



微孔杂交检测登革病毒及其分型方法的建立

聚合酶链反应(PCR)技术自20世纪80年代出现以来,已被广泛应用于疾病的核酸诊断,其扩增产物的检测主要依赖于琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,由于临床标本复杂,常出现非特异性扩增条带或电泳拖尾现象[1][2],给结果的判定带来困难,采用PCR方法往往难以作出确诊。为了探讨更加敏感、特异的登革病毒快速检测及分型方法,我们在分析登革病毒1~4型病毒基因组序列的基础上,分别设计针对登革病毒病毒1~4型的特异性包被探针及检测探针,建立了快速检测登革病毒并对其进行分型的微孔杂交(PCR-ELISA)方法,现将实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

实验中所用登革病毒(Dengue virus, DV)分别为:登革病毒1型(Hawaii株),登革病毒2型(NGC株),登革病毒3型(H87株),登革病毒4型(H241株),流行性乙型脑炎病毒(中山株),黄热病毒(D17株),均为本研究室传代保存。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细胞由本研究室传代保存。实验中所用的反转录酶、Taq DNA聚合酶、pMD18 T载体均购自大连TaKaRa生物公司,采用进口单条可拆聚乙烯微孔板。

1.2 引物设计合成

分析登革1~4型病毒基因组序列,设计引物(DV1-P1, DV1-P2; DV2-P1, DV2-P2; DV3-P1, DV3-P2; DV4-P1, DV4-P2)分别扩增登革病毒1~4型的特异性包被探针,扩增片段经克隆测序确证,用作微孔板的包被。随后在扩增片段5'端外侧设计检测用上游引物(Bio-DV1、Bio-DV2、Bio-DV3、Bio-DV4),并于引物5'端标记生物素,等量混合(每种引物12.5 $\mu\text{mol/L}$)后制备上游引物Bio-DV; DV1-P2、DV2-P2、DV3-P2、DV4-P2等量混合(每种引物12.5 $\mu\text{mol/L}$)制备下游引物DV-P2,用于待检样品的PCR扩增。同时在PCR扩增区域内部设计半套式引物(IDV1-P2、IDV2-P2、IDV3-P2、IDV4-P2),等量混合(每种引物12.5 $\mu\text{mol/L}$)制备下游引物IDV-P2,与上游标记引物Bio-DV引物配对,制备长标记探针,用作待检测样品的PCR扩增,以增加检测的可信性及敏感性(引物序列见表1)。

表 1 登革病毒 1~4 型扩增用引物

Tab.1 Primer sequences for detecting dengue virus types 1-4

Dengue virus	Primer	Primer position	Sequence of primer
Type 1	Bio-DV1	3731	GTTGTTCCGCAGACTA
	DV1-P1	3782	GAGTCTAGTGGCATCTG
	DV1-P2	4076	CATGGTTAGTGGTTTG
	IDV1-P2	3845	CATTGCAAGTCCATCC
Type 2	Bio-DV2	3760	AAGTTGACCTCCAAGG
	DV2-P1	3775	GAATTGATGATGACTACC
	DV2-P2	4093	TAGCTGTTGGATTGAG
	IDV2-P2	3888	CACCATTTTAAGGACC
Type 3	Bio-DV3	3747	CTAGGAAACTGACATC
	DV3-P1	3773	TTATTGCTGGGAGTTG
	DV3-P2	4089	AAAAGTGGTAGGGGTG
	IDV3-P2	3863	TGAGCCCCAAAGCAA
Type 4	Bio-DV4	3756	AGGAAACTCACTTCAAG
	DV4-P1	3773	AGAGACAGCACTAATGG
	DV4-P2	4102	AGGTACACTGGCAGAG
	IDV4-P2	3872	GATTAACCCAGTGAT

1.3 包被探针制备

用改良的碘化钠法提取登革1~4型病毒RNA [3], 采用常规方法进行反转录获得其cDNA。用DV1- P1、DV1-P2; DV2-P1、DV2-P2; DV3-P1、DV3-P2; DV4- P1、DV4-P2引物分别扩增登革1~4型特异性包被探针: 取cDNA5 μ l, 10 \times PCR缓冲液5 μ l, 正向引物、反向引物各2 μ l、dNTP 4 μ l、Taq DNA聚合酶2 U, 补充水至总体积50 μ l进行PCR扩增。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共30次循环, 最后一次循环后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。扩增产物克隆入pMD18 T载体, 经大连宝生物公司测序确认。

1.4 微孔杂交

1.4.1 DNA包被 登革1~4型特异性包被探针纯化、回收后经100 $^{\circ}$ C变性5 min, 迅速冰浴10 min, 与冰预冷的包被液混合, 加入微孔板进行包被, 弃上清, 洗液(1 \times PBS~0.25%Tween20)洗涤2次, 每次1 min, 55 $^{\circ}$ C干燥30 min, 4 $^{\circ}$ C保存待用。包被量分别设20、50、100、200、300 ng/孔5个梯度; 并探讨45 $^{\circ}$ C包被1、3、5 h, 37 $^{\circ}$ C包被2 h及4 $^{\circ}$ C包被过夜对杂交结果的影响, 及采用1 \times PBS+0.05 mol/L Mg²⁺、1 \times PBS+0.1 mol/L Mg²⁺、1 \times PBS+0.15 mol/L Mg²⁺及1 \times PBS+0.5 mol/L NaCl、1 \times PBS+1.0 mol/L NaCl、1 \times PBS+1.5 mol/L NaCl包被液对包被效果的影响。

