维普资讯 http://www.cqvip.com

单纯疱疹病毒基因组的限制性核酸内切酶分析*

楚雍烈 房益兰 刘延娜 董小平

（西安医科大学微生物学教研室，西安710061）

提 要

为了获得单纯疱疹病毒（HSV）基因组的限制性核酸内切酶（RE）分析资料和选择合适的RE去研究HSV感染，用11种常用的RE对HSV两个型别的实验室标准毒株的基因组分别作了分析。比较研究的结果表明，BamHI、Hpa I和Pst I等RE较适于HSV的研究和分型。本研究所采用的小量提取HSV DNA的方法具有快速、简便和实用的特点，值得在HSV感染的诊断、分型和HSV分子流行病学诸研究中推广使用。

关键词： 单纯疱疹病毒 限制性核酸内切酶分析 DNA分型

单纯疱疹病毒（HSV）有两个血清型，HSV-1和HSV-2。两者的临床感染症状有一定相似之处，均可引起面部、生殖道疱疹，胸部乃至全身感染。虽然HSV-1多引起胸部以上的感染，HSV-2多在胸部以下致病，但近来却发现两者感染的交义分布有上升趋势。由于两型病毒在致病性、愈后及对某些化疗药物的敏感性上存在差异，故在临床诊断、治疗上要求能准确地将HSV分型。此外，HSV还具有致畸、致癌和引起潜伏感染的作用，故建立一个简单、快速和实用的技术确定HSV感染及型别，是个十分重要的课题[1]。

过去在确定HSV感染和型别时多采用生物学和免疫学技术，它们虽各具优点，但局限性很大。如结果不稳定，特异性不高，分型时受交叉反应干扰和不能在基因组水平上分析等[2]。近年来，随着分子生物学的飞速发展，建立了一些在HSV分子水平上进行分析的技术，如核酸杂交、结构多肽分析和核酸限制性内切酶分析等。由于前两种方法技术复杂，要求条件高，在基层不易推广。现在，一般认为HSV DNA的限制性核酸内切酶分析技术（REA）较为实用，有推广价值，国外已广为应用[1-3]。目前，此项技术在我国的HSV研究中尚未广泛开展，资料也较缺乏。本研究使用11种不同的限制性核酸内切酶（RE）对HSV的两型标准毒株DNA作了酶解分析，同时改进和建立一种快速提取HSV DNA的简单方法。旨在为我国HSV核酸水平的研究、特别是在临床上确定HSV感染、分型及分子流行病学调查提供资料和方法。

本文于1989年4月19日收到
* 国家自然科学基金资助项目
部分实验得到美国芝加哥大学B.Roizman教授的指导和帮助，特此致谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

材 料 和 方 法

1. 细胞、病毒和感染 Vero细胞用于病毒的增殖和病毒DNA的提取，按常规培养传代[4]。病毒HSV-1(F)株，滴度为10^8PFU/0.1ml，HSV-2(G)株，滴度为10^7PFU/0.1ml，两型标准毒株均由美国芝加哥大学B.Roizman教授惠赠。在细胞长成良好单层时，分别以4MOI（感染复数，PFU/细胞）的病毒量感染细胞，37℃吸附1—2小时后加维持液于37℃培养，逐日观察病变。分离的两株地方株均经蚀斑纯化，其培养方法同上。

2. 提取病毒DNA

(1)HSV DNA的大量制备 采用碘化钠平衡密度离心法[5]并略加改进：在细胞病变(CPE)达100%时收获感染细胞，3,000r/m低速离心后弃上清，加入10ml TE缓冲液重悬细胞团块，依次加入10%NP-40 0.5ml、0.25mol/L EDTA1.2ml、20%SDS 0.3ml和蛋白酶k 1mg，混匀后置37℃水浴3小时或过夜。最后加入TE饱和的碘化钠溶液，在折光仪上检查，使终折光率为1.434。在超速离心机上以45,000r/m离心18小时，抽取病毒DNA条带，充分对TE缓冲液透析后，置-20℃冰箱备用。

(2)HSV DNA的小量快速提取 对常用的Mocarski法[6]作了简化和改进，使之可在基层使用。当培养瓶中的感染细胞CPE达100%时，移去维持液，加入0.5ml含0.5% NP-40的STE缓冲液，室温作用2分钟，振摇方瓶使细胞脱落，小心移到小离心管中，10,000r/m离心2分钟。把上清移到另一洁净小管，弃去沉淀的细胞核。上清中加入5微升（μl）核糖核酸酶(10mg/ml），室温5分钟。依次再加入25μl20%SDS、25μl蛋白酶k(10mg/ml)37°C水浴1小时。最后加0.5ml TE饱和酚，振摇后离心，上清用氯仿抽提两次离心，取上清用酒精沉淀DNA，离心后弃上清，用40μl双蒸水重悬病毒DNA，—20℃保存备用。此操作只需台式离心机在2小时内完成，本实验中，HSV分离株DNA采用上法提取。

