

## 登革 1 型病毒荧光定量 PCR 快速检测\*

熊建英<sup>1</sup> 张复春<sup>2</sup> 马丹娟<sup>1</sup> 朱利<sup>1</sup> 张玲<sup>1</sup> 胡凤玉<sup>2</sup> 黎诚耀<sup>1</sup> 钟志成<sup>1</sup> 万成松<sup>1</sup> 赵卫<sup>1</sup>

**摘要:**目的 建立登革 1 型病毒快速特异的荧光定量 PCR 检测方法。方法 设计登革 1 型病毒特异的引物和 TaqMan 探针,制作标准曲线,并检测其特异性、重复性、再现性和敏感性,采用荧光定量 PCR 和常规 PCR 对临床标本进行检测比较。结果 成功构建了标准曲线,回归方程为  $Y = -3.410 \log X + 45.10$ ,相关系数  $R^2 = 0.999$ ,扩增效率  $Eff = 96.5\%$ ,灵敏度可达  $10^3$  copies/mL,此荧光定量 PCR 方法对登革 1 型病毒检测高度特异,与其他 3 型登革病毒和乙型脑炎病毒之间并无交叉反应;采用登革病毒种特异引物探针和本研究建立的登革 1 型病毒型特异引物探针对 166 份 cDNA 样本进行荧光定量 PCR 检测,均发现 126 份为阳性,阳性率均为 75.9%, $C_t$  值为 20.84 ~ 36.36,浓度范围为  $1 \sim 1.3 \times 10^4$  copy/ $\mu$ L;常规 PCR 方法检测到其中 36 份为阳性,阳性率为 21.7%。结论 荧光定量 PCR 方法能够快速灵敏地检测登革 1 型病毒,并能实现对病毒滴度的绝对定量。

**关键词:** 荧光定量 PCR; 登革病毒; TaqMan 探针

中图分类号: R 373.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0069-03

**Development of real-time PCR for detection of dengue virus type 1.** XIONG Jian-ying, ZHANG Fu-chun, MA Dan-juan et al. *Central Laboratory, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University (Guangzhou 510515, China)*

**Abstract: Objective** To develop a real-time PCR method for the detection of dengue viruses. **Methods** Multiple alignments of dengue virus sequence were designed and used to develop a system of real-time PCR to detect dengue virus type 1 strain. The system was validated for specificity, sensitivity, repeatability, and reproducibility and then applied to a series of human samples. **Results** The specificity of the system was determined by experimental tests on different flaviviruses. There were no cross reactions with Japanese encephalitis virus (JEV) and other serotypes of dengue virus. The system allowed the detection of less than one infectious particle and was able to detect dengue virus type 1 in human samples where infectious virus cannot be isolated. **Conclusion** The system developed is valuable for rapid detection of dengue virus type 1 and epidemiological studies.

**Key words:** real time PCR; dengue virus; TaqMan-based probe

登革病毒(dengue virus, DEN)属黄病毒属<sup>[1]</sup>,为单股正链 RNA 病毒<sup>[2]</sup>,可导致登革热和登革出血热。登革病毒病流行于热带和亚热带地区,每年约有 5 000 万至 1 亿人感染,已成为全球公共卫生关注的焦点之一<sup>[3]</sup>。登革热的诊断目前主要依赖病毒分离培养以及血清中特异性 IgM、IgG 抗体测定,但是所耗时间长,在早期诊断中受到一定限制<sup>[4]</sup>。而常规 PCR 方法扩增产物需要凝胶电泳检测,易造成实验室交叉污染。本研究拟建立可对登革 1 型病毒感染进行早期诊断的更省时、特异的荧光定量 PCR 方法。现将结果报告如下。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒株与临床标本 登革病毒 1-4 型毒株标准株(DEN-1 夏威夷株、DEN-2 新几内亚株、DEN-3-H87 株和 DEN-4-H241 株,均由本实验室保存);登革 1 型病毒感染者临床标本(广州市第八人民医院);乙型脑炎减毒活疫苗(成都生物制品研究所)。

