

· 实验研究 ·

# 多重逆转录-聚合酶链反应快速检测登革病毒及其临床应用

任瑞文 方美玉 刘建伟 王军军 郝丽 程刚锋 洪文艳 田小东

**【摘要】** 目的 建立登革 1~4 型病毒的多重逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)快速检测及分型方法。方法 参照登革 1~4 型病毒核酸序列设计多重 RT-PCR 引物,并检索国际基因序列数据库初步验证其特异性,随后对 PCR 反应条件进行优化,以同属于黄病毒科的黄热病毒、流行性乙型脑炎病毒为对照,验证其特异性。并对 2003 年 30 份临床疑似登革患者血清标本进行了检测,阳性片段克隆测序验证扩增片段特异性。结果 采用多重 PCR 引物对登革 1~4 型病毒进行扩增,分别获得 295、237、118、347 bp 片段,与设计相符;而黄热病毒及流行性乙型脑炎病毒均无非特异性扩增条带,对引物的相关性实验结果表明引物之间不会因相互干扰而出现假阳性结果,30 份疑似患者血标本 RT-PCR 扩增阳性率为 83.3% (25/30),其核酸序列与登革 1 型病毒柬埔寨株以及中国 1997、1999 年流行株 GD14/97、GD05/99 同源性分别为 97%、97%、98%。结论 实验证明,所建立的多重 PCR 方法能够快速检测和鉴定登革 1~4 型病毒,为登革病毒的检测及分型提供了一种方便易行的方法。

**【关键词】** 登革病毒;多重-聚合酶链反应;快速检测

**Development of multiplex reverse translation-polymerase chain reaction methods for detection of dengue virus type 1-4 and its application in clinical use** REN Rui-wen, FANG Mei-yu, LIU Jian-wei, WANG Jun-jun, HAO Li, CHENG Gang-feng, HONG Wen-yan, TIAN Xiao-dong. The Military Medical Institute of Guangzhou Military District, Guangzhou 510507, China

**【Abstract】 Objective** To develop multiplex reverse translation-polymerase chain reaction(RT-PCR) method for detection of dengue virus type 1-4. **Methods** Based on the genomes sequence analysis of dengue virus type 1-4, four-pair of primers were designed. The specificity of the primers was primarily tested by searching the GenBank DNA sequence database. The optimal reaction conditions of the multiplex RT-PCR were then established. The specificity of RT-PCR was tested using the homologous yellow fever virus and Japanese encephalitis virus. 30 serum samples of dengue virus from suspected sufferers in the prevalence of dengue virus in 2003 were detected using the methods we developed. **Results** Positive segments about 295, 237, 118, 347 bp could be seen in the multiplex RT-PCR production of dengue virus type 1-4, respectively. There were no positive segments in the RT-PCR productions of Japanese encephalitis virus and yellow fever virus. 25 of the 30 serum samples showed dengue virus type 1 positive results, while the sequencing results suggesting the amplification sequence having a high homology with dengue virus type 1 strain Cambodia, GD14/97 and GD05/99 (97%, 97%, 98%, respective). **Conclusion** The method of multiplex RT-PCR we established could be used for early detection and identification of dengue virus type 1-4.

**【Key words】** Dengue virus; Multiplex reverse translation-polymerase chain reaction; Quick detection

登革病毒(dengue virus, DV)是一种急性虫媒传染病的病原体,可导致登革热(DF)、登革出血热(DHF)和登革休克综合征(DSS),而 DHF 和 DSS 死亡率高,严重危害人民的健康。根据 DV 抗原性的异同,可将其分为 4 个血清型(DV 1~4 型),4 个

血清型的致病性、临床症状、流行范围均不相同,我国以 DV 1 型及 2 型为主。随着我国经济的发展,对外经济交往和人员流动逐年增大,DF 爆发的频率越来越高<sup>[1]</sup>,探讨特异、敏感的 DV 早期诊断手段对 DF 的预防、治疗与控制具有重要意义。

## 材料与方 法

基金项目:全军医学科研“十五”计划重大课题资助项目(01Z014);广东省自然科学基金资助项目(04001618)  
作者单位:510507 广州军区军事医学研究所微生物研究室

