

## 从 HFRS 患者的 PBMC 建立 BLCL 及其意义

潘 蕾, 白雪帆\*\*, 黄长形, 李光玉, 陈伟红

(第四军医大学唐都医院传染科, 陕西西安 710038)

### Significance of BLCL Constructed from PBMC in HFRS Patients

PAN Lei, BAI Xue-fan\*\*, HUANG Chang-xing, LI Guang-yu, CHEN Wei-hong

(Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract:** In order to provide some data for the study on T cell epitopes of *Hantaan virus* nucleocapsid protein, we constructed EBV-transformed B lymphoblastoid cell line (BLCL) from HFRS patients' PBMC. We inserted HTNV S and 5' and 3' terminals of S gene segment into a eukaryotic expression vector pcDNA 3.1/V5-His TOPO. The recombinant expression plasmids pcDNA3.1-S and pcDNA 3.1-S-N pcDNA3.1-S-C were constructed. BLCL were transfected *in vitro* with them, selected by G418 and used as target cells for CTL cytotoxicity assay. The expression of HTNV S and 5' and 3' terminals of S gene segment in BLCL was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA). These recombinant plasmids can be expressed efficiently and steadily in BLCL. We can provide a tool for the study on T cell epitopes of Hantaan virus nucleocapsid protein. The CTL clone recognized and killed the target cells with specificities of HTNV-NP. Cytotoxicities(%) were 50.2%, 39.0% and 25.4%, respectively. HTNV T cell antigenic epitopes were mainly localized on the C-terminal of the virus nucleocapsid protein.

**Key words:** *Hantaan virus*; S gene segment; Nucleocapsid protein; BLCL

**摘要:** 体外研究汉滩病毒(*Hantaan virus*, HTNV) S 基因及其 5'端、3'端在 BLCL(EBV-transformed B lymphoblastoid cell line, BLCL) 内稳定表达的意义, 为核蛋白 T 细胞表位的研究奠定基础。本研究从肾综合征出血热(HFRS)患者的外周血单个核细胞(PBMC)建立与 HTNV 特异性 CTL 同源的患者自身的 EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞系, 将含有不同 HTNV S 基因片段的重组真核表达载体转染入 BLCL, 获得长期稳定表达, 作为靶细胞系, 为下一步进行 CTL 杀伤试验提供靶细胞系。设计 4 条引物, 用 PCR 方法从 PBV220-S22 原核质粒中扩增出 S 基因全读码框(37-1326bp)及 S 基因 5'端(37-501bp), S 基因 3'端(502-1326bp), 用 TA 克隆将其克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 成功构建 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 真核表达载体, 并通过脂质体转染至 BLCL 细胞中, 进行了稳定表达。间接免疫荧光成功检测到 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 在 BLCL 细胞中的表达。pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 真核表达载体有较高的转染效率, 目的基因能在宿主细胞中长期稳定表达, 有利于研究 HTNV-S 基因在 T 细胞表位研究中的意义。建立的特异性 CTL 克隆对表达完整 NP、NP 羧基和氨基端肽段的靶细胞均有比较明显的杀伤效应, 平均杀伤率分别为 50.2%、39.0%和 25.4%。HTNV-NP 优势 T 细胞表位可能主要位于病毒核蛋白的羧基端。

