

登革病毒 2 型全长 cDNA 感染性 转录体的构建和鉴定

贡树基^{1**} 赵 卫^{1**} 张文炳¹ 周 浩¹ 陈丽丹¹ 张复春² 严子锵³ 曹 虹^{1*}

(1. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系 广东 广州 510515)

(2. 广州市第八人民医院 广东 广州 510060)

(3. 广州市疾病预防控制中心 广东 广州 510080)

摘 要: 为构建登革病毒感染性克隆, 针对登革病毒 2 型基因组全长 cDNA 的体外转录方法及感染性转录体进行研究。采用长链 RT-PCR 技术, 扩增 DEN2 NGC 株全长基因组 cDNA, 以之为模板, 用 SP6 RNA 聚合酶系统制备体外转录 RNA 转录体, 分别经乳鼠脑内接种及电穿孔转染 BHK-21 细胞, 观察其感染效应。并从受染鼠脑和病变细胞中提取总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增、克隆测序以及电镜观察。结果发现, 从感染鼠脑和细胞中经 RT-PCR 均可扩增出病毒特异的基因片段, 大小与预期一致; 并从乳鼠脑组织和 BHK-21 细胞中观察到恢复病毒颗粒。上述结果表明本文成功构建的 DEN2 NGC 株病毒全长 cDNA 的体外转录体具有感染性, 乳鼠脑内接种途径与电穿孔转染细胞一样可成为体外转录体感染宿主细胞、获得恢复病毒的方法。

关键词: 登革 2 型病毒, 全长 cDNA, 感染性转录体

Construction of Infectious RNA Transcripts from Full-length cDNAs of Dengue 2 Viruse

GONG Shu-Ji^{1**} ZHAO Wei^{1**} ZHANG Wen-Bing¹ ZHOU Hao¹ CHEN Li-Dan¹
ZHANG Fu-Chun² YAN Zi-Qiang³ CAO Hong^{1*}

(1. Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

(2. Guangzhou 8th People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

(3. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: To study the method of *in vitro* transcription and the infectivity of *in vitro* RNA transcripts of full-length cDNAs of dengue 2 viruse, thus to lay the foundation of constructing infectious dengue virus clone. The full-length cDNA of DEN2 NGC was amplified by long RT-PCR. With PCR products as templates, the *in vitro* RNA transcripts could be prepared by the SP6 RNA polymerase system. The transcripts were transfected into BHK-21 by electroporation and inoculated brain of suckling mice respectively. The effect of infectivity of the transcripts was observed. The specific sequences of DEN2 NGC strain were ampli-

基金项目: 广州市科技支撑计划项目(No. 2008Z1-E401); 广州市科技攻关计划重点项目(No. 2004Z2-E0214)

* 通讯作者: Tel: 86-20-61648723; E-mail: gzhcao@fimmu.com

**同为第一作者

收稿日期: 2008-09-18; 接受日期: 2008-12-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

fied through RT-PCR of total RNA extracted from brain of mice and infectious cells and the histopathologic changes of mice brain and cells were observed by electron microscope. The results indicated the specific fragment of the dengue virus could be amplified from infected mice brain and cells, and the virion could be observed. The *in vitro* RNA transcripts of full-length cDNAs of dengue virus were infectious. The dengue virus could be assembled by infecting brain of newborn mice and transfecting cell.

Keywords: Dengue 2 virus, Full-length cDNA, Infectious transcripts

登革病毒(Dengue virus, DEN)属黄病毒科黄病毒属, 基因组为单股正链RNA, 全长约 11 kb, 共有 4 种血清型, 均可引起登革热(Dengue fever, DF)、登革出血热(Dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革休克综合症(Dengue shock syndrome, DSS)^[1]。其中DHF和DSS的病情较为严重, 可导致患者死亡。通常登革 2 型病毒(Dengue 2 virus, DEN2)的感染较其他血清型更为严重^[2]。