1. 材料:实验中所用 DV 1 型(Hawaii 株)<sup>[2]</sup>、

DV 2 型(NGC 株)<sup>[3]</sup>、DV 3 型(H87 株)<sup>[4]</sup>、DV 4 型(H241 株)<sup>[5]</sup>、流行性乙型脑炎病毒(中山株)<sup>[6]</sup>、黄热病毒国际参考株 D17,均由本实验室传代保存。实验用乳鼠购自广州军区军事医学研究所实验动物中心,蚊 C6/36 细胞由本室传代保存。血清标本采自 2003 年广州市疑似 DV 患者,广州市第八人民医院提供。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、分子量标准 DL2000 购自大连 TaKaRa 公司,其他常规试剂均为国产分析纯。

2. 引物:用 Primer 软件,参照 DV 1~4 型国际参考株序列,利用 Primer 软件设计多重逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)引物,并检索国际基因序列数据库初步验证其特异性。引物由大连 TaKaRa 公司合成,引物序列见表 1。

表1 DV 1~4 型多重 RT-PCR 引物序列及位置

引物	引物位置(bp)	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
DV 1-P1	3782	GAGTCTAGTGGCATCTG	294
DV 1-P2	4076	CATGGTTAGTGGTTTG	
DV 2-P1	3775	GAATTGATGATGACTACC	236
DV 2-P2	4011	GGAAACGGACACCACT	
DV 3-P1	3747	TGAGGAAACTGACATC	116
DV 3-P2	3863	TGAGCCCCAAAGCAA	
DV 4-P1	3756	AGGAAACTCACTTCAAG	346
DV 4-P2	4102	AGGTACACTGGCAGAG	

3. RNA 制备:DV 1~4 型、流行性乙型脑炎及黄热病毒鼠脑毒种  $10^{-2}$  悬液感染 C6/36 细胞,28~33℃ 培养,当细胞病变出现“卍”时,取 300  $\mu$ l 病毒液用改良的碘化钠法提取病毒 RNA<sup>[7]</sup>。

4. RT-PCR 方法及条件优化:DV 1-P1、DV 2-P1、DV 3-P1、DV 4-P1 等量混合(12.5  $\mu$ mol/L each)制备上游混合引物 DV P1, DV 1-P2、DV 2-P2、DV 3-P2、DV 4-P2 等量混合(12.5  $\mu$ mol/L each)制备下游混合引物 DV P2。用下游引物 DV P2 以常规方法进行逆转录,取逆转录产物 5  $\mu$ l 进行多重 PCR 扩增,反应液组成为:10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l,引物 DV P1、DV P2 各 1  $\mu$ l、dNTP 200  $\mu$ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1 U, Mg<sup>2+</sup> 设 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 nmol/L 6 个梯度进行优化,补水至总体积 25  $\mu$ l。在 PE9600 PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增,条件如下:94℃ 3 min,然后 94℃ 45 s,55℃ 50 s,72℃ 60 s,共 30 次循环,最后一次循环后 72℃ 延伸 10 min。

5. PCR 检测的特异性试验:在上述 PCR 反应体系中,以 DV 1~4 型病毒为阳性对照,以黄热病

毒、流行性乙型脑炎病毒以及不加 DNA 模板组为阴性对照,采用相同的条件进行扩增,验证多重 PCR 的特异性。

6. PCR 检测的敏感性试验:取 DV 1~4 型细胞培养液做系列 1:10 稀释后,分别取 300  $\mu$ l 提取核酸,按前述方法进行逆转录,取逆转录产物 5  $\mu$ l 为模板进行扩增,凝胶电泳观察结果,验证多重 RT-PCR 敏感性。同时分别采用 DV 1~4 型病毒型特异性引物进行单引物扩增,以对比单引物与多引物扩增敏感性的差异。

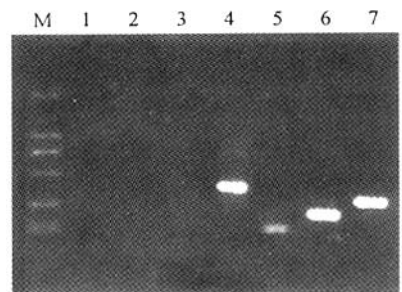
7. 疑似 DF 患者血清标本 PCR 扩增:选择 2003 年 30 例疑似 DF 患者发病早期的血清标本进行多重 PCR 扩增。