**关键词:** 汉滩病毒; S 基因; 核蛋白; BLCL

中图分类号: R511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0439-05

汉滩病毒属于布尼亚病毒科汉坦病毒属, 主要引起人类肾综合征出血热, 我国是肾综合征出血热

发生和流行的主要疫区, 该病具有起病急、病死率高, 流行范围广等特点, 而目前其致病机理尚不完

收稿日期: 2004-03-01, 修回日期: 2004-05-21

作者简介: 潘蕾(1972-), 女, 浙江遂昌籍, 主治医师, 讲师, 医学博士, 主要从事汉坦病毒的分子生物学研究。

\*\* 通讯作者。 Correspondence author. Tel: 029-83377452, E-mail: xfbai@fmmu.edu.cn

全清楚。核衣壳蛋白 (Nucleocapsid Protein, NP) 是汉坦病毒 (Hantaviruses, HV) 的主要结构蛋白。已知 HV 约 45kDa~51 kDa 的 NP 由 428~433 个氨基酸组成, 其 N 端约 100 个氨基酸大部分具有亲水性, 且能被患者血清及许多单克隆抗体所识别<sup>[1-3]</sup>。虽然对 HV NP 氨基端蛋白的原核表达产物的抗原性及免疫原性已进行了许多研究, 并已用于出血热的诊断, 但该抗原表位的精确一级结构及其基因定位迄今尚未完全明确。而研究 T 细胞表位的前提是首先要构造含病原体抗原基因片段的表达载体质粒。要实现 CTL 效应细胞对靶细胞的有效杀伤, 前提条件之一是效靶细胞必须具有相同的 HLA 型别。通常选用与效应细胞同源即同一供者的 PBMC 建立靶细胞, 本研究采用与 HV 特异性 CTL 同源的患者自身的 EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞系 (EBV-transformed B lymphoblastoid cell line, BLCL) 建立靶细胞系, 将含有不同 HTNV S 基因片段的重组真核表达载体转染入 BLCL, 获得长期稳定表达, 为下一步进行 CTL 杀伤试验提供靶细胞系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 购自美国 INVITROGEN 公司。

根据 Schmaljohn CS 等<sup>[4]</sup>发表的 HV 76-118 株 S 基因片段序列的资料, 并参照 Morii M 等<sup>[5]</sup>及 Arikawa J 等<sup>[6]</sup>的文献, 设计引物 Primer 76-1: 5'-GGG CTC GAG ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTA CAG -3'; Primer 76-2: 5'-TTA GGT CCC TTT ATT ATC CTT GGT AGT-3'; Primer76-3: 5'-GGG CTC GAG ATG CGG ATT CGA TTT AAG GAT GA-3'; Primer 76-4: 5'-GGG GAA TTC TTA GAG TTT CAA AGG CTC TTG GT-3'。由大连 Takara 生物工程公司合成。Primer 76-1、76-3 5'端含 CTCGAG *Xho*I 酶切位点, Primer 76-4 5'端含 GAATTC *Eco*RI 酶切位点。

### 1.2 目的基因的制备

模板质粒 PBV220-S22 (含 HTNV S 基因全读码框), 由我室黄长形博士构建。以其为模板, 以引物 76-1 和 76-4 扩增 S 基因全读码框 (37-1326bp), PCR 反应体系为取质粒 PBV220-S22 0.5 $\mu$ L 作为 PCR 扩增的模板, 再加入 2.5 mmol/L dNTP 2 $\mu$ L, Taq 酶 1.5U, 10 $\times$ Buffer 2 $\mu$ L, 引物 76-1 和 76-4 各 10pmol, 补加去离子水至总体积 20 $\mu$ L。待 PCR 仪 (PE 2400 型) 温度升至约 60 $^{\circ}$ C 时进入 PCR 循环, 其参数为 96 $^{\circ}$ C 变性 5min, 96 $^{\circ}$ C 45s, 68 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共

循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以引物 76-1 和 76-2 扩增 S 基因 5'端 (37-501bp), PCR 反应体系同上。循环参数为 96 $^{\circ}$ C 变性 5min, 96 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 共循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以引物 76-3 和 76-4 扩增 S 基因 3'端 (502-1326bp), PCR 反应体系同上。循环参数为 96 $^{\circ}$ C 变性 5min, 96 $^{\circ}$ C 45s, 60 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 Promega 公司 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。

### 1.3 目的基因和载体的连接、转化

用 Invitrogen 公司的 pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA cloning Kit 连接、转化。目的基因和载体在 TOPO 酶的作用下, 室温连接 5min, 取 2 $\mu$ L 连接产物转化感受态细菌, 在 Amp 抗性培养板中 37 $^{\circ}$ C 温育过夜。

### 1.4 重组质粒的鉴定

采用双位点单酶 (promega) 切鉴定。酶切鉴定得到的阳性克隆, 送 Takara 公司进行核苷酸序列测定, 用生物软件 pcgene 分析汇总结果。

### 1.5 BLCL (EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞系) 的建立

取 1mL  $1 \times 10^6$ /mL 的 HFRS 患者 PBMC 悬液加 1mL EBV 溶液, 置于培养瓶中, 再补充 0.5mL 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养液。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内将培养瓶直立培养 18~24h。在 24h 内, 将细胞取出离心, 弃上清约 1mL, 补加含有 2 $\mu$ g/mL Cyclosporin A (SIGMA) 的完全 RPMI-1640 培养液 1mL, 平放在培养箱内继续培养。1 周后用含 1 $\mu$ g/mL Cy A 的完全 RPMI-1640 培养液按 1:1 比例换液, 2~3 周后应分瓶培养。以后根据细胞的生长情况酌情换液, 3~4 周后即可获得无限生长的细胞系。形态观察转化成功后, 冻存备用。

