维普资讯 http://www.cqvip.com

牛疱疹病毒IV型（DN-599株）DNA的分子克隆

童光志
（中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，哈尔滨150001）
Dieter Burger David T Shen
（美国华盛顿州立大学 USDA-ARS 实验室）

提要

从感染的MDBK（牛肾）细胞中直接抽提出牛疱疹病毒IV型（BHV-4）DNA。分别经限制性内切酶EcoR I，HindⅢ或BamHI消化后，用鸟枪法和选择法将病毒DNA片段克隆到质粒pBR322和pUC9的相应位点中，构建了三组病毒DNA基因库。阳性克隆是用光生物素标记的病毒DNA和牛胸腺细胞DNA与各重组质粒DNA杂交而筛选的。总共克隆了病毒基因组的94%，其中用EcoRI克隆了83.4%，BamHI克隆了63.4%，HindIII克隆了45%。

关键词：牛疱疹病毒IV型　分子克隆　光生物素

牛疱疹病毒IV型（BHV-4）是一些分类位置尚未确定的病毒，含有TK基因[1]。到目前为此，还没有任何证据证明此类病毒是某种病的原发病原，已有报道从患有呼吸道[2]和生殖道疾病[3]，恶性卡他热[4]，甚至健康的牛[5]体内分离出此类病毒。该病毒能使被感染的细胞形成巨细胞，所以有人称为牛巨细胞病毒[6]，各分离株感染细胞培养都呈现相同的细胞病变和噬斑形成特性，而且DNA的限制性酶切图谱也相同[7]。由于目前对此病毒基因组的特性和克隆报道较少，所以我们用鸟枪法结合选择克隆法构建了病毒DNA基因文库，为进一步研究其特性提供了条件。

材料与方法

1、**病毒和细胞**：BHV-4的DN-599株和MDBK细胞均由ATCC（American Type Culture Collections）提供。

2、**酶及其它试剂**：限制性内切酶EcoR I，HindIII，BamHI，Bgl II，Sst I，Xba I，Kpn I，Apa I，T-4 DNA连接酶、碱性磷酸酶，pBR322，pUC9，X-gal及1Kb ladder（已知分子量标准品）均购自BRL公司（美国）；光生物素（photobiotin）是由Research Organic Inc.生产的。

3、**DNA提取**：BHV-4 DNA是按Pignatti等[8]的方法从感染细胞中直接抽提的。用于酶切分析的重组质粒是采用Triton裂解法[9]快速抽提的，用于生物素标记的质粒是用氯化铯平衡密度离

本文于1989年8月24日收到。
致谢：本实验曾得到华盛顿州立大学USDA-ARS实验室Beverly Hunter和Soohnee Kwan的技术帮助，在此表示衷心的感谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

心[10]纯化的。

4. **分子克隆**：约0.3μg限制性酶切的病毒DNA和0.1μg同种酶切后去磷酸化[11]的pBR322或pUC9混合，加一个单位的T-4 DNA连接酶（缓冲液中含ATP）在15℃连接4—16小时。取100μl感受态细胞（大肠杆菌DH5α株）与连接后的质粒进行转化，然后将细菌涂在含Amp或X-gal的LB培养基上置37℃培养过夜，筛选X-gal培养基上的无色菌落（pUC9）或只在Amp培养基上生长，而在Tet培养基上不生长的菌落（pBR322）抽提质粒。

5. **DNA的非放射性标记**：将超声打碎的病毒DNA和细胞DNA都稀释成1μg/μl，取25μl DNA与25μl（1μg/μl）光生物素混合（避光操作），吸入一毛细玻璃管中，用石蜡封两端平放在冰浴上，再用270W的白炽灯在其上方10～15厘米处照射15分钟进行光合成标记。碎两端，将液体吹入Eppendorf离心管中，加15μl 0.1mol/L Tris(pH9.0)及200μl仲丁醇（Sec-Butanol），混合后简单离心，去掉上层，再加200μl仲丁醇混合后离心。将底层吸入另一管中，加1/2体积的7.5mol/L醋酸铵及三倍体积的95%乙醇后放入在－20℃过夜，最后以12,000×g离心15分钟，沉淀悬浮于50μl 0.1mmol/L EDTA中备用。

