

四株单纯疱疹病毒 (HSV) 感染 四种细胞的SDS—PAGE分析

张天明 向近敏 冯珏孙

(湖北医学院病毒研究所, 武昌)

提 要

我们用SDS—PAGE测定四株HSV感染HEp—2细胞、HeLa细胞、人胚肺细胞、鸡胚细胞多肽与未感染细胞多肽的电泳图结果表明: 四小时感染细胞多肽与未感染细胞多肽相比未见有区别, 二十四小时的感染细胞多肽与未感染细胞多肽的电泳带显示有所区别。其中感染HSV—1和HSV—2型的鸡胚细胞多肽电泳带亦显示有所区别。说明鸡胚细胞对HSV—1型和HSV—2型的敏感性差异, 亦可以从电泳带反映出来, 说明电泳带可作为HSV分型的又一方法。经蔗糖梯度超离心纯化的未标记同位素的地方株HSV—1CC₂₁株和HSV—2W株病毒颗粒用SDS裂解, 并进行SDS—PAGE表明这两株病毒的结构多肽分别为12和15种, 显示型的区别。本文还就关于在制备疫苗时以选择何种细胞为宜的问题进行了讨论。

单纯疱疹病毒有两个血清型, 即HSV—1型与HSV—2型, 均可引起人类的多种疾病^(1,2)。还有不少证据说明HSV—2型与宫颈癌的发生可能有关。因而对HSV的研究越来越受到医学界的重视。为了从生化方面探讨对HSV感染的早期诊断及生化分型的可能性, 我们用SDS—PAGE法对四株HSV感染四种细胞多肽和经蔗糖梯度超离心纯化的病毒颗粒结构多肽进行了分析研究。现将结果报告如下:

材料与方 法

一、细胞

按常规方法培养HEp—2细胞(由美国耶鲁大学医学院熊菊贞教授馈赠)、鸡胚细胞、HeLa细胞、人胚肺细胞。前两种细胞的培养液均为含5%小牛血清的199液。后两种细胞的培养液均为含10%小牛血清的199液, pH7.4, 青霉素100iu/ml, 链霉素100μg/ml, 维持液均为199液, 不含小牛血清。

二、病毒

HSV—2W株为地方株HSV—2型, HSV—1CC₂₁株为地方株HSV—1型。HSV—2G株、HSV—1F株均由美国芝加哥大学B. Roizman教授馈赠的标准株。病毒滴定采用空斑法, 滴度为10⁷pfu/ml。

本文1984年11月5日收到

病毒学杂志 1(2), 1986

• 1 •

三、试剂

丙烯酰胺(分析纯)、甲叉双丙烯酰胺(分析纯)E.M.K进口分装。巯基乙醇(分析纯)进口装。SDS(十二烷基硫酸钠)化学纯,上海牙膏厂产品,经无水乙醇重结晶制纯后使用^[5]。所用其它试剂均为分析纯。

四、标准株和地方株HSV感染细胞与未感染细胞的制备

单层HEp-2细胞、HeLa细胞、人胚肺细胞和鸡胚细胞、每方瓶(规格9×45×3cm,100ml容量)分别接种HSV-1F株,HSV-2G株标准株和HSV-1CC₂₁株、HSV-2W株病毒悬液各1ml感染细胞,同时每瓶加4ml维持液,未感染的细胞对照瓶加5ml维持液,均置37°C温箱培养。收获时间分别为感染后四小时(以检测早期抗原)、二十四小时(此时感染细胞产生CPE达“++++”)。吸出感染细胞的培养液,用0.05M pH7.0 Tris-HCl缓冲液洗二遍后,加适量缓冲液,用橡皮刮头刮取感染细胞,吸入试管内,经1,500rpm离心20分钟后,收集沉淀备用。未感染的细胞对照作同样处理。感染与未感染细胞用Olympus倒置显微镜观察和照相。

五、病毒的浓缩提纯^[6]

