

单纯疱疹病毒分子生物学分型方法的研究

吴强 楚雍烈 房益兰

(西安医科大学微生物教研室,陕西西安 710061)

摘要 联合运用 HSV-1 和 HSV-2 型特异性核酸探针对 28 株 HSV 临床分离株做了鉴定分型,并应用 HSV 型特异性单克隆抗体的三种免疫学方法的检测结果进行了比较。核酸探针与单克隆抗体之间的符合率为 100%,但分型率不同,核酸探针为 100%,单克隆抗体为 64—82%。研究结果表明,本实验所建立的 HSV-McAb-APAAP 桥联免疫酶染技术具有简便、敏感、实用的特点。

关键词 单纯疱疹病毒;核酸探针;单克隆抗体;分型

单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV) 是人类一种重要的致病性病毒。根据抗原性不同分为 HSV-1 和 HSV-2 两个血清型^[1]。型别与致病性及其对抗病毒药物的敏感性密切相关^[2,3]。故对 HSV 分离株准确地分型,对于临床诊断、指导用药、判断预后,以及流行病学和 HSV 的基础研究都有着十分重要的意义。

以往,对 HSV 的分型以普通生物学及血

清免疫学的方法为主,分型率低,准确性差。自 70 年代后期开始,国外学者采用单克隆抗体 (McAb)、多肽分析、核酸杂交技术及病毒 DNA 限制性核酸内切酶图谱分析等手段,在分子水平鉴定 HSV 的型别,使分型率及准确性大大提高^[4]。本研究联合应用了两个 HSV 型特异性核酸探针,对 28 株 HSV 临床分离株进行了鉴定分型,同时应用 HSV 型特异性 McAb 以 ELISA、IFA 及 EIA 三种血清学技术为检测手

段,作了平行的比较研究,旨在寻找特异、敏感、实用的 HSV 诊断和分型方法,同时为我国 HSV 分子生物学分型提供技术资料。

材料与方法

(一) 材料

1. 细胞与毒株:乳兔肾原代细胞 (PRK) 由本室制备;地鼠肾传代细胞 (BHK-21) 由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠。

HSV-1 参考株 KOS 由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠, F 株由美国芝加哥州立大学 Roizman 教授惠赠。HSV-2 参考株 333 由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠, Sav 株购自北京药品生物制品研究所。

2. 标本:头面部标本取自附属医院皮肤科、传染科 1988 年门诊患者共 7 份。宫颈标本取自山西省运城地区医院妇产科宫颈糜烂患者共 40 份。待测分离株 W1-W7 系湖北医科大学病毒研究所郑志明教授惠赠。

3. 试剂:抗体:HSV-1 型特异性 McAb (Mad-2)、HSV-2 型特异性 McAb (CH-A9) 均由第四军医大学汪美先教授惠赠。荧光羊抗鼠 IgG 购自兰州生物制品研究所。

碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶试剂 (APAAP) 购自军事医学科学院基础研究所。蛋白酶 K 购自 Biohringer manubheim 公司;RNA 酶、DNA 酶 I、DNA 多聚酶 I 均购自华美生物制品公司。

含 HSV-1 型特异性 DNA 片段的重组质粒 pRc101 及含 HSV-2 型特异性 DNA 片段的重组质粒 pRc104 均由本室提供^[5,6]。

(二) 方法

1. 病毒分离:将所取的 47 份待测标本接种于 PRK,盲传 3 代,出现典型细胞病变 (CPE) 的视为阳性株。随后用兔抗 HSV 免疫血清做中和试验,阳性定为 HSV。

2. 酶联免疫吸附试验 (ELISA):应用 HSV 型特异性 McAb (Mad-2 & CH-A9) 检测 4 株 HSV 参考株及 28 株 HSV 分离株共 32 份抗原,参照文献^[7]方法进行操作。