### 1.6 PBMC 的体外刺激

上述调整浓度为  $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  的 PBMC 在 AIM/V 培养基中培养, 加 10% 健康人 AB 血清; 4~5d 后加入经  $\gamma$  射线 ( $8 \times 10^6$  rads) 照射灭活的 HTNV (1:160) 和 IL-2 (25U/mL), 此后每 3 天换 1 次培养液, 7d 时加入  $\gamma$  射线照射过的异体 (另一人) 的 PBMC 作为饲养细胞, 14d 时做靶细胞杀伤试验。

### 1.7 效应细胞 CTL 克隆的建立

对上述体外刺激后的 PBMC, 采用有限稀释法建立 CTL 克隆。在培养系统中加入抗 CD3 抗体 (12F6) 和  $\gamma$  射线照射过的异体的 PBMC 作为饲养细胞, 每 3d 换 1 次培养液, 每 14d 加入新的饲养细胞, 重新用 12F6 刺激, 并做靶细胞杀伤试验, 阳性孔稀释后再如上述刺激, 直至 1 细胞/孔, 再如上述刺激, 使之成为 CTL 克隆。

### 1.8 含汉滩病毒 S 基因及其片段的重组质粒转染 BLCL

采用脂质体介导的方法。当 BLCL 在 6 孔培养板长满至 90%~95% 时, 更换为 2.5mL 无血清和抗生素的 DMEM 培养液。5 $\mu$ g 重组质粒 (pcDNA3.1-S, pcDNA3.1-S-N, pcDNA3.1-S-C) 和 15 $\mu$ L 脂质体 (Gibco) 加入 500 $\mu$ L 无血清和抗生素的 DMEM 中, 室温混合 30min。缓慢加入到 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 6h 后, 更换为含有血清和抗生素的 DMEM, 48h 后, 取细胞于盖玻片上, 吹干后, 冷丙酮固定 15min, 吹干。

### 1.9 重组质粒在宿主细胞中表达的检测

采用间接免疫荧光方法。在盖玻片上加 1:50 稀释的 HFRS 病人血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。PBS 洗, 过水, 吹干。再加 1:80 稀释的 FITC 标记的羊抗人 IgG (SIGMA 公司), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。PBS 洗, 过水, 吹干。荧光显微镜下观察结果。

### 1.10 靶细胞的建立及靶细胞杀伤试验

BLCL 经用 HTNV-S 不同基因片段转染后, 用 G418 筛选 4 周建立稳定表达 NP 不同肽段的细胞系, 作为杀伤试验的靶细胞。以 CTL 作为效应细胞, 以稳定表达 HTNV-NP 不同肽段的 BLCL 作靶细胞, 进行 CTL 杀伤试验。所用试剂盒为 Promega 公司生产的以测 LDH 酶为指标的杀伤试验试剂盒 (CytoTox 96 $\oplus$  Non-Radioactive Cytotoxicity Assay), 操作按说明书进行。最后用酶联仪在 490nm 处测吸光度 A 值。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 的构建

以引物 76-1、76-4 和 76-1、76-2; 76-3、76-4 扩增出的 S 基因片段 (1308bp, 477bp, 846bp 见图 1), 分别克隆到 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 转化大肠杆菌, 在 Amp 抗性培养板中 37 $^{\circ}$ C 温育过夜, 均可见散在的抗性克隆菌落生长。

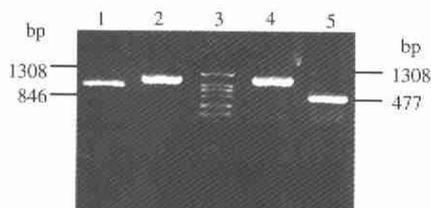


图 1 S 基因片段的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of S gene segment

Lane 1, Amplification result of 3' terminal of S gene segment; 2, and Lane 4, Amplification result of S gene segment; 3, DL-2000 DNA marker; 5, Amplification result of 5' terminal of S gene segment.