1.1.2 主要试剂与仪器 普通 PCR 反应试剂、荧光定量 PCR 试剂、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(大连 TAKARA 宝生物公司)。Mx3005p 荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 引物探针设计 从 GenBank 中下载 80 株不同年份和不同地区的登革 1 型病毒基因组全序列,登革 2、3、4 型病毒以及黄病毒属其他病毒均分别下载 10 株,用 Clustal W 进行比对,寻找保守序列。使用 BeaconDesigner 7.0 软件设计引物探针,由大连 TAKARA 宝生物公司负责合成。上游引物:5'-GATGAGATCCAG ATGGAGTAGAAAG-3';下游引物:5'-TCAGTTGTCCATTATAAGAAGGAG-3';探针:5'-FAM-ACAGC-CAGTGTCCAGTCATCAGCA-Eclipse3'。保守基因(80bp,位于编码非结构蛋白基因 NS2A 处)由 Takara 公司合成至 pMD18-T 载体中,命名为 PMDns2a。登革病毒总引物探针参见文献[5]。常规 PCR 登革 1 型引物参见文献[6]。

1.2.2 荧光定量 PCR 扩增反应 (1)反应体系:取 2  $\mu$ L DNA,上、下游引物、探针、参比染料 Rox reference Dye II 各 0.5  $\mu$ L,Ex taq 酶预混液 12.5  $\mu$ L,加去离子水至总反应体积 25  $\mu$ L。扩增条件:95  $^{\circ}$ C 30 s 预变性;95  $^{\circ}$ C 5 s 变性、60  $^{\circ}$ C 20 s 退火延伸 40 个循环。(2)引物与探针最佳浓度优化:以相同浓度质粒为反应模板,引物浓度(10  $\mu$ mol/L)不变,引物量从 0.2 ~ 0.6  $\mu$ L 以 0.1  $\mu$ L 递增;探针浓度(3  $\mu$ mol/L)不变,探针量从 0.2 ~ 0.7  $\mu$ L 以 0.1  $\mu$ L 递增;采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。

1.2.3 标准曲线的制备 提取质粒 PMDns2a 并且线性化后 10 倍倍比稀释,依次从  $10^{10}$  copies/mL 稀释到  $10^4$  copies/mL。各取 2  $\mu$ L 进行荧光定量 PCR,用去离子水做空白对照。

1.2.4 荧光定量 PCR 特异性、重复性、敏感性试验 参照文献[7],用建立的荧光定量 PCR 方法对登革 1-4 型病毒标准

\* 基金项目: 国家自然科学基金(U1132002);广州市科技计划项目(2008Z1-E401-1);广东省自然科学基金(32833)

作者单位: 1. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院中心实验室,广东广州 510515; 2. 广州市第八人民医院

作者简介: 熊建英(1987-),女,江西南昌人,硕士在读,主要从事分子病毒学研究。

通讯作者: 赵卫, E-mail: zhaowei@fimmu.com

株以及乙型脑炎减毒活疫苗株进行检测。线性化后的 PMDns2a 质粒 10 倍倍比稀释 6 个浓度,从  $1.01 \times 10^7$  稀释到  $1.01 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,分不同的时间重复 3 次,每次做 3 个重复孔,验证重复性和再现性,变异系数(即相对标准偏差 RSD)需  $< 25\%$ <sup>(8)</sup>。此外,对 PMDns2a 质粒进行 10 倍倍比稀释,荧光定量 PCR 检测比较其敏感性。

1.2.5 临床标本检测 对广州市第八人民医院提供的 cDNA 标本进行荧光定量 PCR 检测,用登革病毒总引物探针进行验证,并且根据 Ct 值对荧光定量 PCR 方法以及常规 PCR 方法进行比较。荧光定量 PCR 检测以 Ct 值  $< 37$  并且扩增曲线呈 S 型为阳性判定原则<sup>(9)</sup>。其中 Ct 值  $< 35$  且扩增曲线良好可直接判定为阳性,Ct 值为 35 ~ 37 需要重复实验。2 次实验均能得到良好 S 型扩增曲线方可判定为阳性。根据该标准可确定检测标本是否为阳性,并且可计算阳性率。参照文献<sup>(10)</sup>将 Ct 值分为 4 类对结果进行分析,即  $< 25$ , 25 ~ 29.9, 30 ~ 34.9,  $\geq 35$ 。