3. 限制性核酸内切酶分析技术（REA）

(1)选用十一种RE分别对HSV的两型DNA作了酶解，它们是：BamH I、PglII、Cla I、Eco-R I、HindIII、Hpa I、Kpn I、Pst I、Sal I、Xba I和Xho I。这些酶分别购自美国新英格兰生物实验室、中国医学科学院基础所和华美生物工程公司。酶解按Davis等人的方法[7,8]进行。HSV分离株DNA酶解仅用了BamHI和EcoRI两种酶。

(2)凝胶电泳 用0.8%的琼脂糖凝胶进行水平电泳（4×160×180mm），分离不同酶解后的HSV DNA片段。用Loenies电泳缓冲液（35mmol/L Tris，30mmol/L NaH_2PO_4和1.5mmol/L EDTA，pH7.8），在25—30V，45mA条件下电泳12—18小时，经溴化乙锭（0.5μg/ml）染色后在紫外灯下观察照相。

结 果 和 讨 论

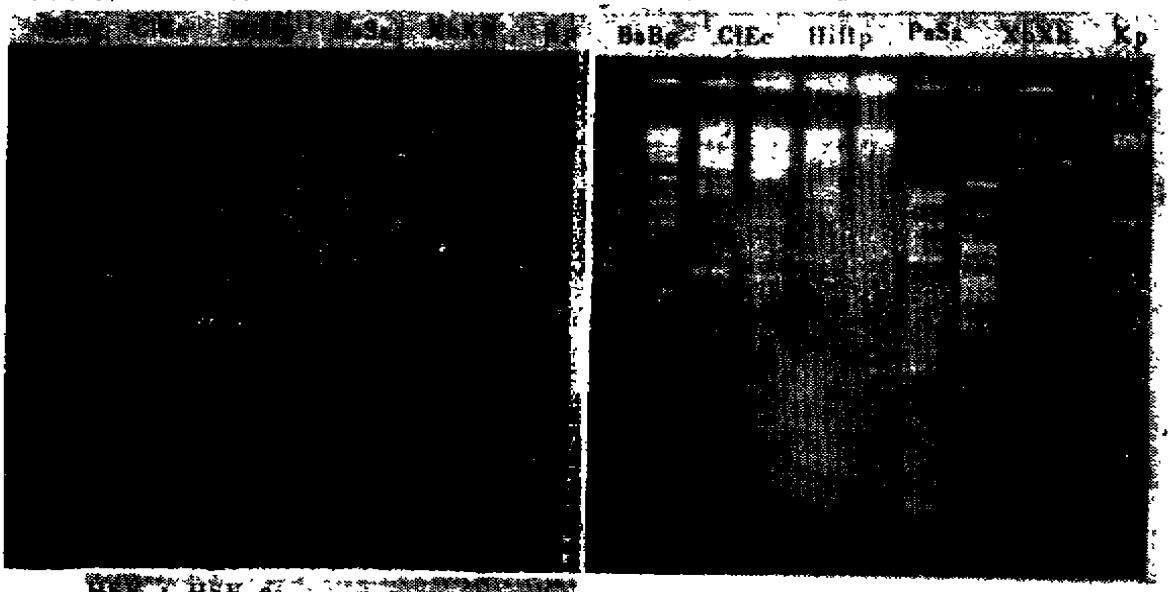
1. HSV DNA的REA结果及分析

限制性核酸内切酶（RE）是研究分子病毒学的强有力工具酶，它能特异地识别和切割DNA分子内的几个特定核苷酸序列，故在基因操作、分子克隆和核酸序列分析中必不可少，广为应用[7,8]。

HSV-1和HSV-2的基因组中虽有50—70%的同源序列存在，但二者仍有许多异源

维普资讯 http://www.cqvip.com

序列存在，而且异源序列是以长短不同的片段散布在基因组的不同部位[9]。当采用同一种酶对两型病毒 DNA 酶解时，其酶解片段的大小、数目就依 DNA序列的差异而不同。事实上，由于 RE 切割点的随机分布，各型 DNA 序列的相对保守性，不同RE 的酶解图谱是基本固定的[12]。所以，不同 RE 对同一 DNA 分子的切割图谱在片段数目、大小上是不同的，并且是特定的。本文依据这一原理和 HSV 分子遗传学基础知识，采用 RE酶解



