

原位杂交技术在斜带石斑鱼神经坏死病毒检测中的应用

陈晓艳^{1,2}, 何建国¹

(1. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632)

摘要: 根据斜带石斑鱼(*Epinephelus coioids*) 神经坏死病毒(orange spotted nervous necrosis virus, OGNNV) 的主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP) 基因的保守序列, 设计一对引物, 从感染 OGNNV 的斜带石斑鱼组织匀浆液提取 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 得到 426 bp 的 cDNA 片断。用得到的 RT-PCR 产物加上地高辛(DIG) 标记作为核酸探针。通过注射病毒提取液人工感染一组斜带石斑鱼, 解剖感染病毒的斜带石斑鱼, 从中分离出脑和眼睛, 运用原位杂交技术检测组织中的 OGNNV。实验表明, 原位杂交具有较高的灵敏性和特异性, 可以用原位杂交的办法来检测养殖的石斑鱼是否有携带该病毒, 达到监控和预防神经坏死病爆发的目的。本实验还采用了 H & E 染色方法检测了感染 NNV 的石斑鱼脑部和眼部组织, 观察细胞内的坏死部分。与原位杂交做对比, 提高了检测的可靠性和准确性。本实验建立的石斑鱼神经坏死病毒的 ISH 检测方法有着较高的特异性和敏感性, 易于操作, 有助于石斑鱼神经坏死病毒的组织定位、发病机理的研究。

关键词: 神经坏死病毒; 地高辛; 原位杂交

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)06-0001-04

石斑鱼(*Epinephelus*) 隶属鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 全世界 400 多种, 中国大陆沿海已记录 45 种^[1]。其肉味鲜嫩可口、形态绚丽多姿, 深受各地消费者的喜爱, 被视为“珍品之冠”, 是驰名世界的海鲜珍品之一。石斑鱼作为海水养殖最名贵的经济鱼类, 具有病害少、生长快等优势, 是海水养殖业进行海洋生物高值化技术开发最理想的选择, 在中国科技兴海战略中发挥着不可替代, 极其重要的作用^[1]。随着人们生活水平不断提高, 石斑鱼的市场需求量也越来越大。目前, 网箱和池塘养殖石斑鱼所需种苗, 主要来自天然捕捞, 供求很不稳定, 因此, 开展石斑鱼人工育苗就显得非常迫切。

病毒性神经坏死病病毒(viral nervous necrosis, VNN) 是石斑鱼鱼苗培育过程的重大病害之一, 该病原体为二十面体, 无囊膜, 直径 25~30 nm 的 RNA 病毒, 属于诺达病毒科(Nodaviridae) β 诺达病毒属(*Betanodavirus*)^[2-4]。发病症状为鱼不正常游动, 鱼鳔胀气肿大, 体色变深, 部分鱼类出现厌食, 可导致鱼苗的大量死亡, 造成养殖上的损失^[5]。鱼类病毒性神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV) 的致病性很强, 对石斑鱼的养殖生产影响严重, 病害一旦爆发, 难以控制, 且目前并没有治疗这种病害的特效药。因此, 对该病的流行暴发, 应着重从预防着手: 如建立有效的诊断技术, 对该病进行监控; 切断传染途径, 防止疾病进一步传播。

作者根据斜带石斑鱼神经坏死病毒(orange spotted nervous necrosis virus, OGNNV) 的主衣壳

蛋白(major capsid protein, MCP) 基因的两端保守序列设计非放射性地高辛素标记 cDNA 探针进行原位杂交, 对感染 NNV 的斜带石斑鱼进行检测, 并结合使用 H & E 染色方法对比观察, 为预防 NNV 感染做了部分研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康斜带石斑鱼(*Epinephelus coioids*) 购自广东省阳江市某养鱼场, 体长 8~10 cm, 平均体质量 9.57 g ± 0.37 g。石蜡组织切片和原位杂交检测所用的试剂和溶液: APES 硅化试剂购自 Sigma 公司; 配成 2% 丙酮溶液, 使用前配备。蛋白酶 K 溶液: 用时现配, 10 mg 蛋白酶 K 溶于 1 mL ddH₂O 或 1 × TNE。1 × TNE 溶液: 10 mmol/L Tris · Cl (pH 7.8), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。0.4% 多聚甲醛溶液: 0.4 g 多聚甲醛, 加入 100 mL ddH₂O, 在磁力搅拌器上加热搅拌, 加入少量 NaOH 助溶, 至溶液澄清。20 × SSC 缓冲液:

收稿日期: 2005-07-28; 修回日期: 2008-04-07

基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA601010); 暨南大学引进人才启动基金项目; 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室开放基金项目(2007A004)

作者简介: 陈晓艳(1972), 女, 湖南浏阳人, 讲师, 博士, 研究方向为水生经济动物病害控制及免疫学, 电话: 020-33038064, E-mail: chenxy5@126.com

3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸三钠, 用 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0, 121 °C 高压灭菌, 4 °C 保存。杂交液: 50 mL, 含 10 mL 20 × SSC, 25 mL 20 × Denhardt's 溶液, 10 mL 25% 硫酸葡聚糖, 2.5 mL 10 g/L 鲑精 DNA。20 × Denhardt's 溶液: 0.4% 牛血清白蛋白, 0.4% 聚蔗糖, 0.4% 聚乙烯吡咯烷酮, ddH₂O 100 mL。25% 硫酸葡聚糖: 25 g 硫酸葡聚糖溶于 80 mL ddH₂O。鲑精 DNA 液: 按《分子克隆指南》, 于室温用超声波磁力搅拌 2 h 助溶, 使其成水样, 配成 10 g/L 贮存液, 存于 -20 °C。Buffer I: 1 mol/L Tris · Cl, 1.5 mol/L NaCl, HCl 调 pH 7.5, 4 °C 保存。Buffer II: 0.5% 阻断剂(用 Buffer I 溶解, 缓慢加热), 用前 0.5 h 配。Buffer III: 0.1 mol/L Tris · Cl, 1.5 mol/L NaCl, HCl 调 pH 9.5, 加入 MgCl₂ 至终浓度为 50 mmol/L, 0.45 μm 滤膜过滤, 4 °C 保存。10 × Buffer IV: 100 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 高压灭菌, 存于 4 °C。地高辛试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit) 购自 Boehringer Mannheim 公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人工感染

病毒液由患病的石斑鱼组织中分离得到。取体色正常、无外伤、活力强的斜带石斑鱼, 用 1 mL 注射器将制备好的病毒液肌肉注射, 每尾 300 μL。

1.2.2 组织切片

取实验鱼的脑和眼用 Davidson's AFA 液固定, 按常规组织学方法依次经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后, 进行切片, 切片厚度为 4 μm, 保存备用。

1.2.3 核酸探针的制备

根据 OGNNV 的 MCP 基因部分片段的保守区设计一对引物, 即: 正向引物(F2): 5'-GTGTCAGT-CATGTGTCGCTG-3'; 反向引物(R3): 5'-CGAGT-CAACACGGGTGAAGA-3'。采用 RT-PCR 法扩增出长度为 426 bp 的目的片段, 经回收纯化后, 按地高辛试剂盒操作步骤对回收产物进行标记, -20 °C 保存备用。

1.2.4 H&E 染色和原位杂交检测

H&E 染色和原位杂交方法参照简旭凤等^[6]的方法进行。具体如下: (1) 硅化玻片: 取 APES 溶于丙酮中形成 2% 的溶液, 将待用的载玻片浸泡于其中 2 min, 取出, 在丙酮中浸泡 1 min, 然后在水中浸泡 1 min, 取出后 37 °C 过夜烘干。(2) 组织样品准备: 样品用 Davidson's AFA 固定 12~24 h 后, 转入 70% 乙醇中保存。按常规方法依次经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后, 进行切片, 切片厚度 4 μm, 在经硅化的载