1.3 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。配伍组资料采用随机区组设计资料的方差分析(two-way ANOVA), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 引物与探针浓度优化 上、下游引物的量分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6  $\mu$ L; 探针量为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7  $\mu$ L。通过对同一浓度模板、不同浓度引物和探针的扩增结果

进行比较,发现当探针量和引物量均为 0.5  $\mu$ L 时,Ct 值最小,荧光强度增加值( $\Delta R_n$ )较高,故本实验采用引物量和探针量均为 0.5  $\mu$ L。

2.2 标准曲线制备 荧光定量 PCR 标准曲线相关系数  $R^2 = 0.999$ ,扩增效率  $Eff = 96.5\%$ ,回归方程  $Y = -3.410 \log X + 45.10$ (Y 为 Ct 值,X 为模板浓度),表明标准曲线的 Ct 值与初始浓度有较好的线性关系。

2.3 特异性 对登革 1 型病毒提取核酸的扩增结果为阳性,而对其他 3 型登革病毒以及乙型脑炎病毒提取核酸的扩增结果均为阴性,表明所建立的针对登革 1 型病毒的荧光定量 PCR 方法不会受到其他 3 型登革病毒和乙型脑炎病毒干扰。

2.4 重复性和再现性(表 1、2) 结果表明,配伍设计有效( $F = 2539.037$ , $P < 0.001$ );而 3 个重复孔之间结果无明显差异( $F = 0.814$ , $P = 0.471$ )。各个浓度的 Ct 值均值及变异系数分析结果表明,重复性标准差( $SD'$ )为 0.04 ~ 0.42,再现性标准差( $SD''$ )为 0.098 ~ 0.29,变异系数  $< 2.5\%$ ,方法具有良好的重复性和再现性。

表 1 重复性测量结果统计分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理组间	0.074	2	0.037	0.814	0.471
配伍组间	575.839	5	115.168	2539.037	0.000
误差	0.454	10	0.045		
总变异	7299.341	18			

表 2 不同浓度的 Ct 值均值及变异系数

理论值 (copies/ $\mu$ L)	Ct 值			Ct 值均值	检测值 (copies/ $\mu$ L)	$SD'$	RSD(%)	$SD''$
	1	2	3					
$31.01 \times 10^7$	10.62	10.91	10.86	10.80	$1.144 \times 10^7$	0.155 03	1.43	0.098 49
$1.01 \times 10^6$	14.44	14.28	14.50	14.41	$1.00 \times 10^6$	0.113 72	0.79	0.198 58
$1.01 \times 10^5$	17.25	17.86	18.05	17.72	106 985.64	0.417 97	2.36	0.290 00
$1.01 \times 10^4$	21.40	21.39	21.11	21.30	9 538.33	0.164 62	0.77	0.132 04
$1.01 \times 10^3$	24.69	24.65	24.61	24.65	993.27	0.040 00	0.16	0.242 69
$1.01 \times 10^2$	27.05	26.95	27.25	27.08	192.511	0.152 75	0.56	0.340 20

2.5 敏感性 本研究建立的荧光定量 PCR 方法检测,敏感性可达到 1 copy/ $\mu$ L。

2.6 临床标本的检测(表 3) 采用登革病毒种特异引物探针和本研究建立的登革 1 型病毒型特异引物探针,对 166 份 cDNA 标本进行荧光定量 PCR 检测,均发现 126 份为阳性,阳性率均为 75.9%,Ct 值为 20.84 ~ 36.36,浓度范围为  $1 \sim 1.3 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L;常规 PCR 方法检测到其中 36 份为阳性,阳性率为 21.7%。表明设计的引物探针,对登革 1 型病毒检测的敏感性和特异性较高,适用于临床样本的早期快速检测。

