

[文章编号] 1000-8861(2008)04-0438-04

湖北地区汉滩病毒与普马拉病毒及多布拉伐病毒的血清学交叉反应研究

李 晴¹, 罗 凡², 杨占秋^{2*} (1. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361005; 2. 武汉大学医学院病毒学研究所 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071)

[摘要] 目的 研究湖北地区汉滩病毒(hantaan virus, HTNV)与普马拉病毒(Puumala virus, PUUV)、多布拉伐病毒(Dobrava virus, DOBV)血清学交叉反应。方法 以酵母菌表达的PUUV、DOBV、HTNV重组核衣壳蛋白(recombinant nucleocapsid protein, rNP)为包被抗原, ELISA法定性、定量分析湖北地区HTN型急性/恢复期血清中IgA、IgG、IgM抗体, 比较疾病早晚期血清学交叉反应变化。结果 DOB-rNP与HTN型血清中IgA、IgG、IgM抗体交叉反应性较高, PUU-rNP对HTN型血清交叉反应很低; IgA、IgG抗体交叉反应在恢复期血清中均增高, 且IgA抗体交叉反应更多更强。结论 湖北地区HTN型血清与DOBV存在广泛交叉反应, 与PUUV交叉反应少。各交叉反应在恢复期增高对汉滩病毒血清学研究具有重要意义。

[关键词] 汉滩病毒; 普马拉病毒; 多布拉伐病毒; ELISA; 血清学交叉反应

[中图分类号] R373.3 **[文献标识码]** A

Humoral cross-reactivity of hantaan viruses to the nucleocapsid protein of Puumala viruses and Dobrava viruses in Hubei province

LI Qing, LUO Fan, YANG Zhan-qiu (Department of Basic Medicine, Xiamen University Medical College, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective** To study the cross-reactivity of hantaan virus to recombinant nucleocapsid proteins of Puumala virus and Dobrava virus in Hubei province. **Methods** Six yeast-expressed recombinant nucleocapsid proteins of hantaviruses, which were derived from PUUV Kazan strain, PUUV Vranica strain, PUUV Sotkamo strain, DOBV Slovakia strain, DOBV Slovenia strain, and HTNV Fojnica strain, were extracted and purified as coated antigens for ELISA assay. The indirect ELISA assay was performed to detect the cross-reacting IgA, IgG and IgM in 34 pairs of acute/convalescent serum samples collected from patients with hemorrhagic fever with renal syndromes (HFRS) in Hubei province. All the samples were distinguished as HTNV by RT-PCR genotyping. Qualitative and quantitative results of ELISA assay were analyzed to compare the change of cross-reactivities between the acute and convalescent phase of disease. **Results** Sera of the patients infected with Hantaan viruses showed a strong cross-reactivity to DOB-derived rNP while a weak cross-reactivity to the PUU-derived proteins. There were marked increases of IgA and IgG cross-reactivities between the heterologous hantavirus recombinant nucleocapsid proteins and HTN-positive sera in convalescent phrase. Moreover, the increase of IgA cross-reactivity was much stronger and more significant. **Conclusion** HTN-positive sera collected from Hubei province are cross-reacted strongly to DOB-derived recombinant nucleocapsid proteins in IgA, IgG, and IgM responses, while the cross-reactivity to the PUU-derived proteins is weak. The increase of IgA and IgG cross-reactivity to heterologous hantaviruses in convalescent sera has significant implications for serological study of hantaan viruses.

[Key words] Hantaan virus; Puumala virus; Dobrava virus; ELISA; Serological cross-reactivity

我国是汉坦病毒(hantavirus, HV)感染重疫区, 主要流行型别是汉滩型(hantaan virus, HTNV)和汉

城型(Seoul virus, SEOV)。HTNV主要分布在我国东北、西北及长江流域, 导致伴出血症状的严重疾病; SEOV主要分布在黄河中下游及东南沿海, 一般引起轻微症状甚至无症状^[1]。2001年, 刘京梅等用HV重组核蛋白对中国肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndromes, HFRS)患者血清进行血清学分型, 提出中国可能有DOBV流行, 但未被证实^[2]。2003年, 刘刚等首次报道在中国东北发现PUUV, 可能是通过地域性传播由欧洲输入我国^[3]。新血清型不断出现表明我国HV血清型别日趋复杂, 可能导致我国HFRS流行特征的改变。目前, 关