8. 基因克隆、鉴定和测序:选择扩增阳性的 2 份标本(GZ19/2003、GZ29/2003)的多重 RT-PCR 产物,经纯化、回收后分别克隆入 pMD18-T 载体,并转化 JM109 宿主菌,经 PCR 及酶切鉴定后,送大连宝生物公司测序。

## 结 果

1. 多重 PCR 反应条件:采用混合引物在各种镁离子浓度下进行多重 PCR 扩增 DV 3 型结果显示,在 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L 反应管内可清晰的扩增出 116 bp 目的带,并且无非特异性杂带,最终确定镁离子浓度为 2.0 mmol/L。

2. PCR 检测 DV 的特异性:多重 RT-PCR 对 DV 1~4 型进行扩增,分别获得 295、237、118、347 bp 片段,与设计相符;而黄热病毒、流行性乙型脑炎病毒及空白对照组均无非特异性扩增条带(图 1)。

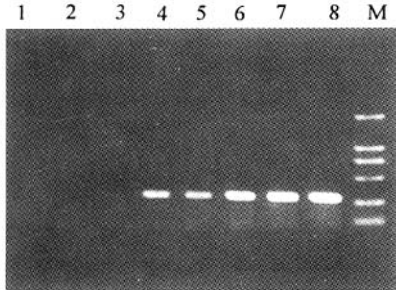


M: 分子量标准 DL2000; 1: 阴性对照; 2: 黄热病毒; 3: 流行性乙型脑炎病毒; 4: DV 4 型; 5: DV 3 型; 6: DV 2 型; 7: DV 1 型

图1 多重 PCR 方法检测 DV 1~4 型结果

3. 多重 PCR 检测 DV 的敏感性:敏感试验结果表明,DV 1、2 型做 1:10<sup>6</sup> 稀释后,仍可见扩增条带,

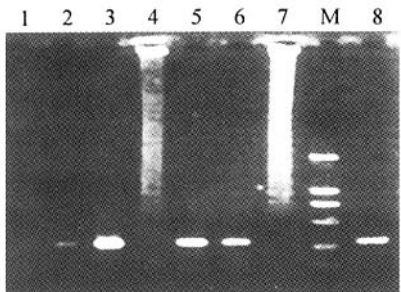
1:10<sup>7</sup> 稀释后扩增条带消失(图 2);DV 3、4 型做 1:10<sup>5</sup> 稀释后,仍可见扩增带。DV 1~4 型按 Reed-Muench 法计算的 TCID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>-4.77</sup>、10<sup>-6.48</sup>、10<sup>-4.38</sup>、10<sup>-4.50</sup>。当采用单引物扩增时,则 4 型病毒均可检测 1:10<sup>6</sup> 稀释后的病毒培养液。



M: 分子量标准 DL2000; 1: 阴性对照; 2: 10<sup>-7</sup>; 3: 10<sup>-6</sup>; 4: 10<sup>-5</sup>; 5: 10<sup>-4</sup>; 6: 10<sup>-3</sup>; 7: 10<sup>-2</sup>; 8: 10<sup>-1</sup>

图 2 多重 RT-PCR 对 DV 2 型扩增的敏感性

4. 临床疑似 DF 患者标本检测结果: 用多重 RT-PCR 扩增 30 份早期患者血标本, 阳性率为 83.3% (25/30) (图 3)。2 株阳性标本经克隆测序后, 与 DV 1 型柬埔寨株以及我国 1997、1999 年 DV 1 型流行株同源性分别为 97%、97%、98%, 进一步证实为 DV 1 型(图 4)。



M: 分子量标准 DL2000; 1: 阴性对照; 2、3、5、6: 阳性结果; 4、7: 阴性结果; 8: 阳性对照

图 3 多重 PCR 方法对 2003 年疑似 DF 患者血清标本检测结果

### 讨论

DV 的检测一般包括病毒分离、核酸杂交法、PCR 以及 ELISA 等方法。这些方法中, PCR 方法敏感、快速, 所用标本量少, 因此非常适合于快速早期诊断, 为 DF 的临床和流行病学诊断提供了一种有效手段。多重 RT-PCR 技术是在常规 PCR 技术的基础上改进和发展起来的一种新的 PCR 扩增技术<sup>[8]</sup>, 可在同一 PCR 反应体系内加入多对特异性引