1.4.2 预杂交 加入预杂交液(5 \times denhart's-5 \times SSC-50 μ g/ml鲑鱼精DNA-3%BSA), 55 $^{\circ}$ C预杂交1 h, 弃预杂交液, 洗液洗涤2次, 每次1 min。

1.4.3 标记 分别用BIO-DV、DV-P2和BIO-DV、IDV-P2引物对待检标本进行PCR标记: 在50 μ l 反应体系中含cDNA5 μ l, 10 \times PCR缓冲液5 μ l, Mg²⁺ 2.5 nmol/L, 正向引物、反向引物各1.6 μ l(每种引物12.5 μ mol/L)、dNTP 200 μ mol/L、Taq DNA聚合酶2 U, 补水至总体积50 μ l。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共30次循环, 最后一次循环后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。

1.4.4 杂交 标记探针100 $^{\circ}$ C变性5 min后, 迅速冰浴10 min, 与杂交液(5 \times denhart's-5 \times SSC-50 μ g/ml鲑鱼精DNA-2%硫酸葡聚糖-50%甲酰胺)混合, 在特定温度下进行杂交, 弃杂交液, 洗液洗涤4次, 每次1 min。探讨杂交1、3、5及42 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C的条件下杂交对结果的影响。空白对照组不加标记探针, 其他操作同检测组。

1.4.5 酶联显色 加入1:500稀释的辣根过氧化物酶(HRP)溶液100 μ l, 37 $^{\circ}$ C温育10 min, 洗液洗涤5次, 每次1 min。加入TMB底物, 37 $^{\circ}$ C显色10 min, 50%H₂SO₄终止后, 于450 nm测A值。

1.5 微孔杂交的特异性实验

分别用B10-DV、DV-P2和B10-DV、IDV-P2引物对登革1~4型病毒以及其与同属黄病毒的流行性乙型脑炎病毒、黄热病毒进行RT-PCR扩增，分别与登革病毒1~4型包被探针进行交叉杂交实验，验证其特异性。

1.6 微孔杂交的敏感性

病毒反转录产物做1:10系列稀释后，分别进行同条件的PCR扩增、杂交、显色，以探讨微孔杂交的敏感性。

1.7 微孔杂交的稳定性

采用6份登革1型病毒细胞培养物，并以无病毒细胞培养上清为阴性对照，进行3次重复实验，比较批内(同一次实验中6份标本间)及批间(不同次实验间)A值的变异，验证其稳定性。

1.8 包被微孔板保存时间

包被探针包被微孔板后，4℃干燥保存2、4、6个月后，分别进行同条件的杂交试验，验证包被微孔板的有效使用期限。

2 结果

2.1 包被探针克隆测序结果

经大连TaKaRa公司测序显示，所克隆包被探针与设计完全相符，可用作包被探针。

2.2 包被条件对杂交结果的影响

包被量低于50 ng时，A值较低，而包被量为100、200、300 ng则无明显区别，考虑到稳定性及经济性的影响，采用200 ng包被。37℃及4℃包被效果不佳，显色后其A值低于0.1；采用45℃包被时，随着包被时间的延长，其A值逐渐升高，本实验中最终采用45℃包被5 h。

2.3 杂交条件对杂交结果的影响

42℃杂交时其背景较高，而采用55℃杂交，显色后阳性标本A值较低(低于0.2)，因此实验中采用45℃杂交。随着杂交时间的延长，其A值逐渐升高，但考虑到尽量缩短实际检测的时间，实验中采用杂交2 h。综合考虑，最终采用的杂交条件为：200 ng包被探针用包被液(1×PBS+0.1 mol/L MgCl₂)45℃包被5 h，弃上清，漂洗液洗涤2次，每次1 min。预杂交液55℃预杂交1 h，弃上清，漂洗液洗涤2次，每次1 min。加入杂交液，45℃杂交2 h，弃上清，漂洗液洗涤4次，每次3 min。加入1:500稀释的HRP溶液100 μl，37℃温育10 min，洗液洗涤5次，每次1 min，加入TMB底物，37℃显色10 min，50%H₂SO₄终止后，于450 nm测A值。

2.4 微孔杂交的特异性实验结果

采用优化的PCR-ELISA条件，分别采用长、短探针对登革1~4型病毒进行了检测及分型，并与同属黄病毒属的流行性乙型脑炎病毒、黄热病毒杂交，以验证其特异性。实验结果显示，登革病毒1~4型杂交探针仅与本型病毒呈杂交阳性，其A值均在0.5以上，而与其他各型病毒无明显交叉，其A值平均在0.1以下，S/N值在10以上，所有杂交均经3次以上重复实验验证(杂交结果见表2)。