3. 间接免疫荧光试验 (IFA):用 HSV 型特异性 McAb (Mad-2 和 CH-A9) 按文献^[4]方法检测 4 株 HSV 参考株及 28 株 HSV 分离株,荧光 (++) 以上判为阳性。

4. 碱性磷酸酶抗抗体桥联免疫酶染试验 (EIA):接种 HSV 参考株及分离株共 32 份毒种于 BHK-21,当 CPE 为 (++) 时,用 PBS-BSA (含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)吹下,常规滴片,冷丙酮固定。加 Mad-2 及 CH-A9 各 20 μ l 室温作用 30 分钟,正常羊血清封闭后,分别加 APAAP 试剂,各作用 30 分钟(上述各步之间用 pH 7.4 的 PBS 冲洗 3 次)。加新配制的底物溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20—30 分钟。最后用 1/5000 伊文思蓝复染 10 分钟,水冲洗,400X 显微镜观察。

5. 核酸分子杂交:采用快提法制备病毒 DNA 主要步骤:把包括 HSV 参考株在内的 32 株病毒接种于 BHK-21,病变达 100% 弃去培养液,加 pH 8.0 含 0.5% 细胞裂解液 (NP₄₀) 的 STE (100mmol/L 氯化钠;10mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸;1mmol/L 乙二醇四乙酸二钠) 0.5ml,室温作用 1—2 分钟,摇下细胞,移入 Eppendorf 管,10 000r/min 离心弃沉淀,加 5 μ l RNA 酶室温 5 分钟,再加十二烷基硫酸钠 (SDS) 及蛋白酶 K 各 25 μ l,37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时。经酚、氯仿/酚、氯仿各抽提一次,无水乙醇沉淀核酸。然后将制备好的样品 DNA 依次分别滴加于两张硝酸纤维素滤膜的既定位置,室温晾干,碱变性,80 $^{\circ}$ C 干烤 2—3 小时。

制备探针:用 α -³²P 去氧三磷酸腺苷 [(α -³²P)dATP] 以缺口翻译法标记 pRc101 及 pRc104 DNA 作为探针。杂交、洗膜、放射自显影均按常规方法进行^[8]。

结 果

(一) 病毒分离结果

接种于 PRK 的 47 份标本,有 21 株出现了典型的 CPE,并可在 BHK-21 上连续传代。用兔抗 HSV 免疫血清做中和试验,结果有 21 株初步确定为 HSV,依次编号为 01-21。

(二) ELISA 检测结果

32 株病毒中, 有 2 株标准参考株及 5 株分离株为 HSV-1, 1 株标准参考株及 13 株分离株为 HSV-2。包括 1 株标准参考株在内的 11 株未能分型(表 1)。

(三) IFA 和 EIA 检测结果

用 IFA 和 EIA 检测的结果一致, 2 株标准参考株及 7 株分离株为 HSV-1; 1 株标准参

考株及 17 株分离株为 HSV-2。包括 1 株标准参考株在内的 5 株未能分型(表 2)。荧光显微镜观察 IFA 法用 Mad-2 检测分离株结果, 阴性对照组荧光极弱或无荧光, 阳性在 BHK-21 细胞上可见环状的强绿色荧光(图 1)。光镜观察 EIA 法用 CH-A9 检测分离株结果, 阴性对照组细胞被染成蓝色(图 2), 阳性 BHK-21 细胞外周被染成红色(图 3)。

表 1 ELISA 对 HSV 分型的结果

标 本	标准参考株				临 床 分 离 株																												
	KOS	F	333	Sav	头 面 部								子 宫 颈																				
					W1	W2	W3	W4	W5	W6	02	16	W7	01	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	
Mad-2	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CH-A9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
HSV 型	1	1	?	2	1	?	1	1	?	1	2	?	2	?	2	2	?	?	?	2	2	?	1	?	2	2	2	2	?	2	2	2	?

