

陈倩,李丹,佟巍,等. 实时荧光定量 RT-PCR 方法在登革热小鼠模型中的评估及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 25-31.

Chen Q, Li D, Tong W, et al. Evaluation of a real-time fluorescence quantitative PCR in the dengue mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 25-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.005

实时荧光定量 RT-PCR 方法在登革热小鼠模型中的评估及应用

陈倩,李丹,佟巍,蔡方舟,郭智,鲍琳琳,王卫*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 评估登革病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法,应用于登革热小鼠模型关键指标的检测。**方法** 首先,选择合适的特异引物和探针,分子生物方法制备质粒标准品,优化 PCR 体系和反应条件;其次,评估该实时荧光定量 RT-PCR 方法的灵敏性、特异性及稳定性;最后,验证该方法对登革病毒感染小鼠血清和组织样本的适用性。**结果** 成功确定一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法;该方法较为灵敏,最低检测线为 49.6 Copies/ μ L;方法特异性好,未见非特异性扩增;方法稳定性好,样本 Ct 值标准差均小于 0.5,且 CV < 5%;登革病毒感染小鼠模型样品的检测结果符合实验预期。**结论** 该 qRT-PCR 方法可作为关键指标检测方法,用于登革热小鼠模型病毒的定量检测及评估。

【关键词】 登革热;小鼠模型;实时荧光定量 PCR;TaqMan 探针;定量检测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0025-07

Evaluation of a real-time fluorescence quantitative PCR in the dengue mouse model

CHEN Qian, LI Dan, TONG Wei, CAI Fangzhou, GUO Zhi, BAO Linlin, WANG Wei*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To evaluate a real-time fluorescence quantitative PCR of dengue virus by detection of key indicators in the dengue mouse model. **Methods** Appropriate specific primers and probes were selected, the molecular method was used to prepare the plasmid standard, and the PCR system and reaction conditions were optimized. Then, the sensitivity, specificity, and stability of the real-time fluorescence quantitative PCR method were evaluated. Finally, this method were tested by using serum and tissue samples from dengue virus-infected mice. **Results** One-step real-time fluorescence quantitative PCR was performed successfully. The method was sensitive, and the lowest detection limit was 49.6 copies/ μ L. The method was specific, and non-specific amplification was not observed. The method repeatability was good, the standard deviation of sample Ct values was less than 0.5, and the CV was <5%. The test result of samples from

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2017ZX10304402-001-022);医学与健康科技创新工程(2017-I2M-B&R-11)。

[作者简介] 陈倩(1993—),女,硕士研究生,研究方向:动物学专业。E-mail: qianchen1777@163.com

[通信作者] 王卫(1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。E-mail: wangw@cnilas.org

the dengue virus-infected mice were in line with experimental expectations. **Conclusions** The qRT-PCR method can be used for quantitative detection and evaluation of dengue virus in a mouse model.

【Keywords】 dengue fever; mouse model; real time RT-PCR; TaqMan MGB; quantitative detection

目前国内尚未建立理想的重症登革热动物模型,缺乏指导性强、可靠稳定的病原学指标。文献报告指出病毒的定量检测可针对病毒颗粒、病毒抗原、病毒核酸等^[1]。传统方法有病毒分离方法,常用细胞培养分离和乳鼠颅内接种分离等,该方法比较可靠,但操作繁琐,实验周期长,不利于登革病毒的快速诊断。其次是抗原检测方法,酶联免疫吸附法(ELISA)、胶体金免疫层析法(GICA)和免疫荧光法(IFA)等。但抗原检测方法操作繁琐,检测灵敏度较低,易与其他黄病毒发生交叉反应,产生假阳性^[2-3]。在过去的几十年,分子诊断技术不断进步,使得检测和鉴定各种病原体更加可靠。其中实时荧光定量 PCR 方法逐渐成为病毒快速诊断的新的金标准。本研究对现有登革病毒 RT-PCR 检测方法进行优化,创建一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法,并用于登革病毒感染小鼠模型的评估。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

2 日龄 SPF 级 BALB/c 雄性乳鼠 20 只,体重 2~3 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008],用于登革病毒的扩增。4~6 周清洁级 C57BL/6 背景的 I 型干扰素受体敲除小鼠(*Ifnar1*^{-/-})[SCXK(京)2014-0011],雌雄各半,共计 40 只,体重 18~22 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所北方中心提供,用于登革热小鼠模型制备。动物实验方案得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管里委员会的批准(WW18002)。动物饲养与实验均在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全二级动物实验室(ABSL-2),遵照 3R 原则进行。