### 2.2 重组质粒 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 的鉴定

用 Hind III 酶切 pcDNA3.1-S 得到 793bp 的预期片段。用 Xho I 酶切 pcDNA3.1-S-N 得到 511bp 的预期片段。用 Hind III 酶切 pcDNA3.1-S-C 得到 331bp 的预期片段见图 2。

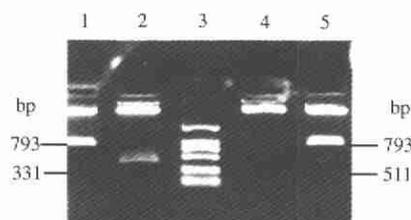


图 2 酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids

Lane 1, Identification of pcDNA3.1-S with Hind III; 2, Identification of pcDNA3.1-S-C with Hind III; 3, DL-2000 DNA marker; 4, Identification of pcDNA3.1-S-N with Xho I.

酶切鉴定获得的阳性克隆, 送 Takara 公司测序, 与 76-118 株 S 基因序列比较, 完全一致。表明目的基因成功克隆入目的载体。

### 2.3 BLCL 的建立

从急性 HFRS 患者的 PBMC 中成功建立 BLCL, 形状呈淋巴母细胞样, 核增大。此 BLCL 成功建立后, 共培养约 3 个月。

### 2.4 重组质粒 pcDNA3.1-S、pcDNA3.1-S-N 及 pcDNA3.1-S-C 在 BLCL 细胞中的表达

间接免疫荧光 (IFA) 检测见图 3。以空载体转染的 BLCL 细胞为阴性对照, 在检测重组质粒转染的 BLCL 细胞中, 表达核蛋白及其氨基端、羧基端的细胞胞浆内可见绿色荧光。

### 2.5 杀伤试验的结果

酶联仪在 490nm 处测转染后细胞的吸光度值, 计算杀伤效率 (表 1)。

经过计算, 表达完整 NP 的 BLCL 被特异性 CTL 杀伤的比率为 50.2% (效靶比为 10:1); 表达 NP 氨基端多肽片段的 BLCL 被 CTL 杀伤的比率为 25.4%

表 1 杀伤试验所得的一组数据

Table 1 Representative data from a CytoTox96 $\oplus$  Non-Radio active Cytotoxicity Assay

	pcDNA3.1-S			pcDNA3.1-S-N			pcDNA3.1-S-C			
E/T	10:1	5:1	2.5:1	10:1	5:1	2.5:1	10:1	5:1	2.5:1	
A value	2.01	1.69	1.58	0.89	1.52	1.32	0.99	1.88	1.67	1.4
	2.12	1.7	1.56	0.9	1.59	1.35	0.98	1.86	1.6	1.38
	2.1	1.75	1.6	0.99	1.6	1.38	1.01	1.85	1.59	1.39
	2.09	1.68	1.55	0.95	1.58	1.33	1.08	1.8	1.58	1.35

(效靶比同上), 而表达 NP 羧基端多肽片段的 BLCL 被 CTL 杀伤的比率为 39.0% (效靶比同上)。

以上试验的结果似提示, 优势 T 细胞表位位于汉滩病毒核蛋白的羧基端。

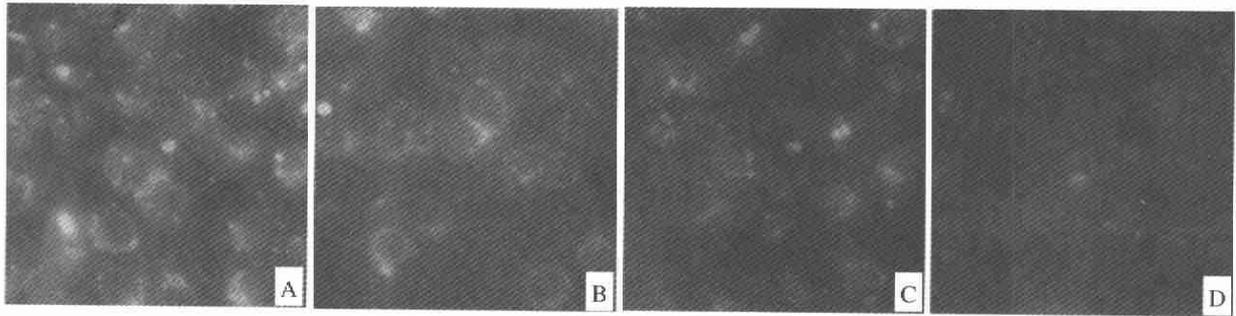


图3 间接免疫荧光检测结果

Fig. 3 Results of IFA

A, Expression of pcDNA3.1-S in BLCL; B, Expression of pcDNA3.1-S-N in BLCL; C, Expression of pcDNA3.1-S-C in BLCL; D, Normal BLCL