玻片上滴加几滴双蒸水, 将组织切片置于载玻片上, 于展片台 37~42 °C 过夜展开。(3) 杂交反应: 实验前将组织切片于 60 °C 烤片 45 min~1 h, 经二甲苯和酒精脱蜡、水化后, 加入蛋白酶 K 至终浓度 10 mg/L (用时现配), 37 °C 下消化 10 min, 0.4% 多聚甲醛后固定, 2 × SSC 过渡, 再加入含有已预变性探针(将探针在 100 °C 下变性 5 min, 然后迅速置于冰上放 5 min) 的杂交液(探针浓度为 10~50 μg/L), 95 °C 变性 6 min, 冰浴 5 min, 42 °C 杂交过夜。(4) 探针的漂洗: 杂交后的玻片用 2 × SSC、1 × SSC 于 37 °C 漂洗 20 min, 再在 Buffer I 中室温放置 5 min。(5) 显色: 显色方法按地高辛试剂盒手册操作, 在玻片上加入 Buffer II 于 37 °C 中反应 15 min, 倾去; 加抗 DIG 抗体(AP), 37 °C 45 min; Buffer I 漂洗两次, Buffer III 中和, 加 NBT/BCIP 于室温下避光显色 2 h 以上。(6) 封片: 显色完毕, 于 Buffer IV 中浸泡片刻终止反应, 加封片剂后盖上盖玻片, 光镜下观察, 并照相记录结果。

1.2.5 对照设置

由于原位杂交设计的步骤繁多, 影响因素也相应增多, 结果会出现假阳性或假阴性, 所以必须要设置对照。一般用一个已知阳性的样品作为阳性对照, 检测整个反应程序是否正常; 不加探针的样品作为阴性对照, 检测显色系统是否正常。操作时, 阳性对照与待测样品进行同样的操作, 阴性对照只是加入杂交液的步骤有所不同, 即加入的杂交液没有探针, 其余步骤同。

2 结果与分析

2.1 人工感染

健康斜带石斑鱼经注射感染后, 出现游泳异常、体色变深、摄食力降低等典型的病毒性神经坏死病症状, 而对照组未出现变化。

2.2 探针的制备

根据 OGNNV 的 MCP 基因部分片段设计的引物成功地扩增出单一的 426 bp 的核苷酸片段。对标记探针进行效率测定, 标记探针浓度约为 50 μg/L。

2.3 原位杂交检测

用标记有 DIG 的 426 bp 的病毒核酸片段与组织切片上病毒 RNA 进行杂交。杂交阳性物质为紫褐色颗粒。根据其颜色深浅以及分布的密度, 可推断其病毒量的多少, 病毒量大时, 在光镜下可见组织密密麻麻布满杂交点, 而且颜色很深, 几乎黑色; 反之, 杂交点少且染色很浅。从原位杂交的结果来看, OGNNV 侵染的脑部和眼部组织中, 呈阳性反应的

细胞很多,如图 1-1 和 1-2 就是呈阳性反应的脑部组织细胞,图 1-3 和 1-4 则是呈阳性反应的眼部组织细胞。而健康鱼、无探针杂交、无抗 DIG 抗体的显色反