1.1.2 病毒株

登革病毒(DENV):I 型(TH-Sman 株)、II 型(New Guinea 株/NGC 适应株/TH-36 株)、III 型(TH87 株)、IV 型(H241 株)均购自 ATCC,本课题组保存。特异性分析所用病毒株包括:肠道病毒 71 型 EV71(MP10 株)、柯萨奇病毒 10 型 CA10(SJZK12-0046T 株)、柯萨奇病毒 16 型 CA16(Shzh05-1 株)、鼠肺炎病毒 PVM(15 株)、鼠肝炎

病毒 MHV(A59 株)、呼肠孤病毒 REO(Abney 株)、鼠诺如病毒 MNV(CW1 株)、及狂犬病毒 RV(CVS 株)分别由中国医学科学院医学实验动物研究所肠道病毒课题组、检测中心及本课题组提供。

1.2 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit; 52904)和实时荧光定量 PCR 试剂盒(Probe RT-PCR Kit; 204443)均购自德国 Qiagen 公司;Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物和探针

根据文献^[4],选择特异引物和 TaqMan 探针,上下游引物及探针序列分别为:5'-GAR AGA CCA GAG ATC CTG CTG TCT-3'; 5'-ACC ATT CCA TTT TCT GGC GTT-3'; 5'-FAM-AGC ATC ATT CCA GGC AC-MGB-3',委托中美泰和公司合成。

1.3.2 标准品的制备

选择 II 型登革病毒(New Guinea 株)3' UTR 的目的片段制备标准品。使用上述特异性引物进行 PCR 扩增,将目的基因克隆于 TOPO 载体,构建质粒作为标准品,以上操作委托中美泰和公司完成。质粒合成后,用紫外分光光度计测定原倍标准品,质粒浓度为 1035 ng/ μ L。

1.3.3 动物感染和取材

为扩增登革病毒,使用 1 mL 胰岛注射器(BD; 328421)吸取 20 μ L New Guinea 病毒液,颅内接种 2 日龄 BALB/c 乳鼠(病毒浓度:8 $\times$ 10⁵ Copies/ μ L)。观察 8~9 d,出现麻痹、抽搐瘫痪等中枢神经系统症状,则安乐处死动物。采取鼠脑,研磨;3500 r/min 离心 15 min,吸取上清冻存于-80℃冰箱。为建立小鼠模型,使用 1 mL 胰岛注射器吸取 100 μ L New Guinea 病毒液,尾静脉接种 *Ifnar1*^{-/-}小鼠(病毒浓度:8 $\times$ 10⁶ Copies/ μ L)。在感染后第 4 天(4 Days Postinfection, Dpi.4)采取组织样本,直接冻存于-80℃冰箱;Dpi.2、4、6、8 采取血液样本,3000 r/min 离心 10 min,吸取上清冻存于-80℃冰箱。

1.3.4 病毒核酸的提取

本实验操作在生物安全二级实验室(BSL-2)的生物安全柜内进行,操作步骤参见试剂盒说明书。

简单地,1.5 mL EP 管内预置 560 μL 病毒裂解液,加入 140 μL 样本;静置 10 min,充分裂解。再加 560 μL 无水乙醇,混匀;转移至 2 mL 收集柱内,8000 r/min;加 500 μL AW1,8000 r/min;加 500 μL AW2,14000 r/min;空离 14000 r/min;换新的 1.5 mL EP 管;加 40 μL AVE,8000 r/min;重复上一步骤。4℃ 保存继续下一步实验,或冻存于-80℃ 冰箱。

1.3.5 一步法实时荧光定量 PCR 反应

根据表 1,配制实时荧光定量 PCR 反应体系;根据表 2,设定反应程序,共 40 个循环。

表 1 PCR 反应体系
Table 1 PCR system

组分 Component	体积 (μL) Volume
RT-PCR 混合液	12.5
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix *	
逆转录混合液 QuantiTect RT Mix	0.25
无 RNA 酶水 RNase-free water	8
上游引物 DENV-F	1
下游引物 DENV-R	1
探针 Probe	0.25
模板 RNA Template RNA	2
总量 Total	25

