 水浴孵育 60 分钟, 放入冰浴中止反应, 取 20 μl 滴加在 Whatman 3mm ($\phi 15\text{mm}$) 滤纸上, 干燥, 按以前描述的方法^[4]处理, 计数。收集最佳条件下的反应混合液, 作翻译产物分析用。

(四) 翻译产物分析

取 90 μl 上述的反应混合液, 其中含有净合成 $3.5 \times 10^6\text{cpm}$ 不溶于 TCA 的 ^3H -HRV 多肽/mg

HRV ss RNA, 加 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase 液 20 μl , 60°C 处理 15 分钟。再加 10 μl 1% SDS-10mM 二硫苏糖醇溶液, 摇匀后立即放入冰浴 20 分钟, 于 18000 转/分离心 15 分钟, 得上清液 100 μl , 对消毒过的 PBS 透析两昼夜, 然后加到 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶管 ($\phi 6 \times 105\text{mm}$) 上, 根据李明等人^[8]的方法进行电泳。用液氮冻硬凝胶, 从原点起(指加样处)连续切片 35 张 (3mm/片), 各放入计数瓶中, 40°C 烘干(过夜), 加 H_2O , 0.3ml/瓶, 加盖密封后于 50°C 4 小时完全消化, 冷却, 每瓶加 5ml 闪烁液 (2.5 克 PPO, 0.25 克 POPOP, 甲苯 500ml, Triton X-100 250ml), 计数。最后按 ^3H -HRVs 多肽(cpm) = 实验组合成的多肽(cpm) - 对照组内源 RNA 合成的多肽(cpm) 计算。

结果与讨论

(一) 筛选的 HRV 阳性粪便样品

采用上述方法, 从 59 例粪便样品中检出 23 例强阳性样品。图 1A 的电泳图具

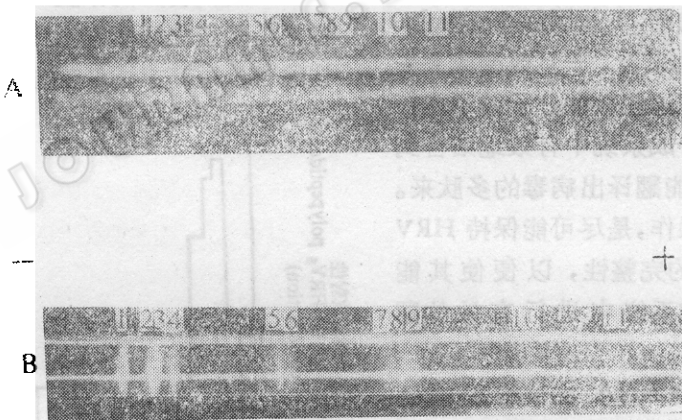


图 1 HRV ds RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

- A. 直接从患者粪便中抽提出的 HRV ds RNA
 B. 先从 A 同一样品中分离出 HRVs, 再制备出供翻译用的 HRV RNAs
 (7.5% 聚丙烯酰胺, 100V, 电泳 17 小时, 溴乙淀染色, 图中 1—11 为基因组片段序号。)

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of HRV dsRNAs

- A. HRV ds RNAs were directly extracted from faeces of children with acute diarrhoea
 B. translatable HRV RNAs were prepared from HRVs extracted from same faeces as above A

(After electrophoresis on a 7.5% polyacrylamide disc gel at 100V for 17h, HRV ds RNAs was stained with ethidium bromide. On the figures arrows indicate 1—11 genome segment number.)