表 3 临床标本不同检测方法的比较

Ct 值	样本数	荧光定量 PCR		常规 PCR	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
$< 25$	3	3	100	3	100
25 ~	13	13	100	12	92.3
30 ~	31	31	100	20	64.5
$\geq 35$	119	79	100	1	1.26
总计	166	126	75.9	36	21.7

## 3 讨论

本研究通过对 4 个血清型的登革病毒基因组序列同源性分析,发现登革 1 型病毒在非结构蛋白基因 NS2A 处有一段 80bp 的保守序列,而且该段基因序列与登革病毒其他 3 型及其他黄病毒属之间存在较大差异。设计的引物探针经研究证实与其他 3 型病毒及乙脑病毒间不存在交叉反应,显示出较高特异性,而且敏感性可达 1 copy/ $\mu$ L,与 Isabelle<sup>(7)</sup>的报导结果接近。验证试验的 Ct 值差异小,表明该方法稳定性较好。以阳性质粒制作的标准曲线回归方程  $Y = -3.410 \log X + 45.10$ ,相关系数  $R^2 = 0.999$ ,扩增效率  $Eff = 96.5\%$ ,可根据此标准曲线对样品中的登革 1 型病毒进行绝对定量。

利用本研究设计的荧光定量 PCR 方法对临床标本进行了检测。在 166 份标本中,检测出 126 份为阳性,而常规 PCR 方法只检测出 36 份,可见荧光定量 PCR 法比常规 PCR 法更加灵敏,而且常规 PCR 法从病毒核酸提取、逆转录、PCR 反应与电泳,整个过程大约需 6 ~ 7 h,而采用本方法仅需 3 h 左右,能同时完成多个样本的高通量检测,可实现对临床疑似病例的早期快速检测和鉴别诊断,并具有快速、敏感、特异并可对标本中病毒进行定量的优点。

## 参考文献

- (1) 贡树基, 赵卫, 曹虹, 等. 登革 2 型病毒全长基因组的长链 RT-PCR 法扩增[J]. 中国公共卫生 2006 22(4): 429-430.
- (2) 周永兵, 左丽, 刘伟, 等. 不明原因发热病人血清中登革病毒核酸检测[J]. 中国公共卫生 2008 24(5): 623-624.
- (3) Halstead SB. Dengue[J]. Lancet 2007 370: 1644-1652.
- (4) David M, Morens MD. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever [J]. The Pediatric Infectious Disease Journal 2009 28: 635-636.
- (5) 姚锦绣, 赵卫, 张玲, 等. 实时荧光 PCR 技术检测登革病毒的研究[J]. 华西医学 2009 24(4): 912-914.
- (6) Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods 1993 41: 311-322.
- (7) Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the

- detection and typing of dengue viruses [J]. Journal of Clinical Virology 2009 45: 61-66.
- (8) Yang L, Zhang H, Guo J, et al. International collaborative study of the endogenous reference gene LAT52 used for qualitative and quantitative analyses of genetically modified tomato [J]. Agricultural and Food Chemistry 2008 56(10): 3438-3443.
- (9) 朱水荣, 张政, 卢亦愚, 等. 嗜肺军团菌荧光定量 PCR 检测[J]. 中国公共卫生 2008 24(9): 1111-1113.
- (10) Ito M, Takasaki T, Yamada K, et al. Development and evaluation of fluorogenic taqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004 42(12): 5935-5937.

