

11-13

汉坦病毒沟3株 PCR 分型

R373.32

孔艳, 刘文雪, 董关木, 俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要:汉坦病毒(HV)沟3株在以往报道的免疫学中和效价检测,为一株中和抗原广谱的毒株。本研究对这一毒株经过两次挑斑纯化,并经PCR方法进行分型检定,初步认为沟3毒株为SEO型HV病毒。

关键词:汉坦病毒沟3株;病毒分型;聚合酶链反应

中图分类号:Q939.4 **文献标识码:**B **文章编号:**1003-5125(2000)01-0011-03

目前汉坦病毒(HV)分型多用血清学方法,蚀斑中和,PCR以及核酸测序,一般应用血清学方法特别是空斑减少中和试验,可将HV分为四个血清型^[1,2]。然而,HTN(汉滩)和SEO(汉城)型病毒间的抗原性有一定的交叉,但一般中和效价仍相差4倍或更多,所以有些病毒出现广谱抗原性。HV沟3株的免疫血清对国内外多株HTN和SEO型毒株均表现几乎相同的中和效价^[3]。为了进一步对这一病毒进行研究,鉴别沟3株是否为HTN和SEO型混杂的毒株,我们对这一病毒进行了两次空斑纯化,并对所挑大小空斑病毒进行PCR分型,结果证明沟3原株和不同空斑株病毒均为SEO型病毒。现报告如下:

1 材料和方法

1.1 毒株和细胞

沟3株分离自杭州市黑家鼠,在Vero E6细胞中传代,-70℃冷冻保存。Vero E6细胞由美国泛里特军事医学研究所Eckels博士惠赠,本室保存。

1.2 蚀斑减少中和试验(PRNT)

见参考文献[4]。选择国内外具有代表性的毒株10株,其中HTN型6株(76-118、A9、A16、A537、陈株和LR1)和SEO型4株(UR、沟3、R22和湖北-1),沟3株病毒免疫家兔,采血分离血清,分别与上述病毒株进行PRNT,测定血清中和抗体滴度。

1.3 空斑纯化

将病毒稀释接种于细胞单层平面上,吸附1h,加入第一层琼脂糖培养至第五天,加入第二层培养物,如前文报道^[4]。挑出单个的大斑及小斑,接种入E6细胞单层,免疫荧光试验呈++~+++时,收获病毒液,进行二次挑斑,方法同前,培养至荧光++~+++时,收病毒液,分装保存。

1.4 PCR 试验

1.4.1 病毒核酸提取 将原沟3株及两次挑斑病毒接种于单层细胞上,荧光呈++~+++时收获,用Promega公

收稿日期:1998-10-26,修回日期:1999-01-19

作者简介:孔艳(1962-),女,河南省人,助理研究员,硕士。研究方向为病毒疫苗的研究及应用,出血热病毒的分子生物学及检定。

司产细胞总 RNA 提取试剂盒(Promega Z5110)提取总 RNA。

1.4.2 引物合成 由本室在美国赛百盛公司合成自 M 片段保守区,为型特异性引物。HTN 型:P1:5'-AATATCAAAGATCCCATG-3' (+), P2:5'-CAATCAGCAACATGGGGTAT-3' (-), 分别位于 M 片段的 30~49 位和 631~648 位,产物长度 619 个核苷酸,一对巢式引物 NP1:5'-GTGATAGGTTATGTAGAATTAC-3' (+); NP2:5'-ACTTCTCTCATAAACCACCTG-3' (-)。SEO 型:P1:5'-AGTTGGCCAAGGCTTTGCATTAAA-3' (-); P2:5'-TTGCTGATGTGATGGCAGTCTCT-3' (+); 分别位于 M 片段的 78~101 和 726~748 位核苷酸,产物长度为 671 个核苷酸,巢式引物为 NP1:5'-TCTTGTCGATCACGGTCTCTC-3' (+); NP2:5'-GTCAATATACCCGTAGTGCAG-3' (-)。

1.4.3 cDNA 合成及 PCR 扩增 逆转录及扩增试剂盒为美国 Promega 公司产品(Promega A1250)试验方法如文献[5]。

1.4.4 产物分析 将 10 μ L PCR 产物在含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶(Sigma 公司产品)电泳,紫外灯下观察扩增后 DNA 条带。

2 结果

2.1 血清学 PRNT 中和抗体结果

由表 1 可见,沟 3 株免疫血清对 6 株 HTN 型病毒的中和效价为 1:320,而对本株和其它三株 SEO 型为 320~640,其对两型的中和抗体滴度相同或只差两倍,说明血清学差异极小。

表 1 沟 3 株血清对两型出血热病毒株的空斑减少中和试验抗体效价

Table 1 The neutralizing antibodies of anti-Gou 3 serum to different Hantavirus strains in both types by PRNT

HTN		SEO	
Virus strain	Titers of antibody	Virus strain	Titers of antibody
76-118	320	UR	640
A9	320	Gou 3	640
A16	320	R22	320
A537	320	Hubei	≥ 320
LRI	320		

