维普资讯 http://www.cqvip.com

203-205, 211

第21卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.3
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

免疫转印技术分析流行性出血热病毒抗原组分的研究

法医学教研室 邓世雄 裴润方

提 要 免疫转印技术分析流行性出血热病毒(EHFV)陈株、R_{22}株结构蛋白。病毒抗原系感染乳鼠脑内增殖，硫酸鱼精蛋白—PEG法提取。采用免疫EHFV血清(浙江R_3血清，抗R_{22}血清)及抗EHFV单克隆抗体(R_{31}、A_{19}、A_{20}、A_{35}、A_{35-1})对两株病毒多肽抗原进行分析。结果陈株具有75KD、69KD、66KD、61KD4条多肽，R22株具有72KD、69KD、64KD3条多肽。抗体识别模式表明两株病毒抗原仅有微小的株间差异。

关键词 免疫转印技术;流行性出血热病毒;单克隆抗体;病毒抗原组份
中图分类号 R373;R392.33

流行性出血热病毒属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)一个新属，命名为汉坦病毒属(Hantaan Viridae)[1]。该组病毒基因为单链RNA，具有3个核酸片段，表达G_1、G_2和N三种结构蛋白。对该病毒蛋白质抗原分析，近年来曾有不少报道，但结果不尽相同。本文采用免疫转印技术对初步纯化的病毒抗原进行分析研究。

1 材料和方法

1.1 病毒株

陈株:姬鼠型，重庆市卫生防疫站转赠。

R_{22}株:大鼠型，中国预防医学科学院病毒研究所惠赠。

1.2 免疫血清及单克隆抗体(McAb)

兔抗出血热病毒R_3血清:浙江省卫生防疫站提供(下称浙江R_3血清)。

兔抗R_{22}病毒血清:本室制备。

McAb:A_{19}、A_{20}、A_{35-1}、A_{35}、R_{31}均由中国预防医学科学院，病毒研究所陈佰权教授提供，均经IFA鉴定。其中A_{19}、A_{35-1}，A_{35}为组特异性，R_{31}为大鼠型特异性，A_{20}为姬鼠型特异性。

1.3 实验动物

昆明种小白鼠，3～4日龄乳鼠，本校动物室提供。

1.4 主要试剂

硝酸纤维膜[NC]:浙江黄岩人民化工厂产品。

硫酸鱼精蛋白:上海化学试剂厂产品。

聚乙二醇[PEG]:分子量6000，分析纯，日本进口，重庆化玻公司分装。

酶标抗体:酶标羊抗兔IgG抗体，工作浓度1:100(批号862)，酶标羊抗BALb/c IgG抗体，工作浓度1:100(批号863)。均由北京生物制品研究所提供。

蛋白质分子量标准品:上海生物化学研究所东风试剂厂产品，含烟草花叶病毒外壳蛋白17.5KD，碳酸酐酶30KD，肌动蛋白43KD，牛血清蛋白67KD，磷酸化酶B 94KD。

十二烷基磺酸钠(SDS):日本进口分装，广州医药站化学试剂公司。

甲叉双丙烯酰胺(Blis):化学纯，E.Merck公司产品。

丙烯酰胺(Acr.)化学纯，北京化学试剂厂。

1.5 病毒增殖及抗原的初步纯化

陈株及R_{22}株病毒细胞培养上清液，以0.02ml/只，接种于3－4日龄乳鼠脑内，连续传代增殖，乳鼠发病后于频死期处死，取出鼠脑，经荧光证实阳性者，－70℃冰箱保存。按硫酸鱼精蛋白——PEG法从鼠脑中提取EHEV抗原，初步纯化之抗原，经点酶法鉴定，确定为病毒特异性抗原。其抗原滴度分别为:陈株1:160，R_{22}1:80。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.6 SDS——PAGE