收稿日期: 2010-10-05

(王奕编辑 郭薇校对)

## 【检验技校】

## 人及禽类禽流感病毒蛋白芯片检测方法建立

顾大勇<sup>1</sup>, 徐云庆<sup>1</sup>, 史蕾<sup>1</sup>, 赵纯中<sup>1</sup>, 刘春晓<sup>1</sup>, 杨燕秋<sup>1</sup>, 李永进<sup>2</sup>, 林连成<sup>3</sup>

**摘要:** 目的 建立可同时检测人及禽类禽流感病毒的蛋白芯片方法。方法 采用醛基化玻璃载体蛋白芯片和双位点模式, 将禽流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2、NP、NS1 等 9 种亚型抗原以最佳浓度, 点样于玻璃载体表面, 构建相应抗体的检测芯片, 分别用于禽类不同类型禽流感病毒血清及随机选择的人血清检测, 并对特异性、敏感性及重复性进行测试, 与血凝抑制法进行双向验证比较。结果 探针 H1、H3、H5、N1、N2、NP、NS1 亚型抗原的最佳浓度为 1 mg/mL, H7、H9 亚型抗原最佳浓度为 0.5 mg/mL; 检测禽类禽流感病毒及人禽流感病毒使用的酶标抗体浓度分别为 1:1 000 和 1:1 500; 方法具有较好的特异性, 对 H7N7 阳性血清的检测限为 1:40 稀释度; 重复性检测的变异系数均 <2%; 血凝抑制法和蛋白芯片法的检测结果一致。结论 所建立的蛋白芯片法可用于人类和禽类禽流感病毒的检测。

**关键词:** 蛋白芯片; 禽流感; 病毒; 检测

中图分类号: R 373.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0071-03

**Detection of avian influenza virus in birds and human using protein chip** GU Da-yong, XU Yun-qing, SHI Lei, et al. *Research Institute of Disease Control and Prevention, International Travel Health Care Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (Shenzhen 518033, China)*

**Abstract: Objective** To develop a protein chip-based method for simultaneous detection of avian influenza virus (AIV) from birds and human. **Methods** Protein chip was constructed by immobilizing the positive control (PC), negative control (NC) and different antigen subtypes with the optimal concentration onto the aldehyde glass slide according to the predesigned pattern. Then the prepared protein chip was used to detect the serum samples from the different AIV subtype and human. The parameters for the performance of protein chip such as specificity, sensitivity and repeatability were tested in details. In addition, interactive validation experiment was performed using the protein chip-based method and avian influenza virus (H subtype) hemagglutination inhibition test kit. **Results** To construct protein chip, the optimal probe concentrations of H1, H3, H5, N1, N2, NP, NS1 and H7, H9 subtype were 1 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. The optimal concentrations of horseradish peroxidase enzyme labeled antibody for AIV from birds and human were 1:1000 and 1:1500 dilution. The specificity of prepared protein chip was confirmed by testing the samples of H5N1, H7N7, H9N2 positive serum and normal serum. The results were consistent with the expected and there was no cross-reactivity observed. The prepared protein chip had a detection limitation of 1:40 dilution for H7N7 positive serum and showed excellent repeatability validated by consecutive test of 10 times for H5, H7, and H9 positive serum with a variation coefficient of <2%. The results of the interactive validation experiments using protein chip-based method were consistent with those of hemagglutination inhibition test. **Conclusion** The prepared protein chip has a good specificity, sensitivity and repeatability and could be used to detect AIV from birds and human simultaneously.

**Key words:** protein chip; avian influenza; virus; detection

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 属于正黏病毒科

流感病毒属, 是一种 A 型流感病毒<sup>(1)</sup>。根据血凝素 (H) 和神经氨酸酶 (N), 可将 A 型流感病毒分为不同亚型<sup>(2)</sup>, 目前已发现的 16 种血凝素 H 亚型 (H1~H16) 和 9 种神经氨酸酶 N 亚型 (N1~N9) 中, 禽流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2 亚型带有致病性, 并有感染禽类和人类的情况发生; 核蛋白 NP 是 A 型流感的标志, 非结构蛋白 NS1 是病毒复制和急性感染

作者单位: 1. 深圳出入境检验检疫局国际旅行卫生保健中心疾病预防控制中心预防控制研究室, 广东深圳 518033; 2. 长江大学生命科学学院; 3. 深圳市赛尔生物技术有限公司

作者简介: 顾大勇 (1972-) 男, 江苏人, 副研究员, 博士, 研究方向: 微生物分子诊断技术及传感器技术。