由病毒的cDNA体外转录获得恢复病毒是研究RNA病毒致病机理的有效手段。传统的方法, 即利用体外连接的方法是将小片段的RT-PCR产物构建成病毒的基因组全长cDNA, 将其作为模板进行体外转录, 并转染易感细胞获得具有感染性的恢复病毒^[3,4]。本研究利用长链RT-PCR技术, 一次扩增出DEN2 NGC株基因组全长cDNA, 并以之为模板, 体外转录制备RNA转录体, 观察了该RNA转录体的感染性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株与细胞株: DEN2 NGC 株、BHK-21 细胞, 本室保存。

1.1.2 实验动物: 1 d~3 d 龄昆明鼠, 由南方医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 工具酶及主要试剂: RNeasy Mini Kit、Rnasin

(荷兰 Qiagen 公司); RNase H、SuperScriptTMIII 逆转录酶(美国 GibcoBRL 公司); RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems(美国 Promega 公司); RNA Cap Structure Analog(美国 Biolab 公司); TaKaRa LA TaqTM、TaKaRa EX TaqTM、DL-15000 DNA Marker、DL-1200 DNA Marker、DNA 凝胶回收纯化试剂盒(大连 TaKaRa 公司); RPMI-1640 培养基(美国 JRH 公司); 小牛血清(杭州四季青公司); 胰酶和青霉素、链霉素(广州威佳公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 根据 DEN2 NGC 株基因组全序列(GenBank access number: AF038403), 利用 DNASTar 软件包设计扩增全长基因组的引物, 上、下游引物分别命名为 2.0(+)、2.0(-)。在上游引物 2.0(+) 中加入 SP6 RNA 聚合酶启动子核心序列, 下游引物 2.0(-) 中加入 *Cla* I 内切酶位点。另设计 2 对特异性引物, 分别命名为 2.1 和 2.2(表 1)。引物由上海博亚生物技术有限公司广州分公司合成。用无 RNase 水溶解引物, 储存浓度为 100 μmol/L, 工作浓度为 10 μmol/L。

1.2.2 DEN2 NGC 株基因组扩增: 采用 RNeasy Mini Kit 从 DEN2 NGC 株感染鼠脑中提取总 RNA。取总 RNA 15 μL, 加入 10 μmol/L 反向引物 2.0(-) 1 μL, 95℃ 作用 3 min, 随后置冰浴中 1 min, 加入 5× buffer 5 μL、DTT 1 μL、RNasin 1 μL、SuperScript III

表 1 用于登革 2 型病毒全基因组序列扩增和鉴定的引物序列
Table 1 Primers for the amplification and identification the complete genome of dengue 2 virus

引物名称 Primer	核苷酸位置 Position	扩增片段长度 Length of PCR product	5'→3' 引物序列 Sequence(5'→3')
2.0(+) 2.0(-)	1~30 10724~10695	10724 bp	<u>ATTTAGGTTGACACTATAG</u> AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGAC <u>ATCGAT</u> AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC ATTCCA
2.1(+) 2.1(-)	1791~1813 2091~2070	301 bp	CAGGCTGAGGATGGACAAACTAC TCCGGCTCTACTCTATGATG
2.2(+) 2.2(-)	9517~9539 9786~9764	270 bp	GTAGGGCGCGAAAGGTTATCAAG TCGGGCTCTACCAATCAGTTCAT

注: 引物 2.0(+) 序列中下划线部分为启动子 SP6 序列; 引物 2.0(-) 序列下划线部分为内切酶 *Cla* I 酶切位点。
Note: The underlined part in the primer 2.0(+) is SP6 promoter; The underlined part in the primer 2.0(-) is *Cla* I.

