病毒学杂志 2，1988
Virologica Sinica

HSV 诱导的 dTK 分析及其在抗病毒药物研究中的应用

汤 华 任中原

（天津医学院微生物学教研室，天津）

提 要

本试验描述了以 ^{125}I—UdR 为基质检测 dTK 活性的方法。发现 HSV—1，HSV—2 在感染的 HeLa 细胞中诱导产生了高活性的 dTK，同时证明了病毒 dTK 对新的抗病毒化合物——DHPG存在较高的敏感性，并讨论了其敏感性与DHPG 抗病毒作用的关系及其检测dTK 的可能意义。

HSV-1，HSV-2 及 VZV 在感染的细胞中能诱导合成一种特异的脱氧胸苷激酶（Deoxythymidine Kinase，dTK），它是由各自 360个氨基酸的二条多肽链构成的蛋白酶[1]。它能利用不同于细胞 dTK 的特异性基质，据此，人们致力于寻找这些特异性基质作为选择性抗疱疹病毒药物[2]。近年来所发现的几种新的选择性抗病毒药物，其特异性正是由于这些化合物选择性地被病毒 dTK 磷酸化所致，这些化合物包括 BVdU，FIAC，ACV 以及目前研究较为活跃、在结构上与 ACV 类似但抗疱疹病毒活性优于 ACV 的化合物——DHPG（二羟丙氧甲基鸟嘌呤）等[3,4]。我室正在进行 DHPG 的抗病毒活性研究，为阐明其抗 HSV 作用与 dTK 的可能相互关系，我们参考前人的方法建立了检测 dTK 活性的分析方法，并同时进行了 HSV 对 DHPG 的敏感性分析，现报告如下：

材 料 与 方 法

（一）病毒 HSV-1（Stocker 株），HSV-2（Sav 株）均由中国预防医学科学院病毒研究所提供。

（二）细胞培养 HeLa 细胞，传代按常规进行，生长液 DMEM（Difco）加10%灭活新生牛血清，卡那霉素（100μg/ml）。

（三）Whatman DE*81（LKB）

（四）试剂 ^{125}I-UdR（370μCi/mmol，中国原子能研究院提供），DTT(Sigma)，ATP（天津生化制剂厂生产），DHPG（南开大学分子生物学研究所提供）。

（五）FT—613自动计数 ^{125}I 放免测量仪 北京核仪器厂。

本文于1987年2月24日收到

本院生化教研室苏学良教授，南开大学分子生物学研究所宗建超讲师提供部分试验，特此致谢。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（六）dTK 活性分析 按 Cheng 及 Gronowitz 等方法进行[5,6]。

1，dTK 的制备。生长在 25ml 培养瓶中的单层 HeLa 细胞，移去生长液，37℃吸附 HSV-2 或 HSV-2（100PFU）1 小时，弃去病毒液加上含 2% 新生牛血清的 DMEM 维持液。37℃培养到 70%CPE 出现时，将细胞吹打下来，离心收集，PBS 洗一次，加 1 ml 稳定缓冲液(见表 1)，细胞超声打碎1-$\frac{1}{2}$分钟，而后 3600r/m 离心 30 分钟，收集上清。最后，上清经 100,000g（Beckman L8--80M，171 转头）离心 2 小时，收集上清，用稳定缓冲液作不同的稀释，－80℃冰箱保存备用。HeLa 细胞 dTK 的制备方法同上，但不吸附病毒。

2，dTK 的活性测定。先将 5μl 所需浓度的酶样品与 35μl 稳定缓冲液混合，置 37℃，2 分钟，再加 14μl 分析混合物（见表 1）与 7μl 基质液(^{125}I-UdR，稀释成0.32 μCi/7μl），37℃反应不同的时间，取出 30μl 滴于保持在95～100℃的 1cm^2 Whatman DE-81 纸片上以终止酶促反应。然后，将纸片放在 1 mM 的甲酸铵溶液中漂洗四次，蒸馏水洗 1 次。最后甲醇漂洗 1 次，待干燥后置试管中在放免测量仪上测定 CPM 数。