### 3 讨论

目前, 国内外学者已经进行了大量的抗 HTNV 感染免疫方面的研究, 但主要侧重于体液免疫, 关于细胞免疫在抗 HTNV 感染中的作用仍知之甚少。虽然近年国内外学者已经证实 HTNV 感染后可诱导产生保护性 CTL, 但对于诱导人 CTL 产生的 HTNV 病毒抗原组分研究尚未见有报道。本研究基于分析 HTNV 的 NP 位于病毒囊膜内侧, 并与核酸组成病毒核衣壳, 属于高度保守的内部抗原特性, 以及在其它病毒 NP 诱导特异性 CTL 的基础上, 通过基因转染技术, 建立稳定表达病毒结构蛋白 NP 的 BLCL, 为研究 HTNV-NP 上的 T 细胞表位提供了重要的实验工具。

Epstein-Barr 病毒(EBV)在全世界各地分布广泛, 为 95% 以上的成人所携带。EBV 是传染性单核细胞增多症的病原, 并与 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、何杰金病、口腔腺体肿瘤、胸腺瘤、器官移植后 B 细胞淋巴瘤、艾滋病相关的淋巴瘤等恶性肿瘤有密切的关系, 被列为可能致癌的人类肿瘤病毒之一。利用 EBV 的这一特性, 通过 EBV 感染人 B 淋巴细胞可使之成为具有无限繁殖力的淋巴母细胞样细胞株。EBV 血清抗体阴性个体的 B 淋巴细胞比抗体阳性个体的细胞更易转化。在 EBV 血清抗体阳性的个体中, T 细胞能抑制 B 细胞的转化, 如果用物理方法除去 T 细胞或用药物 (如 Cyclosporin A, CyA) 抑制 T 细胞的功能, 则 B 细胞的转化成功率会更高。此外, 静止的 B 淋巴细胞较活跃的 B 淋巴细胞易转化。B 淋巴细胞在 EBV 感染初期为多克隆细胞, 在培养 3~4 周后, 即可成为单克隆细胞株。

本研究通过 EBV 转化 HFRS 患者的 PBMC, 成功建立了 EBV 转化的 B 淋巴母细胞系, 并用间接免疫荧光技术成功检测到 pcDNA3.1-S、pcDNA3.1-S-N、pcDNA3.1-S-C 在 BLCL 细胞中的高效表达。pcDNA3.1/V5-His-TOPO 质粒是能在哺乳动物细胞中高效表达的真核载体, 它含有 CMV 启动子, 并含有牛生长激素基因 (BGH), 这样的结构最适合核蛋白基因在哺乳动物细胞中的表达。且其含有的 V5 和 His 便于表达蛋白的检测和纯化, 并具有与目的基因连接迅速、高效的特点。由于缺乏重组痘苗病毒及其专用载体系统, 本研究采用含有 HTNV-S 基因全读码框架及 S 基因氨基端、羧基端在 BLCL 内进行了真核高效表达, 并筛选出稳定表达的 BLCL 细胞系, 用以替代经重组痘苗病毒感染的 BLCL 作为特异性 CTL 杀伤试验的靶细胞, 实验表明该种靶细胞能够稳定表达相应的病毒抗原并用于 CTL 杀伤试验, 为初步确定 NP 上的 T 细胞表位奠定了基础。

实验还表明, 虽然高效瞬时表达的 BLCL 也可用于 CTL 杀伤试验, 但是其表达高峰期较短, 通常仅能维持 48~96h, 且细胞转染阳性率不高, 可能影响 CTL 的杀伤效率, 影响 T 细胞表位的判定。为了实验的稳定性, 我们对转染重组载体的 BLCL 用 G418 进行了筛选, 并得到了稳定表达 S 基因片段的 BLCL 细胞系。