6. **分子杂交**：将快速抽提的各重组质粒DNA，超声破碎的牛胸腺细胞DNA和BHV-4 DNA先在沸水中加热10分钟使其变性，迅速插入冰中，然后点在硝酸纤维素膜上置于80℃真空干燥2小时。把膜装入塑料袋中按100μl/cm² 加入预杂交液(50%甲酰铵，5×SSC，5×Denhardt'S液，25mmol/L磷酸钠pH6.5，1mg/ml Sslmon鱼精DNA，用前在沸水中加热10分钟变性)，赶尽气泡后封口，置42℃水浴中预杂交2—4小时。加入变性后的探针在42℃水浴中杂交过夜。取出膜用2×SSC-0.1% SDS及0.2×SSC-0.1% SDS各洗两次，每次10分钟（室温），然后再用0.16×SSC－0.1% SDS在50℃洗两次，每次10分钟。将膜用3%BSA在50℃封闭20分钟，再放在80℃真空干燥20分钟。将膜放在玻璃皿中按7ml/100cm² 加0.1mol/L Tris-HCl（pH7.5），0.15mol/L NaCl缓冲液，再按1μl/ml加链霉亲和素-碱性磷酸酶连接物（Streptavidin-Alkaline Phosphatase，BRL）与探针上的生物素作用10分钟后倒掉，用0.1mol/L Tris-HCl（pH7.5）、0.15mol/L NaCl洗两次（每次15分钟），最后加底物氮蓝四唑（NBT）和5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸（BCIP）显色，详细操作见BRL公司的BIUGENE—非放射性核酸检测试剂盒(Cat.No.8279SA)的操作指南[12]。

结　　果

1. BHV-4 DNA的限制性酶切分析

提纯的病毒DNA分别用限制性内切酶Hind Ⅲ，BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ，Bgl Ⅱ，Sst Ⅰ，Xba Ⅰ，Kpn Ⅰ和Apa Ⅰ在37℃消化2小时后，在0.7%琼脂糖凝胶中电泳17小时(40V)，结果见图1。

2. BHV-4 DNA EcoR Ⅰ片段的克隆

克隆病毒DNA EcoR Ⅰ片段用的载体是pUC9质粒。在含X-gal的LB培养基上选无色菌落，杂交后选阳性克隆(图2)进行酶切分析，结果证明共获得16个EcoR Ⅰ片段(表1，图3)。其中有些片段（H和H'，K和K'）迁移率相同，用双酶切（EcoR Ⅰ＋Hind Ⅲ或EcoR Ⅰ＋BamH Ⅰ）分析证明是非同源序列。在总共分析的120个重组质粒中，有36个含有与EcoR Ⅰ-K大小相同的片段，双酶切(EcoR Ⅰ＋BamH Ⅰ)证明其中32个序列相同。从图1中也可看出EcoR Ⅰ-K片段的摩尔浓度远比相邻的片段高。

维普资讯 http://www.cqvip.com

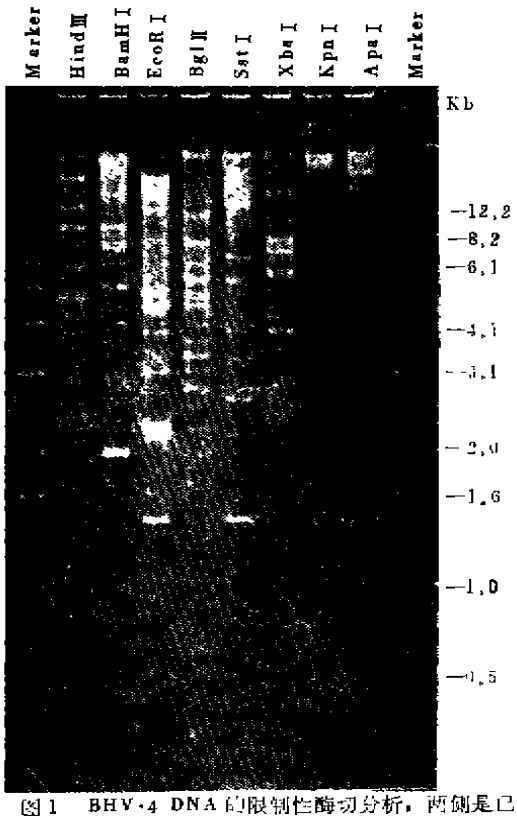

图1 BHV-4 DNA的限制性酶切分析，两侧是已知分子量标准DNA(1 Kb ladder, BRL)

Fig 1. Restriction analysis of BHV-4 DNA. MW markers(1kb ladder, BRL) were placed at both sides.

