

DNA斑点杂交法在单纯疱疹病毒检测及分型中的应用

温 平 房 益 兰

(西安医科大学微生物学教研室, 西安)

提 要

本文从HSV-2(333)DNA BgI II H₂片段中筛选出HSV型共同性(7.8kb)及HSV-2型特异性(3.0kb)DNA片段, 经³²P标记后作为探针用斑点杂交法对4株HSV标准株及24株疑为HSV分离株进行了检测和分型。结果能准确地将2株HSV-1及2株HSV-2标准株区分开, 并确定24株疑HSV分离株中21株为HSV。这些结果与血清学鉴定结果一致, 且HSV-2型特异性DNA探针的HSV-2检出率高于McAb。

我们用限制性核酸内切酶对重组质粒p₈₃₄进行双酶解, 分别与HSV-1(KOS)及HSV-2(333)DNA探针进行Southern分子杂交试验。以质粒P834DNA酶切片段为探针与HSV分离株进行斑点杂交, 建立了准确的HSV-1与HSV-2的分型及HSV分离株的检测方法。

材 料 与 方 法

(一) 材料

(1) 细胞系与病毒株: 按常规方法^[8]制备BHK-21细胞单层。标准株HSV-1(SM₄₄)及HSV-2(Sav)引自北京卫生部药品生物制品检定所, HSV-1(KOS)及HSV-2(333)由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠。24株HSV株分离自患者宫颈分泌物。其中21株鼠抗HSV-2全血清反应, 为HSV; HSV中14株与HSV-2型特异性单克隆抗体(McAb), CH-A₉(四军大微生物教研室赠)及B₅(本室制)反应, 为HSV-2; 3株与HSV-1型特异性McAb Mad-2反应, 为HSV-1; 另4株型别待定。

(2) 质粒: 质粒P834为本室房益兰等克隆的以质粒pHO314(5.14Kb)为载体, 在单一BgI II酶切位点处插入HSV-2(333)BgI II H₂片段(11.6Kb)的重组质粒。

(3) 酶和试剂: 内切酶BgI II, BamHI, Pst I 及XhoI均为中国医学科学院基础医学研究所产品, 溴化乙锭系西德Serva产品, Nonidet NP-40系美国Sigma产品, 链霉蛋白酶E系瑞士Switzerland产品, [α -³²P]dATP系中国原子能研究院产品, 硝基纤维素滤膜

本文于1986年10月12日收到

本工作由中科院基金资助完成

系美国 Schleicher Schueu 产品, dNTP 系西德 Boehringer Mannheim 产品。

(二)方法

(1) 质粒DNA的制备及酶解; 参见文献^[10,11,12]。

(2) 电泳: 选用λDNA-Hind III为标准分子量, 同质粒DNA酶切片段进行琼脂糖凝胶电泳。详见文献^[12]。

(3) HSV DNA的提取: 方法参见^[9]文献, 稍作修改。将病毒粗提物铺于30、40、50%蔗糖不连续梯度介质面上, 120,000g 4℃离心2小时, 弃上清, 以1×TE缓冲液悬浮沉淀物。加入链霉蛋白酶E(终浓度1mg/ml)37℃保温3小时, 经酚及氯仿、异戊醇抽提, 酒精沉淀HSV DNA。

待测样品DNA的制备用修改过的文献^[9]的方法进行。用新鲜配制的0.3N NaOH加1×TE溶液25μl, 溶解HSV感染细胞, 65℃水浴1小时后加等量2mol/L乙酸铵混匀即可。

(4) DNA杂交: 用[α-³²P] dATP将HSV-1及HSV-2 DNA标记成探针与用Bgl II + BamHI, Bgl II + Pst I, 及Bgl II + Xho I酶解的重组质粒P834 DNA进行 Southern 法薄膜分子杂交和分子斑点杂交^[10,12]。

结 果

(一) HSV DNA特异片段的筛选

用限制性核酸内切酶Bgl II + BamHI、Bgl II + Pst I 及Bgl II + Xho I对重组质粒P834进行双酶解, 分别得到5, 7、4条带(图1)。然后与³²P标记的HSV-1及HSV-2 DNA探针杂交(图2、3)。

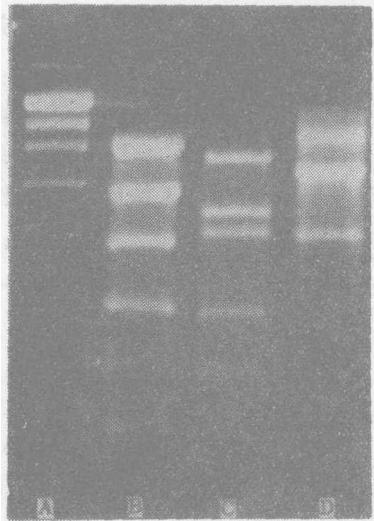


图1 P834酶切片段电泳图

Fig 1 Electrophoresis patterns of P834 digested with restriction enzymes.