[收稿日期] 2007-12-11; [修回日期] 2008-05-06

[基金项目] 国家“863”计划(2007AA02Z465), 国家自然科学基金(30770096), 立陶宛EU Project BIOCEL基金和厦门大学引进人才科研启动基金(Z03111)资助项目

[作者简介] 李 晴(1977-), 女, 湖北武汉市人, 讲师, 博士, 主要从事肾综合征出血热的分子流行病学研究。(Tel) 0592-2188672; (Email) sunnymaylq@xmu.edu.cn

*通讯作者: 杨占秋, (Tel) 027-68759136; (E-mail) zqyang@whu.edu.cn

于 HV 血清学特征的研究大多集中在对病原进行血清学分型或对各种特异性抗体进行检测,关于血清学交叉方面研究很少。湖北位于我国中部,是以 HTNV 流行为主的混合疫区,近来 HFRS 流行特征发生了明显改变,流行规律不清,目前也未报导新的血清/基因型。为探讨湖北地区 HTNV 与上述两种新出现 HV 之间的血清学关系,拟通过 ELISA 法分析湖北 HTN 型血清与 PUUV-rNP、DOBV-rNP 间的交叉反应性,为 HFRS 的防治与监测提供新思路。

1 材料与方法

1.1 血清标本 34 对急性/恢复期血清收集自 1985 至 2000 年间原湖北医科大学(现武汉大学)附属医院和原同济医科大学(现华中科技大学)附属医院部分住院 HFRS 患者。所有急性期血清经 ELISA 抗体捕捉法检测抗 HV 混合抗原 (HTNV 76-118、HV 114 和 A9) 特异性 IgM 抗体阳性,滴度 1 200 以上,且经 RT-PCR/RFLP 法基因分型为 HTN 型^[4]。ELISA 试验中所用阴性对照,阳性 PUUV 对照和 DOBV/HTNV 对照均由德国 Friedrich-Loeffler 研究所 Dr. Ulrich 提供。

1.2 酵母表达系统 表达带 6 个组氨酸标记的 PUUV Kazan 株、PUUV Vranica 株、PUUV Sotkam 株、DOBV Slovakia 株、DOBV Slovenia 株和 HTNV Fojnica 株 NP 的酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 由立陶宛维尔纽斯生物技术研究所 Dr. Sasnauskas 提供。其结构及分子量见表 1。

表 1 六种 HV-rNP 结构及分子量^[5]

Tab 1 Primary structure and predicted molecular mass of six hantavirus-derived rNP

RN proteins of different hantaviruses	Size and primary structure of the rN protein	Predicted molecular mass
rN PUUV-Vra	439 aa (M ^{HIS} ₆ -N ₂₋₄₃₃)	Mr 50 300
rN PUUV-Sot	443 aa (M ^{HIS} ₆ -L ₃ -N ₁₋₄₃₃)	Mr 50 700
rN PUUV-Kaz	443 aa (M ^{HIS} ₆ -L ₃ -N ₁₋₄₃₃)	Mr 50 800
rN HTNV-Foj	435 aa (M ^{HIS} ₆ -N ₂₋₄₂₉)	Mr 49 000
rN DOBV-Slk	435 aa (M ^{HIS} ₆ -N ₂₋₄₂₉)	Mr 49 100
rN DOBV-Slo	435 aa (M ^{HIS} ₆ -N ₂₋₄₂₉)	Mr 49 000

1.3 主要抗体及其他试剂 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记小鼠抗人 IgG 抗体、小鼠抗人 IgA 抗体、生物素抗人 IgM 抗体、抗生物素蛋白抗体均为 BD 公司产品;抗人 IgG 抗体为 PROGEN 公司产品。蛋白质提取、纯化为 Qiagen 公司 QIA expressionist 试剂盒;抗组氨酸小鼠单抗 (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK); SDS-PAGE 蛋白分子量 Marker (Sigma); Western blot 分子量 Marker (Fermentas)。

1.4 rNP 的表达、提取和纯化 按文献[6]操作。

纯化后蛋白样本 PBS 透析后 4℃ 保存待用。

1.5 rNP 纯度和浓度检测 考马斯亮兰染色的 SDS-PAGE 法和抗组氨酸小鼠单抗 Western blot 常法操作检测 rNP 纯度。Bradford 法测 rNP 浓度。

