

单纯疱疹病毒 2 型特异性 DNA 片段的克隆和鉴定

楚雍烈 房益兰 刘延娜 周玉玲

(西安医科大学微生物教研室, 西安)

提 要

用核酸限制性内切酶 BamHI 对单纯疱疹病毒 2 型 (HSV-2) 的 DNA 进行酶解, 回收位于基因组中的反向重复序列区的 BamHI G 片段, 然后将其克隆在载体质粒 PUC 8 的 BamHI 切点上, 进一步用核酸限制性内切酶 EcoRI 和 KPN1 对这一重组质粒联合酶解, 移去 EcoRI-KPN1 小片段, 经末端修饰后, 将其连接得到新的重组质粒 pRC 102, 它含有一小段 HSV-2 的 DNA 序列。以此质粒为探针, 分别与 HSV-1、HSV-2 及细胞 DNA 进行斑点杂交; 与 HSV-1 和 HSV-2 酶解后的 DNA 片段进行 Southern 转印杂交。两组实验结果显示, pRC 102 质粒 DNA 只与 HSV-2 DNA 特异性杂交, 其 HSV-2 的型特异性良好。

关键词: HSV-2 型特异性 DNA 片段; 基因克隆

单纯疱疹病毒 2 型 (HSV-2) 在人群中的感染很普遍, 特别是生殖道感染的日渐增多和具有致癌的可能, 日益为国内外研究者所重视^[1]。由于单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 和 2 型 (HSV-2) 两者在抗原性上有 75% 的交叉反应, 但二者在致病性, 流行病学和对药物敏感性诸方面又有不同, 故准确地把它们分型对单纯疱疹病毒的基础研究和临床应用均具有重要意义。过去常用的分型方法虽各具优点, 但特异性不够理想。八十年代国外建立了 HSV-2 的核酸杂交分型技术, 敏感性高特异性强, 直接从核酸分子水平对 HSV-1 和 HSV-2 进行分型^[2]。国内由于尚未建立 HSV-1 和 HSV-2 型特异性 DNA 片段的无性繁殖系, 此项技术的应用受到限制。为在我国开展单纯疱疹病毒核酸分型提供材料, 我们筛选并克隆了 HSV-2 型特异性 DNA 片段。

材 料 与 方 法

1. 细胞、病毒和感染 Vero 细胞按常规定进行培养、传代^[3], 供病毒繁殖和提取 HSV-1 和 HSV-2 DNA。HSV-1(F) 株滴度为 10^5 PFU/0.1ml (PFU, 空斑形成单位); HSV-2(G) 株, 滴度为 10^7 PFU/0.1ml。两株病毒均为美国芝加哥大学 Roizman 教授惠赠的实验室标准毒株。当 Vero 细胞长成良好单层时, 以每个细胞 2 个 PFU 的病毒量感染细胞, 室温吸附 2 小时

本文于 1988 年 7 月 26 日收到。

本实验部分工作得到美国芝加哥大学 Roizman 教授指导, 将此致谢。

后, 更换维持液 37℃ 培养, 逐日观察细胞病变 (CPE)。

2. 提取病毒 DNA 采用略加改进的密度梯度离心法^[4], 首先收获 CPE 已达 100% 的感染细胞, 低速离心弃上清, 再分别加入适当的 SDS、NP-40、EDTA 和蛋白酶 K 溶液重悬细胞团块, 充分混匀后置 37℃ 水浴过夜。再加入 TE 缓冲液饱和的碘化钠溶液, 使折光率为 1.434, 滴入适量溴化乙锭后, 45,000r/m 超速离心 18 小时, 在紫外灯下小心抽取病毒 DNA 带, 对 TE 缓冲液充分透析后, 置 -20℃ 保存备用。

3. 筛选和组建含 HSV-2 型特异性 DNA 片段的重组质粒

(1) 回收 HSV-2 型特异性 DNA 片段^[5] (图 1) HSV-2 DNA 经限制性核酸内切酶 BamHI 酶解, 再经琼脂糖电泳后, 回收 HSV-2 基因组中间重复序列连接区的 BamHI G 片段, 约 8 千碱基对 (kb)。该片段较大, 而且以其为探针与 HSV-2 和 HSV-1 DNA 进行斑点杂交, 其敏感性和型特异性均不够理想, 故对该片段作了进一步筛选 (见下文)。