注: “+” 阳性, “-” 阴性, “1” HSV-1, “2” HSV-2 “?” 示未能定型。下表同。

表 2 EIA 和间接 IFA 法对 HSV 分型的结果

标 本	标准参考株				临 床 分 离 株																											
	KOS	F	333	Sav	头 面 部								子 宫 颈																			
					W1	W2	W3	W4	W5	W6	02	16	W7	01	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21
Mad-2	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH-A9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
HSV 型	1	1	?	2	1	?	1	1	1	1	2	?	2	2	2	2	1	2	2	?	1	2	2	2	2	2	?	2	2	2	2	2

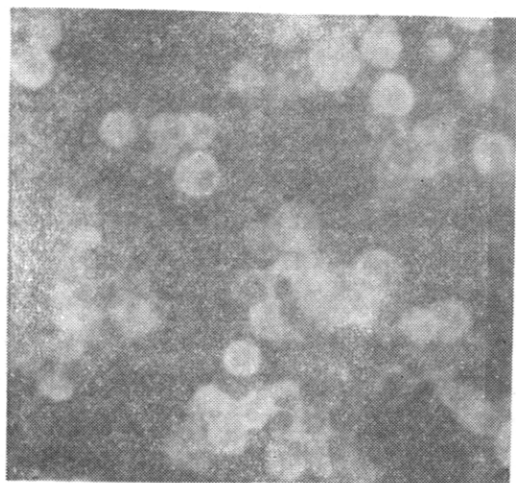


图 1 IFA 法用 Mad-2 检测的阳性结果示环状强绿色荧光 (400×)

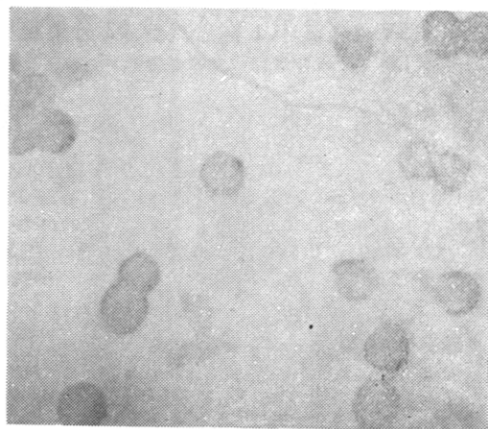


图 2 EIA 法用 CH-A9 检测的阴性呈蓝色结果 (330×)

表 3 分子杂交方法对 HSV 分型的结果

样 品	标准参考株				临 床 分 离 株																		
	KOS	F	333	Sav	头 面 部								子 宫 颈										
					W1	W2	W3	W4	W5	W6	02	16	W7	01	03	04	05	06	07	08	09	10	11
pRc101	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
pRc104	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
HSV 型	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2

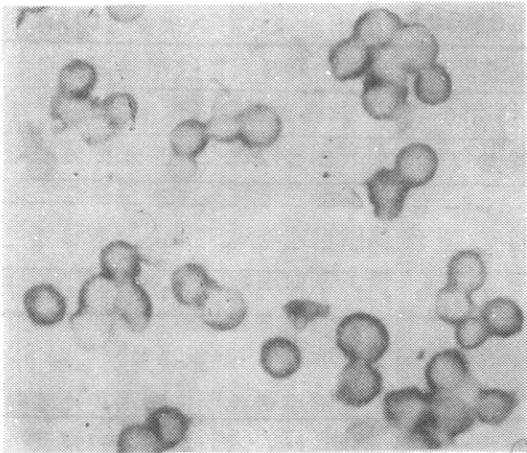


图 3 EIA 法用 CH-A9 检测的阳性呈红色结果 (330×)

(四) 核酸分子杂交结果

检测 4 株标准参考株及 28 株临床分离株的 DNA 样品(表 3), 结果 2 株标准参考株及 9 株临床分离株为 HSV-1 (其中 2 株分离株 06, 16 分离自宫颈炎), 2 株参考株及 19 株分离株为 HSV-2 (其中 1 株分离株 02 分离自咽