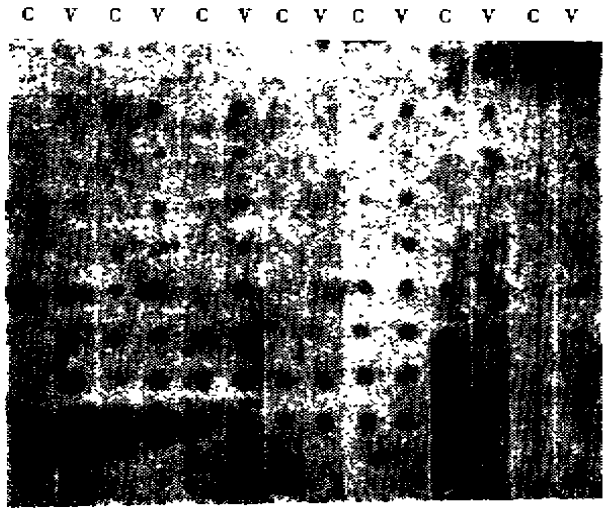

图2 Dot Blot杂交筛选，将各重组质粒分别点在两个NC条上，再分别用细胞DNA（C）和病毒DNA(V)探针杂交，只与后者反应的证明含病毒DNA片段。

Fig 2. Dot Blot Hybridization. Recombinant plasmids were dotted on two NC strips and hybridised with cellular (C) and viral(V)DNA probes respectively. The plasmid only reacted with viral probe indicated containing viral DNA fragment.

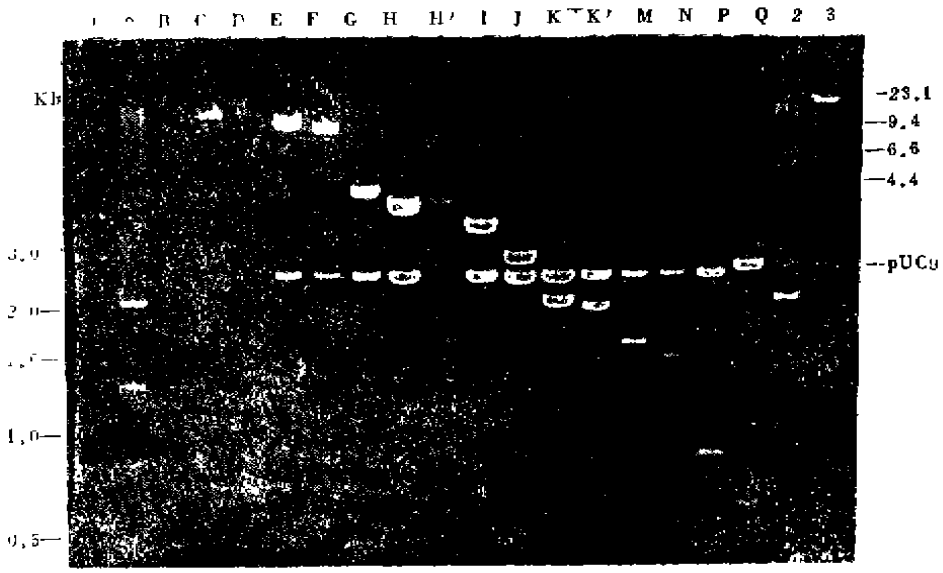

图3 克隆的BHV-4 DNA EcoR Ⅰ 片段，各重组质粒及BHV-4 DNA(2)用EcoR Ⅰ完全消化后同时在0.7%琼脂糖凝胶上电泳18小时（40V）。已知分子量标准是1 kb ladder (1) 和λDNA的HindⅢ消化产物(3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Fig 3. Cloned EcoR I fragments of BHV-4 DNA. Recombinant pUC9 containing EcoR I fragments(as indicated) and BHV-4 DNA (2) were digested completely with EcoR I, and electrophoresed on a 0.7% agarose gel for 18 hours at 40V. The MW markers were 1 kb ladder(1) and lambda DNA cleaved with HindⅢ(3).