(2) HSV-2 DNA 中 BamHI G 片段的克隆 我们使用了只有单一 BamHI 酶切点的质粒 pUC 8 作载体, 按 Maniatis 等方法^[6]扩增、提取质粒 DNA, 经 BamHI 酶解后, 回收切开的质粒 DNA 供重组用。用 Davis 法^[7]把 HSV-2 的 BamHI G 片段和具 BamHI 切口的 pUC 8 质粒 DNA 进行连接, 得到重组质粒。将此重组质粒转化大肠杆菌, 按上述方法提取质粒 DNA 备用。

(3) 组建含 HSV-2 型特异 DNA 片段的重组质粒 用限制性核酸内切酶 EcoRI 和 KpnI 将重组质粒 DNA 联合酶解, 经琼脂糖电泳, 回收含有载体 pUC 8 及少部分 HSV-2 DNA 序列的大片段。用 S₁ 核酸酶去除两端的单链部分使之成为平端, 然后加入人工接头 EcoRI, 使之连接构成新的重组质粒 pRC102。将此质粒 DNA 转化大肠杆菌 JM103 株, 通过选择获得含有质粒 pRC 102 的转化菌^[8], 整个克隆过程如图 1 所示。

4. 重组质粒 pRC'102 HSV-2 型特异性鉴定 按 Davis 等方法^[7]繁殖转化菌, 用氯化铯平衡离心法提取 pRC'102 质粒 DNA。用缺口翻译法制备 ³²P 标记的质粒 pRC102 探针, 并以此探针和 HSV-1、HSV-2、宿主细胞 DNA 进行斑点杂交, 同时也与 HSV-1 和 HSV-2 DNA 酶解后的片段进行 Southern 转印杂交^[9]以验证其特异性。

结果与讨论

1. HSV-2 DNA 型特异性片段的筛选和克隆 单纯疱疹病毒 (HSV) 的 DNA 是长约 150kb 的双链线状 DNA 分子, 由一条长链 (L) 和短链 (S) 两部分组成。每个部分又由单一序列和末端重复序列组成^[9], 详见图 1 所示。HSV 的两个血清型 HSV-1 和 HSV-2 的分子结构相似, 许多结构基因和功能基因的排列都是对应的^[10]。分子遗传学的研究还发现, 尽管 HSV 两型 DNA 之间的 DNA 序列同源性可达 50—70%, 但仍然存在着完全不同的 DNA 序列。而且发现两型的同源序列主要位于非重复序列, L 部分较 S 部分为多, 在末端重复序列中则较少存在同源序列^[11]。同时, 还知道 HSV 和其他疱疹病毒 (如: 巨细胞病毒、水痘病毒及 EB 病毒) DNA 的同源性极低^[2], 这些就是建立 HSV 核酸杂交分型方法的分子基础。国外目前不但从 HSV-2 分子 L 和 S 连接部位分离和克隆了其型特异性片段^[12], 而且还人工合成了 HSV 的型特异性寡核苷酸链并制备成探针^[13]。

我们根据 HSV 的分子生物学基础和国外资料, 首先把位于 HSV-2 DNA 分子中间末端重复序列的 BamHI G 片段予以分离和克隆, 该片段横跨 L 和 S 两部分的连接部, 含