表 2 登革 1-4 型病毒 PCR-ELISA 杂交检测的 A 值

Detection primer	Template	Capture probe			
		DV1	DV2	DV3	DV4
BIO-DV	DV1	1.307	0.041	0.081	0.060
	DV2	0.018	0.559	0.007	0.004
	DV3	0.014	0.001	0.827	0.009
	DV4	0.013	0.015	0.016	0.815
	JEV	0.081	0.052	0.029	0.031
DV-P2	YF	0.098	0.047	0.031	0.023
	DV1	1.055	0.003	0.033	0.007
	DV2	0.005	0.612	0.020	0.004
	DV3	0.004	0.004	0.509	0.008
	DV4	0.014	0.009	0.014	0.943
BIO-DV	JEV	0.055	0.035	0.036	0.034
	YF	0.069	0.066	0.052	0.024
	Blank control	0.000	0.003	0.001	0.005

2.5 微孔杂交的敏感性

敏感性实验显示, 采用常规的PCR反应可检测 10^{-6} 倍稀释的病毒RNA, 而采用微孔杂交则可检测出低至 10^{-7} 倍稀释的病毒RNA。

2.6 微孔杂交的稳定性

重复实验表明, 样本批内变异系数(CV)平均为6.21%, 批间为9.92%; 阴性对照孔批内CV平均为1.92%, 批间为3.68%, 其S/N值均在10以上(表3)。

表 3 PCR-ELISA 杂交的稳定性实验结果

Group	No. of sample	Absorbance of sample	Coefficient of variation(CV)	Absorbance of negative control	Coefficient of variation(CV)
1	6	1.330±0.083	(6.24)	0.077±0.015	(1.95)
2	6	1.410±0.095	(6.73)	0.086±0.012	(1.40)
3	6	1.380±0.078	(5.65)	0.075±0.018	(2.4)
Outside groups	18	1.360±0.135	(9.92)	0.076±0.028	(3.68)

2.7 包被微孔板保存时间

实验显示在4℃干燥保存6个月期间内, 杂交结果无明显下降。

3 讨论

登革病毒是一种急性虫媒传染病的病原体, 可导致登革热(DF)、严重的登革出血热(DHF)和登革休克综合征(DSS), 而DHF和DSS更具死亡率高的特点, 严重危害人民的健康。随着我国经济的发展, 对外经济交往和人员流动逐年增大, 登革热暴发的频率越来越高, 近年来更是连年暴发[4], 因此开发特异、敏感的登革病毒早期诊断手段对登革热的预防、治疗与控制具有重要意义。在PCR基础上发展起来的PCR-ELISA技术近年来得到越来越广泛的应用, 它可对扩增结果进行进一步的放大, 提高了检测的敏感性, 并且其杂交反应可大大提高检测的特异性, 以消除PCR假阳性率高的影响。其所需仪器简单, 而且应用较为普及的ELISA技术, 具有很强的实用性。目前, 在肝炎病毒[5]、乙型肝炎病毒[6]、人乳头瘤病毒[7]的检测及分型已得到广泛应用。

PCR-ELISA的操作相对较繁琐,影响因素较多,因此需要对其反应条件进行系统的优化,建立其反应的最优条件,以提高检测的可靠性。在本实验中发现DNA的包被为其关键步骤,其中包被液中 Mg^{2+} 的浓度及其pH值对包被效果影响显著,在不适宜的 Mg^{2+} 浓度及其pH值条件下,结果中其A值显著下降。杂交温度及漂洗条件也对杂交结果产生重要影响,因此在应用中需要对操作步骤进行标准化,并设立空白及阳性对照。在本实验中,重复性实验结果显示,阳性样品的A值均在0.5以上,而阴性及空白对照则均在0.2以下,S/N值均在10以上,表明尽管影响PCR-ELISA的因素很多,但只要在最优条件下,保持条件稳定,可取得较好的稳定性,其结果具有重复性。本方法在临床中应用的研究也正在进行中。

(责任编辑:陈望忠)

参考文献:

- [1] 李惠民,石 岚,段 勇,等. IgH重排的实时定量PCR检测及反应参数研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13 (4): 645-50.
- [2] Negi SS, Basir SF, Gupta S, et al. Comparative study of PCR, smear examination and culture for diagnosis of cutaneous tuberculosis[J]. J Commun Dis, 2005, 37(2): 83-92.
- [3] 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[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(11): 267-70.
- [4] Guzman MG, Garcia G, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities[J]. Rev Panam Salud Publica, 2006, 19(3): 204-15.
- [5] Bezold G, Gottlober P, Leiter U, et al. Quantitation of herpes simplex DNA in blood during aciclovir therapy with competitive PCR ELISA[J]. Dermatology, 2000, 201(4): 296-9.
- [6] Kim JW, Shim JH, Park JW, et al. Development of PCR-ELISA for the detection of hepatitis B virus x gene expression and clinical application[J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19(4): 139-45.
- [7] Chandeying V, Garland SM, Tabrizi SN. Prevalence and typing of human papilloma virus (HPV) among female sex workers and outpatient women in southern Thailand[J]. Sex Health, 2006, 3(1): 11-4.