

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00152

应用单管巢式多重 PCR 技术检测登革病毒及分型

李淑华¹, 方美玉², 刘世建¹, 常文军¹, 王珊珊², 曹广文^{1*}

1. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

2. 广州军区疾病预防控制中心微生物研究室, 广州 510000

[摘要] **目的** 建立一种单管巢式多重 RT-PCR 方法, 以用于临床对于不同型别登革病毒混合感染的检测并分型。**方法** 将 1~4 型登革病毒 RNA 混合, 首先用 1~4 型病毒通用外引物进行一步法 RT-PCR, 然后以混合病毒 RT-PCR 产物为模板, 在同一反应管内同时加入 4 对(5 条)型特异性引物进行巢式多重 PCR, 结果用 EB 染色的 3% 琼脂糖凝胶电泳观察; 并将其检测敏感性和特异性与该方法的单一病毒模板 RNA 扩增进行比较。**结果** 经反应条件的优化, 混合病毒模板单管巢式多重 PCR 可以在同一反应管内同时扩增出 4 条病毒特异性目的条带, 分别为 482、119、290、389 bp。其敏感性和特异性与单一病毒 RNA 的扩增相当, 对模板 RNA 检测的敏感性可以达到 66.068 copies/ μ l。**结论** 该方法简便、快速、敏感、特异, 可以根据扩增目的片段的大小进行诊断和分型, 对于临床登革病毒混合感染病例的诊断和快速分型有应用价值。

[关键词] 登革病毒; 混合感染; 单管巢式多重聚合酶链反应

[中图分类号] R 373.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0152-05

Rapid detection and typing of Dengue virus by single-tube nested multiplex-PCR

LI Shu-hua¹, FANG Mei-yu², LIU Shi-jian¹, CHANG Wen-jun¹, WANG Shan-shan², CAO Guang-wen^{1*}

1. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Infectious Diseases, Center of Disease Control and Prevention of PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510000, China

[Abstract] **Objective** To establish a single-tube nested multiplex-PCR assay for rapid detection and typing of Dengue viruses for multiple infections with different serotypes. **Methods** A pair of outer universal primers designed for all the four Dengue virus serotypes were used to amplify the mixed RNA of 1-4 dengue viral serotypes by one-step RT-PCR, and the products were used as template for nested multiplex PCR using four pairs of serotype-specific primers in the same reaction tube. The sensitivity and specificity of single-tube nested multiplex PCR assay amplifying from the mixed 1-4 serotype dengue viral RNA were subsequently compared with those amplifying from the single serotypes dengue viral RNA. **Results** By optimizing the reaction condition, four specific fragments (482, 119, 290, and 389 bp) were successfully amplified from the mixed RNA of 1-4 serotypes dengue viruses in single tube by single-tube nested multiple-PCR. Its sensitivity and specificity amplifying from the mixed RNA of 1-4 serotypes dengue viruses were similar to those amplifying from the single serotype dengue viral RNA. The detection limit of nested multiple-PCR was 66.068 copies/ μ l. **Conclusion** Single-tube nested multiple-PCR method is simple, rapid, sensitive, and specific for detecting and typing dengue viruses, and it is valuable for detecting and typing of the clinical multiple infections.

[Key words] Dengue virus; multiple-infection; single-tube nested multiple-polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):152-156]

登革病毒(Dengue virus, DV)属黄病毒科黄病毒属, 是登革热的病原体, 根据抗原性不同, 可将登

革病毒分为 1、2、3、4 共 4 个血清型。登革病毒感染(Dengue virus infect, DVI) 主要由埃及伊蚊和白纹

[收稿日期] 2009-03-28 **[接受日期]** 2009-12-02

[基金项目] 第 43 批中国博士后科学基金(20080431367), 军队“十一五”科技攻关计划课题基金(06G65), 上海市自然科学基金(07ZR14141). Supported by the Forty-third Post-doctoral Science Foundation(20080431367), the “11th-Five-Year-Plan” for Tackling Science and Technology Problems of PLA(06G65), and Natural Science Foundation of Shanghai(07ZR14141).