（七）dTK 对 DHPG 的敏感性分析 5μl 酶样品与 35μl 含不同浓度的DHPG稳定缓冲液混合，置37℃，2 分钟，加 7μl 分析混合物，37℃作用30分钟后加 7μl 分析混合物与 7μl 基质液，37℃反应45分钟，此后步骤同上。

结　果

表1 dTK 分析所用的缓冲液浓度及组成

Table 1 Concentration and composition of buffers used in the dTK assay*

Component	Stabilizing buffer	Assay mixture	Final conc.
Tris-maleate		700mM	160mM
Tris-hydrochloride	250mM		160mM
$MgCl_2$	2mM	70mM	17mM
KCl		88mM	20mM
NaF		10mM	2.3mM
Adenosine triphosphate	2mM	35mM	9.3mM
Dithiothreitol	3mM	3mM	2.7mM
Glycerol	10%(wt/vol)		6.6%(wt/vol)
Bovine serum albumin	0.5mg/ml		0.33mg/ml
pH	7.5	6.5	7.3

* dTK 在分析时，35μl 稳定缓冲液加上 14μl 分析混合物 7μl 和基质液，加上 5μl 的酶样品，最终体积 61μl。

* In the dTK assay, 35μl of stabilizing buffer mixed with 14μl of assay mixture and 7μl of substrate solution with the appropriate concentration. 5μl of enzyme solution, diluted in stabilizing buffer, was also added, and the final volume was 61μl.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一、不同来源的 dTK 活性。从 HSV-1 或 HSV-2 感染的 HeLa 细胞及对照 HeLa 细胞经上述方法提纯的 dTK 作为酶源，在 1:10 的酶浓度下，其反应活性与时间的关系如图 1 所示。从中可以看出 HSV-1 dTK 比 HSV-2 dTK 活性高，而 HeLa dTK 反应速度最慢。此外，三种来源的 dTK 活性随酶浓度的降低而降低，其结果如图 2 所示，表明任一浓度的酶活性，仍然是 HSV-1 dTK>HSV-2 dTK>HeLa dTK。

二，dTK 对 DHPG 的敏感性。将酶与不同浓度的 DHPG 作用后以阻止 dTK 对底物 ^{125}I-UdR 的磷酸化率（对照百分率 $=\frac{\text{含 DHPG 的 CPM}}{\text{不含 DHPG 的 CPM}}\times 100\%$）为指标来说明 dTK 对 DHPG 的敏感性。结果（表2 所示）表明病毒 dTK（1:100）对 DHPG 存在较高的敏感性，并且随着 DHPG 的浓度增加，对 ^{125}I-UdR 的磷酸化率逐渐降低。其中 HSV-1 dTK 活性最高，而 HeLa 细胞本身的 dTK（1:10）对 DHPG 仅表现出很弱的作用。

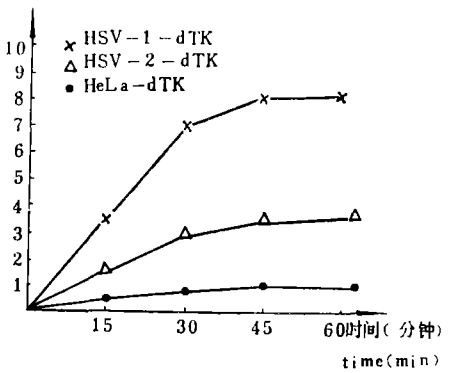

图 1 酶活性与反应时间的关系

Fig 1 Relationship between enzyme activity and reactive time in dTK assay.

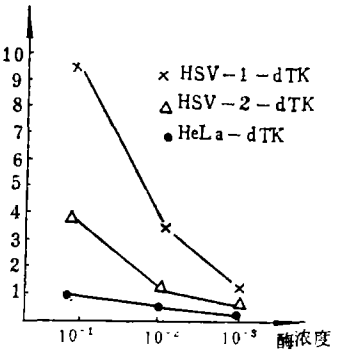

图 2 酶活性与酶浓度的关系

Fig 2 Relationship between enzyme activity and enzyme concentration in dTK assay.