样品经SDS—尿素及SDS—β—硫基乙醇处理，基本按Laemmlli不连续缓冲系统电泳[3]，同时设置正常鼠脑抗原，正常兔血清及PBS代替第一抗体的实验对照。在同一凝胶板上进行样品及蛋白质分子量标准品的电泳。转印电泳按Towbin法[4]。转印有样品的NC膜进行免疫染色，而转印有蛋白质分子量标准品的NC膜采用碳素墨水染色作为参考测定病毒多肽抗原的分子量(图1)。

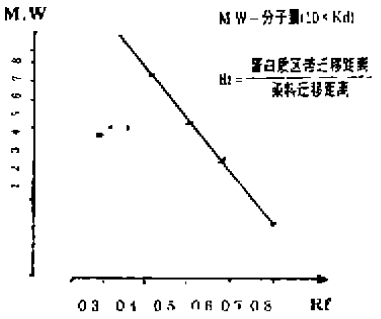
2 结 果

陈株出现4条多肽，分子量为75KD、69KD、66KD、61KD。R_{22}株病毒出现3条多肽，分子量为72KD、69KD、64KD。抗R_{22}病毒血清及McAbA_{19}、A_{20}、A_{35}对两株病毒具有相同的识别模式、能识别两株病毒所有多肽。McAbR_{31}、A_{25-1}均能与陈株病毒75KD、66KD及R_{22}株病毒72KD、64KD发生反应。浙江R_3血清能识别陈株病毒4条多肽及R_{22}株病毒69KD、64KD两条多肽。各种对照未出现阳性区带，证明出现的区带为病毒抗原特异性区带。结果见下表及图2，图3，SDS－β硫基乙醇处理的病毒抗原仅出现一条多肽分子量为50KD(图4)。

表1 EHFV抗原组份免疫转印分析结果

抗体	病毒株							正常鼠脑抗原
	陈株				R_{22}株			
	75KD	69KD	66KD	61KD	72KD	69KD	64KD	
浙江R_3血清	*+	+	+	+	−	+	+	−
兔抗R_{22}血清	+	+	+	+	+	+	+	−
A19	+	+	+	+	+	+	+	−
A20	+	+	+	+	+	+	+	−
A35	+	+	+	+	+	+	+	−
A25－1	+	−	+	−	+	−	+	−
R31	+	−	+	−	+	−	+	−
正常兔血清	−	−	−	−	−	−	−	−
PBS	−	−	−	−	−	−	−	−

*"＋"表示阳性抗原区带，"－"表示阴性。



标准蛋白迁移率

图1 标准蛋白质迁移曲线

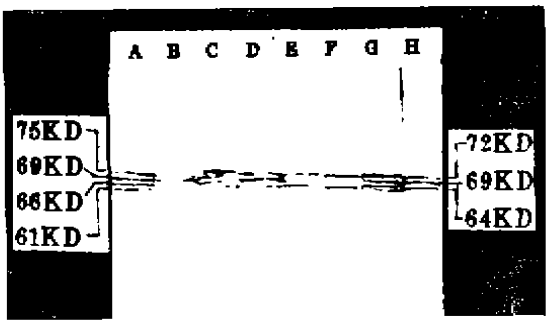


图2 病毒多肽免疫转印图谱(一)

A A19识别陈株多肽图谱 B A19识别R22株多肽图谱
C A20识别陈株多肽图谱 D A20识别R22株多肽图谱
E A25－1识别陈株多肽图谱 F A25－1识别R22株多肽图谱
G A35识别陈株多肽图谱 H A35识别R22株多肽图谱

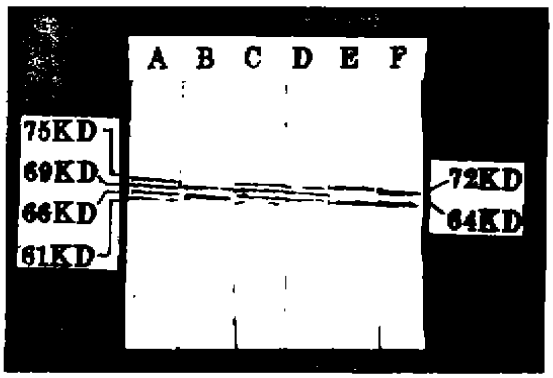


图3 病毒多肽免疫转印图谱(二)