表 2 PCR 反应程序
Table 2 PCR procedure

时间 Time	温度 (℃) Temperature	循环次数 Cycles
30 min	50	×1
15 min	95	
15 s	94	
60 s	60	×40

1.4 统计学方法

实验中得到的数据使用 SPSS 统计软件进行统计分析,NGC 株与 NGC 适应株感染的小鼠样本重复三次检测,计算各组数据 Ct 值的标准差 (Standard deviation, SD) 和变异系数 (Coefficient of Variation, CV)^[5]。

2 结果

2.1 一步法实时荧光定量 PCR 方法的确定

在获得质粒标准品之后,使用分光光度计测定,测得质粒原液 DNA 浓度为 1035 ng/μL。根据计算公式:质粒拷贝数 (Copies/μL) = 6.02 × 10²³

(Copies/mol) × 质粒浓度 (g/μL) / 质粒分子量 (g/mol)^[6];原倍质粒拷贝数为 4.96 × 10¹¹ Copies/μL,连续十倍稀释,做 6 个稀释度,分别使用 10² ~ 10⁷ 倍稀释的标准品作为模板进行 qRT-PCR,建立扩增曲线 (图 1) 和标准曲线 (图 2)。图 1 中 1~6 为不同的稀释度,分别为 4.96 × 10⁴ ~ 4.96 × 10⁹ Copies/μL,可见各梯度间隔得临界循环数 (threshold cycle, Ct) 基本相等,约 3 个循环左右;以 II 型登革病毒标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标,以 Ct 值为纵坐标建立实时荧光定量 PCR 的标准曲线。由标准曲线得出扩增效率为 95.8%,相关系数 R² = 0.999,表明该 PCR 方法扩增效率较高,线性关系良好。

2.2 荧光定量 PCR 方法的评估

2.2.1 灵敏性分析

为了解该 PCR 方法的灵敏性,将 II 型登革病毒标准品进行十倍连续稀释 (4.96 ~ 49.6 × 10¹⁰ Copies/μL),分别进行 PCR 检测。结果表明:浓度为 4.96 × 10¹ ~ 4.96 × 10¹⁰ Copies/μL 的标准品都能产生扩增曲线,而 4.96 Copies/μL 的标准品未能检测到荧光信号 (见图 3)。由此可知 4.96 × 10¹ ~ 4.96 × 10¹⁰ Copies/μL 为该方法可以检测到的线性范围,最低检测线为 49.6 Copies/μL,灵敏性较好。

2.2.2 特异性分析

为了解该 PCR 检测方法的特异性,使用该 PCR 方法分别检测多种实验小鼠或小鼠模型常见病毒,包括四种血清型的登革病毒 (I 型 TH-Sman 株;II 型 New Guinea 株/TH-36 株;III 型 TH87 株;IV 型 H241 株)、肠道病毒 (EV71、CA10、CA16)、PVM、PHV、REO、MNV 及 RV。结果显示:只有 I ~ III 型登革病毒 (TH-Sman 株、New Guinea 株/TH-36 株、TH87 株) 产生了扩增曲线,其余病毒均未检测到荧光信号 (见图 4),说明无交叉反应,与预想一致,表明该 PCR 方法特异性良好。

2.2.3 稳定性分析

为了解该 PCR 方法的稳定性,本研究使用登革热小鼠模型常用的 II 型登革病毒 (New Guinea 株及 NGC 适应株) 来进行测试。分别将两株登革病毒十倍连续稀释,共 6 个梯度,经 PCR 检测,实验重复三次,结果见表 3。结果显示:每个稀释度样本 Ct 值的标准差均小于 0.5,且 CV 值均小于 5%,表明该方法重复性好,稳定可靠。

