

## · 新技术 · 新方法 ·

应用细菌人工染色体技术体外繁殖  
人巨细胞病毒

谢斌华 王波 丁俊彩 胡兢晶 郭媛媛 苏海浩

**【摘要】** 目的 体外快速繁殖人巨细胞病毒(HCMV)。方法 用试剂盒抽提、纯化重组 HCMV 细菌人工染色体(BAC),以重组 HCMV 细菌人工染色体(BAC-HCMV)为模板扩增 UL82 基因,酶切后连接至 pcDNA 载体,构建 pcDNA-pp71 重组质粒,转化感受态宿主菌,抽提及鉴定重组质粒。通过电穿孔技术将 BAC-HCMV 与鉴定成功的 pcDNA-pp71 重组质粒共转染人包皮成纤维细胞,通过多重 PCR 法及观察细胞病变效应、绿色荧光蛋白等方法鉴定培养后获得的 HCMV。结果 (1)获得 pcDNA-pp71 重组质粒,经 PCR 及双酶切后,片段大小与预期相符,进一步测序鉴定成功。(2)BAC-HCMV 与 pcDNA-pp71 共转染人包皮成纤维细胞,出现细胞病变效应,经荧光显微镜观察可见绿色荧光。(3)以培养出的病毒 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增,获得两条与预期大小相符的条带,鉴定 HCMV 体外繁殖成功。结论 应用 BAC 技术成功在体外快速繁殖 HCMV,为 HCMV 研究提供实验材料,也为进一步研究 HCMV 分子机制奠定基础。

**【关键词】** 电穿孔; 巨细胞病毒; 转染; 染色体,人工,细菌

**To propagate human cytomegalovirus *in vitro* by bacterial artificial chromosome** XIE Bin-hua, WANG Bo, DING Jun-cai, HU Jing-jing, GUO Yuan-yuan, SU Hai-hao. Department of Pediatrics, Women and Children Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 511442, China

Corresponding author: WANG Bo, Email: dr. wangbo@163.com

**【Abstract】 Objective** To rapidly propagate human cytomegalovirus *in vitro*. **Methods** BAC-HCMV were extracted and purified by using a plasmid DNA purification kit. The HCMV UL82 gene fragments were amplified from the template BAC-HCMV by polymerase chain reaction (PCR) and digested by BamH I and Xho I which were also used on vector pcDNA3.1(+). The digested UL82 gene fragments and pcDNA3.1 were connected by T4 ligase, forming the combinant plasmid pcDNA-pp71 which was transformed into competent *E. coli* DH5 $\alpha$ . After amplifying in Amp + LB liquid medium, combinant plasmid pcDNA-pp71 was extracted, purified and confirmed by DNA sequencing. Human foreskin fibroblast (HFF) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and cotransfected with bacterial artificial chromosome-human cytomegalovirus (BAC-HCMV) and pcDNA-pp71 by electroporation. By multiplex PCR method and observation of cytopathic effect (CPE), green fluorescent protein and other methods were used to identify human cytomegalovirus. **Results** The combinant plasmid pcDNA-pp71 was successfully constructed, confirmed by PCR, the digestion of enzymes and sequencing. CPE and green fluorescence were observed under microscope after the HFF cells were cotransfected with BAC-HCMV and pcDNA-pp71. The virus produced by the transfected HFF cells was confirmed to be Towne strain by multiple PCR. **Conclusions** Human cytomegalovirus was rapidly propagated *in vitro* as a result of electroporation, providing essential material and foundation for further research on molecular mechanism of HCMV.

**【Key words】** Electroporation; Cytomegalovirus; Transfection; Chromosomes, artificial, bacterial

巨细胞病毒在自然界中普遍存在,属于疱疹病毒科,多种动物皆可遭受感染,本病毒对宿主或培养细胞有高度的种特异性,人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)只能感染人。HCMV 在人群中感染率高,多

