维普资讯 http://www.cqvip.com

⑤314－321

第14卷第4期 中国病毒学 Vol.14 No.4
1999年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1999

汉坦病毒核壳蛋白重组抗原的制备和基因分型的研究*

R692.046.5

唐家琪 操敏 王长军 雷万里 魏春宝 叶春燕 R392-33

（南京军区军事医学研究所，南京 210002）

摘 要 根据HFRSV汉滩型(HTN)代表株76-118和汉城型(SEO)代表株R22基因资料，设计了两组引物，用电脑软件分析证明设计符合引物标准。以一组引物克隆全长S基因片段和N端的部分S基因片段，并使它们在T7系统进行融合表达和非融合表达。非融合表达产量虽不及融合表达高，但生物活性好。以非融合表达的两个S基因片段产物作间接ELISA的包被抗原，其工作浓度均达1:10 000。用另一组引物建立了逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)，检测我国不同地区由8种主要宿主分离的37个HFRSV毒株，2个阳性标准对照毒株和5个阴性对照标本，并与cELISA法比较，二者阳性检出率分别为100%和84.6%，符合率为84.6%，但前者比后者敏感性高15.4%。对其中20个毒株的PCR扩增产物先后用RsaⅠ和HindⅢ作二级酶切，建立了逆转录-聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(RT-PCR-RFLP)分型法。被定为HTN型的9株，SEO型的8株，余3株未能定型。此20个毒株曾用血清学方法分型，仅11株分型成功，与RT-PCR-RFLP法结果符合。分型成功率RT-PCR-RFLP法比血清法高30%。

关键词 肾综合征出血热病毒，基因分型，重组抗原，逆转录-聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(RT-PCR-RFLP) HFRSV、RT-PCR、RT-PCR-RFLP

肾综合征出血热病毒(HFRSV)是布尼亚病毒科汉坦病毒属成员。目前已知该属至少可分为8个血清型，且其各型间均有交叉反应。其中的汉滩型(HTNV)与汉城型(SEOV)在我国野生动物中广泛分布和传播，并引起病死率较高的肾综合征出血热(HFRS)，因此倍受重视[1]。HFRSV抗原检测、分型和流行病学目前还存在许多亟待解决的问题：现行的抗原检测法敏感性、简便性、特异性尚不理想，且无安全性好的优质抗原；分型方法不仅操作繁琐、费时，且对不少毒株不能准确分型；流行病学上对各型别的地理分布还不很清楚。有鉴于此，本研究研制了HFRSV的核壳工作抗原，建立了RT-PCR检测方法和RT-PCR-RFLP分型方法。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌种 含HFRSV 76-118株S基因片段cDNA的质粒由中国预防医学科学院病毒所杭长寿研究员惠赠；表达质粒pTSAPA[2]由美国Cantor教授惠赠；质粒pEt-28a[3]，菌株*E. coli* BL-21(DE3)系本室保存。

1.2 引物的设计与合成 根据报道的HFRSV 76-118株S片段cDNA序列，设计第一组引物：引物1 5′-ATG CAT GCG GCC GCT ACC ATG GCA ACT ATG GAG G-3′，与S片段cDNA34-52序列相同，含NcoⅠ位点；引物2 5′-GAT CGT CGA CTT AGA TCT AGA GTT TCA AAG GCT C-3′，与S片段cDNA 1324-1308序列互

收稿日期：1998－08－10，修回日期：1999－01－11
* 本研究为国家自然科学基金课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

补,含 Sal Ⅰ 酶切位点;引物 3 5′-T TGT CGA CTC TTC TGC CTT CAT GCT-3′,与 S 片段 cDNA 595-612 序列互补,含 Sal Ⅰ 酶切位点。根据 HTNV 76-118 株及 SEOV R22 株 M 片段 cDNA 序列,选取同源性较高的 G1 区设计第二组引物:引物 4 5′-GCA TCA GTG AAG CCT TTT C-3′,与两型病毒 cDNA 1199-1218 序列相同;引物 5 5′-GCA GAT GTG CCC AAC CAT G-3′,与两型病毒 cDNA 1497-1478 序列互补。上述引物设计经军事医学科学院王槐春设计的 PCRDESN 软件进一步分析,证明符合条件,由中国科学院上海植物生理研究所合成。