[作者简介] 李淑华, 博士. E-mail: hsl167@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

伊蚊为传播媒介,可引起登革热(dengue fever, DF)、登革出血热(Dengue hemorrhage fever, DHF)和登革休克综合征(Dengue shock syndrome, DSS)。登革出血热和登革休克综合征是登革热的严重类型,病死率高。登革热主要流行于热带、亚热带地区,以东南亚国家的流行最为严重,该地区也是世界上重要的登革病毒疫源地。近年来,由于全球气候变暖、国际旅游频繁和对蚊虫缺乏有效的控制措施,登革病毒感染有扩大之势,发病率不断升高。目前,登革热广泛流行于 100 多个国家和地区,在我国登革热属输入性流行,自 1978 年广东省佛山市首次从病原学确诊登革热流行以来,我国共有 650 万人感染 DV。2002 年国内首次发现登革病毒 2 个型同时感染的病例^[1]。由于登革热临床表现复杂多样、传播迅速、发病率高、人群易感染、目前尚无特异性疫苗防治措施等。研究建立快速早期检测的方法在登革病毒感染的预防和控制中具有重要意义。

登革病毒的传统检测方法常用病毒分离、血清学检查,由于其工作量大,所需时间长,4 个不同型别的登革病毒在血清学上有交叉反应等,均不宜作为早期诊断的方法。随着分子生物学技术的不断发展与完善,核酸检测技术以其灵敏性、特异性和快速性等特点,为登革热的早期诊断提供了可能,这些技术包括 RT-PCR 和 nested-PCR,多重 PCR 及 real-time PCR 等体外聚合酶链反应技术^[2-5]。但上述方法都是针对单一型病毒感染的诊断,1~4 型病毒分

管进行反应,容易造成阳性标本间的交叉污染而得到假阳性结果。肖维威等^[6]利用多重 PCR 技术单管内成功对混合病毒进行了扩增。因此,本研究利用另外一套多重 PCR 引物,并与常规 RT-PCR 相结合,对混合病毒 RNA 进行单管反转录巢式多重 PCR,并对最低检测模板的拷贝数进行了精确定量,以期实现对临床登革病毒混合感染病例进行早期快速诊断和分型。

1 材料和方法

1.1 登革病毒的来源 1~4 型登革病毒国际标准毒株(1 型 Hawaii 株、2 型 New Guinea C 株、3 型 H87 株和 4 型 H241 株)由广州军区疾病预防控制中心保存。1~4 型地方流行株为广东省不同地区的分离株,均来自临床登革热病例。根据基因型和流行年份实验室命名为 91DV1、95DV1、97DV1、99DV1、03DV1、06DV1、93DV2、98DV2、01DV2、78DV4 和 90DV4。上述国际标准毒株及地方流行株分别经乳鼠脑内接种及 C6/36 细胞培养复活。

1.2 引物设计 根据参考文献^[3-4],常规 PCR 外侧通用引物为 D1 和 D2。同时 D1 为内侧通用正向引物,登革病毒 1~4 型反向特异引物分别为 TS1、TS2、TS3、DEN4。各型登革病毒引物设计分别参考国际标准毒株: Hawaii (EU848545)、New Guinea C (AF038403)、H87(M93130)、H241(AY947539)。各引物序列在参考株基因位置及扩增片段长度见表 1。

表 1 1~4 型登革病毒型特异性引物

Tab 1 Sequences of primers for 1-4 serotype dengue viruses

Serotype	Name	Location	Sequence(5'-3')	bp
	D1	134-161*	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	511
	D2	616-644*	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	
DEN-1	TS1	568-586	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	482
DEN-2	TS2	232-252	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	119
DEN-3	TS3	400-421	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	290
DEN-4	DEN4	494-516	TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC	389

* New Guinea C(AF038403). D1 location: DEN-1, 133 bp; DEN-3, 132 bp; DEN-4, 128 bp

1.3 RNA 提取 采用 TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP315)方法,分别提取上述经鼠脑及 C6/36 细胞培养复活的登革 1~4 型标准株及各型地方流行株病毒 RNA。每份取培养上清液 200 μ l,按说明书操作,最后沉淀物用 20 μ l DEPC 处理水溶解,备用。