有 9 条带, 共 11 个基因组 (dsRNA), 其中 2 和 3 以及 8 和 9 的 dsRNA 带尚未分开, 这与 Buitenwerf 等人^[5]报道的 S 型一致。

(二) 有模板活性的 HRV RNA

先从强阳性粪便样品中制取 HRV, 再抽提纯化的 HRV dsRNAs, 在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 中, λ_{\max} 为 257nm, λ_{\min} 为 230nm。图 1B 表明, 此种核酸在 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离成 10 条带, 与 Buitenwerf 等人^[5]报道的 F 型一致。这 11 个基因的大小与比例最近已由 Rixon 等人^[10]用电镜法测出。

图 1 中 A、B 是同一样品分别采用不同的方法制备的 HRV dsRNAs 的凝胶电泳图, 它们之间存在着差异, 可能前者是在 87°C 剧烈条件下抽提出来的核酸, 而后者是先分离出 HRV, 再用 SDS-EDTA 40°C 处理 20 分钟抽提纯化出来的核酸所致。从 Imai 等人^[11]报道的第 11 基因组 5' 端 m⁷G PPP GG^(m)C-结构来看, 一旦改变或丢失了这个帽子结构, 这些核酸分子就不能在麦胚无细胞蛋白合成系统中有效地结合到核糖体上, 也就不能翻译出病毒的多肽来。本实验的设计与操作, 是尽可能保持 HRV dsRNA 在结构上的完整性, 以便使其能在麦胚无细胞合成系统中进行有效的翻译。

(三) HRV ssRNA 在试管里的翻译

HRV dsRNA 经 90% DMSO 70°C 变性后, 得到了 HRV ssRNAs。在 50 μ l 麦胚无细胞蛋白合成液中, 分别含有 2、4、6 和 8 μ g 这种 RNA, 就能有效地合成 0.4 $\times 10^4$ 、1.4 $\times 10^4$ 、1.9 $\times 10^4$ 和 2.6 $\times 10^4$ cpm 不溶于 TCA 的 ³H-HRVs 多肽。在本实验条件下, 每 mg HRV ssRNAs 能合成 1.9—3.5 $\times 10^6$ cpm 不溶于 TCA 的 ³H-

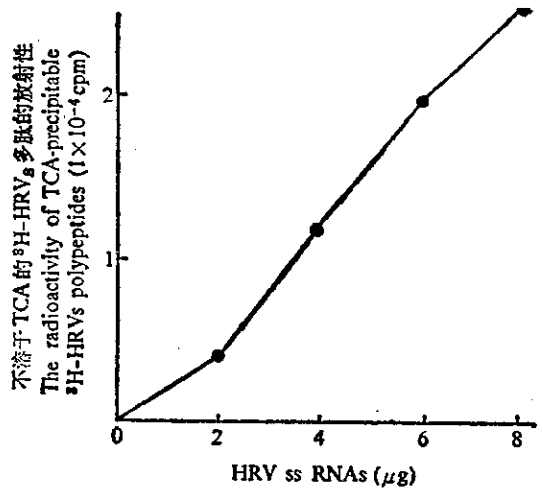


图 2 不溶于 TCA 的 ³H-HRVs 多肽的放射性 (cpm) 与 HRV ss RNA 浓度之间的关系

Fig. 2 The relationship between radioactivity of TCA-precipitable ³H-HRVs polypeptides and HRV ss RNAs concentration

HRVs 多肽。

由图 2 可见, 在一定浓度范围内, HRV ssRNA 在试管里的浓度与翻译出 ³H-HRV 各种多肽量之间基本上成正比关系。然而核酸含量过高或过低都会使合成多肽的效

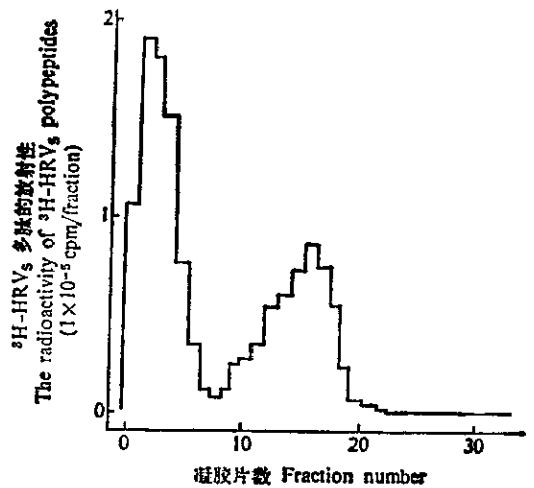


图 3 ³H-HRVs 多肽在 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶中的分布图

Fig. 3 Distributive profiles of ³H-HRVs polypeptides on 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis

率降低。此种现象与许多报道的结果都是一致的^[4,5,8,12]。

(四) HRV ss RNA 的翻译产物

选择 HRV ssRNAs 在麦胚无细胞蛋白合成系统中最佳反应条件,将合成的³H-HRV 各类多肽产物进行 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。发现新合成的 1.1×10^6 cpm 的 ³H-HRV 各类多肽集中分布在两个区域(图 3),其中最高峰大约集中了 5.4×10^5 cpm 的 ³H-HRVs 多肽,另一峰集中了 5.3×10^5 cpm 左右的 ³H-HRVs 多肽,这与 McCrae 等人^[12]报道的“图 1, F”放射自显影图示的趋势基本上是类似的,前者相当于轮状病毒 VP1—VP4 四种多肽的位置,后者为轮状病毒 VP5—VP12 八类多肽的位置,此项结果表明,HRV ss RNAs 能在陕西 4732 小麦胚(S30 抽提液)无细胞蛋白合成系统中进行有效的翻译,为研究 HRV 基因的体外表达与探索致病机理

提供参考数据。

参 考 文 献

- [1] Roseto, A. et al.: *J. Gen. Virol.*, **64**: 237—240, 1983.
- [2] Both, G. W. et al.: *Nucleic Acids Research*, **12**: 1621—1626, 1984.
- [3] Tyrrell, D. A. J. et al.: *Virus Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel, p. 111—124, 1982.
- [4] 李明等: *实验生物学报*, **12**: 247—255, 1979.
- [5] Buitenwerf, J. et al.: *J. Med. Virol.*, **12**: 71—78, 1983.
- [6] 李明等: *海洋与湖沼*, **13**: 318—330, 1982.
- [7] Smith, M. L. et al.: *J. Virol.*, **33**: 976—982, 1980.
- [8] 李明等: *实验生物学报*, **14**: 145—152, 1981.
- [9] Suzuki, H. et al.: *J. Med. Virol.*, **13**: 41—44, 1984.
- [10] Rixon, F. et al.: *J. gen. Virol.*, **65**: 233—239, 1984.
- [11] Imai, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**: 373—377, 1983.
- [12] McCrae, M. A. et al.: *Virology*, **117**: 435—443, 1982.

TRANSLATION IN THE WHEAT GERM CELL-FREE PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEM OF HUMAN ROTAVIRUS RNA

Li Ming Chen Jiafang

(*Depart. Infec Des., Nanfang Hospital, The First Medical College of PLA., Guangzhou*)

This paper reported that we have allowed HRV ssRNAs to translate into ³H-HRVs polypeptides in a cell-free protein-synthesizing system derive from 4732 wheat germ in Shaxi.

First we screened out human rotavirus (HRV) positive samples from stool of children with acute gastroenteritis employing 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of RNAs extracted from sample by the method of Rixon, et al. The HRV was isolated from positive samples according to the description of Buitenwerf, et al. Its pellets were resuspended in TSC containing 1% SDS-0.01 M EDTA in order to lyse the viruses, the suspension was allowed to stand for 20 min at 40°C. Then samples were deproteinized by subsequent phenolchloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction and finally the RNA present was precipitated by ethanol. It was washed with 4 M LiCl and denatured after incubation at 70°C for 3 min in 90% dimethyl sulfoxide. The prepared HRV ssRNAs

were translated in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. The HRV ssRNAs were added directly to the translation reaction mixture in an amount sufficient to give a final concentration of 2—8 μg/μl. Incubation was at 29°C for 60 min.

The protein products of translating HRV ssRNAs were represented by 2.0—3.5 × 10⁵ cpm/mg trichloroacetic acid-precipitable radioactive material and analyzed by PAGE. The distributive tendency towards ³H-HRVs polypeptides more or less corresponds to VP1—VP4 and VP5—VP12 region with 5.4 × 10⁵ & 5.3 × 10⁵ cpm respectively. These usually were similar to the autoradiograms of labeled products of Fig. 1 F as described by McCrae et al.

Key words

Human rotavirus (HRV); PAGE of HRV dsRNA; *in vitro* translation of HRV ssRNAs and analysis of its products