

用标记分析法对我国海南地区登革 2 型病毒株的抗原表位分析

杨佩英 司炳银 阎国珍 徐品芳 李瑞霞

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

用标记分析 (signature analysis) 法了解我国海南地区 3 年 (1985—1987) 来流行的登革 2 型 (DEN-2) 病毒株的抗原性变化。用 3 种单克隆抗体 (McAb), 包括黄病毒属特异、亚属特异和登革 2 型型特异, 分析了 8 个 DEN-2 病毒流行株, 并与标准株新几内亚 B 株进行比较。通过统计分析和微机处理, 发现 8 株中有 5 株与标准株类似, 有 3 株显示出明显差异。标记分析法为病毒抗原性分析提供了一个高度敏感的方法, 并可用于监测一个地区病毒种群的变化及新株的引入。

关键词 登革 2 型病毒; 标记分析; 单克隆抗体

近年来, 我国广州、海南等地连续发生登革热流行。为进一步了解, 阐明我国登革 2 型病毒流行来源及传播途径等问题, 为登革热的预防控制提供依据。我们对近三年来 (1985—1987) 我国海南地区流行登革 2 型病毒部分毒株进行了抗原性分析。用普通血清学方法不能检测病毒抗原表位 (epitope) 上的细微变化, 本试验采用标记分析法^[1], 用单克隆抗体对海南地区登革 2 型病毒株进行了表位分析, 现将结果报告如下。

材料与 方法

(一) 病毒株

本室于 1985—1987 年 3 年内在海南地区分离的登革 2 型病毒 8 株, 标准株为新几内亚 B 株, (表 1)。所分析的病毒株均在 C₁/36 传代 3 次。5% 小牛血清的 DMEM 作为标记分析用感染细胞培养液, 33℃ 培养 3—4d 后收获病毒培养液, 补加小牛血清至 10%, 调 pH 到 8.0, 分装后于 -20℃ 或 -70℃ 保存备用。

(二) 单克隆抗体

本室于 1984 年制备的登革 2 型单克隆抗

体^[2](表 2)。

(三) 羊抗鼠 IgG 碘标记

羊抗鼠血清用硫酸铵沉淀后经蛋白 A 亲和层析柱进一步纯化。然后用 lodogen 法^[3]标记¹²⁵I, 经 G50 柱去除游离碘。收集第一峰为¹²⁵I 标记羊抗鼠 IgG 峰。

(四) 放射免疫测定

间接固相放射免疫法^[4], 将病毒培养液作 10 倍系列稀释 (10⁻¹—10⁻⁷), 每个稀释度取 100 μl 加在塑料板孔内, 双孔, 4℃ 过夜, 冲洗后加 McAb, 37℃ 2h, 冲洗, 再加¹²⁵I 羊抗鼠 IgG 100 μl (10 万 cpm) 37℃ 2h, 然后测定每孔 CPM 值。同时设有正常腹水对照。

(五) 数据统计分析

将三种 McAb 与 8 个病毒流行株及一个标准放射免疫测定结果进行微机统计处理, 每个毒株阳性 CPM 平均值/阴性腹水 CPM 平均值为 S/N。以 Log S/N 为纵坐标, 以稀释度对数为横坐标作结合曲线, 以最小叠代平方法估算 S/N 与病毒稀释倍数的关系^[5], 按微机程序加以统计处

本文于 1988 年 3 月 18 日收到。

本文统计部分由张学忠副教授协助; 论文经黄志尚教授审阅, 特此一并致谢。

国家自然科学基金资助的课题。

表 1 登革 2 型病毒株
Table 1 Dengue-2 virus strains

毒 株 Virus strains	来 源 Source	年 代 Year	地 区 Location
新几内亚 New Guinea B	病人血清 Dengue patient's serum	1944	新几内亚 New Guinea
85-2	"	1985	Hainan province, China
85-5	"	1985	"
85-04	Dengue patient's serum	1985	"
85-10	"	1985	"
86-45	"	1986	"
86-47	"	1986	"
87-1	"	1987	"
87-6	"	1987	"

表 2 抗登革-2 型病毒单克隆抗体
Table 2 Monoclonal antibodies against dengue-2 prototype strain

McAb	特 异 性 Specificity	免疫荧光效价* Immunofluorescence titer of McAb				
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	JBE
2F10	属特异 flavivirus group	2560	5120	1280	1280	1280
2B11	亚属特异 subcomplex	<10	2560	<10	>40	<10
2B8	型特异 type	<10	40960	<10	<10	<10