- A: λDNA-Hind III酶切分子量标记。片段大小依次为23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.6 (Kb)
- B: P834 Bgl II + BamHI 酶切片段, 大小依次为6.6, 4.3 (质粒片段)、3.0, 1.85, 0.8 (质粒片段) (Kb)
- C: P834 Bgl II + Pst I 酶切片段, 大小依次为5.7, 3.6 (质粒片段)、3.2, 1.7, 1.45 (质粒片段)、0.9 (Kb)
- D: P834 Bgl II + Xho I 酶切片段, 大小依次为7.8, 5.14 (质粒片段)、3.0, 0.9 (Kb)
- A: Lambda DNA-Hind III digest. 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.6 Kb
- B: P834 fragments digested by Bgl II plus BamH I. 6.6, 4.3 (plasmid fragment), 3.0, 1.85, 0.8 (Plasmid fragment) Kb.
- C: P834 fragments digested by Bgl II plus PstI. 5.7, 3.6 (plasmid fragment), 3.2, 1.7, 1.45, (Plasmid fragment), 0.9Kb.
- D: P834 fragments digested by Bgl II plus XhoI. 7.8, 5.14 (plasmid fragment), 3.0, 0.9Kb

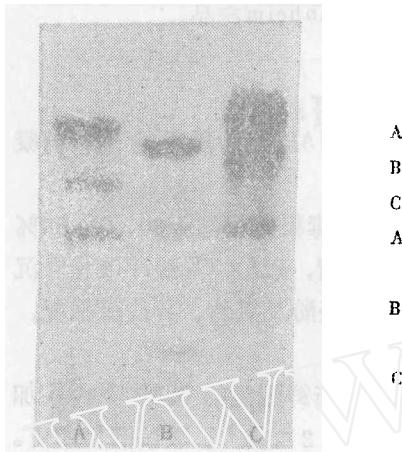


图2 P834酶切片段与HSV-2 DNA探针杂交放射自显影图
Fig 2 Radioautography of P834 fragments hybridized with HSV-2 DNA probe.

A: P834 Bgl II + Bam HI 酶切片段
B: P834 Bgl II + Pst I 酶切片段
C: P834 Bgl II + Xho I 酶切片段
A: P834 fragments digested by Bgl II plus Bam HI
B: P834 fragments digested by Bgl II plus Pst I.
C: P834 fragments digested by Bgl II plus Xho I.

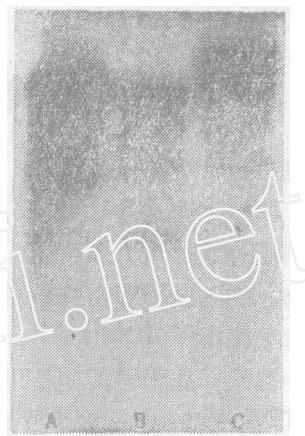


图3 P834酶切片段与HSV-1 DNA探针杂交放射自显影图
Fig 3 Radioautography of P834 fragments hybridized with HSV-1 DNA probe.

质粒P834的Bgl II + Bam HI和Bgl II + Pst I酶切片段与两种探针杂交程度无明显差异，而Bgl II + Xho I酶切片段中7.8Kb带与HSV-1及HSV-2 DNA均有明显杂交，3.0kb带仅与HSV-2DNA有明显杂交，与HSV-1 DNA无明显杂交，0.9Kb带由于片段小，与HSV-1及HSV-2 DNA均无明显杂交。因此，可以认为，7.8Kb带为HSV型共同性DNA片段，而3.0Kb带为HSV-2型特异性DNA片段。

(二)HSV的分子杂交检测及分型

用Xho I消化质粒P834，得到两条8.9Kb和7.8Kb的带。预实验证实，8.9Kb带完全可以代替3.0Kb带作为HSV-2型特异性DNA探针(图4)。

从琼脂糖凝胶中回收并用³²P标记7.8Kb及8.9Kb带作为HSV DNA探针，对4株HSV标准株及24株疑似HSV分离株进行了检测和分型(图5、6)。结果发现：(1)两种探针均与质粒P834而不与BHK-21细胞DNA杂交；(2)HSV型共同性探针与4株HSV标准株杂交，而HSV-2型特异性探针只与2株HSV-2标准株杂交，与2株HSV-1标准株不杂交；

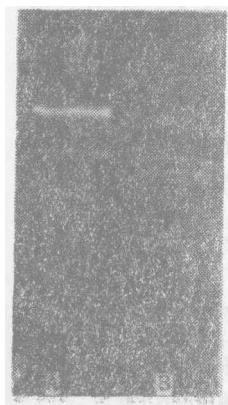


图4 P834 Xho I 酶切电泳图
Fig 4 Electrophoresis pattern of P834 digested with Xho I.

