维普资讯 http://www.cqvip.com

病毒学杂志 2，1989
Virologica Sinica

肾综合征出血热病毒 T-E抗原的制备及其特性研究

唐家琪 李先富

（南京军区军事医学研究所，南京）

提 要

本试验建立了用Tween 80和乙醚处理HFRSV感染鼠脑、肺制备特异性抗原的方法，该抗原具有安全、稳定、特异性好、制备简单的特点，可能是HFRSV抗原的共同组分。

关键词：肾综合征出血热，T-E抗原

检测特异性抗体是对肾综合征出血热(HFRS)进行病原学研究、实验室诊断、流行病学调查的重要手段。检测抗体的关键是制备安全、稳定、特异的HFRSV抗原。目前报道的热灭活法[1]，蔗糖丙酮抽提法[2]，甲醛处理法[3]及盐水浸渍法[4]存在破坏抗原活性、对HFRSV颗粒灭活不彻底和处理后抗原活性不稳定等问题。抗原需低温保存，影响实验的重复性和普及推广。本试验建立了用Tween 80和乙醚处理鼠脑、肺制备HFRSV特异性抗原(T-E抗原)的方法，并对其特性进行初步研究。

材料和方法

一、HFRSV 陈株[5]：自安徽省医学科学研究所引进，在本所通过接种乳鼠脑内传代。

二、小白鼠乳鼠：昆明鼠种，本所动物房饲养。

三、Tween 80：上海红卫制药厂。

四、乙醚：南京化学试剂公司。

五、单克隆抗体(McAb)及其致敏绵羊红细胞：见参考文献[6]。

六、HFRSV R_2及R_{22}株免疫血清：本所免疫鼠及家兔制备。

七、T-E抗原的制备：

（一）以无菌EFRSV陈株脑内、皮内同时接种3日龄新生小白鼠乳鼠，100LD_{50}／只。

（二）待发病濒死前，取脑和肺，加适量1640培养基，用鼠脑研磨器进行充分地研磨，3000r／m离心20分钟，取上清。

（三）加入Tween 80塞紧后猛烈振荡。

（四）加入乙醚，塞紧后猛烈振荡。

（五）3000r/m离心20分钟，取水相充分排醚，加适量50% PBS甘油及叠氮钠（终浓度0.2‰），4℃或冰隔保存备用。

八、反向间接血凝试验（RPHA） 取待检抗原0.025ml于96孔V型板内，进行倍比稀释，每孔加入0.025ml McAb致敏绵羊红细胞，混匀后置37℃，1小时后判读结果。以50%红细胞被

维普资讯 http://www.cqvip.com

凝集孔最高稀释倍数的倒数定为终点滴度。以凝集 50%红细胞抗原量定为 1 个单位抗原。

结 果

一、Tween 80 工作浓度和作用时间的选择

向不同分装的感染鼠脑和肺悬液分别加入不同浓度的 Tween 80，作用不同时间后再用乙醚处理并用 RPHA 法测定所得 T-E 抗原效价，反复方阵滴定的结果表明，当 Tween 80 浓度为 0.25～0.5%，作用时间为 8～10分钟时，T-E 抗原效价最高，故选择 Tween 80的工作浓度为 0.5%，作用时间为 8 分钟。

二、乙醚工作浓度及其作用时间选择

对不同分装的感染鼠脑和肺悬液经 0.5% Tween 80 处理 8 分钟后，加入不同浓度的乙醚并作用不同时间，然后测定 T-E 抗原效价，反复方阵滴定结果表明，当乙醚工作浓度为 50%；作用 15 分钟时，所得 T-E 抗原效价最高，故选择乙醚的工作浓度为 50%，作用时间为 15 分钟。

三、T-E 抗原的特性

(一)抗原活性：经 10 次比较，T-E 处理前后 RPHA 滴度无变化，表明 T-E 处理抗原活性无损失。

(二)安全性：将 T-E 抗原用微型滤器过滤。取滤液分别以 10000、1000、100、10 单位抗原接种 4 组小白鼠，每组 4 只。观察 15 天无发病，拉颈处死，取肺、脑分别用间接免疫荧光试验(IFA)、RPHA 及酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HFRSV 相关抗原，经连续 3 次传代检测结果均为阴性。

