维普资讯 http://www.cqvip.com

流行性出血热病毒血凝素抗原位点分析*

王灵枢 倪大石 周宁
（安徽省医学科学研究所，合肥230061）

提 要

用八株不同来源的流行性出血热(EHF)病毒的单克隆抗体(McAb)，采用血凝抑制试验、反向间接血凝抑制试验、间接酶联免疫及阻断酶联免疫试验等，对两种方法(TE、SA)制备的血凝素抗原进行分析。根据A35、2A6 McAb试验的结果，证实血凝素抗原中的核蛋白上存在有非构象依赖性的血凝结合位点；而另外5株McAb在血凝抑制活性方面，虽具有明显的株间交叉，但在反向间接血凝抑制试验、间接酶联免疫试验时则均为阴性，故认为其血凝结合位点位于病毒的膜蛋白，可能与G_2糖蛋白有关，为构象依赖性位点。有关4G6 McAb，在阻断酶联免疫试验时，虽与A35、2A6一样具有较高的阻断率，但在反向间接血凝抑制试验、间接酶联免疫试验时明显有别于后二者，对其属性有待进一步确定。

关键词：流行性出血热病毒 单克隆抗体 血凝素 位点分析

1983年 Schmaljohn C. S. 首次报道汉坦病毒（Hantaan virus）具有大（L）、中(M)、小（S）三个基因片段，其3′末端的核苷酸序列基本相近，其中M、S基因片段分别编码病毒膜蛋白G_1、G_2和核蛋白（NP）三种结构蛋白，随后又进一步报道了M片段编码的膜蛋白的氨基酸序列中G_1、G_2的糖化位点[1-3]，这些糖化位点一般认为与病毒血凝活性位点有关，但未见有S片段编码的核蛋白中血凝活性位点的报道。1987年Arikawa等分别用6株抗G_1、19株抗G_2的单克隆抗体（McAb）对汉坦病毒中的4个血清型的代表株，进行了交叉血凝抑制试验（Cross Hemagglutination Inhibition Test）和交叉中和试验(Cross Neutralization Test)，发现抗G_1 McAb为株特异性的，而抗G_2 McAb则具有较多的株间交叉，但血凝抑制活性与中和活性并不完全一致[4]。已知我国研制的流行性出血热病毒（EHFV）的组特异性McAb中，A35是具有血凝抑制活性的抗病毒核蛋白的抗体，同时具有中和活性等特点[5-6]。EHFV的血凝素（HAN）虽具有较好的免疫原性，但在加热灭活或福尔马林灭活后，导致血凝活性丧失，免疫后的血清中血凝抑制抗体亦为阴性[7]，而EHF患者血清中该抗体为阳性，同时还存在抗50kd病毒核蛋白的抗体。因此进一步研究HAN中的抗原结合位点，不仅与诊断和疫苗研制有关，也涉及本病的发病机理，为此我们进行了这项研究，现将实验方法和结果报告如下。

本文于1988年6月23日收到。
*国家自然科学基金资助的课题。
本研究所用单克隆抗体承第四军医大学庄美先教授、南京军事医学研究所唐家琪大夫、湖北医学科学院病毒研究所林乔主任和中国预防医学科学院病毒学研究所陈伯权教授赠予，在此一并表示谢意。

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料与方法

一、EHFV 单克隆抗体（McAb）：

8株McAb中$1H_8$、B_9、$3D_8$、$3G_1$系用EHFV陈株免疫制备，$2A_8$、$4G_8$由J_{18}株免疫而得，A_{35}和R_{31} McAb分别由EHFV A_8株和R_{22}株免疫获得。上述8株McAb中除$1H_8$为本室制备外，其余McAb分别由南京军事医学研究所唐家琪大夫、第四军医大学汪美先教授、湖北医学科学院病毒研究所林乔主任和中国预防医学科学院病毒学研究所陈伯权教授赠予，具体来源及其球蛋白亚类的鉴定结果见表1。

表1 八株EHFV单克隆抗体的来源
Table 1 List of Monoclonal Antibodies

Immunity of strain	McAb	Subclass	Antibody Titer NT	IFA	References
Chen	$1H_8$	IgG_{2b}	—	16 10^4	余荣汉等，1988，安徽医学9：36
	B_9	IgG_{2b}	—	1280	唐家琪等，1988，中国免疫学杂志4：260
	$3D_8$	IgG_1	5120	1 10^4	汪力亚等，1988，四军医大学报9：20
	$3G_1$	IgG_1	40960	2 10^4	
J_{18}	$2A_8$	IgG_{2b}	—*	5120	林乔等（待发表）
	$4G_8$	IgG_{2b}	—*	320	
A_8	A_{35}	IgG_{2a}	128	4096	陈伯权等，1985，中华微生物学和免疫学杂志5：135
R_{22}	R_{31}	IgG_{2b}	—	320	

— *：<1：10 made in our laboratory.