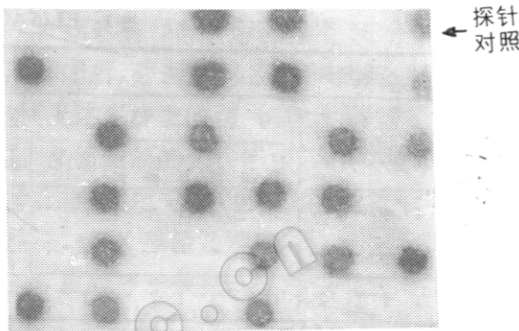


图 5 探针 pRc104 杂交结果

部)。图4、5 显示用核酸探针 pRc101 及 pRc104 检测的结果, 黑色斑点为阳性。

讨 论

1. HSV 型特异性核酸探针的应用价值: Redfield 和 Peterson 等都曾证明用打点杂交法 (Dot blot hybridization) 进行 HSV 的检测及分型是完全可行的^[8]。本研究以 (α -³²P) 标记质粒 pRc101 及 pRc104 作为探针, 与 HSV 标准参考株及分离株在严格状态下杂交。结果表明, 探针 pRc101 只与 HSV-1 标准参考株及被 McAb (Mad-2) 鉴定为 HSV-1 的分离株发生杂交; pRc104 只与 HSV-2 标准参考株及被 McAb (CH-A9) 鉴定为 HSV-2 的分离株发生杂交; 两型探针之间无交叉杂交现象出现, 分型率达 100%。两型探针对所检测标本的分型结果互为补充、互相佐证。因此用 HSV 型特异性核酸探针对 HSV 进行分型是完全可行的, 具有高度的特异性、敏感性及可靠性, 可测到 lpg (或 10³ 细胞) 的 HSV DNA。但使用的同位素价格较贵, 需要防护, 使其推广

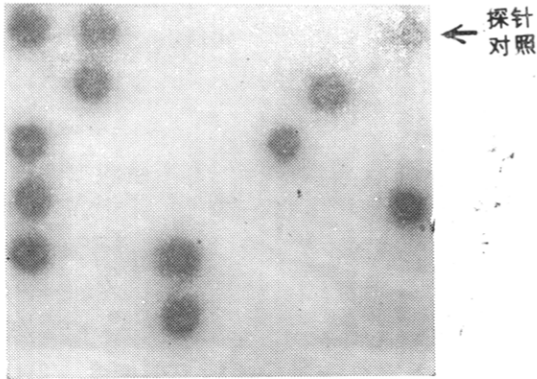


图 4 探针 pRc101 杂交结果

受到一定的限制。目前急待解决的是用非放射性物质替代同位素进行标记的问题,国内外均有成功运用生物素进行标记的报道,国内生产的 Bio-11-dUTP 业已通过鉴定。随着非放射性标记物质的商品化、系列化,会使型特异性核酸探针的实用性大大提高,使核酸分子杂交技术广泛地应用于 HSV 的鉴定分型、临床诊断、流行病学及 HSV 基础研究等多个领域。

2. 三种 McAb 分型方法的比较: 我们以前的研究及文献资料均表明,由于 HSV 两个抗原型的许多抗原成分具有相同或相似性,在免疫学上可发生广泛的交叉反应,应用普通的 HSV 免疫血清难以对 HSV 进行准确地分型。然而 McAb 制备技术的问世,使免疫学分型法显示出在 HSV 诊断分型上的优越性。本研究所用的三种免疫学方法对 28 株 HSV 分离株的分型率分别为 ELISA 64%,IFA 和 EIA 均为 82%。虽然分型率较核酸分子杂交法低,但其分型的符合率达 100%。同时由于 McAb 的免疫学分型法具有操作简便、经济、快速等优点,仍不失为较实用的 HSV 分型技术。

