

## 逆转录聚合酶链反应检测 II 型登革病毒基因

王飞 李刚 郭日波 柯伟民 罗慧容\* 疗育煌\*

(中山医科大学传染病学教研室, 广州 510630)

R373.33

## 提 要

本文应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测 II 型登革病毒基因。所设计引物在 E 基因区, 引物 1 位于碱基序列的 1566—1586, 引物 2 位于 1437—1458。引物在黄病毒属中为 II 型登革病毒特有, 它是 II 型各株保守区。反应产物为 150bp, 内含一个 Hind III 酶位点, 酶切后有 111bp 和 39bp 两个片段。使用本法对一系列稀释的培养液进行检测, 可检出少至 5TCID<sub>50</sub> 的病毒 RNA。此外还检测了 10 份经病毒分离与免疫荧光分型证实为 II 型登革热病人的血清和 14 份疑似 II 型登革热病人但病毒分离阴性的急性期血清。证明本法敏感性明显高于病毒分离。

**关键词:** II 型登革病毒 逆转录 聚合酶链反应

目前登革热的临床和流行病学诊断主要依靠病毒分离及血清学, 但均不能用于快速早期诊断, 敏感性和特异性有待提高。最近, 采用特定基因扩增的方法在病毒学的研究有大量报道。但在登革病毒方面, 国内仍未见用于临床标本检测的研究报道。因此, 我们在建立将登革病毒 RNA 逆转录为 cDNA 再进行聚合酶链反应的方法基础上, 对 II 型登革病毒培养液及血清进行了检测, 并与病毒分离比较, 证明此法更具有敏感性, 可用于临床及流行病学的快速早期诊断。

## 材 料 与 方 法

1. **病毒及血清** 登革病毒标准株 I 型 (Hawaii)、II 型 (New Guinea)、III 型 (H87) 和 IV 型 (H-241) 及乙脑病毒分别感染 C6/36 细胞单层, 细胞病变达 1 卅时收集培养液, 并滴定 TCID<sub>50</sub>, -20℃ 保存。血清采自海南省琼山县石山镇 1988 年 8 月登革热流行的病人, 共 24 份, 均在发病 6 日内采血。其中 10 份血清经病毒分离和免疫荧光分型证实为 II 型登革病毒感染。14 份血清病毒分离阴性。I、IV 型登革热血清采自 1990—1991 年广州地区登革热病人。血清存于 -20℃ 以下备用。

2. **试剂** RNasin、AMV 逆转录酶、dNTP、DNA 分子量 Marker、Hind III 均购自华美公司。蛋白酶 K 由 Merck 公司提供。Taq DNA 聚合酶购自复旦大学遗传所。两个引物分别为 21bp 及 22bp。

本文于 1992 年 7 月 14 日收到, 12 月 10 日修回。

\*广州市卫生防疫站。

由上海细胞生物研究所合成。见图1。

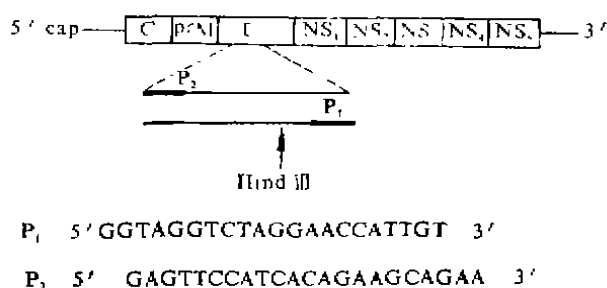


图1. 所用引物位置、序列和酶切位点

Fig 1. The locations and sequences of primers used and the site of Hind III

3. 病毒RNA的提取<sup>[1]</sup> 培养液或血清100 $\mu$ l加入SDS、蛋白酶K在56 $^{\circ}$ C消化1h。加入二巯基乙醇后常规酚、氯仿抽提三次, 上清在无水乙醇及醋酸钠中-20 $^{\circ}$ C沉淀12h, 10000r/m离心30min, 倒出液体后抽干, 加20 $\mu$ l双蒸水溶解。

