

两种制备感染细胞 DNA 的内切酶图谱法用于单纯疱疹病毒分型的研究

李景赞 刘 过* 尹明标 高雅君
夏丽娟 柳元元

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京)

摘要 用 ^{32}P 标记单纯疱疹病毒 I 型和 II 型感染 Vero 细胞, 抽提病毒 DNA, 然后以核酸内切酶 BamHI 酶切, 电泳结果 2 个型别的病毒 DNA 的电泳图谱均不相同。用非同位素标记的疱疹病毒感染细胞 DNA 酶切, 电泳与 ^{32}P -标记的病毒 DNA 图谱相比较, 显示相同的结果。实验表明简单受染细胞 DNA 进行核酸酶切及电泳可用来进行疱疹病毒的分型。实验说明选择核酸内切酶进行酶切有重要的影响。

关键词 疱疹病毒 DNA; 限制性核酸内切酶; 琼脂糖电泳

单纯疱疹病毒存在两个不同的血清型, 即 I 型 (HSV-1) 与 II 型 (HSV-2)^[1]。早期认为, HSV-1 主要感染于面部, HSV-2 主要感染于生殖器^[2]。鉴于单纯疱疹病毒可能与生殖器肿瘤的发生有关^[3,4], 因此建立快速而简便鉴别 HSV 的方法, 对于宫颈癌及其它生殖器疾病的病因学调查及 HSV 感染的分子流行病学研究具有重要的意义。依据生物学与免疫学性质, 建立了许多分型方法, 但由于二型病毒之间存在许多共同抗原, 采用这些方法常出现严重交叉反应^[5-8]。近年来发展的 DNA 限制性内切酶图谱分型方法可以避免这一缺点^[9-11]。本文利用标记的与非标记的感染细胞 DNA, 分析病毒 DNA 的内切酶图谱, 达到特异性分型的目的, 现将初步研究结果报道如下。

材料与方法

(一) 细胞与病毒

本实验采用 Vero 细胞 (非洲绿猴肾传代细胞), 生长在含有 10% 小牛血清的 Eagle's 培养液内。单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1, KOS 株) 及单纯疱疹病毒 II 型 (HSV-2, 333 株) 由美国 Rapp 实验室引进, -80°C 保存, 按文献 [12] 方法进行病毒空斑滴定。

(二) ^{32}P -标记病毒 DNA 的制备

参照文献 [9] 方法, 并作适当修改。待 Vero 细胞长成单层后, 置于低磷 Eagle's 培养液内保温 24 小时, 然后接种 5—10 MOI (感染倍数), 吸附 1 小时, 更换含有 2% 小牛血清的低磷 Eagle's 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 小时后, 每毫升培养液内加入 50 微居里 ^{32}P -磷酸盐 (无载体, 中国科学院原子能研究所提供), 继续培养, 直到出现 70% 以上的病变。加入等体积 5% (W/V) SDS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 小时, 振荡并转入塑

• 西南林学院的进修生。

料离心管内,用酚-氯仿抽提核酸3次,加2倍乙醇沉淀后,置-30℃冰箱保存备用。

(三) 限制性内切酶切割与放射自显影

乙醇沉淀的³²P-标记的病毒DNA用RNase A 37℃处理1小时,在耐RNase的样品内,加入足够量的限制性内切酶和予消化的pronase, 37℃消化3小时,加入适量含有60%蔗糖与溴酚兰的0.2M EDTA, pH7.5, 终止反应。0.6%琼脂糖凝胶电泳,每厘米2伏,电泳15小时左右。电泳完毕,³²P-标记的DNA片段转移到硝酸纤维素滤膜上,干燥后,在增感屏间压天津产X光胶片,-30℃曝光24—48小时,获得放射自显影图像。

(四) 病毒感染细胞DNA的抽提

参照文献[10, 11]方法,并作某些改良如下:单层Vero细胞接种5—10MOI HSV-1或HSV-2, 37℃培养16—24小时,出现70%以上病变。收获的细胞用磷酸缓冲盐水冲洗3次,重悬于0.05M Tris-HCl为0.01M EDTA缓冲液(pH8.1),加入1% SDS与500 μg/ml予消化的pronase, 37℃保温2小时,酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提核酸3次,2倍乙醇沉淀,样品溶于0.05M Tris-HCl, pH8.1, 用100 μg/ml RNase处理后,对0.1 × SSC (0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠)透析过夜,用于酶切与电泳分析。

(五) 琼脂糖凝胶电泳与EB染色

非标记的病毒感染细胞DNAs每微克加入5单位限制性内切酶, 37℃处理2小时,加到0.7%琼脂糖凝胶上,凝胶内含有0.5 μg/ml溴化乙锭,电泳15小时左右,紫外光下照相。

