

嵌套式 PCR 法分型检测登革病毒基因^①

方美玉^{1,②} 陈火胜² 陈翠华¹ 郭辉玉²

(1 广州军区军事医学研究所,广州,510507 2 中山医科大学微生物教研室)

提 要 应用一对通用引物同时扩增 4 个型登革病毒(DEN)的 NS1 基因部分片段,然后采用嵌套式聚合酶链反应(PCR)方法对 DEN 进行分型鉴定。通用引物扩增基因序列长度为 413bp; DEN 各型内引物扩增序列长度分别是: DEN1 型为 262bp; DEN2 型为 189bp; DEN3 型为 392bp; DEN 4 型为 97bp。应用嵌套式 PCR 法直接分型检测登革热患者血清标本 21 份,发现 DEN 1 型阳性 18 份, DEN 2 型阳性 2 份。该法能在 2d 内完成对 DEN 的分型鉴定,为登革热的早期快速诊断提供了可靠的方法。

主题词 聚合酶链反应; 登革热病毒/分析; 核糖核酸; 病毒/化学合成; 基因, 病毒

中图分类号 R373.33

DEN 属黄病毒科,该病毒感染可引起登革热、登革出血热和登革休克综合征。全世界每年有上千万病例。从 1978 年以来,我国广东、广西和海南省也陆续发生较大流行,死亡病例不断发生。为了 DEN 的早期快速诊断和病毒分子生物学的研究,我们进行了逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增登革病毒核酸的研究,并进一步用嵌套式 PCR 法对 DEN 1~4 型作分型鉴定。

我们在黄病毒基因组 NS 1 基因序列设计了一对通用引物,在 DEN 1~4 型的 NS 1 基因序列设计了各型的内引物^[1~4]。采用改良的碘化钠法^[5]提取病毒 RNA。应用 RT-PCR 扩增 DEN 1~4 型 NS 1 基因部分片段,然后应用嵌套式 PCR 鉴定 DEN 型别,并对登革热患者血标本进行了分型检测。现将实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒

DEN 1~4 型参考株由日本 Akira Igarashi 教授赠送;乙型脑炎病毒(JEV)为日本中山株,本实验室保存。1 株国内 DEN 1 (GZ)于 1991 年登革热流行时广州分离。甲病毒代表株辛德毕斯病毒(SIN)为军事医学科学院赠送。各毒株感染 C₆/36 细胞单层,病变明显时收获,-70℃保存。正常 C₆/36 细胞上清同样处理冻存作为阴性对照。

1.2 病毒 RNA 的提取

采用碘化钠法进行改良后提取病毒液或血清标本中的 RNA。首先用含异硫氰酸胍和碘化钠溶液与病毒液或血清标本混匀,再加入氯仿、异戊醇,离心后取含 RNA 水相,然后用异丙醇沉淀核酸,以乙醇洗沉淀,最后以 TE 缓冲液溶解后冻存备用。

1.3 血清标本

1991 年广州市登革热流行时收集患者发病 2~7d 的血标本 21 份,-70℃冻存备用。

① 卫生部医学重点科技项目基金资助课题;

② 第一作者为国内访问学者,1945 年出生,女,副研究员

1.4 引物

根据文献报道黄病毒序列资料分析,在其 NS 1 基因序列设计了一对通用引物见表 1, DJS(+)和 DJA(-)均为 17 个碱基,扩增序列长度为 413 bp。在 NED 1~4 型 NS 1

基因设计了各型的内引物见表 2。各型一条内引物分别与通用引物的 DJA 引物配对,形成一对内引物。内引物分别为 17 个碱基,扩增序列长度分别是 DEN 1 为 262bp, DEN2 为 189bp, DEN 3 为 392bp, DEN 4 为 97bp。

表 1 黄病毒通用引物序列和 PCR 产物

引物	位置	碱基序列(5'-3')	GC(%)	PCR 产物
DJS(+)	NS1	GACATGGGGTATTGGAT	47	413bp
DJA(-)	NS1	TCCATCCCATACCAGCA	53	

表 2 登革病毒内引物序列和嵌套式 PCR 产物

病毒	位置	碱基序列(5'-3')	GC(%)	PCR 产物
DEN1	NS1	ATGGAGGACCAATATCT	41	262bp
DEN2	NS1	GTAAGCTTGAGATGGAC	47	189bp
DEN3	NS1	AGCCAAAAGAATGGAAG	41	392bp
DEN4	NS1	CTGCATCTGGAAAATA	41	97bp