* 单克隆抗体最高稀释度的倒数。
Reciprocal of McAb highest dilution

理并作图,如两株病毒结合曲线重迭表示有同样的抗原表位,如果岔开表示在量上和质上有区别。

结 果

用黄病毒属特异、亚属特异、登革 2 型型特异 3 种 McAb 分析 8 株我国海南地区近 3 年来流行的登革 2 型病毒所获得的初步结果(图 1、2)说明,8 株中有 3 株与标准株出现不同程度的差异,即 1985 年 85-04 株(人株)、85-5(蚊株)及 1987 年 87-1(人株),其中 85-04 株在属特异、亚属特异、型特异 3 种抗原表位均与标准株有明显差异,85-5 株在属特异、型特异两种表位上有差异,亚属特异表位则类似。87-1 株在

亚属特异、型特异两种表位上有差异,属特异表位则与标准株类似。上述有差别的 3 株中,85-5 株差别更为明显,说明蚊株比人株差异更显著。其它 5 个毒株(85-2、86-45、86-47、85-10、87-6)均系人株,均与标准株类似。

讨 论

常规血清学方法可比较不同病毒株在生物学性质上的差别,但不能检测病毒抗原表位上的变化。标记分析技术不仅简便、快速,而且可在分子水平上定量检测病毒抗原表位上的变化。这种技术可用来

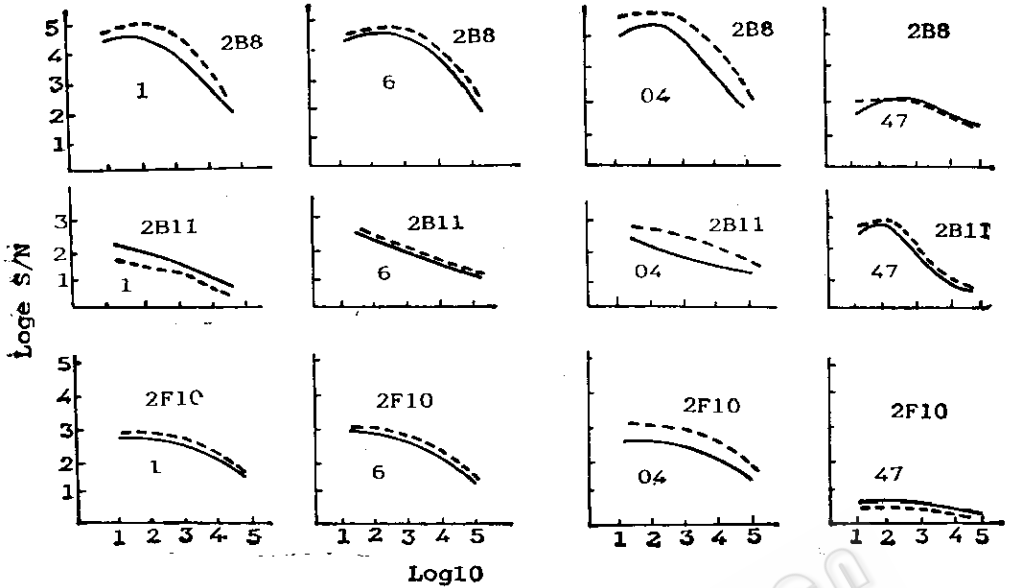


图1 DEN-2 87-1、87-6、85-04、86-47 与标准株(——)的比较

Fig. 1 DEN-2 87-1, 87-6, 85-04 and 86-47 strains were compared with prototype strain (——)