为隐性感染,但孕妇感染 HCMV 可导致胎儿畸形、流产、婴幼儿智力低下等严重后果,因此对 HCMV 的研究有重要意义。通常病毒的分离培养可用动物接种和组织培养等方法,但 HCMV 只感染人类组织细胞,不能用动物接种的方法。而采取组织细胞培养的方法分离培养 HCMV 费时(实验操作时间约 1~6 周,出现细胞病变的平均时间为 2~3 周)<sup>[1]</sup>,且传代达到一定次数后,病毒基因组容易出现突变(如突变后造成的 HCMV 实

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.11.129

基金项目:广东省自然科学基金(9151008901000085)

作者单位:511442 广州医学院附属广东省妇幼保健院儿内科

通讯作者:王波,Email:dr.wangbo@163.com

实验室病毒株与临床病毒株的差异)<sup>[2]</sup>,造成实验材料的不稳定,给 HCMV 的实验研究带来很大困难。

细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 是可容纳 30 ~ 300 kb 的 DNA 片段,性质稳定,极少发生重组,是 DNA 文库构建和基因簇研究的理想载体<sup>[3]</sup>。目前已有研究者把 HCMV 基因组构建到 BAC 上,转染细胞后能获得重新组装的病毒颗粒<sup>[4]</sup>,提供了稳定保存 HCMV 基因组的新方法,促进了对该病毒的进一步研究。为了在体外快速繁殖 HCMV,我们进行了以下研究。

## 材料与amp;方法

### 一、材料

1. 试剂:限制性内切酶 (Bam H I 和 Xho I)、DNA 聚合酶 (LA Taq 和 Ex Taq)、T4 DNA 连接酶、dNTP、RNase Inhibitor、DL2000 Marker、胰酶等购自 TAKARA 公司;DEPC、水饱和酚购自北京鼎国公司;Viral DNA Kit、凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 OMEGA 公司;小量质粒抽提试剂盒购自天根公司;Plasmid DNA Purification 试剂盒购自 MACHERY-NAGEL (MN) 公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自四季青公司;引物合成及测序委托上海 Invitrogen 公司。

2. 质粒、菌株和病毒株:载体 pMD18-T Vector、宿主大肠杆菌 DH-5 $\alpha$  购自 TAKARA 公司;载体质粒 pcDNA3.1 (+) 购自基因公司;人包皮成纤维细胞 (HFF)、BAC-Towne HCMV 为实验室保存。

### 二、方法

1. BAC-HCMV 质粒 DNA 的提取、纯化及鉴定:收集 LB/氯霉素培养液中对数生长期的 DH5 $\alpha$  [BAC-HCMV] 菌液,离心,使用 Plasmid DNA Purification 试剂盒提取 BAC-HCMV 质粒 DNA,将最后步骤的 DNA 沉淀置于 4  $^{\circ}$ C 保存,临用前 1 d 再溶于适量 TE,待充分溶解后备用。紫外分光光度计测定其在 260 nm 处吸光度 (A) 确定含量。根据 NCBI 上公布的 HCMV Towne 病毒株序列,选用 HCMV 的保守基因即早期基因 (IE) 和晚期基因 (LA) 作为 HCMV 鉴定指标。IE 的上游引物序列为 5'-CCACGCAGCGGCCCTTGATGTTT-3',下游引物序列为 5'-CATTGGTGGTCTTAGGGAAGGC-3';LA 的上游引物序列为 5'-CCTGTCACCGCTGCTATATTTGC-3',下游引物序列为 5'-ATTGTACCTGAGGATAAGCGGG-3'。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,62  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 32 个循环;72  $^{\circ}$ C 延长 10 min。1% 琼脂糖凝胶中电泳确认扩增产物。

2. UL82 基因的引物设计:根据 GenBank 上 HCMV

病毒株 Towne pp71 蛋白基因序列 (UL82) 以及克隆的需要设计引物,序列如下:上游引物为 5'-GCGGGGATCCGCAATGTCTCAGGCATCGTCTCG-3';下游引物为 5'-GCGGCTCGAG GATGCGGGGTGCGACTGCGTGG-3'。上游引物中 GGATCC 为 BamH I 酶切位点,GCAATGT 为真核表达所需要的 Kozak 序列;下游引物中 CTCGAG 为 Xho I 酶切位点,并去掉终止密码子,以融合 C-myc 标签,为方便以后用 Western 检测该基因表达产物。