1.6 ELISA 法检测血清中抗 PUUV、DOBV 核蛋白抗体 将 rNP 制备成 2 μg/mL 包被抗原,待测血清 1 100 稀释,常法进行 ELISA 反应。同时设空白、阳性和阴性对照。HRP-小鼠抗人 IgG 抗体 1 8 000 稀释、IgA 抗体 1 10 000 稀释,反应 1 h 后加入 TMB 底物显色液,最后 10% H₂SO₄ 终止,酶标仪 450 nm 处测 OD 值。检测 IgM 抗体时,选用经预试检出率较高的 HTNV-Foj、DOBV-Slo 重组核蛋白对急性期血清进行检测。先用 ABS (Absorb IgG Reagent) 试剂预处理去除血清中 IgG 抗体。处理方法:将血清与 ABS 试剂以 1 5 体积比混匀,室温放置 15 min;9 000 g 离心 10 min 沉淀 IgG 抗体,取上清稀释用。以生物素标记的抗人 IgM 抗体 (1 7 000 稀释) 为一抗、HRP-抗生物素蛋白抗体 (1 1 000 稀释) 为二抗进行反应,余操作同上。

1.7 ELISA 结果处理及统计学分析 同时符合以下标准为阳性结果:

样品的绝对 OD 值 0.2;

$$\frac{\text{样品 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}} \geq 2.1;$$

样品相对 OD 值 = 样品 OD 值 - 空白对照 OD 值。SPSS 11.0 软件对相对 OD 值进行均数比较分析 (独立样本 *t* 检验或 LSD 法),以 HTN 血清与 HTNV-Foj 重组核蛋白的反应性为参照,分析 PUUV、DOBV 与 HTN 血清交叉反应性。

2 结果

2.1 rNP 纯度和浓度检测 SDS-PAGE 和 Western blot 染色结果与预期一致,DOBV-Slo、DOBV-Slk 和 HTNV-Foj 的全长重组核蛋白带出现在大约 Mr 49 000 处,另外 3 种重组核蛋白带位置略靠后,约在 Mr 50 000 ~ 51 000 处。蛋白质片段大部分是纯的,仅在大约 Mr 30 000 处有条淡着色带 (图 1)。Bradford 法测定每克湿重的酵母细胞团块能产生约 0.5 ~ 1.5 mg 重组核蛋白。

2.2 HTNV-Foj rNP 检测 HTN 型血清中各种抗体经 ELISA 法定性检测,34 份急性期血清中,27 份产生针对 HTNV-Foj rNP 的特异性 IgG 抗体 (27/34, 79.4%),31 份产生特异性 IgA 抗体 (31/34, 91.2%),28 份产生特异性 IgM 抗体 (28/34, 82.4%)。恢复期血清中,IgG 抗体检出率达 100%,IgA 抗体检出率与急性期结果一致 (表 2)。

2.3 湖北地区 HTN 型急性/恢复期血清与 PUUV、

DOBV 核抗原交叉反应分析 如表 2 中所示,PUUV-rNP、DOBV-rNP 与急性/恢复期 HTN 型血清间存在不同程度交叉反应。34 个研究对象中,有 3 例病人的急性期和恢复期血清中均有针对 PUUV、DOBV 各株型 rNP 的 IgG、IgA 和 IgM 抗体;14 例患者的双份血清能产生针对每型中至少一个株型 rNP 抗原的 IgG、IgA 和 IgM 抗体;1 例双份血清经 PUUV 抗原检测结果全部阴性,但对 DOBV-rNP 反应均阳性。将 ELISA 反应 OD 值进行统计学分析后发现,DOBV-rNP 与 HTN 型血清中 IgG 抗体的交叉反应性显著高于 PUUV-rNP,仅略低于 HTNV-rNP 的反应水平;但分析其对 IgA、IgM 抗体的交叉反应水平,发现与 HTNV-rNP 的反应性无显著差异;而 PUU 型核抗原对 HTN 型血清的 IgG、IgA 抗体交叉反应均很低(图 2、图 3)。比较急性/恢复期 IgG、IgA 抗体交叉反应变化,发现 HTN 型血清与 PUUV-rNP、DOBV-rNP 的交叉反应在恢复期均更明显。

表 2 抗 HV-rNP IgA, IgG, IgM 抗体阳性标本数

Tab 2 Number of samples with detectable IgA, IgG, and IgM antibodies against rNP of different hantavirus