2.2 PCR 分型结果

将原株沟 3、第一次挑斑纯化的大、小斑及第二次挑斑纯化的大、小斑,按顺序编号为 1、2、3、4、5,用 HTN 和 SEO 型引物在同一条件下同时进行扩增,结果 HTN 型未见条带,SEO 型在原株、第一次纯化大、小斑,第二次纯化大、小斑均在 671 个碱基处出现条带,结果见图 1。

3 讨论

我们对分离自黑家鼠的沟 3 株病毒以 PRNT 方法进行抗原谱的测定,分析结果提示,对两个血清型的 10 株病毒的 PRNT 滴度基本一致,最高只相差 2 倍,这一结果与 Schmoljohn^[6]和 Lee^[7]报道的两型间的效价相差 25~50 倍和 10~100 倍甚远。因此,这一结果提示沟 3 株病毒具有广谱的中和抗原,但传统的血清方法对 HV 分型不能准确辨别,确实是本株病毒具有广谱抗原性或是两型病毒混杂污染所致。由于汉坦病毒的 M 片段中 G1 蛋白区同源性最低,且型特异性抗原决定簇位于 G1 区,因此,选择 G1 区合成引物所扩增的 PCR 产物能有效区别不同型别的毒株。本实验室以前对 R_r 株的 PCR 扩增对 HTN 和 SEO 均阳性^[5],怀疑为二型病毒混杂所致。本研究将原沟 3 株经两次挑斑纯化,从理论上可认为是由一个病毒粒子扩增

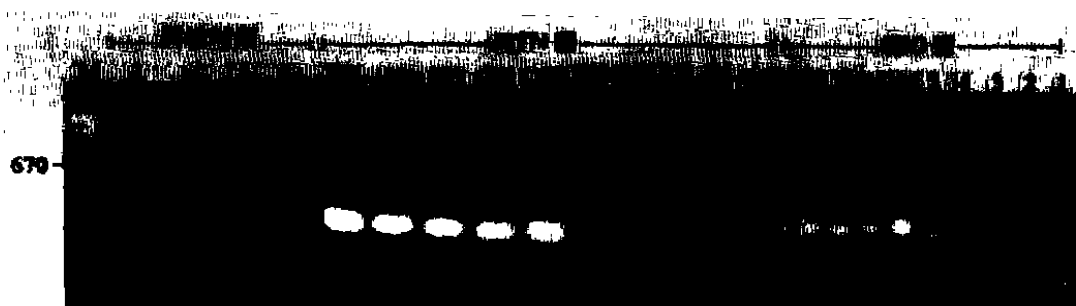


图 1 沟 3 株汉坦病毒 PCR 分型结果

Fig. 1 PCR typing products of Hantavirus Gou 3

M: PCR marker N: Nest primer a, b, c, d: Negative

1: Guo 3 strain 2, 3: The first picked up plaques 4, 5: The second picked up plaques

产生^[6]。因此,我们将沟 3 原株、一次挑斑和二次挑斑的不同形态的蚀斑样品再进行 PCR 扩增,这一结果提示沟 3 株病毒无 HTN、SEO 型混杂,是一株抗原谱很广的具有作为疫苗候选株优势的毒株,此结果也符合 SEO 对 HTN 型的交叉程度大于 HTN 对 SEO 的反应程度的报道^[1,7],即 SEO 型表现抗原性更广谱。但沟 3 株对 HTN 型的基因同源性是否较其它 SEO 型高,有待进一步对其基因进行序列分析确定。

参 考 文 献

- [1] Schmajohn C S, Hasty S E, Dalrymple J M *et al.* Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Science*, 1985, 227: 1041
- [2] Lee Pyung-Woo. Serotypic classification of hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests [J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 22: 940
- [3] 俞永新, 安祺, 姚智慧等. 一株广谱中和抗原性出血热病毒株的发现[J]. *中国病毒学*, 1991, 6(3): 271
- [4] 姚小剑, 俞永新, 安祺等. 检测流行性出血热病毒滴度和中和抗体效价的半微量空斑法[J]. *病毒学报*, 1988, 4: 347
- [5] 姚智慧, 俞永新. 应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合症出血热病毒的型别分析[J]. *病毒学报*, 1994, 10(2): 128
- [6] 戴华生等编著. *新实验病毒学* [M]. 北京: 中国学术出版社, 1985. 114
- [7] Lee HW, Lee PW, Baek LJ. Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses [J]. *Arch Virol*, 1990, (suppl 1): 5

PCR Typing of Hantavirus Gou 3 Strain

KONG Yan, LIU Wen-xie, DONG Guan-mu, YU Yong-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: Hantavirus Gou 3 strain has been reported by plaque reduce neutralization test (PRNT) being a neutralizing antigen broad strain. In this investigation the Gou 3 strain was purified by double picked up plaques and identified the types using PCR method. The results indicated that the Gou 3 strain virus is Seoul-like virus.

Key words: Hantavirus; Virus typing; PCR