1.5 RNA 逆转录

病毒 RNA 逆转录按试剂盒(kit)说明书进行。在反应管内加入:10×缓冲液 2μl, 25mmol/L MgCl₂ 4μl, 10mmol/L dNTP 2μl, DJA 引物 4μl, 提取的 RNA 10μl, rRNA sim 和 AMV 逆转录酶各 0.5μl, 混匀 42℃保温 45min, 95℃加热 5min, 置-20℃备用。

1.6 嵌套式 PCR

按 FDDK-1 DNA 扩增 kit 说明书操作,对 DEN 基因进行两次 PCR。首先应用通用引物进行第一次酶促扩增,然后应用内引物进行第二次扩增。两次 PCR 循环:93℃ 40s, 55℃ 45s, 72℃ 60s, 分别为 30 次。

1.7 试剂

逆转录 kit 为 Promega 公司产品; PCR kit 由复旦大学科技开发总公司提供。异硫氰酸胍为华美生物工程公司产品。限制性内切酶 *Bst*N I 购自北京中国协和和医院友谊公

司。

1.8 PCR 产物电泳及酶切分析

配制含溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶。取 10μl PCR 产物电泳,在透射式紫外发生仪上观察并照相记录实验结果。DEN 1~4 型 PCR 产物提取后以 *Bst* N1 40℃酶切 2h, 然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 通用引物扩增 DEN 1~4 型的结果

应用黄病毒通用引物扩增 DEN 1~4 型,可观察到一条明显的扩增带,其扩增基因片段的大小与设计片段相符,约 413 bp。该通用引物扩增国内分离株 DEN 1(GZ)和 JEV 中山株也有一条明显的荧光带,扩增片段大小均为 413 bp 左右。甲病毒的 SIN 应用通用引物酶促扩增后无特异性条带;正常 C₆/36 细胞采用该引物检测也无条带。上述

结果见图1。

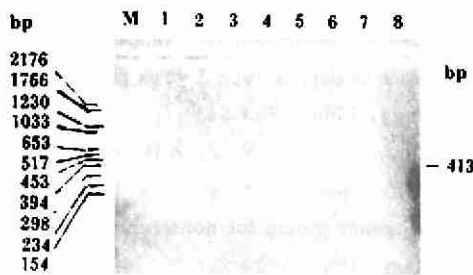


图1 RT-PCR 产物的琼脂糖电泳

M. 标准分子量, 1. DEN1, 2. DEN2, 3. DEN3,

4. DEN4, 5. DEN1(GZ), 6. JEV, 7. SIN, 8. C₆/36 Cells

2.2 应用嵌套式PCR对DEN1~4型分型鉴定

以通用引物PCR扩增后DEN1~4型产物为模板,应用各型内引物酶促扩增后可见与设计相符的不同基因片段。DEN1扩增基因片段大小约为262bp, DEN2约为189bp, DEN3约为392bp, DEN4约为97bp,见图2。应用各型内引物分别与DEN1~4型病毒进行交叉PCR,均未扩增出特异带。C₆/36细胞用内引物扩增后也无条带。结果表明DEN1~4型内引物特异性良好。

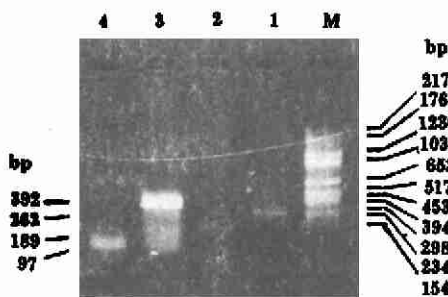


图2 嵌套式PCR 产物的琼脂糖电泳

1. DEN1, 2. DEN2, 3. DEN3, 4. DEN4

2.3 酶切分析

用限制性内切酶 *Bst*NI 切割 DEN 1~4 型的 PCR 产物,也可进一步分型鉴定

DEN。 *Bst*NI 酶切后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, DEN1, 2, 3 型可见大小不同的基因片段。表明这 3 个型的扩增产物含有 *Bst*NI 酶切位点。 DEN4 型中不含 *Bst*NI 酶切点,故不能被切开,仍为一条 413bp 的条带。 DEN2, 3 型酶切后的基因片段与预计大小相符,分别是: DEN2 切开为 185bp 和 227bp; DEN3 切开为 199bp 和 213bp。 DEN1 型经酶切后的基因片段与预计片段大小有所差别,考虑为此型病毒有变异,有待进一步证实。