逆转录酶 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 1 μL ，最后加 DEPC 处理水至总体积 30 μL ，55 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 h 进行反转录，反应完毕，70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min。逆转录产物中加入 1 μL 重组 RNase H，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min，去除 cDNA 中混合的 RNA。以 2.0(-) 为反向引物，用 SuperScript III 逆转录酶合成第一条链 cDNA。以 2.0(+) 和 2.0(-) 为上、下游引物，扩增 DEN2 NGC 株基因组。PCR 反应体系为：2 μL 模板 DNA (250 ng/ μL)、10 \times 缓冲液 (Mg^{2+} 25 mmol/L) 3 μL 、0.5 μL dNTP (50 mmol/L)、1 μL LA Taq 酶 (5 U/ μL)、2.0(+) 和 2.0(-) 引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、加水补至总体积 30 μL 。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min, 扩增 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增片段大小。扩增产物用 PCR 纯化试剂盒回收。

1.2.3 DEN2 NGC 株全长 cDNA 的转录：采用 Promega 公司 SP6 RNA 聚合酶系统。设 2 个平行管，每管 20 μL 反应液进行体外转录：NTP (25 mmol ATP、CTP、UTP 和 8.33 mmol GTP) 6.0 μL 、帽子结构类似物 [m7G(5') ppp(5')G, 10 mmol/L] 2.5 μL 、SP6 transcription 5 \times Buffer 4 μL 、模板 5 μL (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、SP6 Enzyme Mix 2 μL 、RNasin 0.5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h 后，将其中 1 管加入 RNase A 1 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 20 min 作为对照。0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察转录结果。

1.2.4 转录产物接种鼠脑后恢复病毒的获得及鉴定：
① 转录产物接种乳鼠鼠脑：将体外转录产物(转录体)及对照(经 RNase A 消化)各取 5 管分别接种于 10 只乳鼠脑内，继续与母鼠一起喂养，持续 2 周，观察是否出现脑炎症状，获得恢复病毒。
② 受染鼠脑恢复病毒的 RT-PCR 鉴定：采用 RNeasy Mini Kit 从感染鼠脑中提取 RNA。以 2.0(-) 为反向引物，用 SuperScript III 逆转录酶合成第一条链 cDNA。然后用片段 2.1 的上、下游引物，扩增恢复病毒基因组第 1791~2091 区的特异片段。用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增片段大小。最后将扩增片段用纯化试剂盒回收后，克隆在 pGEM-T 载体，重组质粒命名为 pGEMT-2.1，并对其进行测序鉴定。
③ 受染鼠脑恢复病毒的电镜观察：分别取受染鼠脑及正常鼠脑组织，用 3% 的戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜，电镜观察组织病变特性。

1.2.5 转录产物转染 BHK-21 细胞获得恢复病毒和恢复病毒的鉴定：将体外转录产物(转录体)及对照

(经 RNase A 消化)采用电穿孔法转染 BHK-21 细胞，BHK-21 细胞用 1640 培养液(含 10%FCS、1% HEPES、1% 双抗)培养至单层，将 2 瓶(10 mL 培养瓶)细胞经胰酶消化、吹打分散后移入细胞管，1500 r/min 离心 5 min，半径 162 mm，弃培养液，用冷 PBS 缓冲液洗 2 次，加入 200 μL 冷 PBS 缓冲液中，移入预冷的无菌 0.2 cm Gene Pulser Cuvettes 中。然后加入 20 μL 转录的病毒 RNA，混匀后置冰上 10 min。使用 Gene Pulser II 电穿孔系统，最终优化确定参数为：电压 150 V、25 μF 和 300 Ω 条件下电击 2 次。完成电穿孔后置于冰上，再将电击槽内的细胞无菌条件下接种于培养瓶内，用 1640 培养液 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养，细胞生长成单层，换成 1640 维持液(含 2%FCS、1% HEPES、1% 双抗)，37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养，每天观察细胞状态。
① 恢复病毒的感染性实验及传代：BHK-21 细胞培养到第 6 天，将细胞连同培养液反复冻融 3 次，3000 r/min 离心 20 min，半径 162 mm，收集上清液于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。待正常的 BHK-21 细胞长成单层时，弃去培养基，加入 1 mL 病毒液，均匀覆盖于细胞上，37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后，加入 1640 维持液，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。观察细胞病变，待病变达到+++时，收取病毒培养液，同样处理再次接种 BHK-21 细胞，收获病毒液，即为恢复病毒的种子病毒。
② 细胞转染恢复病毒的 RT-PCR 鉴定：同 1.2.4 方法采用 RNeasy Mini Kit 从感染细胞中提取 RNA。RT-PCR 扩增恢复病毒基因组第 9517~9786 区的特异片段。克隆在 pGEM-T 载体，重组质粒命名为 pGEMT-2.2，对其进行测序鉴定。
③ 细胞转染恢复病毒的电镜鉴定：为观察恢复病毒在 BHK-21 细胞中的形态，用恢复病毒再次感染 BHK-21 细胞传代，待病变达到++时，弃去培养液，用冷 PBS 缓冲液洗细胞 2 次，用 3% 的戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜，电镜观察细胞病变形态。