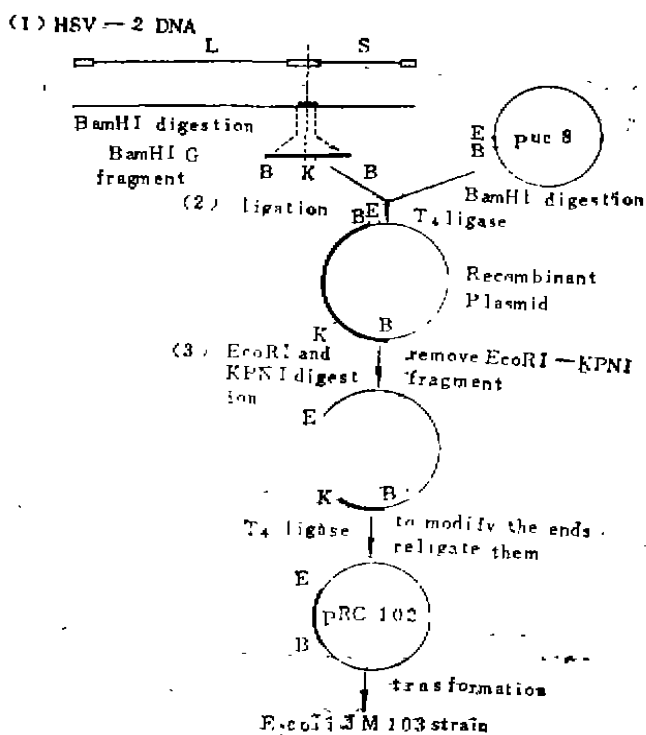


图1 HSV-2型特异性 DNA 片段的克隆。(1)HSV-2DNA 中 BamHI G 片断的筛选, (2)把 BamHI G 片段克隆到载体质粒 pUC8 上, (3)构建重组质粒 pRC102。

图中, B, BamHI; E, EcoRI; K, KPNI。

Fig.1 Cloning of HSV-2 DNA type-specific fragment.

- (1) Selection of BamHI G fragment of HSV-2 DNA,
 - (2) Cloning of BamHI G fragment on the vector pUC 8,
 - (3) Construction of recombinant plasmid pRC102.
- B, BamHI; E, EcoRI; K, KPN 1.

HSV-1 DNA 的同源序列较少。所得重组质粒虽具 HSV-2 型特异性, 但其分子量较大, 敏感性和特异性也不理想, 有必要进行改进。参照 HSV-2 的有关酶切物理图谱, 我们将移去此重组质粒中的 EcoRI-KPNI 小片段, 即除去 HSV-2 之 BamHI G 片段中所有 L 部分序列, 重新连接所成的 pRC 102 重组质粒中含有 HSV-2 S 部分中一小段 DNA 序列 (见图 1)。

2. 重组质粒 pRC 102 的 HSV-2 特异性鉴定

对 HSV 进行核酸分型和对 HSV-2 进行分子流行病学研究, 必须有特异性强敏感性高的核酸探针。为此, 我们制备了重组质粒 pRC 102 的 DNA 探针, 分别与 HSV-1、HSV-2 DNA 和其他 DNA 进行杂交, 来检测其特异性。首先进行了斑点杂交, 同位素放射自显影的结果显示 (图 2): ① pRC 102 质粒 DNA 不和宿主细胞 DNA 杂交。② 与 HSV-2 的 DNA 杂交, 而且能检测到毫微克水平 (Pg), 敏感性高。③ 和 HSV-1 的 DNA 斑点不杂交。为了确证重组质粒 pRC 102 的 HSV-2 型特异性, 我们进一步采用较斑点杂交更具说服力的 Southern 转印核酸杂交实验进行检验。先用限制性核酸内切酶