1.4 单对型引物特异性 RT-PCR 及巢式 RT-PCR 扩增 单对型引物特异性 RT-PCR 扩增以提取的单一病毒 RNA 为模板,分别以单对型特异性引物

进行一步法 RT-PCR 扩增,所用试剂盒为 Access RT-PCR System(Promega, A1250)。按试剂盒说明配置反应体系: 5 \times 反应缓冲液 10 μ l, MgSO₄ (25 mmol/L) 2 μ l, dNTPMix(10 mmol/L) 1 μ l, 上游引物(D1, 50 μ mol/L) 和下游引物(TS1/TS2/TS3/DEN4, 50 μ mol/L) 分别为 0.5 μ l, AMA 反转录酶(5 U/ μ l) 1 μ l, *Tfl* DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 1 μ l, RNA 模板 2 μ l, 补足 DEPC 处理水至总体积 50 μ l。扩增反应条件: 48 $^{\circ}$ C 反转录 45 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min 变性,

94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 68℃ 2 min 循环 35 次, 68℃ 延伸 10 min。单对型引物巢式 RT-PCR 扩增首先分别对提取的单病毒 RNA 模板进行外侧通用引物 D1、D2 的一步法 RT-PCR 扩增, 所用试剂盒及方法同前; 各对型引物巢式扩增以通用外引物 RT-PCR 扩增产物为模板, 反应体系为: 通用外引物 RT-PCR 扩增产物 2 μ l, 上游引物(D1, 50 μ mol/L) 和下游引物(TS1/TS2/TS3/DEN4, 50 μ mol/L) 各 0.5 μ l, 10 \times Taq Buffer 5 μ l, 2.5 U/ μ l Taq DNA 酶(TIANGEN)1 μ l, dNTPMix(10 mmol/L) 1 μ l, 补足 H₂O 至 50 μ l 总体积。反应条件: 94℃、2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。上述反应结束后, 经琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 单型病毒模板多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 扩增 分别以单型病毒 RNA 及通用外引物单型病毒 RT-PCR 扩增产物为模板, 用 4 对型引物构建多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 体系。单型病毒模板多重 RT-PCR 在同一反应管内同时加入 D1、TS1、TS2、TS3、DEN4 共 5 条(4 对)引物, 各引物浓度分别为 50 μ mol/L D1 2 μ l, 50 μ mol/L TS1、TS2、TS3、TS4 各 0.5 μ l, 所用试剂盒及其方法同单对型引物 RT-PCR。单型病毒模板巢式多重 RT-PCR 扩增分别以单型病毒通用外引物 RT-PCR 扩增产物为模板, 在同一反应管内同时加入 D1、TS1、TS2、TS3、DEN4 共 5 条(4 对)引物, 各引物浓度分别为 50 μ mol/L D1 2 μ l, 50 μ mol/L TS1、TS2、TS3、TS4 各 0.5 μ l, 所用试剂及方法同单对型引物巢式 RT-PCR。

1.6 混合病毒模板多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 扩增 取 1~4 型病毒 RNA 各 2 μ l 混合为模板, 构建 4 对型引物多重 RT-PCR 扩增体系, 所用引物浓度及方法同单型病毒模板多重 RT-PCR。巢式多重 RT-PCR 首先将前述 1~4 型病毒 RNA 混合模板, 以通用外引物 D1、D2 进行扩增, 在以扩增产物为模板在同一反应管内进行 5 条(4 对)引物的多重 PCR 扩增。所用引物浓度及方法同单型病毒模板巢式多重 RT-PCR 扩增。

1.7 登革病毒提取 RNA 模板定量 以 1 型登革病毒为例(91DV1), 运用 TaqMan 探针法对提取的 1 型登革病毒 RNA 进行实时定量 PCR, 所用引物和探针序列位于 D1、D2 之间, 上游 DV1F: 5'-TGA ACA TAA TGA ACA GGA GGA AAA GAT-3', 下游 DV1R: 5'-CCC TCG GGT GGT CAG ATG-3'; DV1 Probe: 5'-(Fam) TGT TAC CAT GCT CTT CAT GCT GCT GCC(TAMRA)-3'。

定量标准品系列是以 D1、D2 扩增产物(511 bp)制备, 标准品拷贝数为 10⁸/ μ l, 以上由上海基康公司制备。荧光定量模板为 cDNA, 首先取 10 μ l 病毒 RNA, 用随机引物进行反转录, 反转录反应体系为 20 μ l, 反应结束后取 2 μ l 反转录产物 cDNA 为模板配制荧光定量反应体系: 20 μ mol/L DV1 Probe 0.25 μ l, 20 μ mol/L DV1F 0.45 μ l, 20 μ mol/L DV1R 0.45 μ l, 2 \times TOYOBO Master mix 5 μ l, H₂O 1.85 μ l, 总体积 10 μ l。标准品作 10 倍比稀释, 平均浓度(copies/ μ l)依次为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³, 取 2 μ l 模板, 反应体系同上, 检测样品与标准品系列反应体系一同置于 ABI 7700 定量 PCR 仪(GC240062-1), 反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 循环 40 次。按标准曲线法计算模板 cDNA 浓度, 从而根据上述的反应过程可以推算定量所提取体积为 20 μ l 的病毒 RNA 模板的浓度。