3. PCR 扩增目的基因 UL82 及片段纯化:以 BAC-HCMV 质粒为模板,反应条件为 94  $^{\circ}$ C 1 min;94  $^{\circ}$ C 45 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 90 s,共 32 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。1% 琼脂糖凝胶中电泳确认 PCR 产物,使用 OMEGA 公司 E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit 从琼脂糖凝胶中回收纯化 PCR 产物。

4. 酶切反应:分别用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切纯化后的 PCR 产物及质粒 pcDNA3.1 (+),37  $^{\circ}$ C 恒温箱 3 ~ 4 h。1% 琼脂糖凝胶中电泳并从凝胶中回收酶切后的质粒和目的片段。

5. 连接反应:用 T4 连接酶连接酶切后回收的质粒和目的片段。

6. 宿主菌 DH5 $\alpha$  感受态的制备及转化:CaCl<sub>2</sub> 法制备 DH5 $\alpha$  感受态,并将以上连接产物全部转化入 DH5 $\alpha$  感受态。转化的重组质粒菌株接种于含氨苄西林 (Amp) 的 LB 固体培养基上,16 ~ 20 h 后观察转化情况。倒置保存于 4  $^{\circ}$ C。

7. 重组质粒的提取及鉴定:挑取单个菌落接种于含氨苄西林的 LB 液体培养基中培养扩增后,做菌落 PCR 后将 PCR 反应液在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,初步确认 PCR 扩增产物。用天根公司的小量质粒抽提试剂盒抽提菌液中的重组质粒,双酶切,电泳,筛选出可能含有目的片段的阳性质粒,送测序。经测序验证的阳性质粒命名为 pcDNA-pp71,保存菌液于 -80  $^{\circ}$ C。

8. 细胞培养:使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 HFF。

9. 电穿孔转染:常规培养的 HFF 细胞密度接近 100% 时,于超净台中,倒弃培养基,PBS 洗两遍,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 min 后倾去消化液,加入正常培养基终止消化。轻柔吹下细胞,4  $^{\circ}$ C 低速离心后以适量培养基重悬细胞。细胞计数后调整细胞浓度,使每 265  $\mu$ l 的培养基中含有 (3 ~ 5)  $\times 10^6$  个细胞,大约等于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中 1/2 的细胞。在 0.4 cm 的电转杯中加入 265  $\mu$ l 的细胞,1  $\mu$ g 的 pcDNA-pp71 和适量的 BAC-HCMV 质粒。电转条件为:电压 260 V,电阻 75  $\Omega$ ,电容 960  $\mu$ F,电转时间在 24 ~ 40 ms 之间,完成后立即补加 900  $\mu$ l 的预冷培养

基。把细胞重悬在新鲜 DMEM 培养基中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 24 h 后更换培养基, 继续培养, 观察细胞病变效应 (cytopathy effect, CPE)。

10. 收集病毒液: 待 CPE 达 80% ~ 90% 时, 收集细胞上清即病毒液, 存于 -80 °C。

11. 病毒的培养: 将 HFF 进行常规传代, 在传代后 48 h 内细胞状态良好且单层贴壁时进行病毒接种: 弃培养基, PBS 缓冲液洗 3 次并尽量吸干残留的 PBS, 加入 15% ~ 20% 的病毒量, 然后补加新鲜培养基, 轻轻摇晃培养瓶, 让病毒液在细胞面均匀分布。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养 1 h, 每隔 15 min 轻轻摇晃细胞瓶, 使病毒充分吸附至细胞表面; 1 h 后, 倾去接种液, 加入新鲜的细胞培养基, 继续培养。待 85% 以上的细胞出现病变时, 用 2.5% 的胰酶对细胞进行消化后收集细胞, 在收集的细胞中加入含 10% 二甲基亚砜的细胞冻存液, -80 °C 保存。

12. 多重 PCR 鉴定病毒: 待 80% 以上细胞出现病变时, 取上清样本, 按照 OMEGA 公司 Viral DNA Kit 抽提 HCMV 基因组 DNA, 以 HCMV 基因组 DNA 为模板扩增 HCMV 的 LA 和 IE 基因。引物和反应条件同前。1% 琼脂糖凝胶中电泳确认扩增产物。