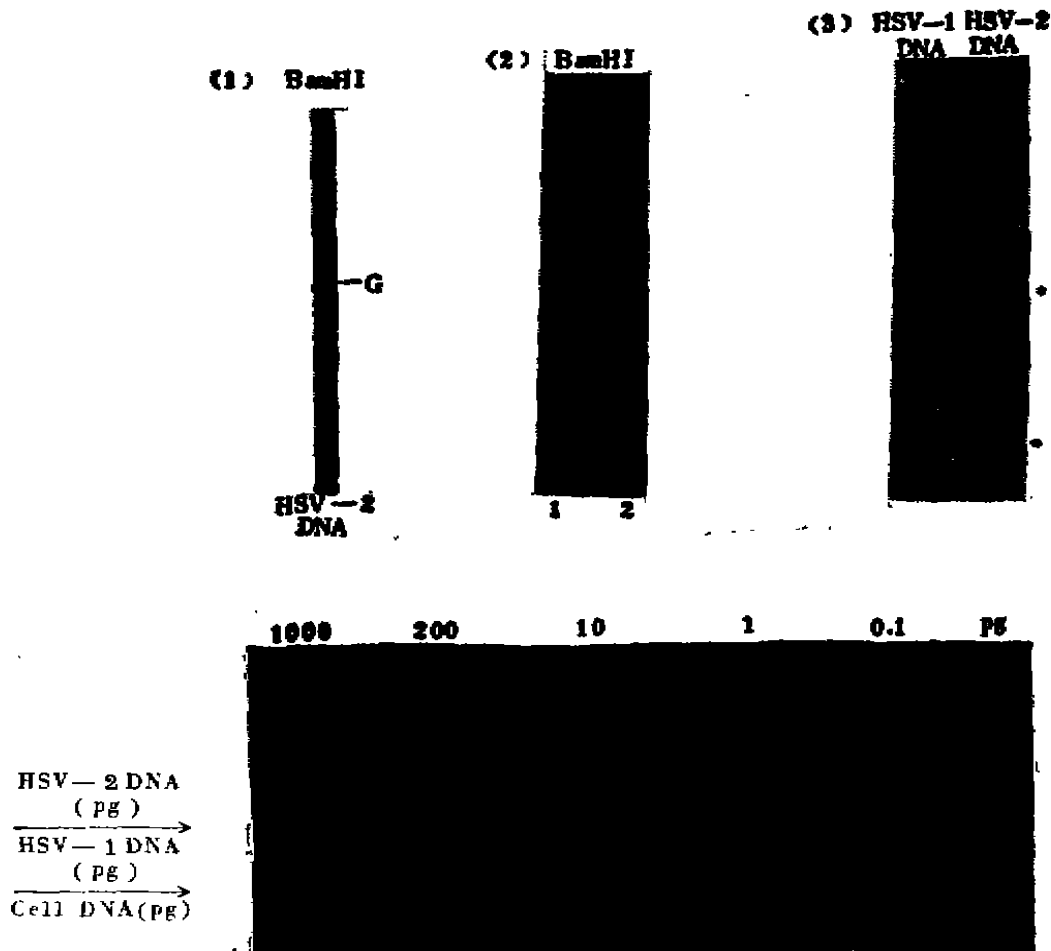


图2. 重组质粒 pRC 102 的 HSV-2 型特异性分析。(1). HSV-2 DNA 经 Bam HI 酶解后的电泳图像。G: 示 Bam HI G 片段位置。(2) HSV-1、HSV-2 DNA 经 Bam HI 酶解后不同电泳图像。(3). 以 pRC 102 为探针, 与 HSV-1、HSV-2 DNA 行 Southern 转印核酸杂交, 只有 HSV-2 DNA 的片段与之杂交 (*). (4). 以 pRC 102 为探针, 与不同 DNA 进行斑点杂交后的放射自显影图像。

Fig.2 Analysis of the specificity of pRC 102. (1) The location of BamHI G fragment(G). (2) Different electrophoretic pattern of HSV-1, HSV-2 DNA digested with BamHI. (3) Autoradiogram of HSV-2 bands (*) after Southern blot and hybridization with probe pRC 102. (4) Autoradiogram of the Dot blot hybridized with probe pRC 102.

BamHI 对 HSV-1 和 HSV-2 DNA 分别进行酶解, 经电泳后确认为 HSV-1 和 HSV-2 的特定电泳图象, 而后经 Southern 转印, 再用探针 pRC 102 与之杂交。放射自显影的结果表明, pRC 102 的质粒 DNA 只与 HSV-2 的两个片段杂交, 而不和 HSV-1 的 DNA 酶解片段杂交。这有力地说明 pRC 102 的 DNA 和 HSV-1 的 DNA 之间无同源序列, 其型特异性良好。