在实验中我们所建立的 HSV-McAb-APAAP 技术较 IFA、ELISA 更实用。桥联免疫酶染法的原理是: HSV 型特异性 McAb 与同型 HSV 特异地结合,羊抗鼠 IgG 发挥搭桥作用,它的一个 Fab 段与 HSV-McAb 的 Fc 段联结,另一 Fab 段与鼠抗碱性磷酸 McAb 的 Fc 段相联,通过碱性磷酸酶催化底物坚固红显示红色,从而鉴定出 HSV 的型别。该法进行 HSV 分型,其准确性、分型率与 IFA 一致,且无需特殊仪器,省时间、易判定,是一种值得推广的 HSV 分型方法,适用于大量临床分离株的诊断、分型及流行病学调查。

3. HSV 感染规律分析: 本文对 28 株 HSV 分离株的最终分型结果是: 分离自头面部的 8 株中,有 7 株为 HSV-1,1 株为 HSV-2。分离

自宫颈的 20 株中,18 株为 HSV-2,2 株为 HSV-1。这表明在我国也存在 HSV-1 引起的生殖器官感染及 HSV-2 引起的头面部的感染,但低于国外的类似报道^[9]。

以前的研究认为,HSV-1 主要引起腰部以上器官和部位的病变,HSV-2 则主要引起腰部以下泌尿生殖器官的感染。但近年来,国外的研究表明,生殖器官 HSV-1 感染的比例正不断增大,大约 1/3 生殖器官 HSV 分离株是 HSV-1。而大学妇女生殖器官 HSV 分离株中有 63% 为 HSV-2,37% 为 HSV-1^[10]。同时,生殖器官以外的 HSV-2 感染也日益增多。这种 HSV 型别与致病部位关系的变化,一是与性交方式的改变有关,二是与 HSV 分型方法的特异性和敏感性不断提高有关。鉴于 HSV 型别与抗病毒药物的敏感性及病情预后的关系密切,故应认识这种变化的规律,选用敏感、特异的 HSV 诊断分型方法,从而对 HSV 的临床感染作出正确诊断和治疗,为 HSV 的流行病学调查提供准确的资料,为控制 HSV 的感染、保护人类健康作出贡献。

参 考 文 献

1. Plummer G.: *Brit J Exp Pathol*, 45: 135—41, 1964.
2. Dowle W R et al.: *J Immunol*, 99: 974—80, 1967.
3. Elion G B et al.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5716—29, 1977.
4. Peterson E et al.: *J Clin Microbiol*, 17: 92—6, 1983.
5. 楚雍烈等: 中华微生物学与免疫学杂志, 8: 344—346, 1988.
6. 楚雍烈等: 中华实验和临床病毒学杂志, 5(1): 25—27, 1991.
7. Niheden E et al.: *J Clin Microbiol*, 17: 677—80, 1991.
8. Redfield D C: *Amer Soc Microbiol Abst*, 741, 1983.
9. Thomas M, Becker M D: *Ann Rev Med*, 36: 185—193, 1985.
10. Kalinyak J E et al.: *J Med Virol*, 1: 175—181, 1977.

STUDY ON HERPES SIMPLEX VIRUS TYPING WITH MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS

Wu Qiang Chu Yonglie Fang Yilan*

(Department of Microbiology, Xi'an Medical University, Shaanxi Xi'an 710061)

A total of twenty eight HSV isolates from the patients were typed by using HSV type-specific monoclonal antibodies (McAb). Comparison of typing results with McAb in three sero-immunological methods with molecular hybridization indicated 100% concordance in the results. But the typing rates were quite different among the various methods (ELISA 64%, IFA and EIA 82%, Hybridization 100%). The results demonstrate that the molecular hybridization with HSV type-specific probes was highly sensitive and specific, and the method of EIA with HSV type-specific McAb was accurate, cheap, rapid and practical.

Key words Herpes Simplex Virus; DNA probe; McAb; Typing