二、血凝素（HAN）的制备及血凝抑制（HI）试验：

用适应于乳鼠的EHFV接种于3日龄乳小白鼠脑内，每只0.02毫升，待乳鼠发病垂死前解剖取脑，同一鼠脑沿脑中线分为二份，分别用蔗糖-丙酮法（SA）和吐温-乙醚法（TE）制作HAN抗原（血凝滴度SA 1：64；TE 1：128），置-70℃冰箱备用。血凝抑制试验时所用McAb均经丙酮处理后再用鹅血球吸收备用。有关HAN的制备、效价滴定及HI试验方法参阅文献[8]。

三、反向间接血凝抑制（RPHI）试验：

RPHI试验所用致敏血球为A_{35} McAb致敏人"O"型红血球冻干制剂（制品批号为8801），并用所附稀释液稀释，但所用的病毒抗原则为应用SA、TE法制备的病毒HAN（反向间接血凝滴度为SA 1：32；TE 1：4），具体操作方法按制剂使用说明进行。

四、间接酶联免疫（Indirect ELISA）和阻断酶联免疫（Blocking ELISA）试验：

间接酶联免疫试验基本参照文献[8]进行。阻断酶联免疫试验参阅文献[9]稍加改进；先用方阵法滴定包被抗体（27株McAb的混合液）和两种方法制备的HAN及酶标记抗体（HRP-A_{35}McAb）的最适浓度后进行。即先用混合McAb包被40孔聚苯乙烯板，室温过夜，用洗涤液洗三次后甩干，加入抗原-待检McAb复合物（复合物已于37℃预热30分钟），37℃孵育2小时，洗涤三次、甩干，再加酶标记抗体，经37℃ 2小时，洗涤五次，最后加底物（OPD）显色，用2mol/L H_2SO_4终止反应，用DG-3021型酶标仪检测OD值。每一待检McAb均作平行试验，并设正常腹水、正常抗原对照，计算阻断率。

$$阻断率=\frac{正常腹水OD值-待检McAb\text{-}Ag\ OD值-正常抗原OD值}{正常腹水OD值-正常抗原OD值}\times 100\%$$

维普资讯 http://www.cqvip.com

以A_{35} McAb的阻断率为100%，再分别计算各McAb的阻断率，据阻断率的高低来判断同源性程度。

结 果

八株不同来源的具有血凝抑制活性的 McAb，在 HI 试验中显示其抑制活性并不一致，但可看出在用TE法HAN测定时，有 5 株 McAb（B_9、$2A_6$、$4G_6$、A_{35}、R_{31}）的效价明显高于用SA法HAN测定的结果；而在RPHI试验时，仅有$2A_6$、A_{35}两株 McAb 具有抑制能力，但$2A_6$对 SA 法 HAN 抑制能力明显高于TE法HAN，在间接酶联免疫试验时，也仅$2A_6$、A_{35} McAb显示阳性，见表 2。

表 2 两种血凝素抗原、三种检测方法的比较

Table 2 Comparison between TE and SA HAN for detection of HI、RPHI、ELISA

McAb	HI		RPHI		ELISA	
	TE	SA	TE	SA	TE	SA
$1H_8$	5120	10240	—	—	—	—
B_9	2560	640	—	—	—	—
$3D_8$	20480	20480	—	—	—	—
$3G_1$	10240	5120	—	—	—	—
$2A_6$	640	20	160	2560	20480	20480
$4G_6$	640	160	—	—	—	—
A_{35}	640	40	1280	1380	5120	5120
R_{31}	840	—	—	—	—	—

Note: "—" < 1 : 10

八株McAb与TE法制备的 4 株HAN进行交叉HI和交叉RPHI试验。在交叉HI试验中，除陈株病毒免疫获得的 4 株McAb效价均明显高于异源株外，J_{10}、A_9、R_{22}三株病毒免疫获得的McAb并未显示上述特点。在交叉RPHI试验时，A_{35}对 4 株HAN均为阳性，$2A_6$对 Chen -HAN、J_{10}-HAN 亦为阳性，见表 3。

表 3 八株EHFV单克隆抗体的交叉HI、RPHI结果

Table 3 Cross Reactivity of HI、RPHI Test

Strain	McAb	Chen-HAN		J_{10}-HAN		A_9-HAN		R_{22}-HAN	
		HI	RPHI	HI	RPHI	HI	RPHI	HI	RPHI
Chen	$1H_8$	5120	—	20	—	40	—	320	—
	B_9	2560	—	80	—	160	—	40	—
	$3D_8$	20480	—	5120	—	1120	—	2560	—
	$3G_1$	10240	—	640	—	320	—	80	—
J_{10}	$2A_6$	640	160	80	20	20	—	40	—
	$4G_6$	640	—	40	—	80	—	40	—
A_9	A_{35}	640	5120	320	640	80	5120	80	1280
R_{22}	R_{31}	640	—	320	—	—	—	10	—

Note: "—" < 1 : 10

维普资讯 http://www.cqvip.com

阻断酶联免疫试验的结果，以A_{35} McAb的阻断率为100%计，根据阻断率的高低排列则为：$2A_6$、$4G_6$、R_{31}、B_9、$3D_8$、$1H_8$、$3G_1$；在用两种制备方法的HAN比较时，除R_{31} McAb外，均无明显差别，见图1。