表2 dTK 对 DHPG 的敏感性

Table 2 Sensitivity of dTK to DHPG

dTK 来源（浓度）Sources of dTK(conc)	对照百分率 % Activity of control* 0.005	0.05	0.5 g/ml
HSV-1(1:100)	57.8	35.9	25.7
HSV-2(1:100)	65	48.7	37.8
HeKa (1:10)	91	76.5	67.5

* ^{125}I-UdR 的磷酸化活性，含 DHPG 与不含 DHPG 的磷酸化活性比。

ϕ DHPG 的最终浓度。

* ^{125}I-UdR phosphorylation activity. Control assay had no DHPG in assay mixture.

ϕ Final concentration of DHPG.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

讨 论

dTK 不仅是疱疹病毒本身的特点之一，而且在 HSV-1，HSV-2 全身感染的患者血清中其 dTK 及 dTK 抗体的检出可能与疾病的归转有一定的关系[6]。此外，单核细胞增多症，某些肿瘤性疾病患者如何杰金氏病，淋巴细胞白血病患者的血清中 dTK 活性增高并认为可作为其肿瘤标志之一[7,8]。同样已证明 dTK 作为 HSV 转化细胞的一显著标志[9]。因此，有必要建立一敏感，快速的检测 dTK 活性的方法。Gronowitz 等认为 ^{125}I-UdR 为基质检测 dTK 的方法具有敏感、快速及简便的特点[6]。本试验亦证实了此方法的可行性。其 ^{125}I-UdR 市场上有供应、一般放免检测仪即可检测其活性，因此在一般诊断实验室也可开展。从前没有多大必要区分临床病人是 HSV-1 还是 HSV-2 感染，更无必要区分是 dTK^+ 还是 dTK^- 的 HSV 感染。由于选择性抗病毒药物的发展，可以利用此方法将临床 HSV 感染的病人区分是 dTK^+ 或 dTK^- 病毒株所感染，如果是 dTK^- 的 HSV 感染，我们只能选用不依赖 dTK 而直接发挥抗病毒作用的 PFA（磷酰甲酸）而不是给与 ACV，BVdU 等治疗。

本试验同时分析了不同来源的 dTK 活性，发现实验所用的HSV-1，HSV-2 株在感染的 HeLa 细胞中能诱导产生高活性的 dTK，前者比后者更高，而 HeLa 细胞本身仅存在低活性的 dTK。当然，病毒 dTK 活性可能包括了宿主的 dTK 那一部份。此外，本试验证实了 HSV-1 及 HSV-2 诱导的 dTK 对 DHPG 存在较高的敏感性，前者比后者更强，可能是 DHPG 对 HSV-1比 HSV-2 更有效的主要原因。另外，还发现低活性的 HeLa 细胞本身的 dTK 对 DHPG 亦存在很弱的敏感性，是否与高剂量的 DHPG 的细胞毒性作用有关有待进一步阐明。

参 考 文 献

〔1〕 Wagner MJ et al., 1981, *Proc Natl Acad Sci USA* 78：1441
〔2〕 Cheng YC et al., 1981, *Mol Pharmacol* 20：230
〔3〕 汤华，1986，首届全国病毒学学术会议论文集 P28
〔4〕 Smith KO et al., 1982, *Antimicrob Agents Chemother* 22：55
〔5〕 Cheng YC et al., 1982, *J Virol Method* 5：209
〔6〕 Gronowitz JS et al., 1980, *Infect Immun* 29：425
〔7〕 Kander CF et al., 1984, *Cancer* 54：2450
〔8〕 Erilksson B et al., 1985, *Acta Radiol* 24：167
〔9〕 Strams M et al., 1985, *Mol Gen Genet* 201：277

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒学杂志 2，1988
Virologica Sinica

Assay for HSV-Induced Deoxythymidine Kinase and Its Application to Antiviral Compound Study

Tang Hua Ren Zheng-yan

(Department of Microbiology, Tianjin Medical College, Tianjin)

An assay for herpes simplex virus type 1 and 2 induced deoxythymidine (dTK) was described by using ^{125}I-UdR as substrate. The assay was also used for detecting the sensitivity of HSV-1 and HSV-2 induced dTK to DHPG. The result showed that sensitivity of viral dTK to DHPG was higher than HeLa cell-dTK's. In addition, we thought that toxicity of DHPG to host cells might be related to the low sensitivity of cell-dTK to DHPG.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net