1.3 试剂 限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 GIBCO BRL 公司,PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司。逆转录酶试剂盒为美国 Promega 公司产品。标准 DNA 和标准蛋白 Marker 及其他常规试剂均购自华美生物工程公司。

1.4 毒株 汉滩型标准株76-118、汉城型标准株 R22 由中国预防医学科学院病毒所杭长寿教授惠赠,本所 Vero-E6 细胞传代或鼠脑传代作为阳性对照;待检毒株:鲁胎(山东 病胎儿)、A537(福建 黑线姬鼠)、B5(浙江 病人血)、S35(上海 病人血)、A3(浙江 黑线姬鼠)、HR54(河南 褐家鼠)、H14(陕西 病人血)、鲁姚(山东 病人血)、R2(安徽、褐家鼠)、H3(湖北 病人血)、鲁徐(山东 病人血)、H5(安徽、黑龙江 病人血)、A96(安徽 黑线姬鼠)、C4(安徽 家猫)、R27(河南 褐家鼠)、R(安徽 大白鼠)、A216(四川 黑线姬鼠)、LR1(甘肃 病人血)、Hubei(湖北 病人血)、A1018(湖北 黑线姬鼠)、L99(江西 黄毛鼠)、R178(福建 褐家鼠)、A16(陕西 黑线姬鼠)、R36(云南 褐家鼠)、R30(云南 褐家鼠)、C10(安徽 家猫)、B11(安徽 病人血)、S 45(上海 病人血)、A59(云南 高山姬鼠)、Rr(安徽 大白鼠)、Hu(山东 病人尿)、B9(安徽 病人血)、B78(山东 病人血)、E142(云南 滇绒鼠)、J10(辽宁 褐家鼠)、陈株(Chen)、A9 共计 37 株由安徽省医学科学研究所倪大石教授惠赠,本所鼠脑传代保存;以未感染 HFRSV 的正常 BALB/c 小鼠鼠脑标本 3 份和正常 Vero-E6 细胞标本 2 份,共 5 份为阴性对照。

1.5 血清和单克隆抗体 HFRS 患者血清 6 份由江苏省卫生防疫站惠赠,阴性对照血清 3 份采自非 HFRS 疫区的健康献血员。抗核壳蛋白单克隆抗体 H5 由第四军医大学徐志凯教授惠赠。

1.6 重组质粒的构建 用引物1和引物2扩增出 S 基因全长编码区片段,约 1.3 kb;用引物 1 和引物 3 扩增出 S 基因部分编码区片段,约 600 bp;分别用限制性内切酶 Nco Ⅰ、Sal Ⅰ 酶切上述扩增的核苷酸片段和质粒载体 pTSAPA 及 pEt-28a,以低熔点琼脂糖电泳回收目的片段,然后进行连接反应。用连接产物转化感受态宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),挑取转化菌,提取质粒,用酶切法和 PCR 扩增法鉴定重组质粒。

1.7 目的基因的诱导表达及表达产物的初步纯化 加 IPTG 分别诱导 1.5、3、4 h 后收集菌体,加裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)、苯甲磺酰氟和溶菌酶,搅拌 20 min,加去氧胆酸、DNase Ⅰ,离心收集沉淀。用 0.5% TritonX-100 和 10 mmol/L EDTA (pH8.0)洗涤、离心,收集沉淀后重新悬浮于适量水中。

1.8 表达产物的鉴定 SDS-PAGE 电泳分析、Western-blot、间接 ELISA 法均按常规方法进行[4,5]。

1.9 RNA 的提取 按 Piotr[6]等的异硫氰酸胍一步法。

1.10 RT-PCR 从 HTNV 76-118 株感染的 Veroc-E6 细胞提取总 RNA 作为模板,RT-PCR 反应条件经优化后确定如下:5×逆转录缓冲液 4 μL,Rnasin 5 μL,10 mmol/L dNTPs 4 μL,引物 Oligo dT 1 μL,AMV RTase 5 u,RNA 模板 1 μL,加灭菌 DEPC 水至 20 μL,混匀后 42 ℃逆转录 2 h,95 ℃灭活 RTase 5 min,向上述逆转录系统中加 Taq 酶 0.5 μL,10×PCR 缓冲液 5 μL,引物 4 和引物 5 各 1 μL,补加双蒸水至总体积 50 μL,退火温度为 57 ℃,变性温度及延伸温度分别为 94 ℃与 72 ℃,各步骤反应时间为 1 min,共 35 个循环。RT-PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.11 捕捉 ELISA(cELISA) 方法按文献[7]操作。