## 结 果

### 一、BAC-HCMV 质粒的鉴定

以 BAC-HCMV 质粒为模板, PCR 扩增基因 IE 和 LA, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1)。产物大小应为 209 bp 和 401 bp, 大小与预期一致, 实验室病毒株 HCMV AD169 作阳性对照, 空 BAC 质粒作阴性对照, 证明所抽提的质粒为 BAC-HCMV, 并通过紫外分光光度计检测其 OD<sub>260</sub>/280 值为 1.83, 符合细胞电转要求。

### 二、pcDNA-pp71 的构建

1. UL82 基因的扩增: 根据 NCBI 上公布的 HCMV Towne 株序列, UL82 基因全序列从 HCMV 基因组 118 417 bp 到 120 096 bp, 全长 1680 bp, 经 PCR 扩增以后, 显示的目的片段大小符合预期 (图 2)。

2. pcDNA-pp71 的酶切鉴定: 将构建的重组质粒 pcDNA-pp71 进行双酶切后电泳, 以 pcDNA-pp71 模板经 PCR 扩增后所得片段及 pcDNA3.1 (+) 空载体经 BamH I 单酶切片段为对照 (图 3)。结果表明 pcDNA-pp71 双酶切后所得片段大小与连接前两克隆片段一致, 证明 pcDNA-pp71 基本构建成功。送交上海英潍捷基生物技术有限公司测序后, 结果与 NCBI 上公布的 HCMV UL82 基因相吻合, 表明此克隆构建完成。

### 三、正常的与出现 CPE 的 HFF

生长正常的 HFF 细胞 (图 4) 密度达到 80% 左右

时, 把构建好的 pcDNA-pp71 与 BAC-HCMV 共同电转细胞, 隔 24 ~ 48 h 换一次液, 6 ~ 10 d 后便可观察到细胞出现病变 (图 5A), 主要表现为感染病毒的细胞会变大, 位于细胞中央的细胞核显著增大, 把细胞质往周围挤压。细胞核通常具有边缘清晰的染色质和显著核内包涵体, 核内包涵体周围有一圈光晕包围。在光镜下在核内可以见到聚集形成 "鹰眼" 样结构的包涵体 (图 5B)。因重组病毒基因组引入了绿色荧光蛋白表达基因, 病毒包装成功后在荧光显微镜见感染细胞发绿色荧光 (图 6B)。

### 四、病毒 HCMV Towne 的培养与鉴定

待 80% 以上细胞出现病变时, 取上清样本, 按照 OMEGA 公司 Viral DNA Kit 抽提 HCMV 基因组 DNA, 以 HCMV 基因组 DNA 为模板扩增 HCMV 的 LA 和 IE 基因, 扩增产物长度分别为 209 bp、401 bp (图 7), 以未感染 HCMV 的细胞 DNA 为阴性对照, 结果证明 HCMV 感染成功。

## 讨 论

BAC-HCMV 质粒的抽提质量和纯度是下一步细胞实验的关键, 因此抽提和纯化该质粒至关重要。BAC-HCMV 质粒是低拷贝的质粒, 通常需要一定量的氯霉素进行培养, 一方面, 氯霉素能抑制大肠杆菌培养中杂菌的产生; 另一方面, 氯霉素能抑制大肠杆菌中宿主蛋白的表达, BAC-HCMV 质粒是不依赖于宿主蛋白的松弛型质粒, 一定浓度的氯霉素 (12.5 μg/ml) 能促进该质粒的扩增, 但是加入过量的氯霉素菌体就不能正常生长繁殖, 将难以得到大量的 BAC-HCMV 质粒。对于 BAC-HCMV 质粒的抽提采用较温和的碱裂解法进行大量抽提, 但需要注意的是 BAC-HCMV 质粒是一个大于 230 kb 的超螺旋质粒, 极容易断裂, 所以在抽提过程中应尽可能保持在低温下, 轻柔的操作。MN 公司的 Plasmid DNA Purification 抽提试剂盒采用醋酸钾中和裂解液, 确保 BAC-HCMV 质粒恢复天然超螺旋结构。在细胞实验中, 一般要求纯度 OD<sub>260</sub>/280 > 1.8, 以达到转染细胞的要求。我们可以通过紫外分光光度计测量双链 DNA 在 OD<sub>260</sub> 时的光吸收值与 OD<sub>280</sub> 时的光吸收值, 两者的比值可作为质粒纯度的参考, 1.8 < OD<sub>260</sub>/280 < 1.9 范围时表明所测样品中 dsDNA 含量达 85% 以上。另外通过 PCR 鉴定可知道样品中是否含有 BAC-HCMV 质粒。

