

汉坦病毒结构蛋白的鉴定及其应用

陈立礼 秦光明 柯红 郑国英

(四川省卫生防疫站病毒科, 成都610031)

提 要

对差速离心纯化的汉坦病毒R84-1毒株进行了SDS-PAGE和免疫印迹试验。发现有67k和43k两条蛋白区带能与汉坦病毒抗体起反应。经单克隆抗体鉴定, 67k多肽可能属病毒囊膜蛋白, 43k多肽未定。用免疫印迹法对出血热患者进行检测, 初步证明野鼠型感染者具有上述两种蛋白抗原的抗体, 大鼠型患者仅具有67k蛋白的抗体, 这对出血热患者血清学分型有重要意义。

关键词: 汉坦病毒 结构蛋白 免疫印迹 血清学分型

自1976年分离出朝鲜出血热(KHF)病毒以来^[1], 肾综合征出血热(HFRS)病毒的研究取得了很大进展。经病毒形态、化学组成及理化性状的研究^[2-4], 已确认其属于布尼亚病毒科的一个新成员, 称汉坦病毒属^[5]。根据血清学研究, 该病毒在我国有两个血清型, 即姬鼠型和大鼠型^[7]。对本病毒结构蛋白的研究, 近年来有不少报道^[8-11], 但结果不尽相同, 应用病毒结构蛋白分析进行病毒感染的型别诊断则尚未见报道。本文采用超离心法从感染的非洲绿猴肾CV₁细胞培养液中提纯汉坦病毒, 用SDS-PAGE法分析出分子量为67k和43k两种病毒结构蛋白, 用免疫印迹法(Western blot)鉴定了这两种蛋白的抗原性, 发现这两种结构蛋白对HFRS感染的血清型别诊断有实用价值。现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

一、病毒: 汉坦病毒R84-1株为本实验室由黄胸鼠分离, 经血清学鉴定及采用单克隆抗体(McAb)抗原分析, 证实属姬鼠型毒株, 抗原性与汉坦病毒76-118株基本一致^[12]。

二、血清及McAb: 抗汉坦病毒R84-1株家兔免疫血清由本室制备, McAb A₁₀、A₂₀、A₃₀、R₃₁和R₉₀由陈伯权大夫惠赠, 其中A₂₀属姬鼠型特异性, R₃₁和R₉₀属大鼠型特异性。A₁₀和A₃₀属组特异性^[13]。McAb H₂、H₁₇、H₁₈、H₂₁、H₂₇及H₃₄由本室制备, 其中H₂、H₁₇和H₃₄具有血凝抑制活性, H₁₇及H₃₄属中和性McAb, H₁₈、H₂₇及H₃₄为膜抗原(MA)荧光染色阳性^[14]。

HFRS患者血清分别采自四川疫区及山西疫区, 由顾先仕大夫及米尔英大夫惠赠。

三、酶结合物及汉坦病毒血凝素: 采用上海生物制品研究所生产的SPA纯蛋白由本室按改良过碘酸钠法^[15]制备SPA-HRp结合物。汉坦病毒姬鼠型(A)及大鼠型(R)血凝素购自中国预防医学科学院流行病学研究所。

本文于1988年9月20日收到

四、汉坦病毒的培养及纯化:将稀释的新鲜病毒悬液接种于非洲绿猴肾CV₁细胞内培养。于35℃培养6—8天收集培养液, 10000r/m离心30分钟澄清。上清用RP65T转头30000r/m离心8小时, 沉淀用TNE缓冲液悬浮, 超声波打散, 病毒样品冻存于-70℃备用。

五、SDS-PAGE,采用LKB多用电泳仪, 按Laemmli方法^[16], 但稍有改变, 分离胶用12.5%浓缩胶用3%, 1.2mm×14cm×15cm凝胶块用恒电流12mA, 电泳16小时, 待溴酚兰指示剂到达凝胶底部时, 取出凝胶, 用甲醇醋酸液固定和考马斯亮兰染色, 以Sigma标准蛋白(MW-ND-500)确定分离蛋白的分子量。