应的对照均呈阴性反应,分别见图 1-5、1-6 和 1-7,显示原位杂交检测 OGNNV 的方法具有特异性。

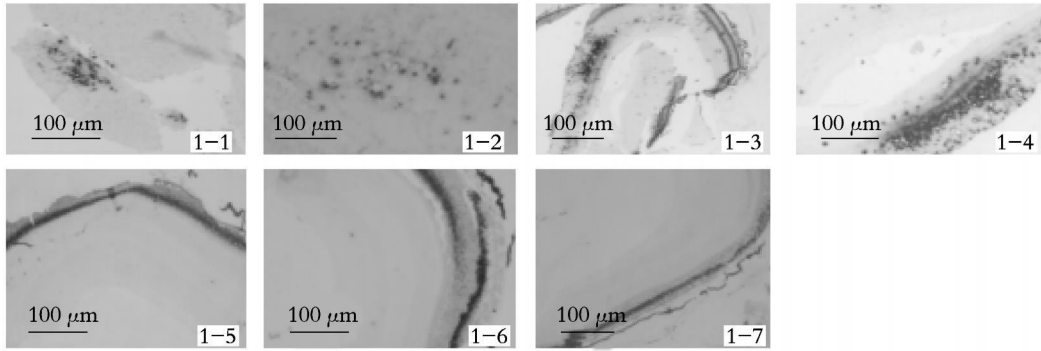


图 1 原位杂交检测结果

Fig. 1 The results of infected fish tested by in situ hybridization

1-1 和 1-2. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼脑组织原位杂交检测结果; 1-3 和 1-4. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼眼部组织原位杂交检测结果; 1-5. 健康斜带石斑鱼眼部组织原位杂交检测结果; 1-6. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼眼部组织未加探针原位杂交检测结果; 1-7. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼眼部组织未加抗 DIG 抗体原位杂交检测结果

1-1 and 1-2. *in situ* hybridization results of brain from infected fish; 1-3 and 1-4. *in situ* hybridization results of retina from infected fish; 1-5. *in situ* hybridization results of retina from fish without OGNNV infection; 1-6. *in situ* hybridization results of retina from infected fish without probe; 1-7. *in situ* hybridization results of retina from infected fish without anti-DIG antibody

2.4 H&E 染色观察

细胞核可被苏木素染色,细胞质可被伊红染色,目的在于观察细胞坏死组织,与原位杂交做对比。H&E 染色后可以清楚地观察到感染 OGNNV 的细胞出现明显的坏死、细胞空泡化。如图 2 所示。

而且敏感直观,不需要复杂的仪器,所需费用小。原位杂交可以在受染细胞内显示特定病毒的 DNA 序列,为病毒的组织细胞定位提供了一个更有效的方法,有助于研究病毒性疾病的发病机理。

原位杂交靠探针的渗透作用进入细胞内与特异的核酸片断杂交,探针太长,会使探针对细胞的渗透进入产生影响,甚至可能出现假阴性结果。杜卫东^[7]认为探针长度一般以 50~300 bp 为佳。吕玲等^[8]曾分别用 WSSV (white spot syndrome virus) 探针 413, 941, 1 447 bp 对虾组织同一部位进行原位杂交检测,结果均为阳性,但敏感性有差异。413 bp 探针杂交阳性细胞数量最多,其次为 941 bp,最少是 1 447 bp。这可能是由于长度增加,渗透力减弱的结果。本实验中使用的 426 bp 的 OGNNV 核酸探针,在感染病毒的石斑鱼不同器官上都得到了阳性结果,显示用 MCP 基因 RT-PCR 产物制备的探针具有很高的敏感性和特异性,可以进一步运用到生产上为石斑鱼养殖业的病毒检测提供一种有效的早期诊断手段。

核酸探针原位杂交技术的要求严格,因为组织的预处理、切片厚度与质量、探针的浓度与标记率、检测的靶核酸的量、杂交时间和温度、杂交前后洗涤强度和洗液中盐的浓度等都要求适当、准确和稳定,否则影响杂交效果^[9]。另外,由于原位杂交涉及的步骤繁多,影响因素也相应增多,结果比较容易容易出现假阳性的情况,所以在实验过程中,还应设置一系列的对照实验。作者分别用健康石斑鱼、无探针、无抗

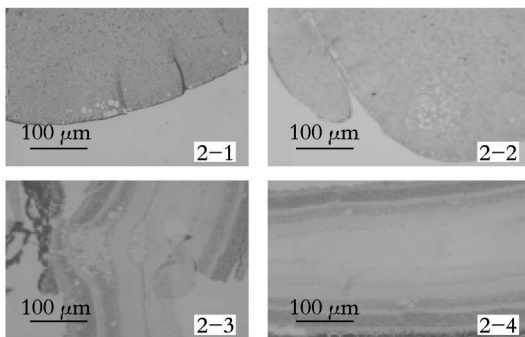


图 2 受 OGNNV 感染鱼的组织病理观察(H&E 染色)结果
Fig. 2 Histopathology results of fish infected with OGNNV (H & E stained)