目前, 国内外研究 T 细胞表位<sup>[7,8]</sup>时, 主要研究鼠的 T 细胞表位, 因为鼠的 HLA 型别较人单一, 同系鼠的 HLA 型别可一致, 有现成的靶细胞系 P815, 取鼠的脾细胞建立 CTL 克隆时, 较易获得。而在研究人的 T 细胞表位时, HLA 型别极其复杂,

必须对每一病人均建立 BLCL, 并使外源基因在其内获得长期稳定表达, 同时建立同一病人的 CTL 克隆, 才能做杀伤试验。因此人的 CTL 研究不仅工作量大, 而且难度较高, 此外还必须确定 T 细胞表位与 MHC 的限制性即特定的 HLA 型别。

总之, 在进行人 T 细胞表位研究时, 必须先建立患者自身的靶细胞系, 这样效应细胞 CTL 才能杀伤 HLA 型别相同的靶细胞, 从而最终找到 T 细胞表位, 为 HFRS 的发病机理及疫苗设计提供一定的资料和依据。

国外研究<sup>[9]</sup>虽然证实人体内存在 HTNV 特异性 T 细胞应答, 但存在着明显的局限性。首先 3 名工作人员均为 15 年前的实验室无症状感染者, 其 CTL 的特异性杀伤活性是经体外病毒抗原反复刺激并联合 IL-2 诱导的, 不能反应疾病状态下 CTL 的动态变化; 其次, 3 例中只搞清了 2 个 HLA I 类抗原 (A1 和 B51) 与识别 HTNV-NPT 细胞表位的关系。众所周知, 不同地区和民族的人群中 HLA 的基因频率有很大的差别。因此, 该文报道的 HLA 型别与 HTNV-NP 的 T 细胞表位的关系远不能包括其它流行区的情况。

本文自我国代表性 HFRS 姬鼠型疫区患者的 PBMC 建立了 CTL 克隆, 并应用基因转染技术建立了能够表达病毒 NP 不同肽段的自身 CTL 靶细胞系 BLCL, 经靶细胞杀伤试验表明, HTNV 核蛋白的 T 细胞表位分布于 NP 的 C 端和 N 端。本试验的结果还显示, 对表达有 HTNV-NP 羧基端靶细胞的 CTL 杀伤活性明显高于表达氨基端靶肽的靶细胞, 提示 HTNV 优势 T 细胞表位可能位于 NP 的羧基端。总之, 本文结果为进一步深入研究 HV 感染后的细胞免疫应答及 T 细胞表位积累了实验经验, 为进一步阐明 HFRS 的发病机理提供了有用的资料。

## 参考文献

- [1] Gott P, Zoller L, Darai G, *et al.* A major antigenic domain of Hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein [J]. *Virus Res*, 1997, 14: 31-40.
- [2] Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev O A, *et al.* A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus[J]. *J Virol Meths*, 1996, 59: 161-172.
- [3] 白雪帆, 杨为松, 张文彬, 等. 流行性出血热病人对三种病毒结构蛋白的抗体应答[J]. *中华传染病杂志*, 1992, 10: 187-191.
- [4] Schmaljohn C S, Jennings G B, Hay John, *et al.* Coding strategy of the S genome segment of hantaan virus [J]. *Virology*, 1986, 155: 633-640.
- [5] Morii M, Yoshimatsu K, Arikawa J, *et al.* Antigenic characterization of Hantaan and seoul virus nucleocapsid proteins expressed by recombinant baculovirus: application of a truncated protein, lacking an antigenic region common to the two viruses, as a serotyping antigen[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 2514-2521.
- [6] Arikawa J, Lapenotiere H F, Iacono C L, *et al.* Coding properties of the S and the M genome segments of Sapporo rat virus: comparison to other causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Virology*, 1990, 176: 114-125.
- [7] Van Epps H L, Schmaljohn C S, Ennis F A. Human memory cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to Hantaan virus infection: identification of virus-specified and cross-reactive CD8+CTL epitopes on nucleocapsid protein [J]. *J Virology*, 1999, 73(7): 5301-5308.
- [8] Park J M, Cho S Y, Hwang Y K, *et al.* Identification of H-2K (b)-restricted T cell epitopes within the nucleocapsid protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T cell clones[J]. *J Med Virol*, 2000, 60(2): 189-199.
- [9] Ennis F A, Cruz J, Spiropoulou C F, *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre Virus nucleocapsid protein isolated during acute illness [J]. *Virology*, 1997, 238: 380-390