1.12 限制性片段长度多态性分析(RFLP)分型法 计算机检索、分析两型病毒 M 节段酶切位点发现,在扩增的核酸片段中,76-118 株含 2 个 Rsa Ⅰ 位点,1 个 Hind Ⅲ 位点;R22 株含一个 Rsa Ⅰ 位点,不含 Hind Ⅲ 位点。因此,选择 Rsa Ⅰ 和 Hind Ⅲ 作为 RFLP 分析的内切酶。迅速加入约 10 u 限制性内切酶 Rsa Ⅰ 或 Hind Ⅲ,37 ℃水浴 3 h 消化被分型毒株的 RT-PCR 产物;然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对酶切产物进行分析,用银染

维普资讯 http://www.cqvip.com

法显影。实验以76-118株和R22株的酶切产物作型标准参照，用DNA标准Marker作分子量参照，根据酶切产物片段的数目和大小，参照76-118株和R22株酶切模式，来判定被检测样本的型别。

2 结果

2.1 目的基因的克隆与表达 经扩增、回收、克隆、酶切鉴定等操作证明，目的基因片段已按正确方向装进表达载体，转化后筛选出重组工程菌。对诱导表达产物进行SDS-PAGE电泳分析显示(图1)，全长和部分的S基因片段均获非融合表达和融合表达，非融合表达产量分别约为9%和13%，分子量分别约为50 kD和22 kD；融合表达产量分别约为16%和20%，分子量分别约为64 kD和37 kD。Western-blot结果显示，两种非融合表达产物均能与6份患者血清及抗核壳蛋白单克隆抗体H5反应(见图2)，表明表达产物具有生物活性；融合表达产物不与上述抗体反应，表明其缺乏生物活性。

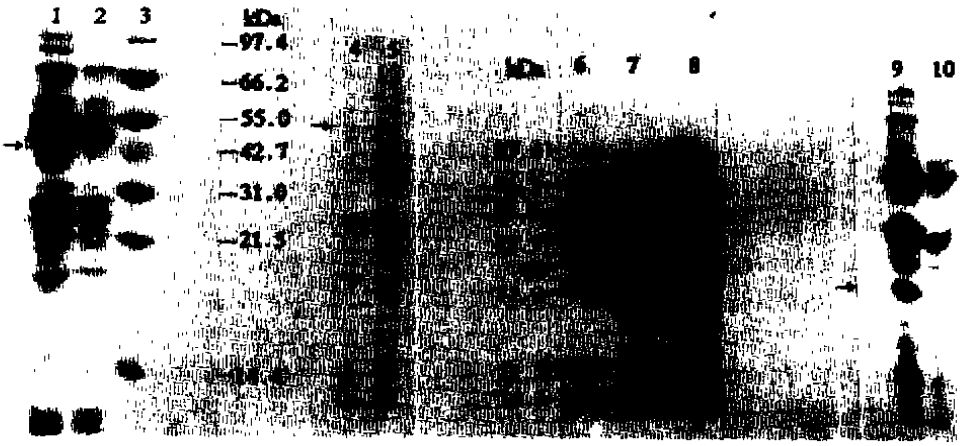

图1 12% SDS-PAGE对重组菌诱导表达产物鉴定

Fig.1 12% SDS-PAGE analysis of nucleocapsid expressed in induced recombinant bacteria

1. S基因全长片段融合表达产物 2. 空白菌体对照 3. 蛋白质Marker 4. S基因全长片段非融合表达产物 5. 空白菌体对照 6. 蛋白质Marker 7. 空白菌体对照 8. S基因N端部分片段融合表达产物 9. S基因N端部分片段非融合表达产物 10. 空白菌体对照