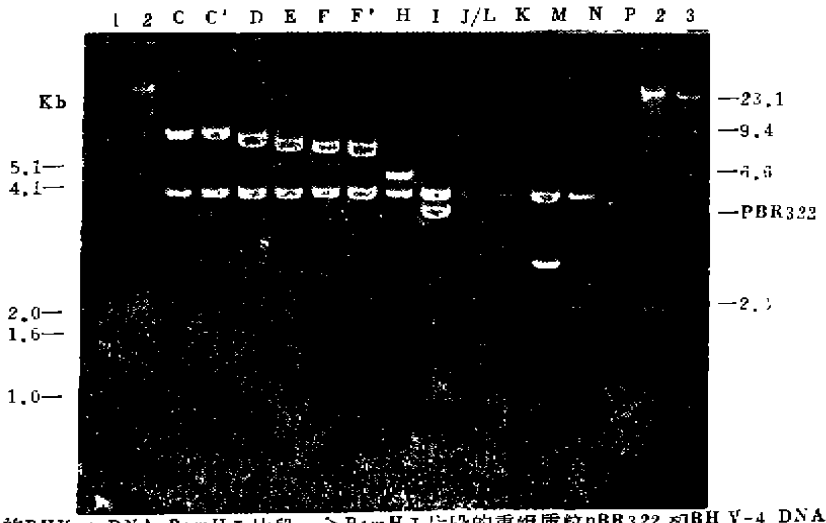

图 4 克隆的BHV-4 DNA BamH I 片段，含BamH I 片段的重组质粒pBR322和BHV-4 DNA (2)后BamH I 消化后在0.7%琼脂糖凝胶中电泳分离(18小时，40V)，两侧是标准分子量样品1kb ladder (1)和λDNA的HindⅢ片段(3)。

Fig 4. Cloned BamH I fragments of BHV-4 DNA. Recombinant pBR322 harboring BamH I fragments and BHV-4 DNA(2) were digested with BamH I and coelectrophoresed on a 0.7% agarose gel for 18 hours(40V). Both sides were MW standards, 1kb ladder(1) and HindⅢ fragments of lambda DNA(3).

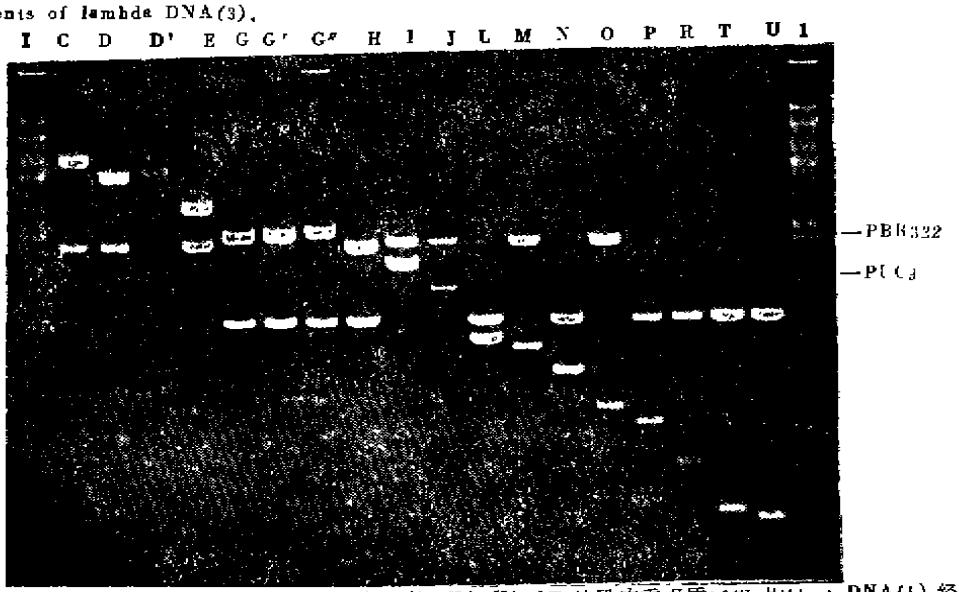

图5 克隆的BHV-4 DNA HindⅢ片段，含病毒DNA HindⅢ片段的重组质粒和BHV-4 DNA(1)经HindⅢ消化后在0.7%琼脂糖凝胶上电泳分离(18小时(40V)，溴化乙锭在电泳前按1.5μg/ml加入到凝胶和缓冲液中。

Fig5. Cloned HindⅢ fragments of BHV-4 DNA. Recombinant plasmids with HindⅢ fragments (as indicated) and BHV-4 DNA(1) were digested with HindⅢ, and separated on a 0.7% agarose gel for 18 hours (40V). Ethidium bromide previously added to the gel and running buffer to a final concentration of 0.5μg/ml.