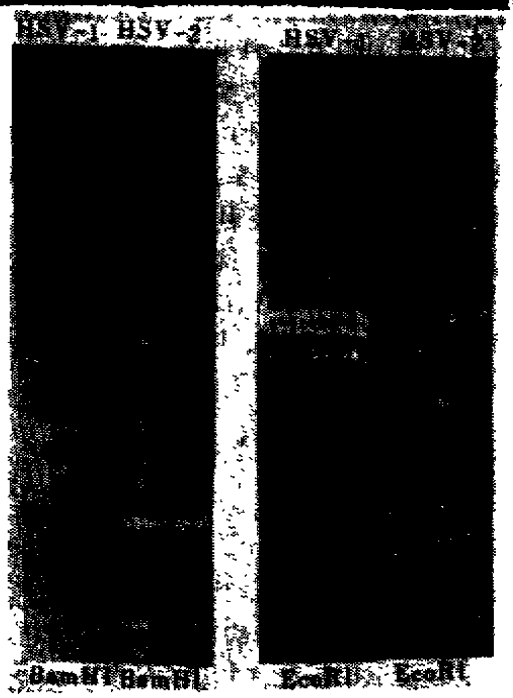


图1. 单纯疱疹病毒 1 型核酸限制性内切酶酶切凝胶电泳图谱

图2. 单纯疱疹病毒 2 型限制性核酸内切酶酶切凝胶电泳图谱

图中限制性核酸内切酶代号：
Ba BamHI, Bg BglII, Cl ClaI,
Ec EcoRI, Hi HindIII, Hp HpaI,
Ps PstI, Sa SalI, Xb XbaI,
Xh XhoI, Kp KpnI

图3. 用小量快速法提取临床分离的单纯疱疹病毒 DNA，经 BamHI、EcoRI 酶切后的凝胶电泳图谱.

Fig. 1. Restriction endonuclease cleavage profiles of HSV-1 by gel electrophoresis
2. Restriction endonuclease cleavage profiles of HSV-2 by gel electrophoresis
3. Restriction endonuclease cleavage profiles with BamHI, EcoRI of HSV isolates from clinic using the quick preparation procedure for small scale

维普资讯 http://www.cqvip.com

和具分子筛效应的凝胶电泳技术，对 HSV 的 DNA 进行分析和分型。

11 种 RE 对 HSV 两型 DNA 的酶解结果显示：虽然个别 RE 的酶解图谱中因片段较多差别不显著外，11 种 RE 的酶解电泳图谱在表现两型 HSV 的不同上是肯定的（图 1—2）。首先，在同一种 RE 酶解时，HSV-1 和 HSV-2 DNA 在酶解片段多少、大小和分布上不同，一目了然。第二，用不同RE对同一型DNA酶解时（HSV-1或 HSV-2），不同酶的酶解图谱不同，各具特征。图 3 是采用快速、简便方法提取 HSV 分离株 DNA 后，用 BamHI、EcoRI 分别酶解电泳的图谱。其结果显示：(1) HSV DNA 的快速、简便小量提取法，所得 DNA 酶解电泳图谱能表现出两型 HSV 的差异，效果满意。(2)HSV 的不同毒株（HSV-1 或 HSV-2）DNA 的电泳图谱，对某一RE 来说是相对恒定的。如图 1—2 中的相应酶解电泳图谱近似。

2. HSV DNA 的 REA 电泳图谱分析

基于每一RE 对 HSV-1 和 HSV-2 DNA 的酶解电泳图谱基本恒定、且具明显差异的特征，当熟知它们各自的标准株 RE 酶解电泳图谱后，就可确认出 HSV感染及其型别。从图 1—3 中可知，两型 HSV 的同一RE酶解电泳图谱中，片段的大小、数目的多少和泳动距离导致了整个电泳图谱不同而各具特征。两者在以下三方面有特征性差异：(1) 从整体上看，酶解电泳图谱有明显差别的RE是：BglⅡ、ClaⅠ、EcoRⅠ、HindⅢ、HpaⅠ和XbaⅠ，利用它们极易将 HSV 分型。(2)从局部分析，两型 DNA 同一RE 酶解电泳图谱的大片段的分布就有明显差异，如 BamHI、EcoRI、HpaI、SalⅠ和XhoⅠ。如 BamHI 的酶解电泳图谱，HSV-1 中的大片段上方密集排列，相邻的五个片段间距近似；而 HSV-2 则不同，一个大片段独自高高在上，与下部片段间距较大，极易和 HSV-1 区分。(3)同理，从某 RE 对 HSV-1 和 HSV-2 DNA 酶解电泳图谱下部的小片段分布的差异中，也能看出有明显不同，这些酶如 HindⅢ、EcoRⅠ和 ClaⅠ等。所以，在分析时，除了对比整个图谱中片段数目、大小和位置外，也可在熟悉的基础上，只掌握某 RE 酶解两型 HSV DNA 电泳图谱上部大片段（或下部小片段）的分布特征和明显的不同将 HSV 分型。总之，熟悉 HSV 两型 DNA 的某些酶解电泳图谱，抓住各自的主要特征，就能迅速而准确地对 HSV 感染作出分子水平上的诊断和分型。在国外，此项工作开展普遍，依据文献资料和我们的实验结果，参考我国 RE 酶源情况，我们认为 BamHI、HpaI 和 PstⅠ适合于 HSV 的诊断和分型。本文首次使用 ClaⅠ对 HSV 的两型 DNA 作了分析，结果证明它亦有明显的使用价值。