A: λ DNA-Hind III 酶切分子量标记。23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0Kb。
B: P834 Xho I 酶切片段。8.9, 7.8Kb。
A: Lambda DNA-Hind III digest. 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0Kb.
B: P834 fragments digested by Xho I . 8.9, 7.8Kb.



图5 病毒分离株与HSV型共同性DNA探针杂交放射自显影图
Fig 5 Autoradiogram of viral isolates hybridized with HSV type-common DNA probe.

(3)两种探针均与病毒分离株38、44及47不杂交；(4)病毒分离株4、7及14与HSV型共同性探针杂交，与HSV-2型特异性探针不杂交；(5)其余18株病毒分离株既与HSV型共同性也与HSV-2型特异性探针杂交。这说明本实验选用的两种HSV DNA探针特异性正确，与病毒宿主细胞DNA无同源性。24株疑HSV分离株中21株为HSV，其中HSV-1

表1 病毒株的斑点杂交及ELISA检测结果

Tab. 1 Detection of viral isolates by dot-blot hybridization and ELISA

病毒株 viruses	KOS SM44	333	Sav	2	3	4	7	8	9	14	30	32	33	34	36	37	38	39	41	42	44	47
鼠抗血清 mouse anti-sera	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
共同探针 common probe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
HSV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	

鼠抗血清：法抗HSV-2全血清

mouse anti-sera, mouse anti-HSV-2 sera

共同探针：HSV型共同性DNA探针

common probe, HSV type-common DNA probe

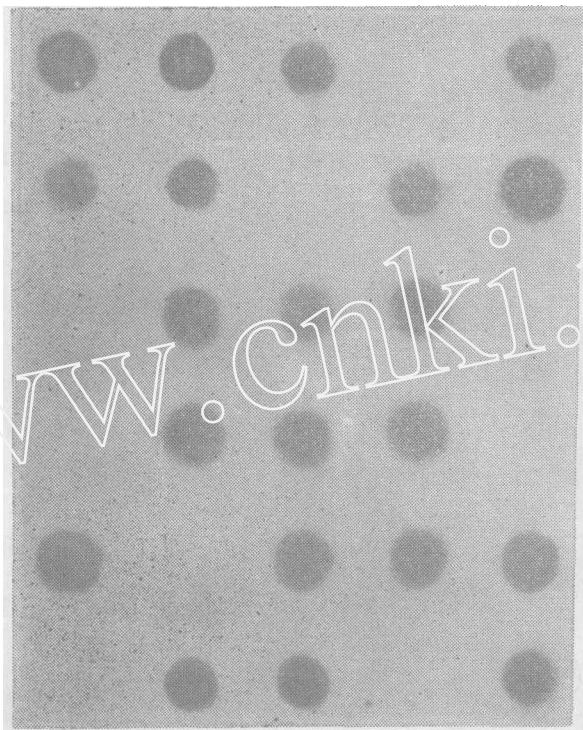


图 6 病毒分离株与HSV-2型特异性DNA探针杂交放射自显影图

Fig 6 Autoradiogram of viral isolates hybridized with
HSV-2 type-specific DNA probe.

3 株, HSV-2 18 株。

(三)分子杂交检测及分型的验证

我们将病毒株的DNA斑点杂交鉴定结果与血清学鉴定结果进行了比较(表1、2)。

表1说明两种方法对24株疑HSV分离株的检测结果是完全一致的。均不能确定分离株38、44及47为HSV，而其余21株均为HSV。

表 2 病毒株的斑点杂交及ELISA分型结果
Tab 2 Typing of viral isolates by dot-blot hybridization and ELISA

病毒株 Viruses	KOS	SM44 333	Sav 2	3	4	7	8	9	14	30	42	310	29	130	31	32	33	34	36	37	38	39	41	142	44	47
Mad-2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CH-A9, B5 特异探针	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Specific probe	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
HSV型别 Types of HSV	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-

Mad-2; HSV-1型特异性McAb.

Mad-2; HSV-1 type-specific McAb.

CH-A9及B5; HSV-2型特异性McAb.

CH-A9 and B5; HSV-2 type-specific McAb.

特异探针: HSV-2型特异性DNA探针

Specific probe: HSV-2 type-specific DNA probe.