维普资讯 http://www.cqvip.com

3. BHV-4 DNA BamH I 片段的克隆

用pBR322共克隆了14个BamH I 片段(见表1及图4)其中重组质粒 pBT4-55 和 pBT4-12，SCB6-4和 SCB6-9 都含有相同大小的插入片段，双酶切分析也证明它们是非同源序列，所以分别命名为BamHI-C、C'和F、F'。BamH I-N片段和EcoR I K 很相似，其克隆效率也远比其它片段高。

4. BHV-4 DNA Hind Ⅲ片段的克隆

BHV-4 DNA的Hind Ⅲ片段是用pBR322和pUC9两种载体克隆的。用pBR322克隆了7个片段(C，D，E，I，J，M，O)，用pUC9克隆了11个片段(D'，G，G'，G"，H，L，N，P，R，T，U)。重组质粒 pXA11-255，pXA11-256和 pXA11-172 均含有一个迁移率相同的病毒 DNA片段(图5)，经双酶切(Hind Ⅲ + EcoR I)及它们的相互杂交结果均证明是三个互不相同的片段(G，G'和G")。

表1 克隆的BHV-4 DNA片段

Table I. Cloned restriction fragments of BHV-4 DNA

片段 Fragment	分子量(kb) M.W.	重组质粒 Recombinant	片段 Fragment	分子量(kb) M.W.	重组质粒 Recombinant
Eco RI					
B	16.4	pXE3-54[a]	J	3.6	pBT4-21[b]
C	14.1	pXE3-53[a]	K	2.98	SCB1-21[b]
D	13.2	pXE3-87[a]	L	2.9	pBT4-21[b]
E	11.7	pXE3-12[a]	M	2.7	pBT4-4[b]
F	10.2	pXE3-10[a]	N*	2.1	pBT4-19[b]
G	4.8	pXE1-71[a]	P	0.7	pBT4-51[b]
H	4.4	pXE1-21[a]	Hind III		
H'	4.4	pXE4-81[a]	C	10.0	SC2-12[b]
I	3.7	pXE4-39[a]	D	8.0	SC2-5[b]
J	3.0	pXE1-96[a]	D'	7.9	pXA11-280[a]
K*	2.35	pXE1-46[a]	E	5.7	S11[b]
K'	2.35	pXE1-45[a]	G	4.6	pXA11-255[a]
M	1.7	SCE13-7[a]	G'	4.6	pXA11-256[a]
N	1.6	SCE14-5[a]	G"	4.6	pXA11-172[a]
P	0.8	SCE16-2[a]	H	4.2	pXA7-15[a]
Q	0.6	SCE17-2[a]	I	3.8	SC2-13[b]
BamH I			J	3.2	SCH9-3[b]
C	8.0	pBT4-55[b]	L	2.4	pXA7-142[a]
C'	8.0	pBT4-12[b]	M	2.35	SCH12-6[b]
D	7.4	SCB2-4[b]	N	2.0	pXA11-229[a]
E	6.9	SCB5-7[b]	O	1.7	SCH14-21[b]
F	6.7	SCB6-4[b]	P	1.5	pXA7-103[a]
F'	6.65	SCB6-9[b]	R	1.25	pXA11-118[a]
H	5.0	SCB1-14[b]	T	0.36	pXA7-21[a]
I	3.8	SCB9-8[b]	U	0.9	pXA7-95[a]

*：高摩尔浓度片段 Hypermolar fragments
a：重组pUC9 Recombinant pUC9
b：重组pBR322 Recombinant pBR322

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

BHV-4是一种慢复制病毒[13]，国内对此病毒研究的报道极少，所以对其DNA特性缺乏了解。Ehlers等[14]曾比较过BHV-4各株重复序列，并推测此病毒DNA的重复序列是以聚合形式存在。本实验克隆的EcoR I-K和BamHI-N片段都是高摩尔浓度片段，其克隆效率远比其它片段高，这两个片段能相互杂交（未发表资料），所以推测这些片段是病毒DNA的重复序列，而且本实验结果证明Ehlers的推测是正确的。

参 考 文 献

〔1〕 Kit, S. et al., 1986, *Virus Res.* 4：197：212.
〔2〕 Smith, P.C.et al., 1972, *J.Am.Vet.Med.Assoc.*161：1134—1141.
〔3〕 Parks, J.B.et al., 1973, *Archiv fur die gesamte virusforschung* 41：211—217.
〔4〕 Storz, J., 1968, *J.Am.Vet.Med.Assoc.*152：804—806.
〔5〕 Luther, P.D.et al., 1971, *Res.Vet.Sci.*12：476—498.
〔6〕 Todd, W.J.et al., 1983, *J.Gen.Virol.*64：1625—1636.
〔7〕 Storz, J.et al., 1984, *J.Gen.Virol.*65：697—706.
〔8〕 Pignatti, P.F.et al., 1979, *Virology* 93：260—264.
〔9〕 Bernard Perbal., 1985, A practical guide to molecular cloning John Wiley&Sons, NY, pp.230—262.
〔10〕 Hardy, K.G., 1987, Plasmid, p57.
〔11〕 Maniatis, T.et al., 1982, Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p93.
〔12〕 Forster, A.C.et al., 1985, *Nucleic Acids Res.*13：745—761.
〔13〕 Gibbs, E.P.J.et al., 1977, *Vet.Bulletin* 47：411—425.
〔14〕 Ehlers, B.et al., 1986, *J.Gen.Virol.*66：55—68.