物, 一次扩增多个 DNA 片段, 从而实现多种病原体 DNA 的同时快速鉴定, 为临床病原体的混合感染, 以及症状不明显的微生物感染的快速诊断提供了快速、灵敏的手段, 提高了检验效率, 在疾病的诊断中得到日益广泛的应用。

GD23/03 : GTTGTCCGAGACTAACATCCAGAGAAGTTCTTCTTAACAATTGGATTGACTC : 56  
 GD14/97 : ..... T ..... T ..... : 56  
 GD05/99 : A. A ..... C ..... : 56  
 Cambodia : A. A ..... : 56

GD23/03 : TAGTGGCATCTGTGGAGTTACCAAAATTCCTTGGAGGAGCTGGGGATGGACTTGA : 112  
 GD14/97 : ..... C ..... : 112  
 GD05/99 : ..... : 112  
 Cambodia : ..... : 112

GD23/03 : ATGGGCATCATGATTTTAAAATTATTGACTGACTTTCAATCACATTAGTTGTGGGC : 168  
 GD14/97 : ..... T ..... G ..... T ..... C ..... : 168  
 GD05/99 : ..... C ..... : 168  
 Cambodia : ..... T ..... C ..... : 168

GD23/03 : TACCTGCTGCTCTTGACATTTATCAAAACAAGTTTTCTTGCATATGCATGGA : 224  
 GD14/97 : ..... : 224  
 GD05/99 : ..... : 224  
 Cambodia : ..... T ..... C ..... : 224

GD23/03 : AGACAATAGCTATGGTACTGTCAATTTGATCTCTCTTCCCTTATGCCTGTCCACG : 280  
 GD14/97 : ..... G ..... : 280  
 GD05/99 : ..... : 280  
 Cambodia : ..... G ..... : 280

GD23/03 : ACCTCCAAAAAACAACATGGCTTCCGGTGTCTTGGGATCTCTGGATCACAACC : 336  
 GD14/97 : ..... A ..... : 336  
 GD05/99 : ..... : 336  
 Cambodia : ..... A ..... : 336

GD23/03 : ACTAACCATG : 346  
 GD14/97 : ..... : 346  
 GD05/99 : ..... : 346  
 Cambodia : ..... : 346

图 4 1997、1999、2003 年 DV 1 型广东流行株及柬埔寨流行株部分核苷酸序列

相对于普通 PCR, 多重 RT-PCR 的影响因素相对较多, 因多重 RT-PCR 反应体系中含有多对特异性寡聚核苷酸引物, 对引物的设计和选择比常规 PCR 反应更为严格, 除了常规的引物设计原则外, 还必须充分考虑到各引物间的相关性和合理性, 避免引物间形成粘性末端或部分双链, 同样也必须排除 PCR 扩增产物间可能发生的错配, 并应使不同引物对之间尽量具有相近的 T<sub>m</sub> 值, 否则就会导致实验失败或假阳性结果。对反应体系中各成分的浓度、比例、反应条件的要求比常规 PCR 更为严格。本实验中发现, PCR 反应液中的镁离子浓度及退火温度可对 PCR 反应产生重要影响, 不合适条件下, 非特异性扩增条带明显增多, 可能与寡聚核苷酸引物的非特异性结合有关。通过各种条件的优化, 建立了稳定、特异的多重 RT-PCR 快速检测 DV 1~4 型及其分型方法。在本实验中, 多重 RT-PCR 的灵敏度虽略逊于单引物 PCR, 但由于多重 RT-PCR 可

在一次反应中同时对 DV 1~4 型进行检测与分型, 简化了实验步骤, 在对未知标本的检测及流行病学调查中具有较高的应用价值。应用所建立的方法对 2003 年广州 DF 疑似患者血标本进行多重 RT-PCR 扩增, 扩增阳性率为 83.3% (25/30), 而对阴性对照及其黄热病毒、流行性乙型脑炎病毒的扩增结果均为阴性, 扩增片段克隆测序显示, 其与 DV 1 型柬埔寨株以及我国 1997、1999 年 DV 1 型流行株同源性分别为 97%、97%、98%, 进一步验证了扩增的特异性, 可用作临床标本的检测。

(感谢广州市第八人民医院检验科提供临床血清标本)