Lane 1. Fusion expressed protein of overal S genome fragment Lane 2. Proteins of *E. coli* BL-21 (DE3) Lane 3. Protein Marker Lane 4. Non-fusion expressed protein of overal S genome fragment Lane 5. Protein of *E. coli* BL-21(DE3) Lane 6. Protein Marker Lane 7. Proteins of *E. coli* BL-21(DE3) Lane 8. Fusion expressed protein of part S genome fragment at N-terminal. Lane 9. Non-fusion expressed protein of part S genome fragment at N-terminal. Lane 10. Proteins of *E. coli* BL-21(DE3)

2.2 表达重组抗原的应用 分别将50 kD和22 kD非融合表达产物粗提物包被酶联反应板，用ELISA间接法检测1:100稀释的HFRS患者血清抗体。滴定结果表明，两种非融合重组抗原的工作浓度均可达1:10 000，两者效价无显著差别。用融合抗原操作时，未能测出已知阳性抗体。

2.3 RT-PCR检测结果 按前述方法检测HFRSV毒株标本及阴性标本共44份。结果显示，39个毒株标本中，36株(含HTNV76-118株和SEOV R22株)扩增出299 bp的目的DNA条带，余3株标本(A1018、HU、B9)未见特异性扩增条带。若将退火温度设定为45 ℃，这3株

维普资讯 http://www.cqvip.com

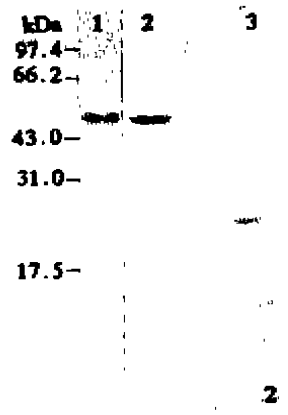

图2　Western-blot分析重组菌诱导表达产物

Fig.2　Western-blot analysis of nucleocapsid protein expressed in induced recombinant bacteria

1. S基因全长片段表达产物与患者血清反应　2. S基因全长片段表达产物与单克隆抗体反应　3. S基因N端部分片段表达产物与患者血清反应

Lane 1. Expression product of overal S genome fragment reacted to patient's blood serum　Lane 2. Expression product of overal S genome fragment reacted to monoclonal antibody　Lane 3. Expression product of part S genome fragment at N-terminal reacted to patient's blood serum

则也是阳性结果,HU呈现299 bp的条带,A1018和B9呈现577 bp的条带(分子杂交证明为HFRSV特异性核酸组份)。5份阴性对照标本在任何反应条件下均无可见的扩增条带。

2.4　cELISA的检测结果　以P/N≥2.10且P－N>0.10为阴阳性判定标准,39个毒株标本中有33株(含二个标准株)可判为阳性,6份为阴性;5份阴性对照标本均为阴性。

2.5　RT-PCR及cELISA检测结果比较　两种方法检测上述标本,结果表明:5份阴性对照标本(24、27、31、35、36)用两法检测均为阴性;39个HFRSV毒株,33株用两法检测均为阳性,另6株RT-PCR检测为阳性,cELISA检测为阴性。RT-PCR及cELISA的阳性检出率分别为100%及84.6%,二者阳性符合率为84.6%,总符合率为86.4%。

2.6　RFLP分型与血清学分型结果比较　用RsaⅠ消化标准株和待分型毒株的扩增产物共20份。酶切片段PAGE的结果见图3:包括R22在内的8份样本产生了特征性的141 bp和158 bp的两片段模式,本研究将这类RFLPs模式称为汉城型模式(RsaⅠ-SEO);包括76-118在内的另6份样本产生了特征性的141 bp、127 bp和31 bp的三片段模式,将这类RFLPs模式称为汉滩型模式(RsaⅠ-HTN);其余6份样本(A16、H5、B5、R178、鲁胎、鲁姚)没有被切开。我们称这种RFLPs模式为未定型模式(RsaⅠ-N)。