3. HSV DNA 的 REA 应用价值

我们的实验和国外的研究均表明 REA 在确定 HSV 感染和分型上效果肯定，特别是能从DNA 分子水平上进行研究，有着不可取代的优越性。实际上，REA 在 HSV 研究中的应用首先是从基础研究开始的，如研究 HSV 基因结构和功能、序列分析、寻找基因突变及鉴定重组病毒等[1,12]。自八十年代，REA的应用进入临床病毒学和分子流行病学研究领域。现已认为 REA 技术在确定 HSV 感染、分型和鉴定单个毒株的流行方面是快速、特异而又实用的方法[10,12]。在发达国家，它不但在临床诊断、HSV 分型上发挥作用，而且在调查人与人之间的传染、分析某病毒株在人群中的传播动向上得到应用。同时，在确定 HSV 的突变和重复感染上，乃至法医学鉴定中均受到重视[12]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本文报道经改进的 HSV DNA 小量提取法是个简单快速而又实用的方法，其结果与超离心法相差不大，这对 HSV 临床分离株的分型及分子流行病学研究帮助极大。当前，我国分子生物学技术的应用已有相当规模，国产的限制性核酸内切酶的种类在增多，质量亦较稳定，REA 技术的推广已有基础。相信 HSV 的 REA 技术的推广，不但能推动我国HSV基础理论研究和临床应用，而且会对我国整个分子病毒学的研究作出贡献。

参 考 文 献

〔1〕 Field BN et al., 1986, Fundamantal Virology. New York, Raven Press pp 281—236
〔2〕 Tetsuji U et al, 1982, *Microbiology Immunology* 26 : 1159
〔3〕 Spear P., 1985, Immunochemistry of viruses. ed by Van Regenmortel et al. New York, Elsevier pp 426—446
〔4〕 Roizman B et al., 1968, *J Virol* 2 : 83—84
〔5〕 Walboomers JM et al., 1976, *J Virol* 742 : 56—258
〔6〕 Mocaski ES et al., 1980, *Cell* 22 : 234
〔7〕 Davis LG et al., 1986, Methods in Molecular Biology. New York, Elsevier pp 41—62
〔8〕 Maniatis T et al., 1982, Molecular Cloning. New York, Elsevier pp 98—174
〔9〕 Kieff ED et al., 1972, *J Virol* 9 : 738—745
〔10〕 Ueno T et al., 1982, *Microbiol Immunol* 26 : 1159
〔11〕 Maintland NJ et al., 1982, *Infect and Immunol* 38 : 834
〔12〕 Roizman B et al., 1983, *Current topics in Microbiology and Immunology*. 104 : 273—284

Analysis of Herpes Simplex Virus Genomes with Restriction Endonucleases*

Chu Yong-lie Fang Yi-lan Liu Yan-nan Dong Xao-ping
(*Dept. of Microbiology, Xi-an Medical University, Xi-an*)

In order to obtain the materials of restriction endonuclease analysis of Herpes Simplex Virus (HSV) genomes and select suitable restriction endonuclease (RE) for studying and typing of HSV infection, the genomes of two standard strains of HSV, HSV-1 F strain and HSV-2 G strain have been digested with 11 REs. The results showed that the REs, especially BamHI, HpaI and PstI, were found to be useful for typing and studying of HSV DNA in the clinical virology and molecular virology. The quick preparation of HSV DNA (for small scale) is a simple, rapid and practical procedure, which can be used in the diagnostic virology and molecular epidemiology.

Key words: Herpes simplex virus Restriction endonuclease analysis HSV DNA typing

* This project was supported by National Natural Science Foundation of China