1.8 多重 PCR 的敏感性与特异性 以登革病毒 91DV1 为例, 将病毒 RNA 进行倍比稀释(10 μ l RNA 加 90 μ l 水)成不同浓度系列(10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰), 按上述方法分别构建单病毒及混合病毒的多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 反应体系, 比较各反应体系对 RNA 模板的最低检出量。特异性检测以乙脑病毒为对照, 按上述方法扩增, 结果与阴性对照扩增结果进行比较。

2 结果

2.1 单对型引物特异性 RT-PCR 及巢式 RT-PCR 扩增 通用外引物 D1、D2 对各型登革病毒的 RT-PCR 扩增结果均可见单一的 511 bp 目的基因条带(图 1A)。单对型引物特异性 RT-PCR 扩增结果分别可见各型登革病毒预期的目的基因条带, 分别为 482、119、290、389 bp(图 1B)。巢式扩增结果与单对型引物特异性 RT-PCR 扩增结果一致(图 1B)。同时由图 1 可见, 各地方流行株与 1~4 型国际标准株扩增结果一致, 目的片段大小相同。随机选取 91DV1、01DV2、90DV4 地方株 511 bp 目的基因送上海基康公司测序, 结果与各型国际标准株序列同源性分别为 95%(488/511)、93%(480/511)、96%(508/511)。结果说明所用引物对各型地方流行株病毒的扩增具有较好的特异性, 并将 91DV1、01DV2、H87、90DV4 株作为本研究各型病毒的实验代表株。

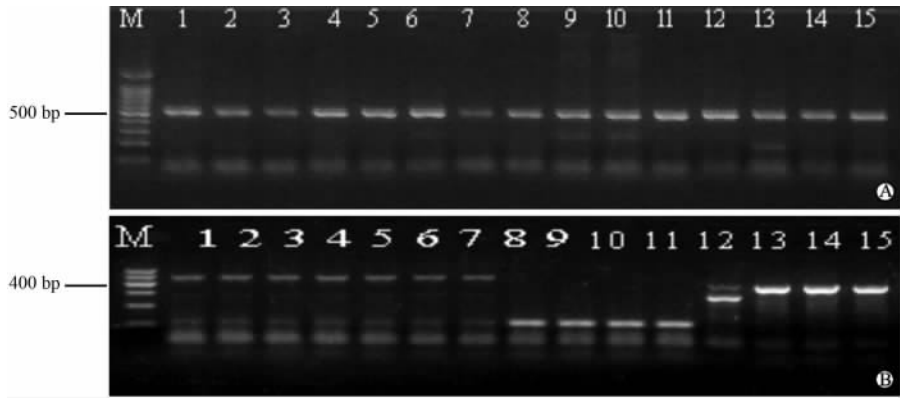


图 1 RT-PCR 与巢式 RT-PCR 扩增结果

Fig 1 RT-PCR and nested-RT-PCR results

A: RT-PCR results with a pair of outer universal primers D1, D2; B: RT-PCR and nested-RT-PCR results with a pair of serotype-specific primer. M: Marker; 1: Hawaii strain; 2-7: 91DV1, 95DV1, 97DV1, 99DV1, 03DV1, 06DV1; 8: New Guinea C strain; 9-11: 93DV2, 98DV2, 01DV2; 12: H87 strain; 13: H241 strain; 14, 15: 78DV4, 90DV4

2.2 单型病毒模板多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 扩增 按前述实验方法, 4 株实验代表株 91DV1、01DV2、H87、90DV4 单型病毒模板多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 扩增结果一致, 如图 2 所示, 可见各型病毒单一目的条带, 分别为 482、119、290、389 bp。

2.3 混合病毒模板多重 RT-PCR 及巢式多重 RT-PCR 扩增 4 株实验代表株 91DV1、01DV2、H87、90DV4 混合病毒 RNA 模板多重 RT-PCR 结果与巢式多重 RT-PCR 扩增结果均可见在同一反应体系中同时出现 4 条各型病毒目的基因条带, 如图 2。