2 结果

2.1 长链 RT-PCR 的扩增结果

以 DEN2 NGC 株乳鼠鼠脑中提取的 RNA 为模板，RT-PCR 扩增产物于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，有约 11 kb DNA 片段(图 1)，相对分子质量大小与预计相符，纯化后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 DEN2 NGC 株全长 cDNA 体外转录体的制备

以纯化的全长 cDNA 扩增产物为模板，采用

SP6 RNA 聚合酶系统体外转录成 RNA。转录体 RNA 为单链结构(为约 11 kb 的单链 RNA), 将转录产物用 RNase A 消化后, 特异条带消失, 证明转录产物确为 RNA(图 2)。

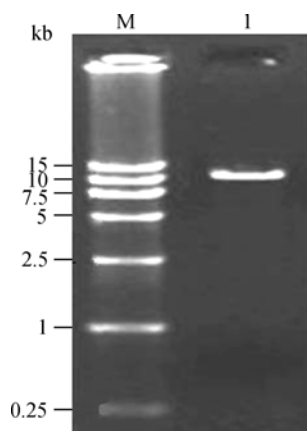


图 1 登革 2 型病毒基因组全长 cDNA 的扩增

Fig. 1 The amplification of genome length cDNA of dengue virus type2

M: DL15000; 1: Genome length cDNA of dengue virus type2.

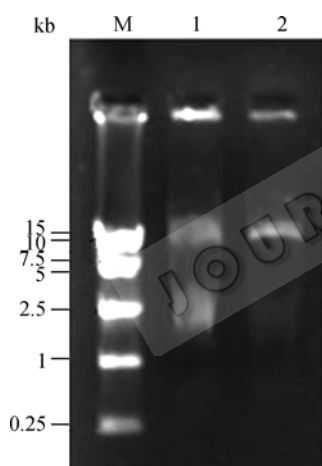


图 2 登革 2 型病毒全长 cDNA 的体外转录

Fig. 2 In vitro transcript of full-length cDNA of dengue virus type2

M: DL15000; 1: Transcript of dengue virus type2; 2: Transcript digested by RNase A.

2.3 转录产物乳鼠脑接种获得恢复病毒

2.3.1 受染鼠脑脑炎症状观察: 体外转录产物(转录体)脑内接种 5 只乳鼠, 饲养约 12 d~14 d 出现神经症状, 如体弱、弓背、离群、行动迟缓等症状, 初步判断受恢复登革病毒感染。

2.3.2 鼠脑中恢复病毒的鉴定: 恢复病毒的分子生物学鉴定: 提取受染乳鼠脑 RNA 后, RT-PCR 方法扩增登革病毒基因组第 9517~9786 区段。PCR 产物

经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 有约 301 bp DNA 片段, 相对分子质量大小与预计相符(图 3)。将扩增特异片段纯化后克隆于 pGEM-T 载体, 进行序列测定。测序结果表明, 所测序列为 DEN2 NGC 株病毒所特有, 表明 DEN2 NGC 株病毒全长 cDNA 的转录体 RNA 接种乳鼠脑内, 在鼠脑内产生了具有感染性的登革 2 型病毒颗粒。