4. cDNA合成 反应混合物含RNA5 $\mu$ l, 0.5mmol/LdNTP5 $\mu$ l, RNasin40u, AMV逆转录酶10u, 引物1(P<sub>1</sub>)500ng, 5 $\times$ buffer10 $\mu$ l, 加双蒸水至总体积50 $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C反应1.5h。

5. cDNA扩增 反应混合物含上述混合液10 $\mu$ l(内含cDNA), 0.5mmol/LdNTP5 $\mu$ l, P<sub>1</sub>100ng, P<sub>2</sub>(引物2)500ng, 5 $\times$ buffer10 $\mu$ l, 加双蒸水至50 $\mu$ l。95 $^{\circ}$ C10min, 加入Taq聚合酶2u, 在55 $^{\circ}$ C1min、72 $^{\circ}$ C45sec、92 $^{\circ}$ C15sec循环30次。最后延伸在72 $^{\circ}$ C10min。

6. 酶切 PCR产物经常规酚、氯仿抽提后沉淀、溶解。Hind III酶消化1h(37 $^{\circ}$ C)。

7. 产物分析 取PCR产物及酶切后产物10 $\mu$ l在含有溴化乙锭的2%琼脂糖中电泳, DNA分子量标准作Marker, 在紫外灯下观察, 照相

## 结 果

1. 引物设计 采用计算机程序, 输入登革I型<sup>[2]</sup>、登革II型4个株<sup>[3-4]</sup>、登革III型<sup>[5]</sup>、登革IV型<sup>[4]</sup>、乙脑病毒<sup>[7]</sup>、黄热病毒<sup>[8]</sup>、Murray Valley脑炎病毒、蜱传脑炎病毒、及丙型肝炎病毒2个株的核苷酸序列。选出II型所特有, 但对II型各株则保守的寡核苷酸作为引物, P<sub>1</sub>与登革II型RNA E基因3'端第1566—1586碱基序列互补, 用于启动逆转录及cDNA扩增。P<sub>2</sub>位于E基因5'端1437—1458, 用于cDNA扩增。两个引物GC对适宜, 计算机分析无二级结构。产物为150bp, 内含一限制性内切酶Hind III的位点, 酶切后有111bp和39bp两个片段, 用于鉴定扩增产物是否为预定片段。

2. 特异性 登革II型培养液及血清有明显的预定条带。产物经酶切后亦可见一条约111bp的条带, 另一片段因碱基对少不能观察到。结果与设计相符。用登革病毒I、III、IV型, C6/36细胞, 乙脑病毒培养液及登革热I、IV型, 乙型脑炎、丙型肝炎血清作对照试验(缺III型登革热血清), 均未见预定条带。见图版II 2。

表 1. 逆转录聚合酶链反应与病毒分离的敏感性比较  
Table 1. Comparison of the sensitivity of RT-PCR with that of viral isolation

		逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)	
		+	-
病毒分离	+	10	0
Viral isolation	-	10	4

$P < 0.01$

阴性者有10份用 RT-PCR法检测为阳性, 4份阴性。见表1。经配对卡方检验,  $P < 0.01$ , 两种方法有显著差异。

4. 重复性 对14份病毒分离阴性血清, 重复一次RT-PCR, 所得结果相同。

图 2. 病毒培养液的扩增产物和酶切片段(图见后)

Fig 2. Amplification products and digest-d fragments of culture supernatants, RNA from dengue 1 (lane 1), dengue 3 (lane 2), dengue 4 (lane 3), Japanese encephalitis (lane 7), c6/36 cell (lane 8) were not amplified. Marker of DNA size (lane 5). Amplified products of dengue 2 virus (lane 6). Fragments from digestion of Hind III (lane 4).

图 3. RT-PCR检测登革Ⅱ型血清的特异性

Fig 3. Specificity of RT-PCR on detection of dengue 2 serum. Marker of DNA size (lane 1). Amplified product of dengue 2 serum (lane 2). Dengue 1, Dengue 4 and Japanese encephalitis serum, respectively (lane 3-5).