Molecular Cloning of Bovine Herpesvirus Type 4 (DN-599 Strain) DNA

Tong Guang-zhi

(*Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin* 150001)

Dieter Burger David T. Shen

(*USDA-ARS, Washington State University, WA* 99164-7031)

Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) DNA was extracted from infected MDBK (Bovine kidney) cells using Triton X-100 and phenol/chloroform /ether. With shotgun and selective cloning procedures, the viral DNA was

维普资讯 http://www.cqvip.com

cloned into EcoR I, BamH I or HindⅢ sites of plasmids pBR322 or pUC9 after digestion of the DNA with the three restriction endonucleases, respectively, and three DNA libraries containing different restricted fragments were constructed. Photobiotin-labeled viral DNA and bovine thymus DNA were used as probes to identify the recombinant plasmids which are harbouring the viral DNA fragments. Total 94% of the entire genome of BHV-4 (83.4% with EcoR I, 63.4% with BamH I and 45% with HindⅢ) was cloned.

Key Words: BHV-4 Molecular cloning Photobiotin

第二次全国干扰素-病毒性肝炎学术会议简介

A Short Introduction of the Second Nationwide Scientific Conference on Interferon-Viral Hepatitis

由中国微生物学会病毒学会及中华医学会传染病和寄生虫病学会联合举办的第二次全国干扰素-病毒性肝炎学术会议于1990年10月11～13日在河南省焦作市召开，来自全国16个省市自治区的58名代表出席了会议。会议共收到学术论文55篇，在会议上报告的有34篇。其中4篇专题报告是：1.细胞因子网络的基础和临床研究进展（杜平）；2.干扰素治疗乙型慢性肝炎的现状（崔振宇）；3.抗病毒药物及抗肝炎病毒疗法研究进展（熊开钧）；4.乙型肝炎病毒分子生物学的研究（吴章琦）。

我国的乙型肝炎患病率占世界之首，其治疗方法尚未解决，应用干扰素治疗该病已成为国内外医学界关注的问题。从收到的论文看，国内目前应用干扰素治疗慢性乙型肝炎的方法主要有3种：一是单独使用小剂量干扰素，每天注射只有几万单位，而且多是粗制品；二是单独使用大量干扰素，每天注射10^6单位或更多；三是联合其他抗病毒药物或中药。经过几年的临床试验，小剂量干扰素（不管是粗制品，还是稀释的部份纯化制品），都有一定疗效。为了提高治疗效果，大多使用低剂量干扰素联合其他药物来治疗慢性乙肝。联合应用的药物主要有无环乌苷、肝炎灵、三氮唑核苷（病毒唑）、强力宁、联苯双脂、肝必服、氟美松、胸腺肽、白细胞介素-2、支链氨基酸、乙肝转移因子、乙肝疫苗、聚肌胞、黄芪、甘草甜素及其他中药等。为了使干扰素在体内缓慢释放、避免迅速降解，还有人用脂质体包被干扰素联合近红外线辐照治疗慢乙肝。在给药途径上，除肌肉注射外，还有人用腹股沟淋巴结周围浸润注射（用量小）和滴鼻（鼻粘膜吸收药物快、方便，用于小儿肝炎）的方法。所有这些试验都取得了一定的疗效，在某些观察指标上还具有一定的统计学意义。

目前，国外已肯定了干扰素对慢活肝的疗效，但对慢迁肝的疗效尚不能肯定。经过讨论，会议认为在以后的试治研究中，应当注意病例的选择和分组，将慢活肝和慢迁肝分成2组，对性别、年龄、病程、病情、有无其他慢性严重疾患都应予以考虑。有条件的单位应尽量采用双盲对照法，并进行长期追踪。此外，根据国家卫生部的要求，都应使用提纯的干扰素制品。会议还就今后的协作进行了磋商，并决定1992年下半年召开第三次全国会议，地点待定。

（范中善　吴章琦　刘振东）