Samples form HFRS patients	PUUV-Vra	PUUV- Kaz	PUUV-Sot	DOBV-Slo	DOBV-Slk	HTNV-Foj
IgG (Acute)	5/34	7/34	11/34	25/34	23/34	27/34
IgG (Convalescent)	11/34	15/34	22/34	31/34	32/34	34/34
IgA (Acute)	20/34	25/34	24/34	32/34	34/34	31/34
IgA (Convalescent)	26/34	28/34	28/34	33/34	34/34	31/34
IgM (Acute)				28/34		28/34

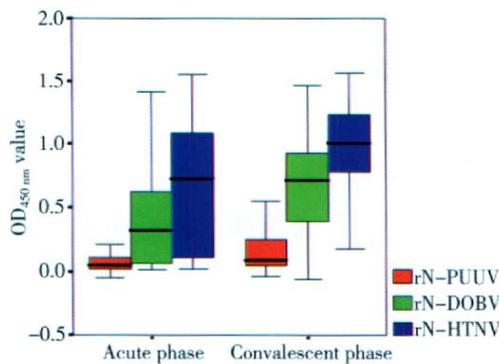
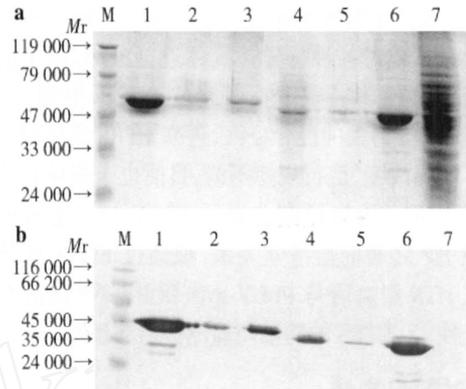


图 2 HTN 型血清中 IgG 抗体与各种重组核蛋白抗原的交叉反应

Fig 2 Increase of cross-reactivity of serum IgG with different phases after onset of HFRS



1) Yeast-expressed purified rN proteins of PUUV-Vra; 2) PUUV-Kaz; 3) PUUV-Sot; 4) DOBV-Slo; 5) DOBV-Slk; 6) HTNV-Foj; 7) Crude lysates of pFX7-His6-transformed yeast cells

图 1 SDS-PAGE/Western blot 分析

HV His-tagged rN 蛋白纯度

Fig 1 Analysis of the purified rN proteins of different hantavirus strains by SDS-PAGE (a) and immunoblotting using a His-tag specific mAb (b)

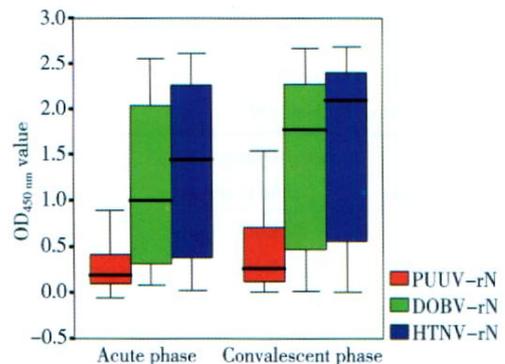


图 3 HTN 型血清中 IgA 抗体与各种重组核蛋白抗原的交叉反应

Fig 3 Increase of cross-reactivity of serum IgA with different phases after onset of HFRS

3 讨论

HV 核蛋白上存在很多交叉抗原位点,能引起不同血清型间广泛的血清学交叉反应,适于进行血清学研究^[7]。采用 Sasnauskas 等人构建的 *S. cerevisiae* 系统表达 HV NP 全长片段,经诱导异源性蛋白质表达后的酵母裂解物中无或仅有痕量蛋白质降解且纯度高,将之应用于 HFRS 患者血清学研究,效果理

想。鉴于 ELISA 反应特异性不足,易产生假阳性,研究中选用同一血清型中几个代表株对不同病期标本进行平行检测,并严格限定阳性标本判定标准,取得了稳定、可靠的结果。

目前,国内外关于 HTNV 与 PUUV、DOBV 血清学交叉反应的研究尚属空白,该文对此进行了探索性研究。研究中发现 6 份急性期血清抗 HTNV-Foj 重组核抗原 IgM 抗体阴性。分析原因,一方面,标本筛