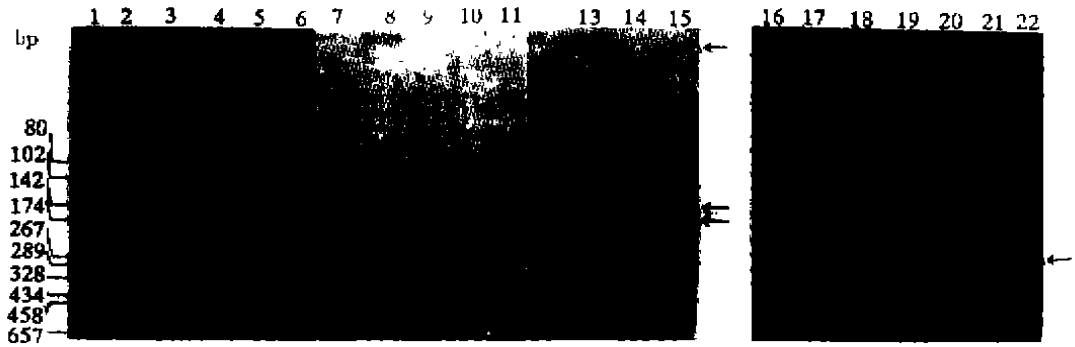

图3　RsaⅠ酶切RT-PCR产物对汉坦病毒各毒株分型的RFLPs模式

Fig.3　Restriction endonuclease digestion patterns of 299 bp RT-PCR products of 20 hantavirus isolates by RsaⅠ

2. HTN76-118　3. C4　4. S45　5. HR54　6. R2　7. A537　8. LR1　9. R27　10. Hubei　11. L99　12. A9　13. Chen　14. HB55　15. R22　16. A16　17. H5　19. R178　20. 鲁胎　21. 鲁姚　22. B5　1, 18. PGEM-7zf(+)HindⅢ DNA Marker

维普资讯 http://www.cqvip.com

为确定 RsaⅠ-N 模式样本的型别，进一步用 HindⅢ对这 6 份样本和 76-118 样本进行酶切，结果 76-118 和 A16、H5、B5 均产生 213 bp 的片段，我们将这类 RFLPs 定名为 HindⅢ-HTN；而另外 3 份样本仍未被切开，呈现 299 bp 的条带(见图 4)。

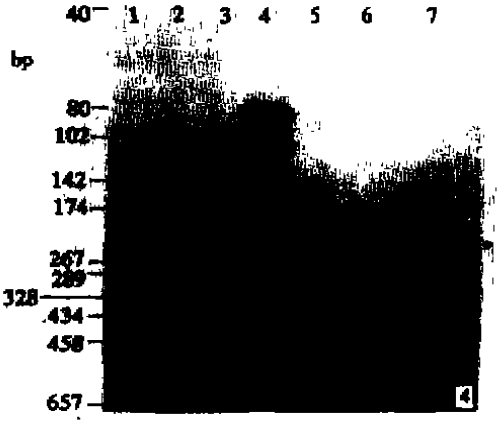

图 4 HindⅢ酶切 RT-PCR 产物对汉坦病毒各毒株分型的 RFLPs 模式

Fig.4 Restriction endonuclease digestion patterns of 299 bp RT-PCR products of 6 hantavirus isolates by HindⅢ.

1. R178 2. 鲁胎(Lu tai) 3. 鲁姚(Lu yao) 5. A16 6. H5 7. B5 4. pGEM-7zf(+)DNA Marker

根据上述 RsaⅠ和 HindⅢ二级酶切的结果，可将被检测 20 个毒株分为三组：9 株(76-118、C4、LR1、A9、A537、Chen、A16、H5、B5)为 HTN 型；8 株(R2、R27、L99、S45、HR54、R22、Hubei、HB55)为 SEO 型；3 株未能定型。此 20 个毒株曾用血清学分型法分型[8,9]，11 株确定为 HTN 型(A537、LR1、A16、Chen、A9、C4、76-118)或 SEO 型(Hubei、L99、R22、HB55)，与 RT-PCR-RFLP 分型结果一致，另 9 株用血清学方法未能定型。用 RT-PCR-RFLP 法分型，2 个毒株(H5、B5)为 HTN 型，4 个毒株(R2、R27、S45、HR54)为 SEO 型，3 个毒株(R178、鲁胎、鲁姚)仍未能定型(见表 1)。