pcDNA3.1 (+) 质粒为真核细胞内蛋白瞬时表达的质粒, 它含有 HCMV 的启动子, 能在绝大多数哺乳动物细胞中稳定高效表达所需蛋白。pp71 是由 HCMV 的 UL82 基因 ORF 编码的早期蛋白, 为病毒的包膜蛋

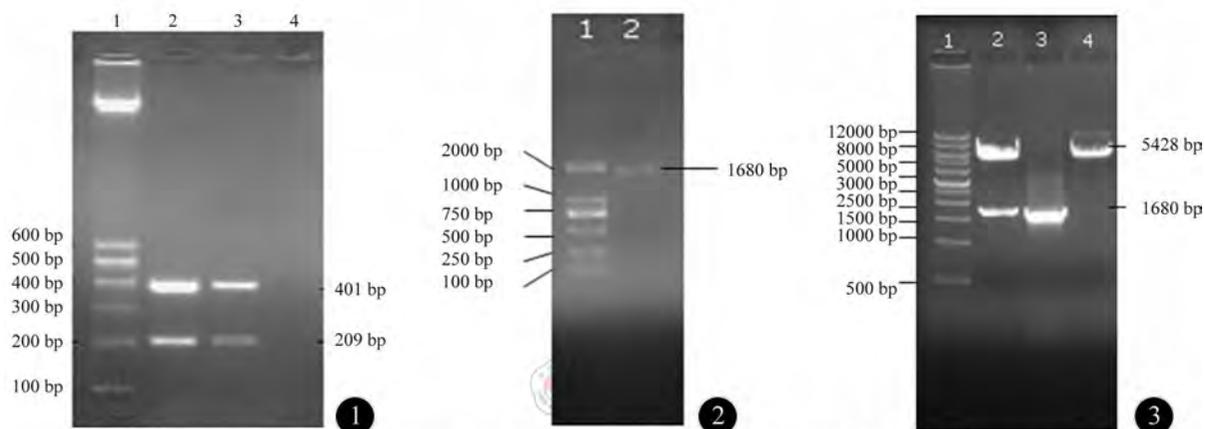


图1 BAC-HCMV质粒鉴定。1: DL1000 Marker; 2: HCMV AD169; 3: BAC-HCMV; 4: 空BAC质粒 图2 PCR扩增UL82基因。1: DL2000 Marker; 2: BAC-HCMV基因组扩增的UL82基因 图3 pcDNA-pp71酶切鉴定。1: DL12000 Marker; 2: pcDNA-pp71酶切; 3: UL82 PCR产物; 4: pcDNA3.1质粒

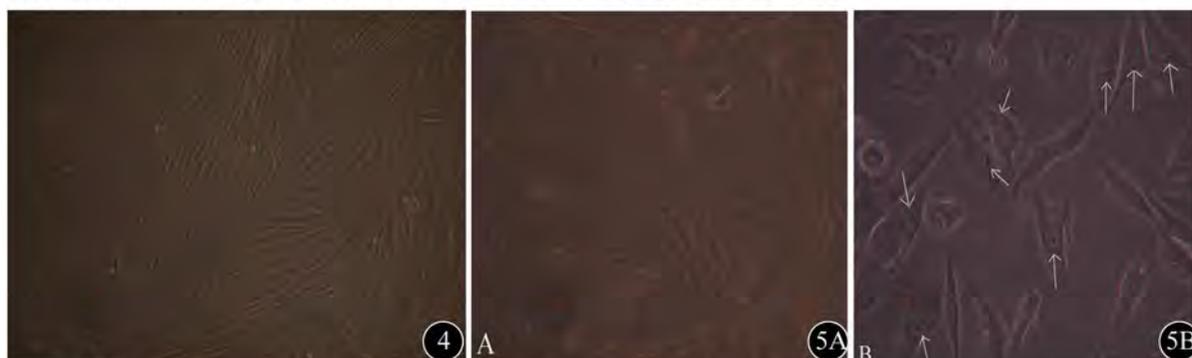


图4 正常生长状态的HFF细胞 (×200) 图5 5A: 出现病变的HFF细胞 (×200); 5B: 病变HFF细胞呈现“鹰眼”样 (×400)