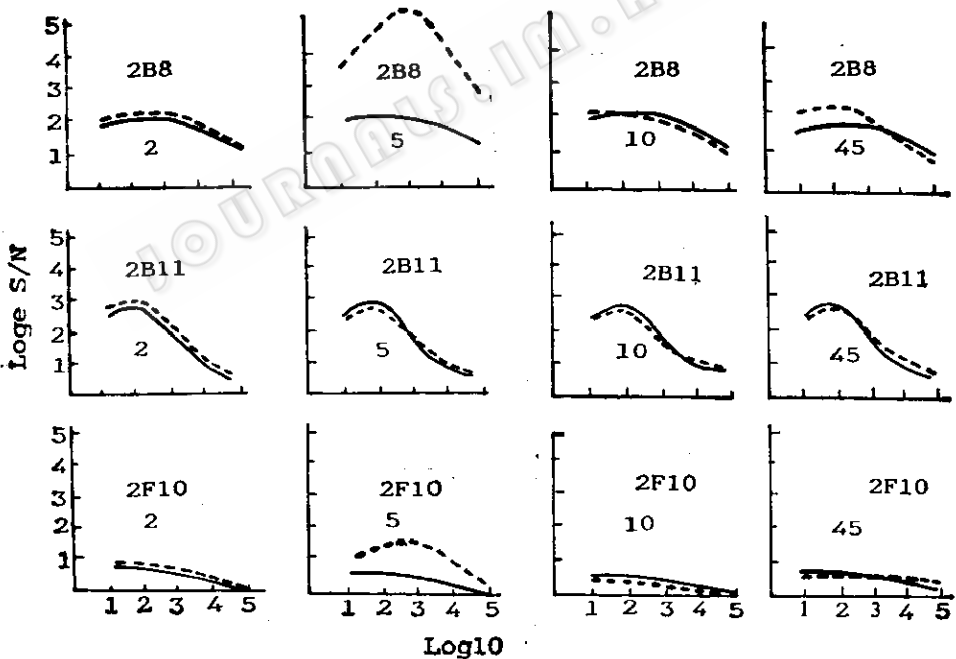


图2 DEN-2 85-2、85-5、85-10、86-45 株与标准株(——)比较

Fig. 2 DEN-2 85-2, 85-5, 85-10 and 86-45 strains were compared with prototype strain (——)

监测一个地区病毒株群的变化及新的毒株的引入, 一个新病毒株引入易感人群或病毒株发生抗原漂移均可引起一个地区易感

人群发生流行。因此, 人们注意力集中在病毒群的变化。登革病毒属于 RNA 病毒, 如病毒基因组的一个核苷酸发生变化,

病毒表型可以发生改变。这种改变用普通血清学方法难以检测。而用标记分析技术则可以监测登革病毒基因演变及抗原漂移。

本试验用此技术分析了我我国海南地区登革 2 型病毒的抗原性, 并与标准株新几内亚 B 株进行比较, 发现 3 株与标准株有明显差异。有的表现在属特异表位上的变化, 如 1985 年 85-5 (蚊株) 两个表位与标准株差异明显, 而人株 85-04 三个表位差异较小, 85-2 85-10 两株则无差异。可能这两株近似于标准株。而 1986 年的 86-45 和 86-47 两个人株中, 似乎又开始在一个表位上出现细微的改变。1987 年人株 87-6 无变化, 而 87-1 株则出现二个表位上的差异。按标记分析法原理来判断, 有迹象表明, 自 1985 年起在人体中适应后一方面有与标准株抗原缩小差异的情况, 但

随着时间的推移, 由于基因变异而又有发生并扩大差异的倾向。这些数据为我们在当地进行登革热预防具有一定的参考价值, 这些差异的原因是由于当地流行毒株发生抗原漂移, 还是由旅游者携带而从国外传入我国的新毒株所致, 目前尚不清楚, 还须继续深入研究。如能引进国外毒株, 特别是东南亚国家如缅甸、泰国、马来西亚, 新加坡等国的毒株进行比较, 对分析我国登革热流行来源及提出预防措施具一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Monath, T. P. et al.: *Virology*, **154**: 313—324, 1986.
- [2] 辛颜彬等: 军事医学科学院院刊, **10**(1): 59—61, 1986.
- [3] Fraker, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**: 849—857, 1987.
- [4] 杨佩英等: 军事医学科学院院刊, (5): 509—511, 1983.

ANTIGEN SIGNATURE ANALYSIS OF DENGUE-2 VIRUSES STRAINS IN HAINAN CHINA

Yang Peiying Si Bingyin Yan Guozhen
Xu Pinfang Li Ruixia

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

In this paper, we try to define the extent of antigenic variation between dengue-2 viruses from Hainan province, which had been isolated over a period of 3 years (1985—1987). The dengue-2 viruses were compared with the prototype New Guinea B strain and were subjected to antigen signature analysis. Eight strains of dengue-2 virus were analyzed by three monoclonal antibodies: flavivirus group, subcomplex dengue-2 type-specific reactive epitopes, over a range of antigen concentration.

Five out of eight dengue-2 virus strains showed them to be antigenically homogeneous,

and the remaining three strains showed them to be heterogeneous.

Signature analysis provides a rapid and simple means to different strains derived from different sources, thus permit monitoring changes or introductions of new dengue virus populations in certain geographic region.

Key words

Dengue-2 virus; Signature analysis; Monoclonal antibodies