单层HEp-2细胞,每方瓶(规格9×45×3cm,100ml容量)分别加1ml HSV-2W株和HSV-1CC₂₁株病毒液感染细胞,同时每瓶加4ml维持液。细胞对照每瓶加5ml维持液,置37°C温箱培养。感染细胞在24小时左右,产生的细胞病变(CPE)达“++++”时收获培养液,于4°C下3,000rpm离心30分钟,然后取上清液于4°C用20,000分子量聚乙二醇透析浓缩约100倍,制成浓缩液。同时未感染细胞对照培养液作同样处理。

采用David Ridge法^[7]制备20—60% (w/w)连续蔗糖梯度。试验管加浓缩感染液,对照管加浓缩对照液各0.4ml,在MOM3170 B 3705水平转子中以40,000rpm 4°C离心3小时后,可见试验管内40—50%区带处形成一条乳白色带。而对照管内未见形成带。离心后,立即在管的底部刺穿一个小孔,收集可见的乳白色带,用缓冲液稀释后,同上条件再次离心,收集沉淀备电泳用。

六、SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)

采用Spear和Roizman^[8]的方法,在垂直板型电泳槽内(中国科学院动物所研制),进行不连续SDS—PAGE,分析比较感染细胞多肽(ICP)和未感染细胞多肽及病毒颗粒的结构多肽(VP)。电泳凝胶板大小为13×10×0.1cm。分离胶长11cm,浓缩胶长2cm。分离胶含0.375M Tris-HCl(pH8.8),0.1% SDS,0.03% TEMED(四甲基乙二胺),0.035% (w/v) AP(过硫酸铵),聚丙烯酰胺凝胶浓度为9%,双体:单体为1:38。浓缩胶含0.125M Tris-HCl(pH7.0),0.1% SDS,0.03% (v/v) TEMED,0.07% (w/v) AP,聚丙烯酰胺凝胶浓度为3%。电极缓冲液pH8.5含0.025M Tris,0.192M 甘氨酸和0.1% SDS。样品处理液为0.05M Tris-HCl(pH7.0),2% SDS,5% 巯基乙醇,10% 甘油,0.005% 溴酚兰。感染细胞和未感染细胞样品及纯化的病毒颗粒加处理液后,于沸水浴中处理3分钟,室温冷却后,立即电泳。每孔加样量为250μg蛋白^[9]。开始时,电流为10mA,10分钟后,电流加到20mA,恒流电泳5小时。凝胶板用15%三氯醋酸(TCA)固定过夜,用含7%冰醋酸的25%甲醇溶

液浸泡2小时后,用0.25%考马斯亮兰R—250染色4小时,再用含7%冰醋酸的25%甲醇溶液脱色。

结 果

四株HSV感染HEp—2细胞、HeLa细胞、人胚肺细胞(HEL)、鸡胚细胞(CE)四小时后,均未见细胞病变。感染二十四小时后几乎所有细胞均产生病变。其中感染HSV—1的鸡胚细胞仍无细胞病变。

用不连续SDS—PAGE测定四株病毒感染四种细胞多肽与未感染细胞多肽的电泳图谱表明:四小时的感染细胞多肽与未感染细胞多肽相比无区别,二十四小时的感染细胞多肽与未感染细胞多肽相比有明显区别。其中感染鸡胚细胞多肽的电泳图谱显示有型与型的区别。

1.在HEp—2细胞的电泳图谱中,感染细胞多肽比未感染细胞多肽多一条带ICP6,约有48条带。图1。

2.在HeLa细胞的电泳图谱中,感染细胞多肽比未感染细胞多肽多一条带ICP11,约有49条带。图2。

3.在人胚肺细胞的电泳图谱中,感染细胞多肽比未感染细胞多肽多一条带ICP5,约有37条带。图3。

4.在鸡胚细胞的电泳图谱中,感染细胞多肽中的ICP3泳动率稍慢于未感染细胞多肽中的带3,其中感染细胞多肽的电泳图谱显示有型与型之间的区别,感染HSV—2G株和W株的感染细胞多肽与感染HSV—1F株和CC₂₁株的感染细胞多肽相比多一条带ICP5,约有35条带。图4。