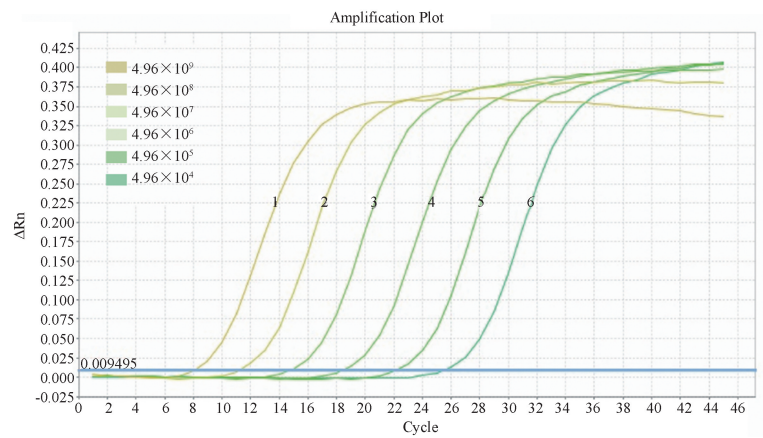


图 1 标准品的扩增曲线
Figure 1 Amplification curve of the standard

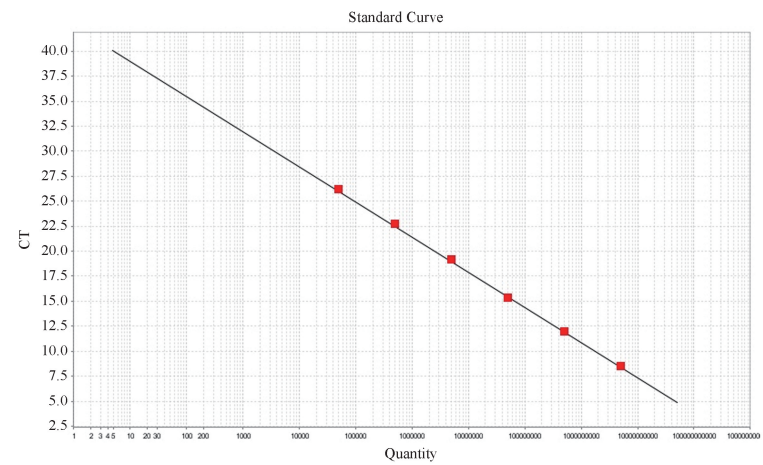


图 2 标准曲线
Figure 2 Standard curve

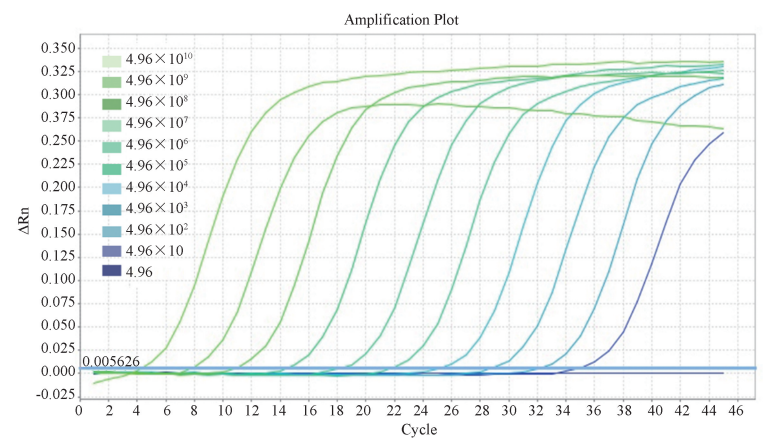


图 3 荧光定量 PCR 方法的灵敏性
Figure 3 Sensitivity of the fluorescence quantitative PCR method

2.3 DENV RT-PCR 方法的初步应用

为确定该 PCR 方法在登革热动物模型研究中的实际使用效果,使用Ⅱ型登革病毒 New Guinea 株

和 N10 株分别感染 I 型干扰素受体敲除小鼠 (Ifnar1^{-/-}),获得感染后不同天数的血清样本及感染后第 4 天的组织样本。经实时荧光定量 PCR 检

测,测得小鼠体内病毒载量的水平与分布。由图 5 可知:New Guinea 株感染 Ifnar1^{-/-}小鼠,血清样本中病毒载量水平在感染后第 2 天达到高峰,在感染后第 8 天消失。由图 6 可知:登革病毒感染小鼠后,病毒主要分布在小肠、脾、肝、肾和脑。在感染后第 4 天,不同组织中病毒载量水平具有差异。New Guinea 株感染小鼠在小肠、肾、肝组织中未见明显病

毒载量,NGC 适应株感染小鼠在肠、脾、肾组织中可检测到高水平的病毒核酸,表明了两株登革病毒在小鼠体内的播散和分布情况。本方法使用于登革热小鼠模型的不同组织样本,多数可检测到荧光信号,Ct 值主要介于 26~31 之间,检出率良好,表明本检测方法可应用于登革热小鼠模型的病毒定量检测。

