

# 逆转录聚合酶链反应检测Ⅲ型登革病毒 的敏感性和特异性研究

李刚 王飞 郭日波 柯伟民 廖育煌\*

(传染病学教研室)

**摘要** 本文应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,检测Ⅲ型登革病毒基因。所设计引物在E基因组,引物2位于核苷酸序列的1139~1158位,引物1位于1453~1471位,反应产物为333bp,内含1个HindⅢ限制性内切酶位点,酶切后有128bp和199bp两个片段。产物在含溴化乙锭的2%琼脂糖中电泳。采用RT-PCR法可测出至少5个半数组织细胞培养感染量(TCID<sub>50</sub>)的病毒RNA。

**关键词** Ⅲ型登革病毒;逆转录;聚合酶链反应

**中图分类号** R512.8

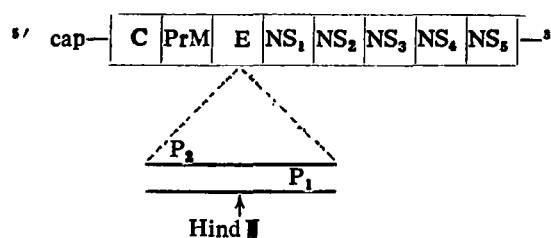
Ⅲ型登革病毒RNA的核苷酸序列已完全弄清<sup>[1]</sup>,使近年来非常活跃的聚合酶链反应技术应用于登革病毒的研究成为可能。现国内的有关研究主要涉及Ⅰ型登革病毒。本研究采用RT-PCR成功地扩增了Ⅲ型登革病毒的E基因部分片段,并对此法的特异性和敏感性进行了探讨。

## 材料和方法

**病毒** 登革病毒标准株Ⅰ型(Hawaii)、Ⅱ型(New Guinea)、Ⅲ型(H<sub>87</sub>)、Ⅳ型(H<sub>241</sub>)及乙脑病毒分别感染C6/36细胞单层,细胞病变达(++)~(+++)时收集培养液,并滴定TCID<sub>50</sub>, -20℃保存。

**试剂** AMV逆转录酶、RN<sub>ase</sub>in、dNTP、DNA分子量标准、HindⅢ购自华美公司。蛋白酶K由Merck公司提供。Taq DNA聚合酶购于复旦大学遗传所。一对引物分别为20nt及19nt,由上海细胞生物研究所合成,引物的位置及序列见图1。

**病毒RNA的提取**<sup>[2]</sup> 培养液100μl加入蛋白酶K 2u, 10%SDS 10μl在56℃消化1h。加入二巯基乙醇后常规酚、氯仿抽提3次,上清



P<sub>1</sub> 5' GAGGGTTCATATTCAGGT 3'

P<sub>2</sub> 5' ACAACGGACTCAAGATGTCC 3'

图1 所用引物位置、序列和酶切位点

在无乙醇及醋酸钠中-20℃沉淀12h,10000rpm离心1h,倒去液体后抽干,加20μl双蒸水溶解。

**cDNA合成** 反应混合液含:RNA 5μl, RN<sub>ase</sub>in 40u, 0.5mmol/L dNTP 5μl, AMV逆转录酶10u,引物1(P<sub>1</sub>)500ng, 5×buffer 10μl,加双蒸水至总体积50μl,42℃反应1.5h。

**cDNA扩增** 反应混合物含:上述混合液10μl(内含cDNA),0.5mmol/L dNTP 5μl, P<sub>1</sub> 100ng, P<sub>2</sub> 500ng, 5×buffer 10μl,双蒸水10μl,总体积为50μl。95℃10min,加入Taq聚合酶2u,在55℃1min,72℃1min,92℃30s循环30次。最后在72℃延伸10min。

**酶切** PCR产物经常规酚、氯仿、乙

\* 广州市卫生防疫站

醚抽提后沉淀、溶解。用限制性内切酶 *Hind* III 在 37℃ 消化 1 h。

**产物分析** 取 10 μl PCR 产物及酶切后产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖中电泳, DNA 分子量标准作标记, 在紫外灯下观察、拍照。

## 结果与讨论

**引物设计** 采用计算机程序输入登革 4 个血清型<sup>[1,3-5]</sup>、乙脑病毒、黄热病毒、蝉传脑炎病毒、Murray Valley 脑炎病毒、及丙型肝炎病毒的核苷酸序列。设计的  $P_1$  与登革 III 型 E 基因 3' 端第 1453~1471 碱基序列互补, 用于启动逆转录及 cDNA 扩增,  $P_1$  为登革 III 型所特有。 $P_2$  位于 E 基因 5' 端 1139~1158, 用于 cDNA 扩增, 为登革 III、IV 型共有。III、IV 型扩增产物分别为 333 bp 和 421 bp, 用琼脂糖电泳即可鉴别。另外 III 型产物内含一限制性内切酶 *Hind* III 的位点, 酶切后有 128 bp 和 199 bp 两个片段。用于鉴定产物的特异性。实验证明, 此设计不影响 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。