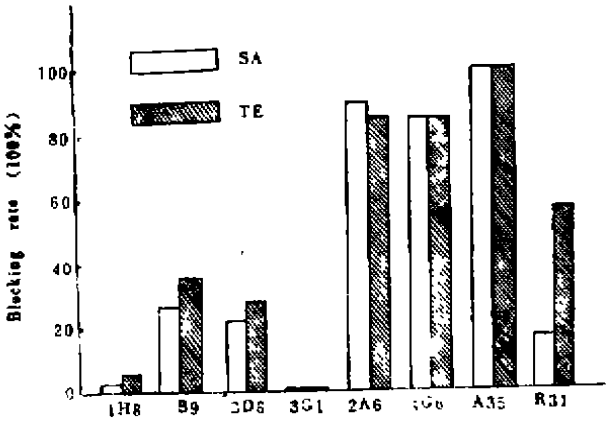

图1 ELISA阻断试验结果
Fig 1 Results of Blocking-ELISA

讨 论

根据我们工作中的体会，用SA法制备血凝素时，常有残余活毒存在，Okuno.Y.等报道用细胞培养物制备的血凝素，经电镜检查发现其中仍为完整的病毒颗粒[8]；用TE法制备血凝素，除乙醚可以灭活EHFV外，其中的吐温-80亦具有裂解病毒蛋白的性能。因此TE法制备HAN可以提高血凝效价，可能与病毒裂解后血凝活性结合位点充分暴露有关；而HI试验中McAb效价的提高，则可能取决于所识别的位点。RPHI与间接酶联免疫试验的结果明确提示：$2A_6$、A_{35} McAb所识别的抗原位点相近似，可能为非构象依赖性血凝结合位点。A_{35}McAb是已知的具有血凝抑制活性及中和活性的抗核蛋白抗体[6]，而本实验证实$2A_6$无中和活性，其血凝位点及中和位点很可能不重叠或靠近。

阻断酶联试验是进行位点分析的重要方法之一，根据实验结果，$4G_6$与A_{35}、$2A_6$ McAb具有相近的阻断率，但在RPHI、间接酶联免疫试验时明显有别于后二者，因此对其特性尚需进一步研究。此外根据$1H_8$、B_9、$3D_8$、$3G_1$、R_{31} 5株McAb均具有血凝抑制活性及毒株间的交叉、在RPHI及间接酶联免疫试验时对两种方法制备的抗原均为阴性，阻断酶联免疫试验时的低阻断率等特点，我们认为其血凝结合位点位于膜蛋白（G_2），为构象依赖性位点。

以上试验的结果说明：不论用TE法或SA法制备的HAN中，均存在有来自病毒膜蛋白和核蛋白的血凝活性组分，而两种组分在不同毒株中的比例亦并不完全一致，可能与毒株的毒力和免疫原性有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 Schmaljohn C.S.et al., 1978, *J Infect Dis* 137 : 298.
〔2〕 Schmaljohn C.S.et al., 1985, *Science* 227 : 1041.
〔3〕 Schmaljohn C.S.et al., 1987, *Virology* 157 : 31.
〔4〕 Arikawa & Schmaljohn C.S., 1987, 29th International Colloquium 10—11 Dec, Antiwerpen Belgium
〔5〕 陈伯权等, 1987, 病毒学报, 3(3) : 298.
〔6〕 Ni D.S.et al., 1988, Proceedings of International Symposium on HFRS, Hubei, P.138.
〔7〕 倪大石等, 1986, 中华医学会病毒学会第一届学术会议论文汇编P.53.
〔8〕 Okuno.Y.et al., 1985, *J.Gen Virol* 67 : 149.
〔9〕 J.Green. et al., 1989. *J.Virol Meth* 23 : 195.

Epitope Analysis of Hemagglutinin Antigen with EHF Virus

Wang Liug-shu Ni Da-shi Zhou Ning

(Anhui Institute of Medical Sciences, Hefei ,230061)

Eight monoclonal antibodies (Mc Abs) from various epidemic hemorrhagic fever (EHF) virus have been used for analyzing the epitopes of SA and TE hemagglutinin antigens by hemagglutination inhibition (HI), reversed passive hemmagglutination inhibition (RPHI), indirect ELISA and blocking ELISA. It was demonstrated that there were conformation independing hemagglutination binding epitopes in nucleocapsid protein by A_{35}、$2A_6$ McAb. Although other five strains of McAbs possessed obvious crosses in the activity of hemagglutinative inhibition, they were negative in RPHI, ELISA. So it is possible for their hemagglutination binding epitopes to localize in membrane protein of virus and to relate with glycoprotein G_2, conformation depending epitopes. Another McAb, $4G_6$ was similar to A_{35}、$2A_6$ that had higher blocking rate, but evidently it differed from the latter in RPHI, ELISA. Its properties will be studied further.

Key words: *Epidemic hemorrhagic fever virus Monoclonal antibody* Hemagglutinin Epitope analysis