结 果

(一) ³²P-标记的病毒DNAs用于HSV分型的研究

高感染倍数HSV-1或HSV-2分别感染单层Vero细胞后4小时,继续在含有³²P-磷酸盐的低磷Eagle's培养液内培养,直至出现70%以上病变,收获细胞,抽提核酸,不经纯化,直接用BamHI酶切后电泳与放射自显影,

获得比较清晰的酶切图谱(图版I-1)。由图版I-1可见, HSV-1与HSV-2的酶切图谱明显不同。

(二) 非标记感染细胞DNAs用于HSV分型的研究

在高感染倍数HSV-1或HSV-2感染Vero细胞后4小时,细胞DNA合成基本终止,主要是病毒DNA合成。感染后16—24小时收获细胞,抽提核酸,尽管HSV感染的细胞DNA中既含有病毒DNA,也含有细胞DNA,但经BamHI酶切,琼脂糖凝胶电泳与EB染色,显示典型的病毒DNAs带(图版I-2),而且HSV-1与HSV-2的酶切图谱也明显不同。

(三) 限制性内切酶的选择

不论³²P-标记的病毒DNAs,或非标记的感染细胞DNAs,用不同限制性内切酶切割后产生特异的酶切图谱。分别用EcoRI与BamHI酶切,获得的酶切图谱如图版I-3所示。由图版I-3可见, HSV-1与HSV-2的不同限制性内切酶图谱也是不同的,而且BamHI的酶切图谱用于HSV分型较EcoRI更佳,提示选择合适的限制性内切酶用于HSV分型的研究是重要的。

讨 论

过去常用的鉴别HSV-1与HSV-2的方法主要是依据单纯疱疹病毒的生物学与免疫学性质,而近年来,某些分子生物学性质也用于单纯疱疹病毒的分型,其中以病毒DNA限制性内切酶图谱分析法最为适用,因为这个方法鉴别最明确,没有交叉。纯化的病毒DNA作病毒基因组物理图谱用于HSV分型的研究虽然很好,但制备纯化的病毒DNA是一项困难而费时的的工作。我们建立的制备与分析³²P-标记HSV DNA的方法,可以清楚地对HSV分离物进行鉴别,且不要求纯化病毒DNA,因为高感染倍数病毒感染细胞4小时后,细胞DNA合成基本终止,³²P-标记的DNA主要是HSV DNA,从而大大地简化了操作步骤,缩短操作

时间,便于大量样品的筛选。另外,由于不同限制性内切酶的酶切图谱不同,用若干不同的限制性内切酶加以比较,有助于对 HSV 分离物的分型获得肯定性结果。尽管上述方法具有一系列优点,但由于要求对细胞内病毒 DNA 进行同位素标记,对于一般基层应用及大规模分子流行病学调查也是困难的,因此迫切要求更为简便、更为实用的方法。在上述方法的基础上,我们又建立了非标记的感染细胞 DNA 内切酶图谱法用于 HSV 分型的研究,也获得较好的结果。该法的特点是直接从感染细胞抽提 DNA 代替从纯化的病毒颗粒抽提病毒 DNA,用非标记的感染细胞 DNA 代替标记的病毒 DNA。从技术上说,该法简便得多,要求感染细胞的数量较纯化病毒法少得多,而且整个操作方法所需时间也大大缩短,可广泛应用于宫

颈癌的病因调查与 HSV 的分子流行病学研究。

参 考 文 献

- [1] Schneweis, K. E.: *Z. Immun-Forsch.* 124: 24., 1962.
- [2] Dowdle, W. R. et al.: *J. Immunol.* 99: 974, 1967.
- [3] Kessler, I. I.: *Cancer Res.* 34: 1091, 1974.
- [4] Rawls, W. E. et al.: *Cancer Res.* 33: 1477, 1973.
- [5] Geder, L. and G. R. B. Skinner: *J. Gen. Virol.* 12: 179, 1971.
- [6] Nahmias, A. J. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 21, 1971.
- [7] Nahmias, A. J. and W. R. Dowdle: *Prog. Med. Virol.* 10: 110, 1968.
- [8] Schneweis, K. E. and A. J. Nahmias: *Z. Immun-Forsch.* 141: 471, 1971.
- [9] Lansdale, D. M.: *Lancet*, 1: 849, 1979.
- [10] Suzuki, N. et al.: *Microbiol. Immunol.* 25: 1291, 1981.
- [11] Ueno, T. et al.: *Microbiol. Immunol.* 26: 1159, 1982.
- [12] 尹明标等: *药学报*, 19 387, 1984.