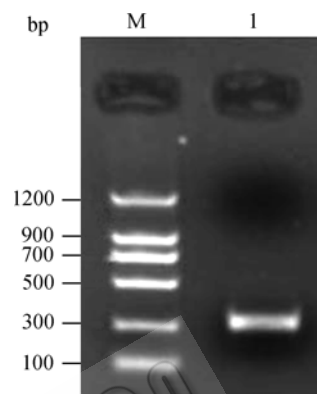


图 3 恢复病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recovered virus by RT-PCR

M: DL1200; 1: Fragments 2.1.

恢复病毒电镜鉴定: 将正常细胞与病变细胞均在电镜下观察, 发现正常细胞线粒体、粗面内质网完好, 镜下未见病毒颗粒形成; 而病变细胞镜下线粒体受损、粗面内质网扩增, 发现数个病毒颗粒形成(图 4)。

2.4 转录 RNA 转染 BHK-21 细胞的感染性观察

2.4.1 转染细胞感染性观察: 将获得的转录产物 RNA(转录体)用电穿孔法转染 BHK-21 细胞, 以经 RNase A 消化转录产物转染 BHK-21 细胞作为阴性对照。7 d 后将对照组和试验组细胞培养液重新接种 BHK-21 细胞, 观察其病变, 结果发现在接种后约 3 d, 试验组能使 BHK-21 细胞产生典型的细胞病变, 表现为细胞变圆、脱落、在细胞单层形成大小不等的网状结构。而转录体经 RNase A 消化转染的 BHK-21 细胞未病变, 证明 DEN2 NGC 株病毒全长 cDNA 的转录体有感染性(图 5)。

2.4.2 转染细胞恢复病毒的鉴定: 恢复病毒的分子生物学鉴定: 提取受染 BHK-21 细胞 RNA 后, RT-PCR 方法扩增登革病毒基因组第 9517~9786 区段。PCR 产物于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 有约 270 bp DNA 片段, 相对分子质量大小与预计相符(图 6)。将扩增特异片段纯化后克隆于 pGEM-T 载体, 进行序

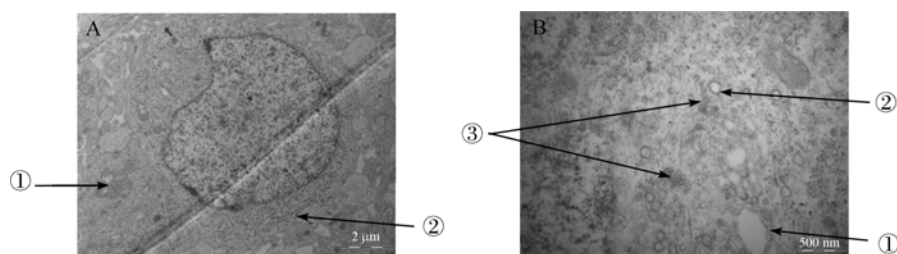


图 4 恢复病毒致鼠脑组织病变的电镜观察

Fig. 4 Electron microscopy observation of mice brain tissue caused by rescued virus

Note: A: Normal mouse brain tissue; B: Pathological changes mouse brain tissue; ①Mitochondria; ②Rough endoplasmic reticulum, RER; ③Virus-like particles.

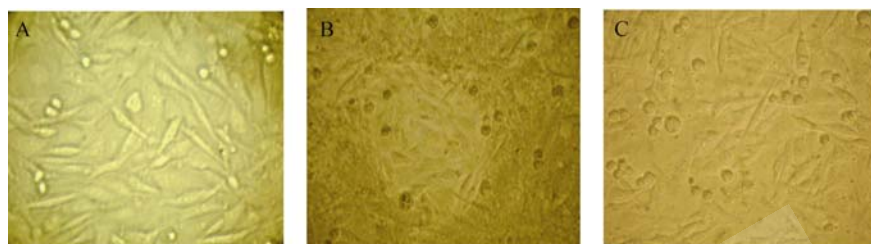


图 5 转染 BHK-21 细胞病变的观察

Fig. 5 BHK-21 cells transfected by electroporation

Note: A: Normal BHK-21 cells; B: BHK-21 cells transfected with infectious transcripts; C: BHK-21 cells treated with transcripts digested by RNase A.