2-1 和 2-2. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼脑组织 H & E 染色结果(箭头示空泡); 2-3 和 2-4. 受 OGNNV 感染的斜带石斑鱼眼部组织 H & E 染色结果(箭头示空泡)

2-1 and 2-2. H & E-stained section of brain from infected fish (vacuolus shown by arrow); 2-3 and 2-4. H & E stained section of brain from infected fish (vacuolus shown by arrow)

3 讨论

原位杂交分子生物学与组织学相结合,从细胞水平上在原位研究特异核酸的分布、数量以及与细胞分化、生理、病理状态、形态特征演化之间的关系,

DIG 抗体做对照, 结果均为阴性, 从而说明了 ISH 方法具有高度的特异性。

此外, 作者还使用 H&E 染色的方法检测感染了 OGNNV 的组织细胞, 观察病变细胞的空泡化现象, 与原位杂交的结果做对比, 证明原位杂交的可靠性和准确性。

参考文献:

[1] 邹记兴. 石斑鱼在我国科技兴海中的战略地位 [J]. 中国水产, 2001, 1: 76-78.

[2] Bovo G, Nishizawa T, Maltese C, *et al.* Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy [J]. **Virus Research**, 1999, 63: 143-146.

[3] Breuil G, Mouchel O, Fauvel C, *et al.* Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae [J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2001, 45: 25-31.

[4] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infection of teleost fish: a review [J]. **Journal of Fish Diseases**, 2002, 25: 127-142.

[5] Lin L, He J G, Mori K, *et al.* Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China [J]. **Fish Pathology**, 2001, 36(3): 186-188.

[6] 简旭凤. 白斑综合症病毒 (WSSV) 原位 PCR 及定量 PCR 检测技术的建立 [D]. 广州: 中山大学, 2003.

[7] 杜卫东. 现代分子生物学技术系列讲座(二) 原位杂交技术 [J]. 徐州医学院学报, 1995, 15(3): 327-332.

[8] 吕玲, 何建国, 邓敏, 等. 核酸探针原位杂交检测白斑综合症病毒的组织特异性 [J]. 热带海洋, 2000, 19(4): 86-91.

[9] Timothy W A. Preparation of nonradioactive probes for *in situ* hybridization [J]. **Methods**, 2001, 23: 297-302.

Application of *in situ* hybridization in testing orange-spotted grouper nervous necrosis virus

CHEN Xiao-yan^{1,2}, HE Jian-guo¹

(1. Life Science School of Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biotechnology of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Received: Jul. 28, 2005

Key words: nervous necrosis virus; DIG; *in situ* hybridization

Abstract: According to the conserved region of the major capsid protein gene of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) nervous necrosis virus (OGNNV), a pair of primers was designed. Using the primers, a RT-PCR product of 426 bp was cloned from the RNA template extracted from orange-spotted grouper infected by OGNNV. The RT-PCR product labeled by digoxigenin (DIG) was used for the non-radioactive nucleic acid probe. A group of orange-spotted groupers were artificially infected by injecting infected tissue filtrates and then the eyes and brain of moribund fish were fixed, and OGNNV was detected by *in situ* hybridization (ISH). The experiment showed that *in situ* hybridization is very sensitive and special. So we can use this method to detect whether grouper is infected with OGNNV or not. It can be used in inspecting and preventing the disease of VNN. The eyes and brains from diseased orange-spotted grouper were also detected by hematoxylin and eosin (H&E) to compare with the result of *in situ* hybridization. We can look into the putrescence portion of the cells to make sure that the result is credible and nice. The established ISH for detecting OGNNV is highly sensitive, special and easily manipulated, and helpful to studies on virus location in tissue and pathogenesis.

(本文编辑: 刘珊珊)