表2比较了HSV-2型特异性DNA探针与HSV-1及HSV-2型特异性McAb对21株HSV分离株的分型结果。14株经HSV-2型特异性McAb鉴定为HSV-2的病毒分离株，均与HSV-2型特异性DNA探针杂交，而3株HSV-1分离株不与HSV-2型特异性DNA探针杂交。4株型别待定HSV分离株被斑点杂交法确定为HSV-2。这说明DNA斑点杂交分型的特异性与McAb相同，是可靠的，检出率高于McAb。

讨 论

单纯疱疹病毒(HSV)基因组是一条分子量为 100×10^6 道尔顿，约150千碱基对(Kb)的双链状DNA分子。由一段长链和一段短链共价结合，单一序列在两端冠以反转重复序列构成。进一步研究发现：(1)HSV-1与HSV-2 DNA同源性为20~70%^[1-4]，同源序列主要集中在单一序列区，而重复序列区同源性极弱^[5]；(2)HSV DNA与其它疱疹病毒，如巨细胞病毒，EB病毒及水痘带状疱疹病毒DNA间同源性<5%^[6,7]；(3)HSV DNA型内株间同源性达95%以上^[4]。因此，从HSV DNA中筛选HSV型共同性及型特异性DNA片段，并应用于HSV的检测和分型是可行的。

在型特异性片段筛选中先将我们克隆的HSV-2(333)DNA Bgl II E、G、J、L、N、O、P、及H₂八个片段^[9]分别与HSV-1(KOS)及HSV-2(333)DNA探针杂交，但未能筛选出HSV-2型特异性DNA片段。后又根据Wilkie等^[5]的发现，从含有重复序列的HSV-2(333)Bgl II H₂片段选出了3.0kb的HSV-2型特异性DNA片段。由此可见，在HSV DNA重复序列区寻找HSV型特异性DNA片段较为容易。为此，我们用Xho I消化重组质粒P834，得到2条DNA带。其中8.9Kb带尽管含有三种DNA成分，但具HSV-2型特异性，完全能代替3.0Kb带而作为HSV-2型特异性DNA片段。这就使P834的酶切及片段回收较为容易，而且两个片段大小相近使放射自显影结果更具可比性。

根据实验结果，DNA斑点杂交法的HSV检出率高于McAb。这可能是由于同型异株间HSV DNA同源性大于95%^[4]的缘故。而McAb可因所针对的抗原决定簇发生变异而与相应毒株不反应^[14]。我们认为，在这一点上，用斑点杂交法进行HSV检测及分型是可靠的。

我们所用探针的比活性为 10^5 cpm/ μ g DNA，在斑点直径为5—8mm条件下，可检出 10^4 个HSV感染细胞中的HSV DNA，比Redfield等^[13]报道的敏感性低，但若能提高探针比活，缩小斑点面积，则可进一步提高敏感性。

参 考 文 献

- [1] Bronson, D.L. et al., 1972, *Biochem. Biophys. Acta* 259 : 24.
- [2] Kieff, D. et al., 1972, *J. Virol.* 9 : 738.
- [3] Ludwig, H.O. et al., 1972, *Virology* 49 : 95.
- [4] Sugino, W.M. et al., 1976 *Virology*, 71 : 605.
- [5] Wilkie, N.M. et al., 1978, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 : 327.
- [6] Brautigam, A.M. et al., 1980, *J. Clin. Microbiol.* 12 : 226.
- [7] Huang, E.S. and Pagan, J.S., 1974, *J. Virol.* 13 : 642.
- [8] 中国医学科学院流行病防治研究所, 1978, 常用病毒实验技术, 人民卫生出版社。
- [9] 房益兰等, 1986, 病毒学报2(1) : 10。
- [10] 房益兰等, 1986, 病毒学报2(2) : 101。
- [11] 王宇等, 1986, 遗传8(1) : 41。
- [12] Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning—a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A
- [13] Redfield, D.C. et al., 1983, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1 : 117.
- [14] Pereira, L., 1982, In *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Technique and Applications*. (ed.) John G.R. Hurrell, CRC Press, Inc. pp.119—38.

Application of Dot-blot DNA Hybridization in Detection and Typing of Herpes Simplex Viruses

Wen Ping Fang Yi-lan

(Department of Microbiology, Xian Medical University, Xian)

HSV type-common(7.8Kb) and HSV-2 type-specific(3.0kb)DNA fragments were selected out from cloned HSV-2 (333) DNA *Bgl* II *H₂* fragment, and labeled with ³²P as probes to detect and type 4 HSV standard strains and 24 cervical viral isolates by dot-blot hybridization. In the results, 2 HSV-1 and 2 HSV-2 were unequivocally differentiated, and 21 out of 24 isolates were identified as HSV, in which 3 were typed as HSV-1 and 18 as HSV-2. These results were consistent with those of ELISA, moreover, the identification rate of HSV-2 of HSV-2 type-specific DNA probe was significantly higher than those of McAb.