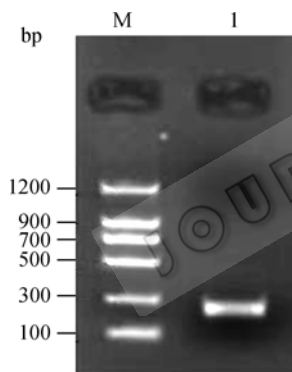


图 6 恢复病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of recovered virus by RT-PCR

M: DL1200; I: Fragments 2.2.

列测定。测序结果表明, 所测序列为 DEN2 NGC 株病毒所特有。

恢复病毒电镜鉴定。将正常细胞与病变细胞均在电镜下观察, 发现正常细胞线粒体、粗面内质网完好, 有少量空泡, 镜下未见病毒颗粒形成; 而病变细胞镜下空泡较多, 线粒体受损、粗面内质网扩增, 发现数个病毒颗粒形成(图 7)。

3 讨论

登革病毒是一类有包膜的单股正链 RNA 病毒, 在复制过程中不形成 DNA 中间体, 因此要在基因水

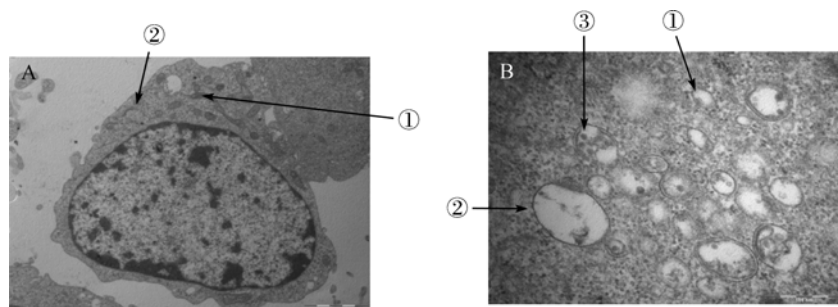


图 7 恢复病毒致转染细胞病变的电镜观察

Fig. 7 Electron microscopy observation of CPE caused by rescued virus

Note: A: Normal BHK-21 cells; B: BHK-21 cells infected by rescued virus (CPE); ①Mitochondria; ②Rough endoplasmic reticulum, RER; ③Virus-like particles.

平研究其特征存在一定的困难, 因为突变、重组和克隆等分子生物学技术都是在 DNA 水平上的操作, 而由病毒 cDNA 进行体外转录以获得恢复病毒是研究 RNA 病毒致病机理的有效方法, 感染性转录技术提供了这项研究的新途径^[5-8]。近年来, 有研究者采用不同方法获得登革病毒转录体 RNA, 再转染不同细胞(如 LLC-MK₂、BHK-21 和 C6/36 等)产生有感染性的病毒^[9,10]。也有将某些 RNA 病毒的转录体 RNA 接种到乳鼠脑内, 观察到其对乳鼠特异性神经毒性的报道, 这一方法主要在日本脑炎病毒(JE)和蜱传脑炎病毒(TBE)中应用较多, 因为此类病毒感染人和鼠后均会表现较强的神经毒性。相反, 登革病毒感染人后很少引发神经症状, 因此登革病毒感染性转录体技术中很少采用鼠脑接种的方法。Lee 等^[11]曾利用带 DEN2 NGC 株全长基因组的质粒, 体外转录后, 将 RNA 接种到 6 日龄的乳鼠脑内, 成功获得具有感染性的登革 2 型病毒颗粒, 这是唯一利用乳鼠接种代替转染细胞实现感染性转录体技术的报道。近来开始有较多登革病毒能够感染神经元细胞并引起脑炎的报道^[12], 为在登革病毒感染性转录体技术中采用乳鼠脑内接种途径提供了理论基础。