以 T-E 抗原接种 Vero-E_6 细胞，盲传三代后用 IFA 检测没有发现HFRSV相关抗原。上述结果表明，T-E 抗原已不具有感染性。

(三)稳定性：将 T-E 抗原、没处理的感染鼠脑、肺悬液及蔗糖丙酮抽提的血凝素抗原分别置于不同温度条件，其滴度变化如表 1。T-E 抗原置于 8 ℃ 90天、15℃ 30天、30℃ 15天、56℃ 2 小时，滴度无变化，表明其稳定性良好。

表 1 三种抗原在不同条件下滴度的变化

Table 1 The activity changes of three kinds of antigens under different conditions

temperature	time	reduced rate(%)		
		T-E antigens	suspension of infected mouse brains	hemagglutinin
8℃	90days	0	100	75
15℃	30days	0	100	87.5
30℃	15days	0	100	75
56℃	2 hours	0	75	50

(四)特异性：将 T-E 抗原用于反向间接血凝抑制试验(RPHI)检测 HFRSV 总抗体、没有出现非特异性凝集和非特异性抑制；用于 ELISA 检测 HFRSV IgG、IgM 抗体没有

维普资讯 http://www.cqvip.com

非特异性反应：检测非HFRSV血清未出现假阳性结果[7]。

四、T-E抗原的反应谱

T-E抗原与广谱单克隆抗体B_{11}、F_3、H_7、H_{11}株[8]均可反应；与HFRSV陈株、R_2株、R_{11}株的免疫血清均可反应；与野鼠型患者血清及家鼠型患者血清均可反应，并且其抗体的几何平均滴度无统计学差异[7]。表明T-E抗原可能是HFRSV共同抗原组分。

讨　论

如何制备安全、稳定、特异性好、容易获得的HFRSV抗原是国内外尚未解决的问题。本试验用Tween 80、乙醚处理HFRSV感染鼠脑、肺，对这一课题进行探讨，确立了Tween 80和乙醚的工作浓度及作用时间。

HFRSV为有囊膜病毒，对脂溶剂乙醚很敏感。乙醚处理可将脂蛋白外壳切成碎片，使其丧失感染力，因此T-E抗原具有安全的特点。Tween 80是一种表面活性剂，它既能部分降解病毒颗粒脂蛋白外壳，又能保护脂蛋白外壳不被乙醚过度降解和变性。因此用Tween 80和乙醚联合处理可将处于动态降解过程中的HFRSV颗粒及表达在鼠脑细胞膜上的病毒成分切割成质地均一、大小一致的片段，保证抗原活性不受损失，使抗原处于相对稳定状态，故T-E抗原具有稳定的特点。T-E抗原制备简单，用于RPHI、ELISA中显示有良好的特异性。由于T-E抗原可以不用低温运输和贮存，将能够供基层实验室使用。

本试验结果还提示，T-E抗原可能是HFRSV的共同抗原组分，可用于野鼠型和家鼠型HFRSV毒株的抗体检测。至于T-E处理是否可用于疫苗，值得进一步探讨。

参 考 文 献

〔1〕徐志凯等，1987，中国免疫学杂志 3(1)：46，
〔2〕Yoshinobu Okuno et al.，1986，*J Gen Virol* 67：194，
〔3〕严玉良等，1985，安徽医学院学报，20(2)：1，
〔4〕陈作权等，1986，病毒学报，2(4)：386
〔5〕倪大石等，1983，中华医学杂志，63(2)：65，
〔6〕唐家琪等，1987，中华微生物学和免疫学杂志，7(3)：237，
〔7〕唐家琪等，1988，上海免疫学杂志，8(2)：57，

维普资讯 http://www.cqvip.com

Method for Preparation of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus (HFRSV) Antigens by Treatment Infected Mouse Brains and Lungs with Tween-ether

Tang Jia-qi et al
(*Military Medical Research Institute, Nanjing Command, Nanjing*)

We first utilized infected mouse brains and lungs to prepare HFRSV specific antigens by treatment with Tween 80-ether. This procedure was very economical and easy. The T-E antigens was a more sensitive, uniform reagent for the RPHI or ELISA and non-multiplication. It also showed an increased thermal stablity at different temperatures and could be stored for more than one year at and below 4℃ without loss of antigenic activity.

Key words: T-E Antigen, RFRSV