3 讨论

目前，用免疫学方法检测 HFRSV 抗原、抗体所用的特异性抗原，仍是用感染的鼠脑或组织培养物制备的天然抗原。制备这种抗原需严格的防护条件，产量有限，稳定性也欠佳。近几年已有较多研制重组抗原的报道[10,11]，由于表达量较低、活性差、反应谱较窄等缺点而未能实际应用。本研究用强启动子 T7 表达系统，对 S 基因全片段和部分片段进行融合表达和非融合表达。融合表达产量较高，但缺乏生物活性；非融合表达产量不如前者，但活性很高，其工作浓度可达 1∶10 000，有望替代天然抗原用于 HFRSV 抗原抗体检测。本研究还对全长 S 基因表达产物(50 kD)和 N 端部分 S 基因(37-612，22 kD)表达产物的生物活性进行了比较，二者无明显的差异。S 基因表达产物为线性抗原，其抗原决定簇主要集中于 N 端，所以本研究表达的 22 kD 抗原可以替代 50 kD 抗原。22 kD 抗原分子量小，表达量相对高，更适于抗原的制备。HFRSV 抗体检测已有数种成熟的方法，但抗原检测尚无令人满意的方法，其主要问题是敏感性和特异性有待提高。本研究建立的 RT-PCR 检测 HFRSV 核酸方法与 cELISA 法检测抗原比较，总符合率为 86.4%。但前者比后者的阳性率高 15.4%，其高度特异性已被核酸探针杂交试验证实，实验操作也较简便，同时还可进一步对待检毒株分型。因此，RT-PCR 法比 cELISA 更适用于分子流行病学调查。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1　基因分型(PCR/RFLPs)和血清学分型结果比较

Table 1　The comparison of genotyping and serotyping results

	基因分型 Genotyping using PCR/RFLPs			血清学方法 Serotyping	
	RsaI酶切 Digestion with RsaI	HindⅢ酶切 Digestion with HindⅢ	RsaI结合HindⅢ酶切 Combined the digesting of RsaI and HindⅢ	空斑减少中和实验 PRNT	间接免疫荧光实验 IFAT
HTN型 (HTN type)	76-118 C4 LRI A9 A537 Chen	A16 H5 B5	76-118、C4、LR1 A9、A537、Chen A16、H5、B5	A537 LR1 A16 Chen A9 76-118	C4
SEO型 (SEO type)	R2 L99 R27 S45 HR54 R22 Hubei HB55		R2、R27、L99、 S45、HR54、R22、 Hubei、HB55	Hubei、 L99、 R22、 HB55	
未定型 (Uncertain type)	A16 H5 B5 R178 Lu tai Lu yao	R178 Lu tai Lu yao	R178 Lu tai Lu yao	C4 H5 B5 R2 R27 S45 Lu tai Lu yao	R178

注:表中血清学分型,PRNT栏中为空斑减数中和试验结果引自文献[8];IFAT为间接免疫荧光试验结果,引自文献[9]。

Notes: As being showed in the table, the results of PRNT were from Yu's report[8], and the results of IFAT were from Ke Zheng *et al*.[9]

HFRSV毒株的准确分型,对疫苗研制、疫苗预防接种和HFRS的临床治疗具有重要意义,但这一问题十分棘手。现有的血清学方法既十分繁琐,又往往不能获得明确的结果。应用RT-PCR-RFLP对HFRSV分型在国外已有报道[12,13],他们分型的毒株较少,缺乏代表性和普遍性,其选取的扩增片段和酶切方法是否恰当,也值得商榷。本研究借助电脑软件分析,在型特异性基因所在的M片段G1区选择扩增片段,在扩增片段中选择二种酶切位点进行二级酶切作RFLP分析。一级酶切用RsaⅠ将部分待检毒株分为HTN型和SEO型;二级酶切用HindⅢ从未定型毒株中分出部份HTN型。该法流程简单,分型率较高,结果也比较可靠。本研究的RT-PCR-RFLP分型法与血清学分型法所得结果具有很高的符合率,但RFLP法的分型率为85%(17/20),血清法的分型率为55%(11/20),前者比后者高30%。造成这种差异的主要原因可能是有些待分型毒株没有经过空斑形成试验进行纯化,这对RFLP法影响小,对血清法影响大。鉴于RFLP不仅分型率高,操作也相对简便,所以有较好的应用前景。