A 浙江R3血清识别陈株多肽图谱
B 浙江R3血清识别R22株多肽图谱
C 抗R22血清识别陈株多肽图谱
D 抗22血清识别R22株多肽图谱
E R3识别陈株多肽图谱
F R31识别R22株多肽图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com

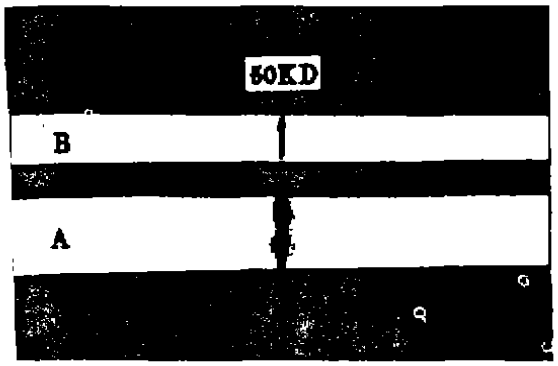


图4 SDS－β疏基乙醇处理粗提与初步纯化样品免疫转印图谱

A 粗提样品
B 初步纯化样品

3 讨 论

免疫转印技术具有凝胶电泳的高分辨力，无需将抗原高度纯化，又具有特异性免疫反应等优点，因而为一种分析流行性出血热病毒抗原较为优越的技术。本文在研究中发现初步纯化的抗原较粗制抗原免疫转印效果好(图4)。采用硫酸鱼精蛋白——PEG法初步纯化的抗原进行分析，未见非特异性区带，说明该方法提取的抗原适合于进行免疫转印分析。本文曾对SDS—β—疏基乙醇与SDS——尿素处理的病素抗原进行比较分析，发现经前者处理的病毒抗原，免疫转印分析仅出现一条特异性抗原区带(图4)；后者处理之病毒抗原，免疫转印分析出现多条特异性区带说明β—疏基乙醇可能造成抗原生物活性丧失，与文献报道相符[5]。故建议作免疫转印时，以SDS—尿素作样品处理液。

本文实验结果表明，姬鼠型病毒陈株与大鼠型病毒R_{22}株，在结构上有交叉。两株病毒共有一条69K多肽，其与各株抗体反应性相同。经免疫荧光分析(IFA)，确定为型特异性单克隆抗体(R_{31}、A_{20})，在免疫转印分析中，与两株病毒抗原均有反应。其原因可能在于完整的病毒颗粒上抗原分子，由于空间结构的位阻作用，掩盖了一部份抗原决定簇，免疫荧光分析可不出现反应。但当病毒颗粒裂解后，暴露其内部的多肽抗原决定簇，在免疫转印分析中，出现异型交叉反应。

对该病毒结构蛋白的研究，不同的作者采用不同的材料和实验方法，结果不尽相同。Elliott[6]采用SDS－PAGE分析76—118株发现3条多肽，特殊标记尚可出现第四种蛋白，分子量分别为45KD、56KD、72KD、200KD。同布尼亚病毒科N、G_1、G_2、L蛋白模式相似，但分子量明显不同。郝连杰[7]等应用免疫转印技术及安徽血清、浙江血清，分析从感染乳鼠脑内提取的陈株抗原，结果发现有7条区带反应。陈立礼[8]等免疫转印分析姬鼠型病毒R_{84-1}抗原，发现67KD、43KD两条多肽，且发现大鼠型特异性单克隆抗体R_{31}，也能与姬鼠型67K多肽反应。徐志凯[2]等采用硫酸鱼精蛋白—PEG法从感染乳鼠脑内提取陈株病毒抗原，再经McAb免疫吸附柱纯化抗原，SDS分析，发现一条50K多肽。本文与上述结果表明，有必要采用标化试剂，统一实验技术常规，对该病毒结构多肽作进一步探讨，以获得客观、公认的结果。