总之, 上述斑点杂交、Southern 转印杂交的实验结果均证实重组质粒 pRC 102 具有

较强的 HSV-2 型特异性, 以其制备的核酸探针能检出 pg 水平的 HSV-2 DNA, 其敏感性高。

3. 建立 HSV-2 型特异性片段无性繁殖系的意义 我们利用 DNA 重组技术, 首次在国内建立了 HSV-2 DNA 型特异性片段的无性繁殖系。这一工作的成功, 大大地方便了 HSV-2 的研究工作。在发达国家, HSV 型特异性探针不但用于实验室的基础理论研究, 而且也用于临床方面的应用研究, 特别在 HSV-2 的分子流行病学中有着独特的作用。近年来的研究发现, HSV 型别与感染部位之间的关系有了变化, 交叉存在的现象日益增多。更为重要的是, 不同型别的 HSV 对比较有效的抗病毒药物敏感性存在差异, 故准确地把 HSV 分型对诊断和临床用药均具有重要意义。HSV-2 与妇女生殖道肿瘤关系系密, 确定 HSV-2 感染也可帮助医生对疾病的预后作出估计。大量的资料表明 HSV 核酸杂交分型敏感性可达 1pg, 特异性可达 100%, 而且是从核酸水平上予以确定, 有不可取代的优越性^[13]。

我们建立的 HSV-2 型特异性 DNA 片段的无性繁殖系, 与业已建立的 HSV-1 型特异性 DNA 片段无性繁殖系^[14]一起为 HSV 的核酸杂交分型提供了材料。目前在我国已有不少地方开展了核酸杂交工作, HSV 分子流行病学的研究受到重视。随着提取病毒 DNA 技术的简化和用生物素代替³²P 同位素标记, HSV 核酸分子水平的研究有着相当广阔的前景, 而 HSV 的型特异性 DNA 片段克隆质粒将在这些研究中发挥重要作用。

考 考 文 献

- [1] Cerey L et al., 1983 *Ann Intern Med* 98: 958,
- [2] Braitigam AR et al., 1980 *J Clin Microbiol* 12: 226,
- [3] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978, 常见病毒实验技术, 科学出版社, 北京, 第 66—75 页
- [4] 侯云德主编, 1986, 病毒基因工程的原理与方法, 人民卫生出版社, 北京, 第 70—87 页
- [5] Voss JH et al., 1985, *J Virol* 54: 509
- [6] Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York, USA PP 76—200,
- [7] Davis LG et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier New York pp89—269,
- [8] Glover DM, 1985, *DNA Cloning*, IRL Press, Oxford pp1—16
- [9] Wadsworth S et al., 1975, *J. Virol.* 15: 1487
- [10] Kieff ED et al., 1971, *J Virol* 8: 125,
- [11] Wilk NM et al., 1978, *Cold Spring Harbor Symp Quant Bio* 43: 82,
- [12] Redfield DC et al., 1983, *American Society for Microbiology*, Abst 741,
- [13] Peterson EM et al., 1986, *J infect Dis* 153: 757,
- [14] 楚雍烈等, 中华微生物学与免疫学杂志 (待发表)

Cloning and Identification of the Type-specific DNA Fragment of Herpes Simplex Virus Type 2

Chu Yong-lie, Fang Yi-lan, Liu Yan-na, Chou Yu-ling

(Dept. of Microbiology, Xi-an Medical University, Xi-an)

The DNA of Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2) digested with restriction enzyme BamHI and the BamHI G fragment was isolated, which locates in the reverse repeat sequence and spans the junction site of L and S component. Then the BamHI G was inserted on the BamHI cut-site of the vector plasmid pUC 8. In order to modify this recombinant plasmid, the EcoRI—KPN I fragment of the recombinant plasmid was removed by restriction enzyme digestion with EcoRI and KPN I. After modification of the ends and ligation of them, a new recombinant plasmid pRC 102 was constructed which still contains a small HSV-2 DNA fragment. Labeled with ^{32}P , the recombinant plasmid pRC 102 was utilized to hybridize with HSV-1, HSV-2 DNA and other DNA. The results of the dot blot and the Southern blot hybridization showed that the probe pRC 102 DNA hybridized only with HSV-2 DNA. The plasmid pRC 102 can be used to type HSV by DNA hybridization.

Key Words, Type-specific DNA fragment of HSV-2, Gene cloning