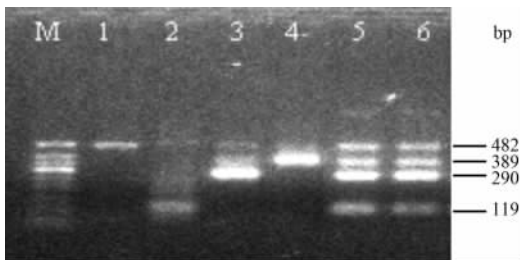


图 2 多重 RT-PCR 与巢式多重 RT-PCR 扩增结果

Fig 2 Multiple RT-PCR result with four pairs of serotype-specific primers

M: Marker; 1-4: Single serotypes dengue viral amplification 91DV1, 01DV2, H87, 90DV4; 5: The mixed 1-4 dengue viral RNA (91DV1, 01DV2, H87, 90DV4) amplification by multiple RT-PCR; 6: The mixed 1-4 dengue viral RNA (91DV1, 01DV2, H87, 90DV4) amplified by nested multiple RT-PCR

2.4 1 型登革病毒荧光定量 PCR 以 91DV1 株为例, 91DV1 反转录产物 cDNA 检测样品 Ct 值为 19.942 467, real-time PCR 标准曲线见图 3。计

算得 91DV1 反转录产物 cDNA 样品浓度为 6 606 822.8 copies/2 μ l, 依据各反应过程的模板加样量推算, 所提取的体积为 20 μ l 的病毒 RNA 浓度约为 6 606 822.8 copies/ μ l。

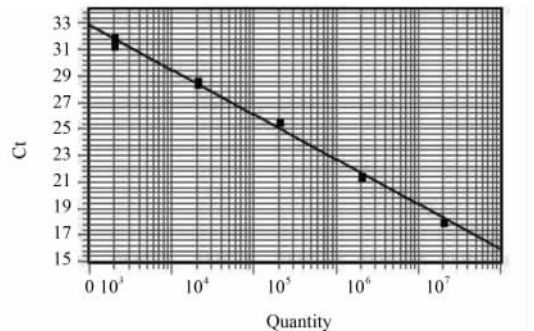


图 3 91DV1 株荧光定量 PCR 扩增标准曲线

Fig 3 Standard curve of series of diluted positive standard control (91DV1) tested by real-time PCR assay

2.5 多重 RT-PCR 与巢式多重 RT-PCR 敏感性与特异性比较 以不同稀释浓度的 1 型登革病毒为例, 91DV1 株病毒模板的多重 RT-PCR 可扩增到 10^{-4} 稀释度, 理论上估算 RNA 模板浓度约为 660.68 copies/ μ l, 而巢式多重 PCR 可扩增到 10^{-5} 稀释度, 理论上估算 RNA 模板浓度约为 66.068 copies/ μ l。特异性结果(图 4)表明, RT-PCR 对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。将不同稀释度的 1 型登革病毒 RNA 分别与 2、3、4 型病毒混合, 结果混合病毒的多重 RT-PCR 及巢式多重 PCR 中, 1 型登革病毒 RNA 的最低检测浓度与单一型病毒结果相当。

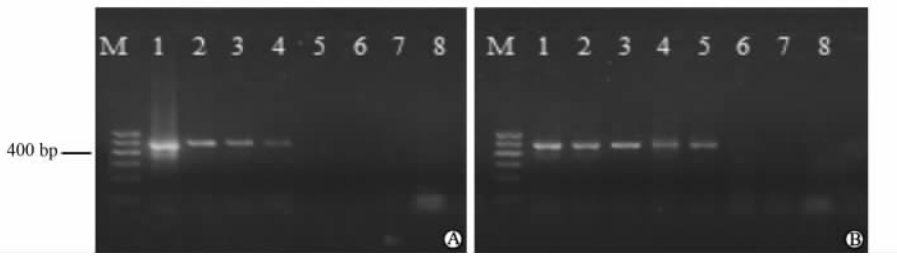


图4 多重 RT-PCR(A)与巢式多重 RT-PCR(B)敏感性与特异性比较

Fig 4 Sensitivity and specificity of multiple RT-PCR(A) and nested multiple RT-PCR(B)