参 考 文 献

1.Lee H.W,et al. J.Infect Dis,1978 137:298
2.徐志凯.等.病毒学杂志 1988 2:124
3.Laemmli U.K.et al.Nature.1970 227:680 Immunol Method.1984 72:313
5.朱运松，等.生物化学与生物物理进展 1984 5:56
6.Elliott L.H.et al.J.Gen Virol 65:1285 1984
7.郝连杰.等.同济医科大学学报 1986,6:381
8.陈立礼.等.预防医学情报杂志 1990,6(1):30

(收稿日期 1996－04－16)

(下转第211页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

同水平的表达异常，已有多种报道。DNA水平的基因点突变，基因插入[1,2]，mRNA水平的转录异常[6]及蛋白质水平的翻译异常[3]均有报道。由此可见，血小板无力症作为一种遗传病，发病原因是GPⅡb/Ⅲa缺失已为人们所认识，但GPⅡb/Ⅲa表达异常导致缺失的原因，其报道按照分子生物学中心法则分析可知，在DNA复制水平(遗传)，mRNA转录水平，蛋白质翻译水平及基因调控异常均可引起该病的发生。而这些异常导致GPⅡb/Ⅲa缺失的机理尚未阐明，特别是基因异常与转录，翻译调控的关系有待进一步研究。笔者认为血小板无力症不失为研究遗传性疾病的基因结构，基因调控与mRNA转录，蛋白质翻译表达等关系的理想模型。

(本文为笔者在日本留学期间所作的部分工作，在此向山口教授，寨教授，安永博士，足立博士，菅野博士，吉田博士的热心指导与帮助深表谢意。)

参 考 文 献

1. 渡边清明.临床检查 1984 28(6):634
2. J.Sambrook,et al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2nd ed 1989.
3. Mutsumi Yasunaga,et al.
Jpn J.Clin.Hematol.1992 33(2):133
4. 彭晓冬，等.生命的化学 1995 15(2):13
5. Newman PJ.Thrombos Haemostas.1991 66:111
6. Bray PF.et al.Blood.1990 75:881
7. 顾建明，等.中华医学杂志 1991 71(12):680

(收稿日期 1996－01－03)

GLANZANN'S THROMBASTHENIA AND GPⅢa GENETIC EXPRESSION

Jiang Jikai, et al
Dept. of Clinical Biochemistry

Glanzann's thrombasthenia(GT) is genetic hemorrhagic disease.Unusual genes of platelet membrane glycoproteins(GP)Ⅱb/Ⅲa cause GPⅡb/Ⅲa deletion，result in platelet coagulation function deletion.Using reverse transcriptase－polymerase chain reaction(RT－PCR),analysed the genetic expression of a GT patient,showed that its translating level was unusual.It was suggested that one of the causing factors of GPⅢa deletion was GPⅢa mRNA not been translated.

KEY WORDS Glanzmann's thrombasthenia; Platelet glycoproteins Ⅲa; PCR

(上接第205页)

ANALYSIS ON EHFV COMPONENT ANTIGEN BY IMMUNOBLOT TECHNIQUE

Deng Shixiong,et al
Dept. of Forensic Medicine

Immunobloting analysis was carried out on the virion protein of strain chen and strain R22 viruses,the a etiologic agent of EHF.The viral antigen was purified and characterized roughly by protamine sulfate and polyethylene glycol precipition from brain tissue of suckling mice infected with EHFV strain chen or strain R22.Immunobloting analysis was performed with rabbit anti－EHFV sera(anti－R22 virus sera,Zhejian R3sera)and McAb A19,A20,A35,A25－1,R31.It showed four bands on NC with molecular weights of 75KD,69KD,66KD,61KD,in strain chen and three bands on NC with molecular weights of 72KD,69KD,64KD in strain R22.All antibodies reacted with the viral antigen of the two viruses.

It shows a little difference between stra in chen and R_{22} in Virral antigen.

KEY WORDS Immunoblot technique,EHFV;McAb; Component of antigen