用RT-PCR-RFLP法对我国HFRS高发省份从几种主要宿主分离的20个毒株进行分析,基本达到了设计的预期效果,进一步肯定了目前的疫区型别划定。至于R178、鲁姚、鲁胎三个未定型毒株的出现,揭示有些疫区的流行株基因可能发生了较大变异,也不能排除新的型别或亚型的存在,详细的基因背景资料调查正在进行之中。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 Schmaljohn C S, Hjeue B. Hantaviruses, a global disease problem. Emerging Infectious, 1997, 4:345～352

2 Sano T S, Cantor C R. A streptavidin-protein A chimera that allows one-step production of a variety of specific antibody conjugates. Biotechnology, 1991, 9:126～130

3 Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol, 1986, 189:113～130

4 金冬雁,黎孟枫等译.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,1992.880～897

5 武建国,方宇,王艾丽等主编.实用临床免疫学检验.第一版.江苏科学技术出版社,1990.375～379

6 Chomczynski P, Nicoletta S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987, 162:156～159

7 雷万里,唐家琪,陆承平等.肾综合征出血热病毒基因检测及分型的研究.中国病毒学,1998.13(1):23～28

8 俞永新,安琪,姚智慧等.用空斑减少中和实验比较流行性出血热不同毒株的抗原性.中华微生物学和免疫学杂志,1991,11(3):162～164

9 柯正,宋干,杭长寿等.汉坦病毒抗原差异及基因分型.病毒学报,1995,11(1):34～39

10 Wang M, Rossi C, Schmajohn C S. Expression of non-conserved regions of the expressed polypeptides for diognosis of haemorrhagic fever with renal syndrom. J Gen Viol, 1993, 74:1115～1124

11 Rossi C S, Schmaljohn C S, Meegan J M *et al*. Diagnostic potential of a baculovirus-expressed nucleocapsid protein for hantavirus. Archives of Viology, 1990. (Suppl 1):19～28

12 Kim E C, Kim I K S, Choi Y *et al*. Rapid differentiation between hantaan and Seoul virus by PCR and restriction enzyme analysis. J Med Viol, 1994, 43(3):245～248

13 Xiao S Y. Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair. PCR, 1992, 73(2):567～573

Studies on Preparations of Nucleocapsid Protein Recombinant Antigen and Genotyping of Hantaviruses

Tang Jiaqi Cao Min Wang Changjun Wei Chunbao Ye Chunyan

(*Military Reserch Institute for Medicine and Technology of Nanjing Command*. *Nanjing* 210002)

Abstract Two groups of primers were designed according to the gene backgrounds of prototype virus of HTN and SEO serotypes and corrected by computer. One group of primers was used to clone entire S genome segment and partial S genome segment with respect to N-terminal. The two cloned genes were fusionally expressed and non-fusionally expressed by T7 system. The non-fusionally expressed products whose working concentration were 1:10 000 presented a good biological activity though their yields were lower than the fusionally expressed products. The other group of primers was used to establish a method of RT-PCR to detect RNAs of 37 virus isolates of HFRSV, 2 positeve standard viruses and 5 negtive controls. On comparision with that of cELISA, the detecting rates of two methods were 100% and 84.6% respectively, the coinciden-

维普资讯 http://www.cqvip.com

tal rate was 84.6% while the former had a 15.4% higher sensitivity than the latter. The typing method of RFLP was set up by digesting the PCR products of 20 virus isolates with Ras Ⅰ and HindⅢ resulting that 9 out of the total were HTN, 8 were SEO and 3 were not determined respectively. The same 20 viruses have been previoushy typed using serotyping method resulting that only 11 could be typed successfully, showing a high consistency with that of RT-PCR-RFLP method and a 30% lower typing efficiency than the latter.

Key words Hantavirus, Recombinant antigen, Genotyping, Restriction fragments length polymorphism (RFLP)