**特异性** 见图 2。登革 III 型 RNA 经扩增后有明显的预定条带。产物经酶切后亦可见两个片段, 结果与设计相符。用 RT-PCR 对登革 I、II、IV 型、乙脑病毒培养液进行检测, 均未见相应条带。作者作多次重复试验、得同样结果。

**敏感性** 见图 3。将已滴定  $TCID_{50}$  的病毒培养液按 10 倍系列稀释至  $10^{-5}$ , 甚至  $2.5 \times 10^{-6}$  时取 100 μl 作 RT-PCR 仍出现特异性条带。经推算, 此法可检出少至 5  $TCID_{50}$  的病毒 RNA。其敏感性与聚合酶链反应的特点是一致的。

目前登革热病原学诊断主要依靠病毒分离及血清学, 但由于病毒分离率低, 有交叉抗体存在, 工作量大, 不能进行快速早期诊断等而具有局限性。国内外已有学者采用 RT-PCR 方法研究登革病毒<sup>[6,7]</sup>, 但国内研究主要集中于 II 型, 未见用于 III 型的报道。RT-PCR 不仅具有高度的特异性和敏感性, 而且在 2 d 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手段。

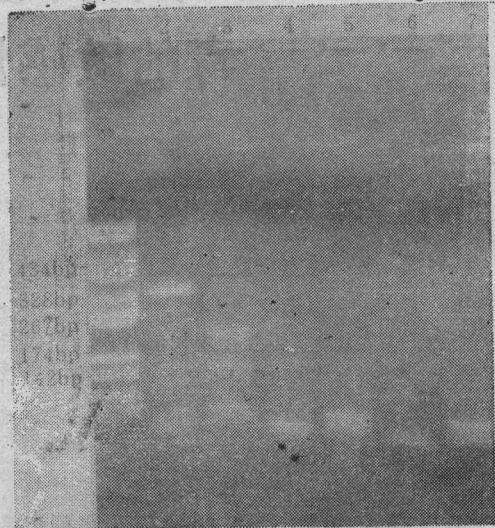


图2 RT-PCR 检测 III 型登革病毒的特异性

1. DNA 分子量标准; 2. 登革 III 型的扩增产物; 3. 产物经 *Hind* III 酶切后片段; 4,5,6,7. 分别为登革 I; II, IV 型病毒及乙脑病毒, 未见扩增产物

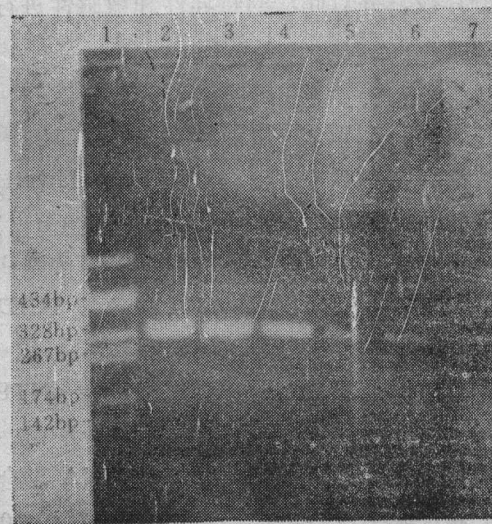


图3 RT-PCR 检测 III 型登革病毒的敏感性

1. DNA 分子量标准; 2,3,4,5,6,7. 登革 III 型病毒培养液分别稀释 10, 100, 1000,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $4 \times 10^5$  倍后的扩增产物

## 参考文献

1. Kiyoshi Osatomi and Hideo Sumiyoshi. Complete nucleotide sequence of dengue

- type 3 virus genome RNA. *Virology* 1990; 176:643
2. Sambrook J, et al. *Molecular cloning. A Laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor. 1989; 7.3~7.36
3. Mason PM, et al. Sequence of the dengue 1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS<sub>1</sub>. *Virology* 1987;161:262
4. Irie K, et al. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinen-C strain). *Gene* 1989;75:197
5. Zhao B, et al. Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of genes coding for structural proteins. *Virology* 1986;165:77
6. Deubel V, et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *Journal of Virological Methods* 1990;30:41
7. 秦鄂德, 等. 登革病毒基因组逆转录及其cDNA扩增的研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 1991;11(5):324  
(1992-10-06收稿 1993-04-06修回)

## STUDIES ON SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION IN DETECTION OF DENGUE 3 VIRUS

Li Gang    Wang Fei    Guo Ribo    Ke Weimin    Liao Yuhuang

(Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital)

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed for the detection of dengue virus 3 genome. Two primers bracketed a 333-nucleotide base in the E gene, corresponding to bases 1139-1471 in the dengue 3 genomic RNA sequence. After digested with Hind III, the product of the reaction was divided into two fragments, 128bp and 199bp, respectively. The amplified product and digested fragments were shown in the ethidium bromide stained 2% agarose gel. This technique can detect dengue viral RNA in the level of 5 TCID<sub>50</sub> virus.

**Key words** dengue virus 3; reverse transcription; polymerase chain reaction