经蔗糖梯度超速离心纯化的HSV—1CC₂₁株与HSV—2W株的病毒颗粒用SDS裂解后,用不连续SDS—PAGE方法测定这两株病毒的结构多肽电泳图显示有明显的区别。HSV—1CC₂₁株病毒颗粒结构多肽分离得到12条带(VP1—VP12),电泳带从上到下依序以数字标记,HSV—2W株病毒颗粒结构多肽分离得到15条带(VP1—VP15),其中CC₂₁株病毒颗粒结构多肽中的VP3、VP5、VP10和VP11分别与W株病毒颗粒结构多肽中的VP1、VP2、VP4和VP9的电泳迁移率相同。图5。

讨 论

HSV感染细胞后,分析病毒基因编码的特异蛋白称为感染细胞多肽(ICP)^[10]。我们用SDS—PAGE测定四株病毒感染四种细胞多肽与未感染细胞多肽的电泳图谱表明,四小时的感染细胞多肽与未感染细胞多肽相比未见有区别,反映此法尚不能检测出早期抗原成分之间的差异。二十四小时的感染细胞多肽与未感染细胞多肽的电泳图则有所区别,结果表明:在感染HEP—2细胞、HeLa细胞、人胚肺细胞中,均可见一条病毒特异多肽带,这条带不见于未感染细胞。HSV—1型与HSV—2型感染鸡胚细胞的多肽也有区别,感染HSV—2型的细胞多肽比感染HSV—1型的细胞多肽多一条。熊菊贞^[11]曾报导HSV—1无论多高的滴度感染鸡胚细胞均不产生CPE。本实验结果表明鸡胚细胞对HSV—1型和HSV—2型的差异,亦可从电泳带反映出来。所以除鸡胚细胞的CPE可作为一个分型依据外,电泳带的区

别亦可作为生化分型的一个方法。

四种HSV感染四种细胞的 SDS—PAGE电泳图的结果表明:HEp—2 细胞与 HeLa 细胞中的电泳带比人胚肺细胞和鸡胚细胞中的电泳带要多十余条,这一点颇有意义,因为电泳带多的两种细胞均为肿瘤细胞系,所产生的蛋白带显然比较复杂。试图制造亚单位疫苗时,选择培养病毒的宿主细胞是一个值得考虑的重要问题。Cappel等^[12]报道用鸡胚成纤维细胞制造HSV亚单位疫苗,其优点是正常细胞,其缺点是异种细胞,抗原性也可能不全。当然抗原性与免疫原性是有区别的。本实验结果表明如果制造疫苗(当以选择)当以选择人胚肺细胞为好,总之是值得和必须详细研究的问题。

关于HSV病毒颗粒的结构多肽数目,不同作者报道的结果不尽相同。Spear和Roizman^[8]首先用丙烯酰胺同甲叉双丙烯酰胺交联的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离得到24条带(VP1—VP24),此后为了得到病毒颗粒中所含多肽的更好溶解,用N,N,一二烯丙基酒石酸二酰胺(DATD)代替甲叉双丙烯酰胺交联的聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离得到33条带^[13]。进一步研究发现血清型不同的毒株电泳图也有区别,根据HSV结构多肽的电泳特征,可以区别HSV—1与HSV—2分离株^[9]。我们用经蔗糖梯度超离心纯化的未标记同位素的地方株HSV—1CC21株和HSV—2W株病毒颗粒用SDS裂解,并进行SDS—PAGE分析的初步结果表明,这两株病毒颗粒的结构多肽有所同,也有所不同:HSV—1CC₂₁株有12条带,HSV—2W株有15条带,其中有4条带泳动相同。这一电泳结果与本所对这两株病毒的血清分型的报道相符^[15],即血清型的差异,在蛋白电泳中可反映出来。