2.4 登革热患者血标本的分型检测

收集临床登革热患者血清 21 份,应用通用引物 PCR 扩增后阳性 20 份,均扩增出约 413bp 的特异带。进一步用内引物嵌套式 PCR 分型鉴定,发现 DEN1 型阳性 18 份,扩增的基因片段约为 262bp; DEN2 型阳性 2 份,扩增的基因片段约 189bp; 1 份标本未扩增出特异带。图 3 为 5 份 DEN1 型阳性标本嵌套式 PCR 的结果。应用嵌套式 PCR 同时检测 3 份健康人血清,结果均为阴性。

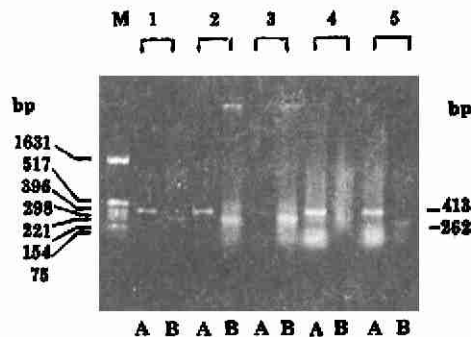


图3 登革热患者血清 PCR 产物的琼脂糖电泳

1-5, DEN1 血清标本; A, 通用引物 PCR 产物; B, 内引物 PCR 产物

3 讨论

应用 RT-PCR 检测 DEN 已有报道^[8-9]。一般均用型特异的引物进行 PCR 来

鉴定。本文报告应用一对通用引物同时扩增4个型的DEN基因片段,然后应用内引物酶促扩增对DEN 1~4型进行分型鉴定,这在国内尚属首次。

本文设计的通用引物在黄病毒中具有高度的保守性,在对DEN 1~4型和JEV的扩增中出现一条特异荧光带,而扩增甲病毒SIN和C₆/36细胞无特异带。设计DEN各型的内引物对于DEN4型的鉴别特异性良好。一般设计引物均在20个碱基以上,而本研究仅用17个碱基作为引物既有良好的特异性又节省经费。

应用嵌套式PCR检测临床登革热患者血标本21份,发现DEN1型阳性18份,DEN2型阳性2份。表明1991年广州市流行登革热是由DEN1,2型所引起。1份标本未检出,考虑收集标本时间离发病时太久,血清DEN含量极少所致。嵌套式PCR能在2d内完成对DEN的分型鉴定,并能检测到登革热患者发病早期血标本中的DEN基因。为登革热的早期快速诊断提供了可靠的方法。

参 考 文 献

- 1 Mason W, Mcada PC, Mason TL, et al. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology*, 1987, 161 : 262
- 2 Deubel V, Kinney RM, Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2

- virus, Jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, 1988, 165 : 234
- 3 Osatomi K, Sumivoshi H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, 1990, 176 : 643
- 4 Mackow E, Makino Y, Zhao B, et al. The nucleotide sequence of dengue type 4 virus; Analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*, 1987, 159 : 217
- 5 Loparev VN, Cantas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J Virol Methods*, 1990, 34 : 105
- 6 Deubel V, Laille M. Identification of dengue sequences by genomic amplification; rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods*, 1990, 30 : 41
- 7 Morita K, Tanaka M. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiology*, 1991, 29 : 2017
- 8 Laille M, Deubel V. Demonstration of concurrent dengue 1 and 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1991, 34 : 51
- 9 Eldadah ZA, Asher DM, Godec MS, et al. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1991, 33 : 260

(1994-03-10 收稿 1994-12-01 修回)

DETECTION AND TYPING OF THE GENOME OF DENGUE VIRUSES BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

Fang Meiyu Chen Huosheng Chen Cuihua Guo Huiyu

(Department of Microbiology Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) were to amplify a fragment of the NS1 genes of dengue virus type 1,2,3 and 4 by using a universal primer set. Dengue virus typing was then conducted by nested PCR by using 4 different internal primers. With the universal primer set designed, the NS1 fragments about the size of 413bp were amplified. With the 4 internal primers, NS1 fragments about the size of 262bp(den 1), 189bp(den 2), 392bp(den 3), and 97bp(den 4) were amplified respectively. With this nested PCR method, direct typing of dengue viruses was performed in 21 serum samples collected from dengue fever patients. The result showed that 18 sera were identified as type 1, and 2 sera as type 2. As the test can be completed within 2 days, it provides a useful method for the rapid diagnosis of dengue fever.

Subject headings polymerase chain reaction; dengue virus/analysis; RNA, viral/chemical synthesis; gene, viral