六、免疫印迹(WIB):

1. 电转移: 基本按Towbin方法进行^[17], 750mA恒电流转移2小时, 转移后凝胶经考马斯亮兰染色, 证实转移完全。

2. 免疫酶染色: 将转移后的硝酸纤维膜(NC)切成0.5cm宽小条, 用含有2%牛血清白蛋白(BSA)的PBS-T(0.02mol/L, pH7.4PBS+0.2%TritonX-100)在4℃封闭过夜。晾干后用1:5⁰-1:100稀释的免疫血清或待检血清在37℃震荡孵育1小时, 用PBS-T冲洗3次以后以1:200稀释的SPA-HRP于37℃孵育1小时, 再以PBS-T洗5次, 最后加0.04%3,3'-二氨基联苯胺底物显色, 蒸馏水冲洗终止反应。

结 果

一、样品纯化及SDS-PAGE

病毒悬液经超离心浓缩后, ELISA滴度可达1:1280—1:2560。浓缩样品经SPS-PAGE_E呈现约10条区带。经蛋白印迹实验证实, 其中只有两条带可与汉坦病毒抗体起反应。这两条带与标准蛋白比较, 一条分子量为67000道尔顿, 另一条为43000道尔顿(见图1)。薄层扫描测定表明, 67k蛋白量约4倍于43k蛋白(结果未列出)。

二、病毒结构蛋白的鉴定

用HFRS患者血清、抗汉坦病毒家兔免疫血清及汉坦病毒McAb与电转移后NC条作免疫酶染色, 结果见表1、2及图2。表1结果指出, 67k及43k两条蛋白区带对汉坦病毒家

表1 汉坦病毒结构蛋白特异性鉴定

Tab 1 Identification of Specificity of Hantavirus Structure Proteins

Serum	Western blot	
	67k	43k
抗汉坦病毒兔免疫血清	+	+
HFRS患者血清		
A622(野鼠感染者)	+	+
A705B(同上)	+	+
R5050(家鼠型感染者)	+	-
R5006(同上)	+	-
乙脑患者血清	-	-
乙肝患者血清	-	-
正常人血清	-	-
正常兔血清	-	-

兔免疫血清及 HFRS 患者阳性血清有特异性反应, 与其他患者血清、正常人血清和正常兔血清无反应, 证实该两条区带为汉坦病毒特异性蛋白抗原。注意到 A622 及 A505B 两份姬鼠型病毒感染患者血清同时对两条蛋白抗原带起反应, 而 R5050 及 R5006 大鼠型感染者血清仅对 67k 蛋白抗原起反应, 初步显示大鼠型感染者缺乏 43k 蛋白抗原的抗体。

McAb 分析结果表明, A₂₀、A₁₉ 及 A₃₅ 对两条蛋白带均有反应, R₃₁ 及 R₉₀ 两株大鼠型特异性 McAb, 仅前者对 67k 蛋白起反应, 6 株 H-McAb, 多数对 67k 蛋白有反应, 仅 H₁₇ 呈双反应性。

表 2 汉坦病毒结构蛋白的抗原性分析

Tab 2 Antigenic Analysis of Hantavirus Structure Proteins
by Monoclonal Antibodies

McAb	Western blot	
	67k	43k
A20	+	+
A19	+	+
A35	+	+
R31	+	-
R90	-	-
H2	-	-
H17	+	-
H18	+	-
H21	-	-
H27	+	+
H34	+	-
正常 Balb/c 鼠血清	-	-