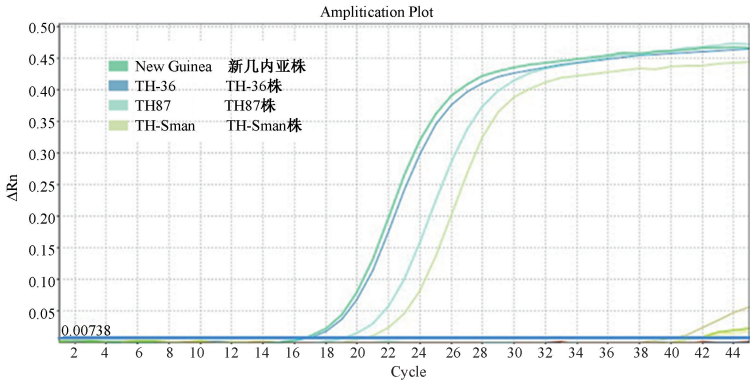


图 4 荧光定量 PCR 方法的特异性
Figure 4 Specificity of fluorescence quantitative PCR method

表 3 荧光定量 PCR 方法的稳定性
Table 3 Repeatability of the fluorescence quantitative PCR method

稀释度 Dilution	Ct 值 ₁		Ct 值 ₂		Ct 值 ₃		平均值		标准差		变异系数	
	Ct value ₁		Ct value ₂		Ct value ₃		Mean		Standard deviation		Variable coefficient	
	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC
	适应株	株	适应株	株	适应株	株	适应株	株	适应株	株	适应株	株
	Adapted strain	Strain	Adapted strain	Strain	Adapted strain	Strain	Adapted strain	Strain	Adapted strain	Strain	Adapted strain	Strain
10 ⁰	17.5	16.5	17.6	16.7	17.7	16.5	17.6	16.5	0.105	0.136	0.59%	0.81%
10 ⁻¹	19.9	19.8	19.5	18.8	19.7	19.4	19.7	19.3	0.196	0.487	0.99%	2.51%
10 ⁻²	22.2	23.3	22.3	22.7	22.8	22.3	22.5	22.8	0.305	0.480	1.35%	2.10%
10 ⁻³	26.6	26.5	26.1	26.4	25.7	26.3	26.1	26.4	0.410	0.075	1.57%	0.28%
10 ⁻⁴	30.2	30.7	29.6	30.4	30.0	29.8	29.9	30.3	0.323	0.460	1.08%	1.51%
10 ⁻⁵	34.6	34.4	34.3	32.8	34.3	34.1	34.4	33.8	0.162	0.860	0.47%	2.50%

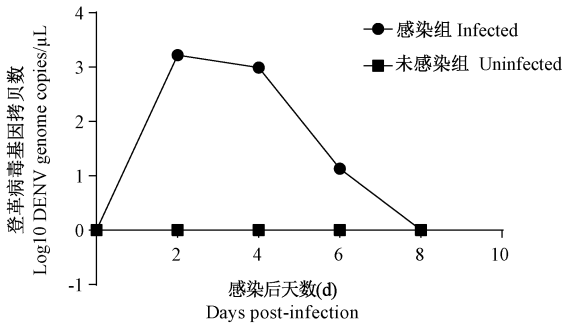


图 5 II 型登革病毒感染 I 型干扰素受体
敲除小鼠血清样本中病毒载量
Figure 5 Viral load in serum samples from Ifnar1^{-/-} mice
infected with dengue virus type II

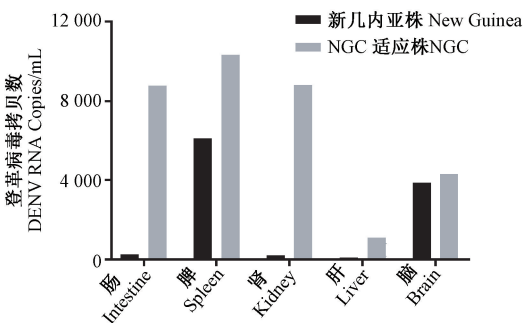


图 6 II 型登革病毒感染 I 型干扰素受体敲除
小鼠组织样本中病毒载量
Figure 6 Viral load in tissue samples from Ifnar1^{-/-}
mice infected with type II dengue virus