图 4. 不同滴度登革Ⅱ型病毒 RNA 的扩增

Fig 4. Amplification of viral RNA from different tirste of dengue 2 virus. Marker of DNA size (lane 1). Amplified products of dengue 2 culture supernatants diluted by 1 (lance 2),  $10^1$  (lane 3),  $10^2$  (lane 4),  $10^3$  (lane 5),  $10^4$  (lane 6),  $10^5$  (lane 7),  $4 \times 10^5$  (lane 8), respectively.

## 讨 论

目前病毒分离和血清学是登革热病原学诊断的主要手段, 但由于病毒分离率低及交叉抗体的存在, 具有一定的局限性。另外, 这些方法工作量大, 不能用于快速早期诊断。现已有人采用RT-PCR进行登革病毒的研究<sup>[9-10]</sup>, 但在国内未见其用于登革热临床标本检测的报道。我们在建立方法学的基础上, 还对24份血清进行检测, 与病毒分离的结果一致, 但敏感性大大提高, 在14份病毒分离阴性的血清中, 有10份RT-PCR法阳性。

考虑到Ⅱ型登革病毒基因与Ⅰ型的同源性较大, 易于找到系列相同的寡核苷酸, 我们设计的 $P_1$ 为登革Ⅰ、Ⅱ型共有,  $P_2$ 则各不相同, Ⅰ、Ⅱ型扩增产物分别为240bp和150bp。用琼脂糖电泳即可鉴别。实验证明, 此设计并不影响RT-PCR的特异性和敏感性。在临床应用时则更经济、更方便实用。

病毒RNA在提取和逆转录过程中易遭到核酸酶的破坏, 实验中除严格无核酸酶操作外, 我们设计的反应产物长度较短, 在相应的RNA片段被机械或核酸酶裂解的机会更

少, 可避免出现假阴性。

我们用RT-PCR检测病程第10天后的恢复期血清, 结果为阴性。因病毒血症仅出现在病程早期, RT-PCR主要适用于检测发病早期病人血清。本法所用血清只需100 $\mu$ l, 无需双份。我们所用血清采自1988年8月登革热流行期的病人, 由于保存得好, 4年后仍可检出病毒的RNA, 故本法可用于流行病学回顾性调查。

RT-PCR不仅具有高度的特异性和敏感性, 而且在2天内可出结果, 方法简便, 能分型。为临床和流行病学诊断提供了一种有效的手段。

### 参 考 文 献

- (1) Maniatis, T, et al., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.
- (2) Mason, P.W, et al., 1987, *Virology*, 161: 262-267.
- (3) Irie, K, et al., 1989, *Gene*, 75: 197-211.
- (4) Hahn, Y.S, et al., 1988, *Virology*, 162: 167-180.
- (5) Kiyoshi, O, et al., 1990, *Virology*, 176: 643-647.
- (6) Bangti Zhao, et al., 1986, *Virology*, 155: 77-88.
- (7) Hideo, S, et al., 1987, *Virology*, 161: 497-510.
- (8) Rice, C.M, et al., 1985, *Science*, 229: 726-733.
- (9) Vincent, D, et al., 1990, *J. Virol. Methods*, 30: 41-54.
- (10) 秦鄂德等, 1991, *中华微生物学和免疫学杂志*, 11(5): 324-326.

## Detection of Dengue Virus 2 Genome by Reverse Transcription—Polymerase Chain Reaction

Wang Fei    Li Gang    Guo Ribo    Ke Weimin  
Luo Huirong\*    Liao Yuhuang\*

(*Department of Infectious Diseases, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630*)

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed for the detection of dengue virus 2 genome. Two primers specific for dengue virus 2 and conservative between geographical variants bracketed a 150 nucleotide base in the E gene, corresponding to bases 1437—1586 in the dengue 2 genomic RNA sequence. After digested with Hind III, the products of the reaction was divided into two fragments, 111bp and 39bp, respectively. The amplified products and digested fragments were shown in the ethidium bromide stained 2% agrose gel. RT-PCR can detect dengue viral RNA from at least 5 TCID<sub>50</sub> virus. It is more sensitive and rapid than viral culture, which was justified by 24 sera.

**Key words,** Dengue virus 2    Reverse transcription    Polymerase chain reaction

\* Guangzhou Health and Anti-epidemic station, Guangzhou.