参 考 文 献

- 1 韩万柏, 杨学颖. 我国登革热研究概况. 临床军医杂志, 2003, 31:103-104.
- 2 Gtanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain Reaction. J Virol Methods, 1993, 41:311-322.
- 3 Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y. Sequence analysis of cloned dengue

- virus type 2 genome (New Guinea-C strain). Gene, 1989, 75:197-211.
- 4 Osatomi K, Sumiyoshi H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. Virology, 1990, 176: 643-647.
- 5 Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, et al. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. J Virol, 1993, 67:6567-6575.
- 6 Shimizu A, Ogata T, Kitaoka M. Biological and immunological studies on two substrains, C-1 and C-3, derived from the Nakayama-NIH strain of Japanese encephalitis virus. Intervirology, 1977, 8:52-59.
- 7 方美玉, 陈翠华, 陈火胜, 等. 黄病毒逆转录-聚合酶链反应检测技术的建立和应用. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11:267-270.
- 8 Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, et al. Rapid detection of HPV in cervical scrapes by combined general primer mediated and type-specific PCR. J Clin Microbiol, 1990, 28:2739-2741.

(收稿日期:2004-01-10)  
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

乙型肝炎病毒污染针具刺伤 5 例的紧急处理

纪永水 史春娟 张亚斌 吴成 蔡森

感染科及手术科室工作人员是乙型肝炎病毒(HBV)感染高风险人群, 常因被 HBV 污染的针具、器械刺伤而受到感染的威胁。如何正确处理此类意外伤害, 避免 HBV 感染已受到广泛重视<sup>[1,2]</sup>。现将我院近年 5 例工作人员被 HBV 污染针具刺伤后紧急处理方法及效果报告如下。

1. 病例简介: 5 例中外科医师 2 例, 感染科护士 3 例。受感染过程: 2 例外科医师均是在给血液 HBVM 呈“大三阳”患者做手术过程中, 不慎被缝合针刺入手指, 并有出血。2 例护士在给现症乙型肝炎(乙肝)患者治疗过程中, 被注射针头刺入手指, 伤口较深并有出血; 1 例护士在给乙肝患者注射过程中针头穿透其小手指。处理方法: ①迅速挤压被刺伤手指。由周围向伤口处反复挤压, 尽可能多挤压出血液。②2% 碘酊反复局部消毒。③尽可能早注射乙肝免疫球蛋白。5 例中 3 例当天注射乙肝免疫球蛋白, 2 例第二日注射。④在注射乙肝免疫球蛋白一周后注射一疗程乙肝疫苗(10 μg 肌注, 0, 1, 6 程序)。结果: 5 例伤者在上述处理后, 分别于 40 天及 6 个月时查肝功、HBVM。40 天时仅 1 例血抗-HBs(+); 6 个月时 5 例均出现抗-HBs, 1 例伴抗-HBc(+). 5 例肝功均正常。

2. 讨论: HBV 主要是经血途径传播, 10<sup>-4</sup> ml 含 HBV 血液足以使人体感染。因此受 HBV 污染针头刺伤威胁很大。我们的处理措施及其机理是: 刺伤后迅速由周围向伤口处反复挤压, 挤出局部血液, 减少进入体内病毒量。碘酊能迅速杀灭 HBV, 在病毒聚集局部尚未扩散前, 尽量杀灭之。立即注射高效价乙肝免疫球蛋白, 其能随时中和进入血液 HBV, 是迅速有效地人工被动免疫。一周后注射乙肝疫苗, 其机理一是避免过早注射乙肝疫苗, 其可中和乙肝免疫球蛋白, 使二者均失去应有作用; 二是在 HBV 进入肝细胞大量复制前即刺激人体产生抗-HBs 形成主动免疫, 清除 HBV。5 例受感染者处理结果表明, 上述处理方法是有效、可靠的。说明乙肝免疫球蛋白与乙肝疫苗实时序贯注射是有效保护该类伤者重要措施。

参 考 文 献

- 1 庄辉. 加强对新生儿以外人群乙型肝炎疫苗免疫. 中华流行病学杂志, 2004, 25:376.
- 2 邢玉兰, 龚晓红. 北京市非新生儿乙型肝炎的疫苗预防. 中华流行病学杂志, 2004, 25:381-384.

(收稿日期:2004-09-02)  
(本文编辑:张林东)