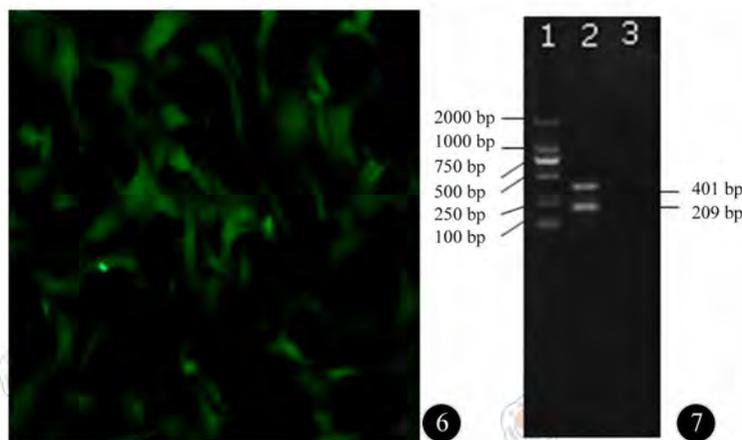


图6 荧光显微镜蓝光下病变的HFF细胞 (×200) 图7 HCMV-Towne病毒株培养后鉴定。1: DL2000 Marker; 2: 多重PCR鉴定培养的HCMV-Towne病毒株; 3: 未感染HCMV-Towne病毒株的细胞作阴性对照

白<sup>[5]</sup>。众研究表明,pp71蛋白可诱导静止的细胞进入细胞周期并使它们停在G1晚期,从而能够增加病毒繁殖,加快病毒在细胞内的传递<sup>[6-8]</sup>。单独用BAC-HCMV转染细胞,病毒组装非常缓慢,极难在短时间内观察到细胞的病变效应。本实验把pcDNA-pp71与抽提的BAC-HCMV共同转染入细胞中获得了重新组装的HCMV,证明pcDNA-pp71确实能有效地启动该病毒的复制。

电穿孔是功能强大的将核酸、蛋白及其他分子导入多种细胞的高效技术。通过高强度的电场作用,瞬时提高细胞膜的通透性,从而吸收周围介质中的外源分子。这种技术可以将核苷酸、DNA与RNA、蛋白、糖类、染料及病毒颗粒等导入原核和真核细胞内<sup>[9]</sup>。电穿孔法转染哺乳动物细胞受诸多因素的影响:(1)处于对数生长期的细胞对电击非常敏感,是最适于进行电转化的生长阶段。电转后细胞死亡率较高,但存活的

细胞中转化子的比例较高。(2)外源 DNA 浓度只能在一定的范围内才能获得最大转化率,外源 DNA 的浓度过高、过低均影响转化率。(3)电场强度。根据参考文献及本实验证实电压为 260 V,电容为 960  $\mu$ F,电阻为 75  $\Omega$ ,电击时间在 20~40 ms 时能有效地将质粒转进细胞并获得重组病毒。(4)温度。在整个过程中最好保持低温操作,这样可以提高转染效率<sup>[10]</sup>。