3 讨论

登革热和严重登革热是由登革病毒感染引起的传染性疾病,已成为全球性的严重公共卫生问题,目前仍缺少针对该疾病安全有效的药物和疫苗^[7-8]。合适的动物模型是登革热防治产品和策略研究的重要工具^[9]。荧光定量 PCR 方法是感染性模型检测常用的实验方法。本研究旨在评估可应用于登革病毒感染动物模型检测的一步法实时荧光定量 PCR 方法,从而为登革热小鼠模型的建立提供基础方法,推动疫苗和药物的研发进程。

登革热的分子诊断逐渐取代传统的病毒分离方法,成为病毒检测的金标准^[10-11]。在过去十几年中,已经报道了多种基于 RT-PCR 的方法,主要针对 NS1、NS5、3' UTR 等基因序列^[12-14]。Lanciotti 等人^[15]最初报道了两步嵌套式逆转录 PCR,后经 Harris 等^[16]改进为一步多重逆转录 PCR 用于登革病毒的检测和分型。但使用琼脂糖凝胶电泳分析扩增子大小区分四种血清型的登革病毒,灵敏度较低。Shu 等^[17]建立的血清型特异的一步法 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,可以用于登革病毒感染急性期的检测与分型。但由于该染料可非特异性的结合 DNA 双链,因而假阳性信号产生的机率增加^[4, 17-18]。Klungthong 等^[19]使用泰国收集的 16454 例登革热患者阳性血清,提高登革病毒检测的巢式 PCR 的灵敏度,但该方法需两次扩增步骤,操作相对繁琐。Sasmono 等^[10, 20]新建立了 Simplexa Dengue 检测方法,提高了检测的灵敏度。但是,目前登革病毒的分子检测方法主要应用于临床样本,针对登革热动物模型的检测方法较少。

本研究改进并评估检测登革病毒的一步法实时荧光定量 PCR 方法,应用于登革热小鼠模型中。相对于普通的荧光定量 PCR 方法,本检测方法具有以下几个特点。一是使用了新型 MGB 探针,该探针与一般的 TaqMan 探针相比具有多种优势。首先, MGB 探针在 3' 端采用非荧光淬灭基团,本身不产生荧光,取代了常规可发光的荧光标记,大大降低反应的本底信号强度,提高反应的灵敏度。其次, MGB 探针比一般探针的 T_m 值高,约 10℃ 左右,增强反应的特异性^[12]。二是简化了操作步骤,缩短了检测时间。常规实时荧光定量 PCR 检测需要进行逆转录及荧光定量两个步骤,所需 4~6 h 不等;而本检测方法通过使用一步法,只需约 2 h 便可得出

结果。三是针对特定的病毒基因型。根据病毒包膜蛋白 E 的抗原性不同,登革病毒分为 I~IV 个血清型。其中 IV 型登革病毒的遗传偏差较大,与 I~III 型存在较大的遗传差异性(33%)^[21]。而我们建立的动物模型主要针对 I~III 型登革病毒,因此,本方法选择的引物和探针也是针对 I~III 型登革病毒。

本研究使用的登革病毒检测方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性高等优点。通过对 II 型登革病毒不同稀释度的标准品进行检测,最低限度达 49.6 Copies/ μ L,灵敏度较好。同时,对 4 种血清型的登革病毒和多种实验小鼠、小鼠模型常见病毒进行检验,仅登革病毒产生扩增曲线,而 EV71、CA10、CA16 等其他 9 株 RNA 病毒检测结果均呈阴性,表明特异性好。使用 12 份乳鼠脑组织样品重复测定 3 次,标准差均小于 0.5,变异系数小于 5%,表明本方法可重复性高。