M:Marker;1:10⁻¹;2:10⁻²;3:10⁻³;4:10⁻⁴;5:10⁻⁵;6:10⁻⁶;7:RNA(-);8:JEV

3 讨论

登革热多为单一型病毒感染,两型以上同时感染者较少见。登革病毒感染后产生的抗体可持续终生,对同型病毒的再感染有保护作用,也可对其他型别病毒的感染提供短暂的保护。但绝大多数的病例显示,异型病毒的感染能够引起机体产生免疫超敏反应,导致发生登革出血热和登革休克综合征的危险性较大,病死率约 5%~15%。登革病毒感染有一定的地域性和流行性,输入性病例的增加会加强混合感染机会,随着国际旅游频繁,登革病毒的混合感染有日趋上升的趋势。20 世纪 80 年代国外相继有登革病毒混合感染的报道:如登革 1 型和 4 型病毒^[7],登革 1 型和 3 型病毒^[8],登革 1 型和 2 型病毒及登革 2 型和 3 型病毒^[9-10]的同时感染等。进入 21 世纪以来,我国也陆续报道有登革病毒混合感染(2 型和 3 型)的病例^[1]和不断的输入性病例^[11]。因此加强混合感染病例的快速诊断对控制感染和流行具有重要的意义。

本研究以国际标准株设计引物,以地方流行株为实验对象,利用单管多重 RT-PCR 及巢式 RT-PCR 技术,在同一反应管内成功将 1~4 型混合病毒同时扩增,同时取得各型病毒目的基因条带。该方法避免了常规实验中由于单病毒分管反应导致的交叉污染,具有操作简单、产出多、快速等特点,其灵敏性与特异度与单型病毒的扩增相当。巢式多重 RT-PCR 经 2 次 PCR 扩增,病毒基因组信息量加倍放大,使检测的敏感性达到 66.068 copies/ μ l,有利于临床血清样品中低病毒含量的检出。该方法实现了一次反应可对 4 型登革病毒混合感染进行分型和鉴别诊断的目的。

另外,该方法中随机选择的实验代表株除 3 型外,其他 3 个型别都是来自于地方流行株,与国际标准株同源性较高,具有广泛的代表性与推广性,尤其

是对于临床登革病毒混合感染的诊断和快速分型有重要的应用价值。

[参考文献]

- [1] 于曼,彭文明,范宝昌,邓永强,秦泰德,姜涛,等.国内首次自患者标本中同时分离的登革 2 型和 3 型病毒的鉴定[J].微生物学报,2004,44:717-719.
- [2] Harris E,Roberts T G,Smith L,Selle J,Kramer L D,Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiple reverse transcriptase PCR[J]. J Clin Microbiol,1998,36:2634-2639.
- [3] Saxena P,Dash P K,Santhosh S R,Shrivastava A,Paridat M, Lakshmana Rao P V. Development and evaluation of one step single tube multiple RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses[J]. Virol J,2008,5:20.
- [4] Lanciotti R S,Calisher C H,Gubler D J,Chang G J,Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue virus from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol,1992,30:545-551.
- [5] Chutinimitkul S,Payungporn S,Theamboonlers A,Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I [J]. J Virol Methods,2005,129:8-15.
- [6] 肖维威,马文丽,郑夔,黄吉城,郑文岭.用多重 PCR 快速检测登革病毒并分型[J].检验医学,2004,19:393-395.
- [7] Gubler D J,Kuno G,Sather G E,Waterman S H. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses[J]. Am J Trop Med Hyg,1985,34:170-173.
- [8] Laille M,Deubel V,Sainte-Marie F F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction[J]. J Med Virol,1991,34:51-54.
- [9] Kanasa-thasan N, Iacono-Connors L, Magill A, Smoak B, Vaughn D, Dubois D, et al. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia[J]. Lancet,1994,343:678.
- [10] Rocco I M,Barbosa M L,Kanomata E H. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo,1998,40:151-154.
- [11] Xu G Z,Dong H J,Shi N F,Liu S J,Zhou A M,Cheng Z H, et al. An outbreak of dengue virus serotype 1 infection in Cixi, Ningbo, People's Republic of China, 2004, associated with a traveler from Thailand and high density of *aedes albopictus* [J]. Am J Trop Med Hyg,2007,76:1182-1188.

[本文编辑] 尹茶