表 3 用不同方法测定 HFRS 患者血清抗汉坦病毒抗体

Tab 3 Detection of Anti-Hantavirus Serum Antibodies by Different Methods

Code of serum	Day after Onset of illness	Endemic area	WIB	Results		
				HI		IFA
				(A)	(R)	
622c	19	四川	67k, 43k	1 : 160	1 : 40	1 : 1280
85011c	25	四川	67k, 43k	1 : 20	<1 : 10	1 : 640
505B	24	四川	67k, 43k	1 : 10	<1 : 10	1 : 1280
8879c	15	四川	67k, 43k	1 : 160	1 : 20	1 : 1280
194c	15	四川	67k, 43k	1 : 80	1 : 10	1 : 640
88334c	17	四川	67k, 43k	1 : 160	1 : 20	1 : 320
5056	6	山西	67k, -	<1 : 10	1 : 40	1 : 1280
503D	22	山西	67k, -	<1 : 10	1 : 20	1 : 1280
5044	28	山西	67k, -	<1 : 10	1 : 40	1 : 1280
5047	6	山西	67k, -	1 : 40	1 : 640	1 : 320
5061	8	山西	67k, -	1 : 10	1 : 80	1 : 1280
5025	4	山西	67k, -	<1 : 10	<1 : 10	1 : 320

(A) : 黑线姬鼠血凝素

(R) : 大鼠血凝素

三、汉坦病毒结构蛋白与患者血清的反应性

为了进一步证实67k及43k蛋白抗原与不同血清型HFRS患者血清反应的差异性,采用山西及四川疫区大鼠型及姬鼠型患者血清与NC抗原条作免疫印迹实验,部分结果列于表3。结果表明,两种结构蛋白抗原对两型HFRS患者确有不同的免疫反应性。

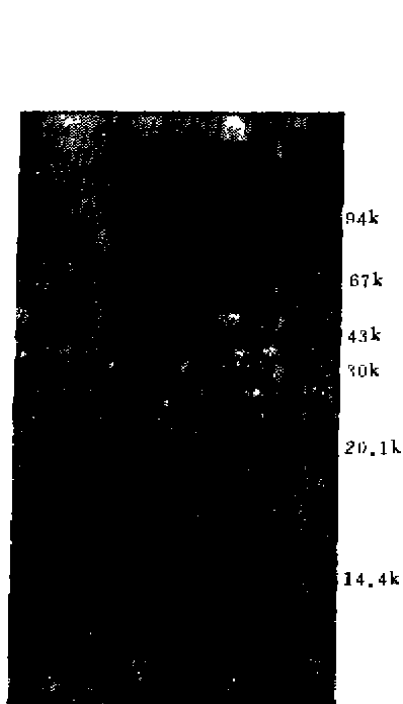


图1 汉坦病毒(a与b)及标准蛋白(c)的SDS-PAGE
Fig 1 SDS-PAGE of Standard Proteins(c)
and Partially Purified Hantavirus