选抗原为 HTNV76-118、HV 114 和 A9 株混合抗原,其抗原性和灵敏度可能较 HTNV-F0j 株重组核衣壳蛋白抗原强,导致阴性结果;另一方面,6 份急性血清均在发病后 2~4 日内收集,且其对应恢复期血清中 IgG 和 IgA 抗体的检测均为阳性,因此可能是疾病早期 IgM 抗体还未产生或者效价不高所致。

与以往报道一致,湖北地区 HTN 型血清与 DOBV 重组核抗原的交叉反应性明显高于 PUUV 重组核抗原。血清学研究表明,HV 不同血清型间存在广泛血清学交叉反应,尤其在 HTNV/SEOV/DOBV 群间和 PUUV/PHV/TULV/TOPV 及 SNV/ANDV 样病毒群间^[8]。由于 PUUV 与 HTNV 不同群,因此血清学交叉反应较少发生。

实验表明,PUUV-rNP 与 DOBV-rNP 对 HTN 血清中 IgG 和 IgA 抗体交叉反应在恢复期均显著升高。该结果对 HTNV 血清学研究有重要意义。在临床上标本多在感染早期采集,此阶段低水平的交叉反应利于早期诊断;另一方面在血清流行病学研究中多采用恢复期病人血清,而此阶段交叉反应较多,给标本分型和其它血清学研究带来困难,也提示在分析和下结论时须更谨慎。但这种现象的机制尚不清,可能与疾病发展不同阶段病毒核衣壳上抗原表位暴露程度有关。感染早期病毒核衣壳上的同源性抗原表位比交叉反应性表位暴露得更为有效;另一方面也与抗体的亲和力成熟有关。已有学者证明在 PUUV 感染过程中,IgG 抗体对抗原亲和力随病情进展增加^[9]。

与其他报道不一致的是,研究中发现 HTNV 感染者血清中 IgA 抗体交叉反应性在恢复期显著增高。Elgh 等发现 PUUV 感染患者血清中 IgG 抗体交叉反应随病程进展显著增加,但 IgA 抗体交叉反应无显著改变^[10]。HTNV 引起的疾病以出血为主,症状严重,而 PUUV 引起的疾病症状较轻甚至无明显症状。这提示机体对 HTNV 和 PUUV 感染的体液免疫反应有差异,这种差异是否与疾病形式及严重程度有关值得进一步研究。收集更多不同时间段的 HFRS 患者血清,对血清中抗体水平进行多阶段、长时间的跟踪观察将有助于更好地阐明这个问题。

致谢:感谢德国 Friedrich-Loeffler 研究所 Dr. Ulrich 及立陶宛维尔纽斯生物技术研究所 Dr.

Sasnauskas 对本研究给予的支持与帮助。

[参考文献]

- [1] Wei CB, Tang JQ. Studies on genotyping of HFRSV isolates in China by RT-PCR/RHLP[J]. *Develop Reprod Biol*, 2001, 10(1): 37-44.
- [2] 刘京梅,李泉根,李新军. 以汉坦病毒重组核衣壳蛋白为抗原进行 ELISA 血清分型的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 13(3): 269-299.
- [3] 刘刚,李川,扈光伟,等. 在中国发现普马拉型汉坦病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(1): 55-57.
- [4] Li Q, Yang ZQ, Qu H, *et al.* Variability of G1 gene of hantaviruses occurring in the Hubei province, P. R. China from 1985 to 2000[J]. *Acta Virol*, 2005, 49(1): 51-57.
- [5] Dargeviciute A, Sjolander KB, Sasnauskas K, *et al.* Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model [J]. *Vaccine*, 2002, 20(29/30): 3523-3531.
- [6] Razanskiene A, Schmidt J, Geldmacher A, *et al.* High Yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biotech*, 2004, 111(3): 319-333.
- [7] Lundkvist A, Kallio-kokko H, Lankine H, *et al.* Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity[J]. *Virology*, 1996, 216(2): 397-406.
- [8] Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, *et al.* Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(5): 1122-1130.
- [9] Hedman K, Vaheri A, Brummer Korvenkontio M. Rapid diagnosis of hantavirus disease with an IgG avidity assay[J]. *Lancet*, 1991, 338(8779): 1353-1356.
- [10] Elgh F, Linderholm M, Wadell G, *et al.* Development of humoral cross-reactivity to the nucleocapsid protein of heterologous hantaviruses in nephropathia epidemica [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998, 22(4): 309-315.

(编辑 李海鸥)