参 考 文 献

- [1] Fenner, F.J., et al., 1976. Herpetoviridae. In "Medical Virology," 297—319, Second, Academic Press.
- [2] 张天明, 1982, 国外医学微生物学分册, 4: 156.
- [3] Kessler, I.I., 1974. Cancer Res, 34: 1091.
- [4] 向近敏等, 1974—1981. 阴道疱疹病毒与宫颈癌关系的研究论文汇编.
- [5] Crestified, et al., 1955. J. Biol. Chem., 216: 185.
- [6] 张天明等, 地方株单纯疱疹病毒的浓缩提纯, 待发表.
- [7] David Ridge, 1978, Centrifugal Separations In Molecular and Cell Biology, 33—59, Butterworth, London.
- [8] Spear, P.G., 1972. J Virol, 9: 143.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室编, 1980. 生物化学实验指导, 94, 人民教育出版社.
- [10] Roizman, B., et al., 1978. Oncogenesis and Herpesviruse II. Part 1, IARC Scientific Publication No 24, Part 1, 269
- [11] Hsiung, G.D., 1980. 来华讲学, 武汉.
- [12] Cappel, R., et al., 1980. Arch. virol. 65 (1): 15.
- [13] Heine, J.W., et al., 1974. J. Virol. 14: 640.
- [14] Cassai, E.N., et al., 1975. J. Virol. 16: 1327.
- [15] 向近敏等, 1979, 肿瘤防治研究, 6: 12.

ON THE SDS-PAGE ANALYSIS OF 4 TYPES OF CELL CULTURE INFECTED WITH 4 STRAINS OF HERPES SIMPLEX VIRUS

Zhang Tien-ming Hsiang Chin-ming Feng Jue-sun
(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan)

Four types of cell culture, namely, HEP-2, HeLa, human embryo lung fibroblast and chicken embryo fibroblast were infected with 4 strains of herpes simplex virus, i. e. CC21, F, W, and G, the formal 2 of type 1 and W and G of type 2. The SDS-PAGE maps showed difference between the maps form at 4 h after infection and that at twenty four hours after virus infection, the electrophoresis maps showed a difference between infected and uninfected cells. In the chicken embryo fibroblast culture, there were difference between maps of HSV-1 and that of HSV-2. This was to mean that by the chicken embryo fibroblast system HSV-1 could be differentiated from HSV-2 by the SDS-PAGE method. Therefore the PAGE technique might be used as a method to classify the types of herpes simplex virus.

After sucrose gradient density centrifugation the SDS-PAGE technique showed 12 bands in HSV-1 and 15 bands in HSV-2 respectively. A discussion was made on some problems of selection of types of cell culture in case the vaccine production is considered.

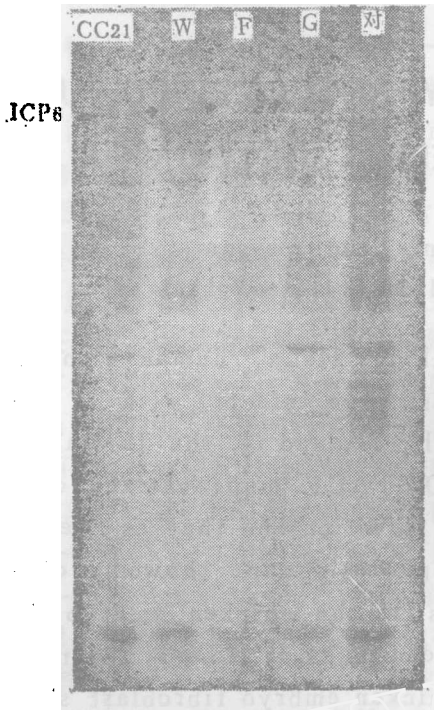


图1 HSV感染HEP-2细胞和未感染HEP-2细胞24小时的SDS-PAGE电泳图谱

Fig1. The SDS-PAGE maps of HSV infected and uninfected Hep-2 cells at 24 hours incubation.