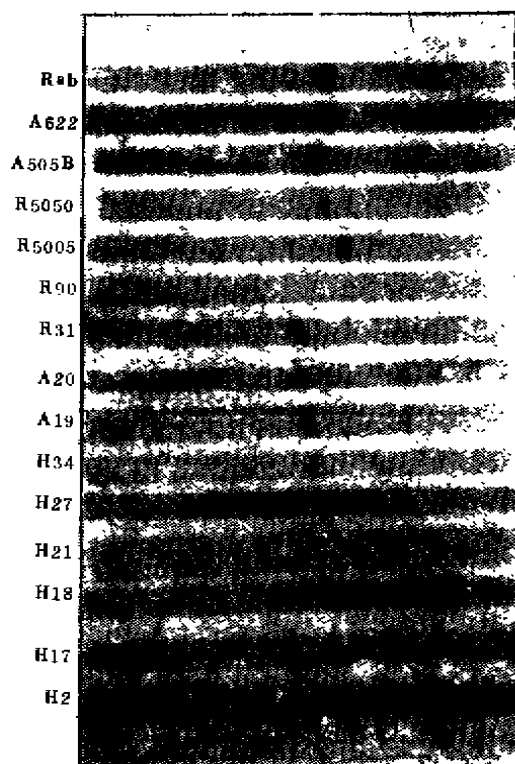


图2 汉坦病毒结构蛋白免疫印迹
Fig 2 Western Blot of Hantavirus
Structure Proteins

讨 论

病毒样品经SDS-PAGE分析和免疫印迹实验,发现有67k和43k两条病毒特异性蛋白区带。经McAb分析,67k蛋白能与具有中和活性、血凝抑制活性和膜抗原荧光染色阳性的McAb起反应,表明该蛋白可能为病毒囊膜蛋白。43k蛋白抗原对一些具有血凝抑制活性和中和性的McAb不起反应,但对具有MA染色阳性特征的H₂有弱反应性。43k蛋白究竟属病毒外膜蛋白或核蛋白尚需进一步证实。

用我们制备的NC抗原条检测HFRS患者血清,结果表明大鼠型感染者缺乏43k蛋白抗原的抗体,这对HFRS患者血清学分型有重要价值。与血凝抑制试验相比较,本法用于血清分型似更准确可靠,而且能测出早期的抗体。

关于汉坦病毒结构蛋白的研究,文献报道颇有出入^[8-10,18],造成差异的原因可能

是由于所采用的病毒材料和实验方法不同所致。关于机体对各抗原组分的反应性,郝连杰等也曾有过研究报道^[10]。这方面的深入研究将对HFRS的血清学诊断和疫苗制备有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Lee HW et al., 1978, *J Infect Dis*, 137: 298.
- [2] Hung T et al., 1983, *Arch of Virol*, 78: 137-144.
- [3] McCormick J B et al., 1982, *Lancet*, 1: 765.
- [4] Schmaljohn CS et al., 1983, *Virology*, 131: 482.
- [5] Schmaljohn CS et al., 1985, *Science*, 227: 1041.
- [6] 宋干等, 1983, *中华微生物学和免疫学杂志*, 3: 76.
- [7] 宋干等, 1982, *微生物学报*, 22(4): 373-377.
- [8] Elliott LH et al., 1984, *J Gen Virol*, 65: 1285-1293.
- [9] Franko MC et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4149.
- [10] 徐志凯等, 1988, *病毒学杂志*, 2: 124-129.
- [11] Yamanishi K et al., 1984, *J Virol*, 52: 231.
- [12] 陈立礼等, 1986, *病毒学杂志*, 1(4): 18-24.
- [13] 陈伯权等, 1985, *中华微生物学和免疫学杂志*, 5(3): 136-138.
- [14] 陈立礼等, 1988, *预防医学情报杂志*, 4: 152.
- [15] Wilson MB, Nakase PK., 1983, *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Holland, Elsevier, 215-224.
- [16] Laemmli UK et al., 1970, *Nature*, 227: 680-685.
- [17] Towbin R et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9): 4350-4354.
- [18] 郝连杰等, 1986, *同济医科大学学报*, 6: 381.
- [19] 郝连杰等, 1987, *中华传染病杂志*, 5(2): 65-67.

Identification and Application of Hantavirus Structure Proteins

Chen Li-li Qin Guang-ming Ke Hong Zheng Guo-ying

(Health and Anti-Epidemic Center of Sichuan Province, Chengdu 610031)

SDS-PAGE and immunoblotting test of Hantavirus (HTV) R84-1 strain purified by differential centrifugation were carried out. Two structure proteins of HTV-R841 strain with MW 67k and 43k were identified respectively. It was identified by McAb analysis test that the 67k polypeptide is a viral envelope protein and the 43k polypeptide was uncertain. By western blot, antibodies to the 67k and 43k protein antigens were found in sera from patients with Apodemus type HFRS and the 67k protein antibody were in the patients with Rattus type only. The results will be useful for serological typing to HFRS.

Key Words, Hantavirus Structure protein Immunoblotting Serological typing