登革热小鼠模型的建立及登革病毒检测对于登革热发病机理、药物和疫苗研究具有重要意义^[22]。第一代登革热小鼠模型使用高剂量登革病毒,以颅内注射的方式感染免疫健全小鼠,出现在了登革热患者身上并未观察到的神经症状,如四肢瘫痪、麻痹等。第二代模型使用登革病毒感染缺乏干扰素受体的免疫缺陷小鼠,如 AG129 小鼠等,该模型可模拟部分人类登革热症状,但不适于研究宿主的免疫应答^[23]。在最近的工作中,研究者期望建立登革病毒的小鼠适应株,以低剂量病毒感染小鼠,使其不产生神经症状,更好的模拟人类登革热的临床表现,从而为后续研究奠定基础。本研究将检测登革热患者临床样本的实时荧光定量 PCR 方法改善、评估后,应用于登革热小鼠模型的病毒载量检测中。通过对 40 份不同的小鼠组织样本,如小肠、肝脏、脾脏等和 40 份血清样本进行定量检测,结果显示 $Ifnar1^{-/-}$ 小鼠样品中登革病毒均呈阳性,且病毒载量水平具有差异。表明本检测方法适用于小鼠模型,登革病毒感染后不同时期及不同样本中的检验,检出率良好。值得注意的是,本检测方法用于登革热动物模型,需要明确具体检测时间及待检组织,现有模型样品在病毒感染 8 d 之后,无法检测到阳性结果;还需明确动物种类及用途等,本研究使用一型干扰素受体敲除小鼠($Ifnar1^{-/-}$),如本方法应用于其他物种模型还需要进行预试,避免假阳性和假阴性的出现。

总之,本研究确认并评估了一种针对登革病毒的 qRT-PCR 方法,该方法可特异、灵敏、稳定地检测登革病毒,适用于登革病毒感染动物模型的建立和应用工作中,从而促进登革热发病机制研究及支撑药物疫苗研发。

参考文献:

- [1] Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(4): 642-650.
- [2] Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(12 Suppl): S30-S38.
- [3] Nunes AR, Alves BEB, Pereira HW, et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2018, 113(5): e170393.
- [4] Simmons M, Myers T, Guevara C, et al. Development and validation of a quantitative, one-step, multiplex, real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of dengue and chikungunya viruses [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7): 1766-1773.
- [5] Pang Z, Li A, Li J, et al. Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan qRT-PCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95635.
- [6] Lee C, Kim J, Shin SG, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli [J]. J Biotechnol, 2006, 123(3): 273-280.
- [7] Moris P, Bauer KM, Currier JR, et al. Cell-mediated immune responses to different formulations of a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate in subjects living in dengue endemic and non-endemic regions [J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 15(9): 2090-2105.
- [8] Sharma M, Glasner DR, Watkins H, et al. Magnitude and functionality of the NS1-Specific antibody response elicited by a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate [J]. J Infect Dis, 2019, pii: jiz081.
- [9] St John AL, Abraham SN, Gubler DJ. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(6): 420-426.
- [10] Sasmono RT, Aryati A, Wardhani P, et al. Performance of Simplex dengue molecular assay compared to conventional and SYBR green RT-PCR for detection of dengue infection in Indonesia [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103815.
- [11] Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, et al. Development of an internally controlled real-time reverse transcriptase PCR assay for pan-dengue virus detection and comparison of four molecular dengue virus detection assays [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2172-2181.
- [12] Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses [J]. Virol J, 2009, 6: 10.
- [13] Alm E, Lindegren G, Falk KI, et al. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 493.
- [14] Cruz CD, Torre A, Troncos G, et al. Targeted full-genome amplification and sequencing of dengue virus types 1-4 from South America [J]. J Virol Methods, 2016, 235: 158-167.
- [15] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(3): 545-551.
- [16] Harris E, Roberts TG, Smith L, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(9): 2634-2639.
- [17] Shu PY, Chang SF, Kuo YC, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2408-2416.
- [18] Chen H, Parimelalagan M, Lai YL, et al. Development and evaluation of a SYBR green-based real-time multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses [J]. J Mol Diagn, 2015, 17(6): 722-728.
- [19] Klungthong C, Manasatienkij W, Phonpakobsin T, et al. Monitoring and improving the sensitivity of dengue nested RT-PCR used in longitudinal surveillance in Thailand [J]. J Clin Virol, 2015, 63: 25-31.
- [20] Kusmintarsih ES, Hayati RF, Turnip ON, et al. Molecular characterization of dengue viruses isolated from patients in Central Java, Indonesia [J]. J Infect Public Health, 2018, 11(5): 617-625.
- [21] 邵焰,江丽芳. 登革病毒的分子进化和流行趋势 [J]. 中国病毒学, 2000, (30)12: 31-34.
- [22] 陈倩,鲍琳琳,王卫. 登革热动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志. 2019, 29(5): 120-124, 137.
- [23] Sarathy VV, White M, Li L, et al. A lethal murine infection model for dengue virus 3 in AG129 mice deficient in type I and II interferon receptors leads to systemic disease [J]. J Virol, 2015, 89(2): 1254-1266.

[收稿日期] 2019-10-08