巨细胞病毒对宿主和组织培养均有严格的种属特异性,通常只使自身宿主或同属动物受感染,亦只有用其自身宿主的成纤维细胞才能进行培养。电转成功后,HCMV 的容许细胞 HFF 细胞可以出现典型的细胞病变,特点是细胞膨胀、核变大、形成巨大细胞,出现有折光性的细胞质颗粒和核内包涵体,常在感染后期出现。由于 BAC-Towne 病毒株在重组时插入绿色荧光蛋白(EGFP),在 pcDNA-pp71 与 BAC-HCMV 共转染到 HFF 细胞时,EGFP 在 HFF 细胞中表达,如受到蓝光照射就可发出绿色荧光(图 6B),同时通过荧光的观察可以评估电转效率的高低。从图 5A 我们可以看到电转 6 d 后细胞开始发生病变效应,我们取发生病变的细胞上清感染生长状态良好的 HFF 细胞,4 d 后 HFF 细胞从成纤维形状变胀、变圆。逐日观察感染病毒的细胞是否出现病变效应,连续 1~4 周。如细胞感染病毒后培养 4 周仍未出现病变效应,则盲传,如盲传三代仍未出现病变效应,则判为阴性。

由于 HCMV 在形态及基因结构上与其他疱疹病毒相似,出现病变效应也很难与其他疱疹病毒感染区别,不能从分子遗传上确证为 HCMV 感染 HFF 所致,需做进一步的鉴定。本研究进一步运用多重 PCR 鉴定 HCMV 病毒,选用 HCMV 的保守基因即刻早期基因(IE)和晚期基因(LA)作为 HCMV 遗传鉴定指标,其中 IE 基因是 HCMV 感染时最早被活化的基因和 HCMV 基因组复制的最重要启动子,其编码产物可与细胞 DNA 结合或与细胞调控因子作用调节宿主细胞基因表达和增生,可促进病毒早期及晚期基因的启动子与病毒 DNA 多聚酶 I 及 RNA 多聚酶 II 作用。LA 基因编码的产物是形成病毒结构蛋白的主要成分,在病毒的装配

和成熟中起主要作用。因此 IE 和 LA 是病毒复制所必需的基因。证实使用两对以上的引物进行 PCR 可以检测 100% 的 HCMV 毒株,普通 PCR 可能是因为靶基因片段发生变异导致假阴性产生,从而降低了 PCR 检测的可靠性<sup>[11]</sup>。

综上所述,本研究应用 BAC 技术体外快速繁殖 HCMV 成功,为 HCMV 的研究提供了更易获得的实验材料,也为进一步研究 HCMV 的分子机制奠定基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 王敏,毛建平.人巨细胞病毒检测技术.中国生物工程杂志,2007,2:103-107.
- [2] Wang B, Hu JJ, Yan CF, et al. Characterization of human cytomegalovirus UL145 and UL136 genes in low-passage clinical isolates from infected Chinese infants. *Med Sci Monit*, 2011, 17:CR423-431.
- [3] Tischer BK, Kaufer BB. Viral bacterial artificial chromosomes: generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:472537.
- [4] Paredes AM, Yu D. Human cytomegalovirus: bacterial artificial chromosome (BAC) cloning and genetic manipulation. *Curr Protoc Microbiol*, 2012.
- [5] Penkert RR, Kalejta RF. Nuclear localization of tegument-delivered pp71 in human cytomegalovirus-infected cells is facilitated by one or more factors present in terminally differentiated fibroblasts. *J Virol*, 2010, 84:9853-9863.
- [6] Hesse J, Reyda S, Tenzer S, et al. Human Cytomegalovirus pp71 Stimulates Major Histocompatibility Complex Class I Presentation of IE1-Derived Peptides at Immediate Early Times of Infection. *J Virol*, 2013, 87:5229-5238.
- [7] Tomtishen JP 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J*, 2012, 9:22.
- [8] Tavalai N, Kraiger M, Kaiser N, et al. Insertion of an EYFP-pp71 (UL82) coding sequence into the human cytomegalovirus genome results in a recombinant virus with enhanced viral growth. *J Virol*, 2008, 82:10543-10555.
- [9] Skořucka N, Sączko J, Kotulska M, et al. [ Electroporation and its application ]. *Pol Merkur Lekarski*, 2010, 28:501-504.
- [10] Hashemi A, Roohvand F, Ghahremani MH, et al. Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: comparative study. *Tsitol Genet*, 2012, 46:19-27.
- [11] Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek M, et al. Multiplex PCR for identification of herpes virus infections in adolescents. *J Med Virol*, 2011, 83:267-271.

(收稿日期:2013-03-15)

(本文编辑:戚红丹)