

明了方向。行为监测不仅对高危人群非常有效,对脆弱人群和一般人群更可以提前揭示艾滋病流行的潜在威胁。

我国目前艾滋病虽然尚处于低流行的阶段,但是随着经济的进一步发展,各种不良的社会现象也

会沉渣泛起而逐渐增多,如吸毒、卖淫、嫖娼等,伴之而来的就是艾滋病传播的危险性逐渐加大。因此我们面对的将是一个艾滋病挑战压力越来越大的社会环境,对艾滋病的战斗将会越来越激烈。

(收稿:1999-01-20 修回:1999-06-10)

汉坦病毒核壳蛋白重组抗原的制备和基因分型研究

唐家琪 操敏 王长军 雷万里 魏春宝 叶春燕

根据肾综合征出血热病毒(HFRSV)抗原检测、分型和流行病学目前还存在许多待解决的问题,研制了HFRSV的核衣壳基因工程抗原,建立了逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和逆转录-聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(RT-PCR-RFLP)分型方法。

根据HFRSV汉滩型(HTN)代表株76-118S片段cDNA序列,用引物1(5'-atg cat gcg gcc gct acc atg g NcoI ca act atg gag g-3')与引物2(5'-gat ctg cga ctt aga Sall tct aga gtt tca aag gct c-3')扩增了全长S基因片段;引物1与引物3(5'-t gtg cga ctc ttc tgc ctt cat gct- Sall 3')扩增了S基因N端的部分片段,并将它们克隆至强启动子T7表达载体pISAP和pEt-28a中,分别进行融合表达和非融合表达。对诱导表达产物进行SDS-PAGE分析显示,全长S基因片段及部分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 50×10^3 和 22×10^3 ,融合表达产量分别约为16%和20%,分子量分别约为 64×10^3 和 37×10^3 。Western blot结果显示,两种非融合表达产物均能与6份患者血清及抗衣壳蛋白单克隆抗体5H5反应,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。以非融合表达的两个S基因片段产物作为间接ELISA的包被抗原,其工作浓度均高达1:1000,有望替代天然抗原用于HFRSV抗原、抗体检测。研究中还对全长S基因表达产物(50×10^3 分子量)和N端部分S基因($37 \sim 612$, 22×10^3 分子量)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在N端,所以 22×10^3 小分子量抗原可以替代完整S片段抗原。 22×10^3 小分子量抗原,表达量相对

较高,更适于抗原的制备。

根据HTNV76-118株及汉城型(SEOV)R22株M片段cDNA序列,选取同源性较高的G1区设计引物4(5'-gca tca gtg aag cct tt c-3'),引物5(5'-gca gat gtg ccc aac cat g-3'),建立了RT-PCR,检测我国不同地区由8种主要宿主分离的37份HFRSV毒株,2份阳性标准对照毒株和5份阴性对照标本。RT-PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行分析,显示39份毒株标本中,36株(含HTNV76-118株和SEOVR22株)扩增出299bp的目的DNA条带,余3株标本(A1018、HU、B9)未见特异性扩增条带。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。将此结果与eELISA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%,其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eELISA更适用于分子流行病学调查。

在20个毒株的型特异性基因所在的M片段G1区选择扩增片段,在扩增片段中选择两种酶切位点进行二级酶切建立了RT-PCR-RFLP分型法。一级酶切用Rsa I将毒株分为HTN型、SEO型和未定型;二级酶切用Hind III从未定型毒株中分出部分HTN型。结果被定为HTN型的9株(76-118、C4、LR1、A9、A537、Chen、A16、H5、B5),SEO型的8株(R2、R27、L99、S45、HR54、R22、Hubei、HB55),余3株(R178、鲁胎、鲁姚)未能定型。该法流程简单,分型率较高,结果也比较可靠。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%。鉴于RFLP法分型率高,操作简便,所以有较好的应用前景。

(收稿:1999-02-25)