本研究中全长 cDNA 的构建是利用长链 RT-PCR 技术一次扩增出登革 2 型病毒全长基因组。设计引物时, 在病毒序列上游加入 SP6 RNA 聚合酶启动子核心序列, 直接将扩增产物作为体外转录的模板, 在 SP6 RNA 聚合酶作用下, 在转录 RNA 的 5' 端加上一个帽子结构类似物 m⁷G(以提高转录体的稳定性), 制备出微克级的转录体 RNA。为获得恢复病毒, 并验证转录体 RNA 是否与 DEN2 NGC 株病毒具有相同的感染性, 将其接种于乳鼠脑或电穿孔转染 BHK-21 细胞, 结果显示乳鼠接种 2 周后, 小鼠出现神经症状, 电穿孔转染 BHK-21 细胞约 1 周后, 产生明显的致细胞病变效应(CPE), 从分子和细胞水平及动物模型上证实 DEN-2 的体外转录体 RNA 具有感染性。体外转录体 RNA 进一步接种鼠脑和转染 BHK-21 细胞, 用 RT-PCR 和电镜观察证实有恢复登革病毒产生, 并且我们发现将体外转录体 RNA 接种乳鼠脑直至鼠死亡, 与登革病毒株直接接种乳鼠脑相比, 乳鼠发病程度较轻, 发病时间也晚的多(DEN2 NGC 株 5 d 左右引起乳鼠发病), 表明以登革病毒 cDNA 为模板的体外转录体 RNA 在宿主细胞内需更长时间才能包装成完整的病毒颗粒, 而本实验

通过体外感染性转录体技术获得恢复病毒的方法, 为进一步研究登革病毒的致病机理和新型防治策略提供了重要手段。

参 考 文 献

- [1] 贡树基, 赵 卫, 曹 虹. 登革病毒感染实验室诊断的研究进展. 中国人兽共患病杂志, 2005, **21**(12): 1103-1105.
- [2] Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, 2000, **181**: 2-9.
- [3] Rice CM, Grakouri R, Gall R. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *Nature New Biology*, 1989, **1**: 285-296.
- [4] Suzuki R, Borba LD, Duarte dos Santos CN, *et al.* Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology*, 2007, **362**: 374-383.
- [5] Dar A, Munir S, Vishwanathan S, *et al.* Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus. *Virus Res*, 2005, **110**: 41-45.
- [6] Khatri M, Palmquist JM, Cha RM, *et al.* Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Res*, 2005, **113**: 44-50.
- [7] Vaughan G, Gonzalez-Hernandez Y, Gudino J, *et al.* An alternative method for the synthesis of competitor RNA transcripts useful for specific detection and quantitation of dengue virus serotype 2 genome and replicative intermediate RNA. *J Virol Meth*, 2008, **152**: 72-76.
- [8] Das S, Pingle MR, Muñoz-Jordán J, *et al.* Detection and serotyping of dengue virus in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR-ligase detection reaction assay. *J Clin Microbiol*, 2008, **46**: 3276-3284.
- [9] Puri B, Polo S, Hayes CG, *et al.* Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific, 74 strain. *Virus Genes*, 2000, **20**: 57-63.
- [10] Polo S, Ketner G, Levis R, *et al.* Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol*, 1997, **71**: 5366-5374.
- [11] Lee YR, Huang KJ, Lei HY, *et al.* Suckling mice were used to detect infectious dengue-2 viruses by intracerebral injection of the full-length RNA transcript. *Intervirology*, 2005, **48**: 161-166.
- [12] An J, Zhou DS, Kawasaki K, *et al.* The pathogenesis of spinal cord involvement in dengue virus infection. *Virchows Arch*, 2003, **442**: 472-481.