图2 HSV感染HeLa细胞和未感染HeLa细胞4小时与24小时的SDS-PAGE电泳图谱

Fig 2. The SDS-PAGE maps of HSV infected and uninfected HeLa cells at 24 hours and 24 hours incubation.

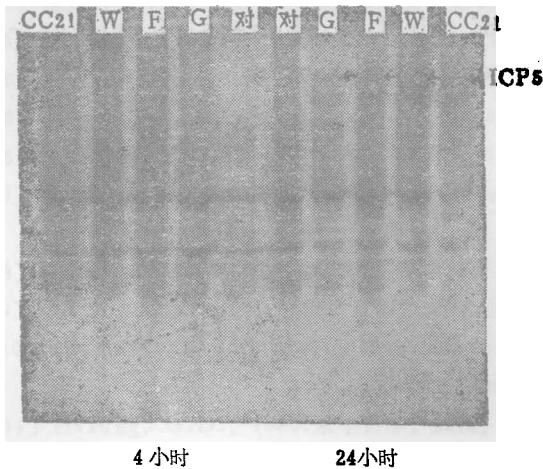


图3 HSV感染HEL细胞和未感染HEL细胞4小时与24小时的SDS-PAGE电泳图谱:

Fig3. The SDS-PAGE maps of HSV infected and uninfected human embryo lung fibroblast cells at 4 hours and 24 hours incubation.

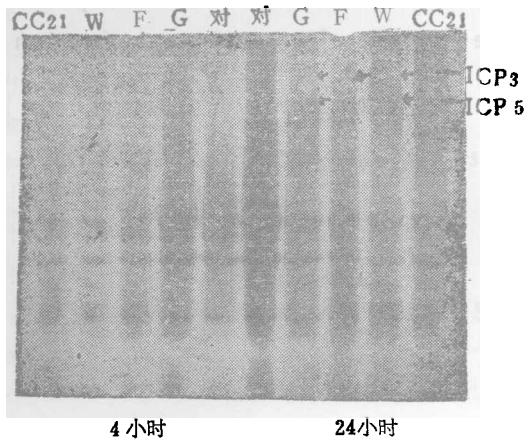


图4 HSV感染CE细胞和未感染CE细胞4小时与24小时的SDS-PAGE电泳图谱:

Fig4. The SDS-PAGE maps of HSV infected and uninfected chicken embryo fibroblast cells at 4 hours and 24 hours incubation.

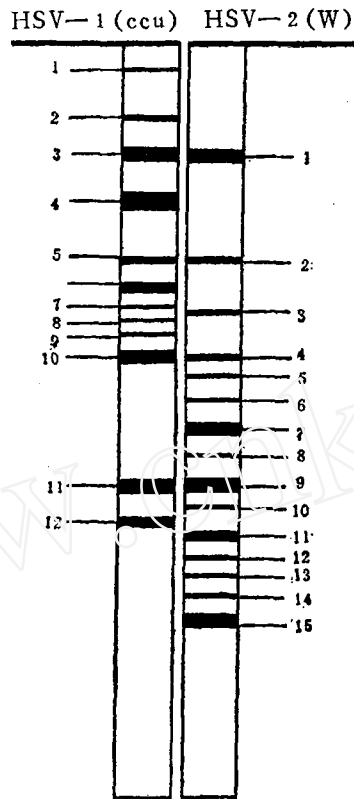


图5. 地方株HSV-1 CC₂₁和HSV-2 W病毒颗粒结构多肽SDS-PAGE电泳图谱示意图。

Fig5. The SDS-PAGE maps of the local strains of HSV-1 CC₂₁ and HSV-2 W virions structural polypeptides.