

# 猪圆环病毒 2 型原位杂交检测技术的建立与应用

姚 鑫,杨汉春\*,郭 鑫,陈艳红,查振林

(中国农业大学动物医学院农业部预防兽医学重点开放实验室,北京 100094)

**摘 要:** 参照 GenBank 发表的猪圆环病毒 2 型(PCV2) ORF2 基因序列设计引物,利用 PCR 扩增得到 PCV2 BF 株 341 bp 的核酸片段,用随机引物法制备出地高辛标记的核酸探针。制备的探针与 PCV1、PRRSV、PPV、PRV 等不发生反应,可检测的最低 PCV2 DNA 含量为 1.78 pg。对 30 份临床组织样本进行了检测,并与 PCR 比较,结果表明,阴性符合率为 100%,阳性符合率为 88.9%。应用原位杂交技术分析了 PCV2 在人工感染仔猪主要组织中的分布,结果表明,感染后 3 d,从仔猪的淋巴结、胸腺、肺脏、脾脏、鼻黏膜可检测到阳性信号,感染后 21 d,肝脏、肾脏、胰腺和回肠可检出阳性信号,至感染后 42 d,可从心脏、胃、脑检出阳性信号。在整个试验过程中会厌软骨、膀胱、皮肤、肌肉等组织均为阴性。本研究结果表明,建立的 PCV2 原位杂交技术具有良好的敏感性和特异性,可用于 PCV2 的实验室诊断和感染靶细胞的定位分析。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型;核酸探针;原位杂交;分布

中图分类号:S858.285.3;S854.43

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)02-0169-06

## Development and Application of an in situ Hybridization for Detection of Porcine Circovirus Type 2

YAO Xin, YANG Han-chun\*, GUO Xin, CHEN Yan-hong, ZHA Zhen-lin

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A fragment of PCV2 BF strain with a size of 341 bp was amplified by PCR with a set of primer designed according to the genomic sequence of porcine circovirus type 2 available on GenBank. A nucleic acid probe labeled with digoxigenin-dUTP was prepared by random priming. Further research indicated that the probe was not reactive to PCV1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV) and pseudorabies virus (PRV), and could detect 1.78 pg DNA of PCV2. Thirty clinical samples were detected with the developed in situ Hybridization (ISH) and polymerase chain reaction (PCR). The results indicated that the ISH had a specificity of 100% and a sensitivity of 88.9%. Distribution of PCV2 in tissues of piglets inoculated with PCV2 was analyzed with ISH. The lymph nodes, thymus gland, tonsil, lung, spleen and nasal mucosa from the inoculated piglets exhibited positive signal at day 3 post-inoculation. The liver, kidney, pancreas and ileum were detected to be positive at day 21 post-inoculation. The heart, stomach and brain were positive at day 42 post-infection. The epiglottis cartilage, urinary bladder, skin, muscle and the tissues from un-inoculated piglets were negative during the experiment. The results suggested the in situ hybridization were sensitive and specific, and could be applied for clinical and laboratory detection of PCV2, as well as location of infected target cells of PCV2.

收稿日期:2006-06-13

基金项目:教育部跨世纪优秀人才培养计划(2003)

作者简介:姚 鑫(1979-),女,天津人,硕士,现在北京市兽医卫生监督检验所工作

\* 通讯作者:杨汉春, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

**Key words:** porcine circovirus type 2; nucleic acid probe; in situ hybridization; distribution

猪断奶后多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 是一种由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起的严重影响断奶仔猪的新疫病, 临床上以断奶仔猪的渐进性消瘦, 生长发育受阻, 体重减轻, 皮肤苍白或有黄疸, 呼吸道症状为特征<sup>[1~3]</sup>。自 1991 年加拿大首先暴发该病以来, 至今已在美国、欧洲、亚洲以及我国的猪群中广泛存在, 给世界养猪业造成了巨大经济损失, 成为国内外学者关注的新疫病。

尽管现已明确, PCV2 感染是导致 PMWS 发生的先决条件, 但血清学证据表明, PCV2 感染在猪群普遍存在。因此, 检测 PCV2 对于 PMWS 及其他与 PCV2 感染相关疾病的诊断十分重要。除病毒分离而外, 聚合酶链式反应、免疫组织化学染色等技术可用于 PCV2 的检测<sup>[4~9]</sup>。关于 PCV2 的原位杂交检测技术, 国内还未见报道。本研究通过制备地高辛标记的 PCV2 特异性 DNA 探针, 成功建立了检测 PCV2 的原位杂交技术, 并分析了 PCV2 在人工感染猪体内的组织分布, 为 PCV2 感染的实验室诊断以及开展 PCV2 相关研究提供了有效的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒与质粒

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) BF 株 (GenBank 登录号: AF38117), PCV1 分离株, 由本实验室分离并保存<sup>[10]</sup>。猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV) 细胞培养物, 由中国兽医药品监察所惠赠。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) cDNA, 由本实验室制备。含 PCV2 BF 株 ORF2 片段的重组质粒 pGEM-T-PCV2-ORF2, 由本实验室构建。

### 1.2 主要试剂、标记试剂盒

Taq DNA 聚合酶、dNTP 等 PCR 检测试剂, 购自上海生工生物工程公司。DNA 片段回收试剂盒购自博大泰克公司。探针标记试剂盒与 Dig 标记及检测试剂盒 (Dig high prime DNA labeling and detection starter kit 1) 购于 Roche 公司。

### 1.3 试验用猪

40 日龄断奶健康仔猪 15 头, 购于北京某种猪场, 经抗体与病毒检测, PCV2 与 PRRSV 为阴性。

### 1.4 临床组织样本

从发生 PMWS 的猪场病死猪采集的脏器组织,

共 30 份。

### 1.5 探针引物的设计与合成

根据已发表的所有 PCV2 及 PCV1 全基因组序列, 利用 Oligo4.0 辅助设计合成了 PCV2 特异性探针 PCR 扩增引物: 上游引物 5'-ATGGCGGGGAG-GAGTAGTTTA-3'; 下游引物 5'-GTTACCGCTG-GAGAAGGAAA-3'。

### 1.6 探针的扩增合成与标记

以重组质粒 pGEM-T-PCV2-ORF2 为模板, 用上述引物扩增合成双链 PCV2 特异性探针, 探针预期扩增长度为 341 bp。反应体系: 总体积 50  $\mu$ L, 包括 10 $\times$  Taq Reaction Buffer 5  $\mu$ L (含 25 mmol/L  $Mg^{2+}$ ), 10 mmol/L 的 dNTP Mixture 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA (浓度约为 1 ng/mL) 3  $\mu$ L, 无菌双蒸水 38.5  $\mu$ L。反应参数: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 31 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物用 DNA 片段回收试剂盒回收纯化后, 按试剂盒说明进行 Dig 标记。

### 1.7 组织切片的制备

人工感染仔猪 10 头, 经滴鼻和经口途径人工感染 PCV2 BF 株, TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>7.25</sup>/0.3 mL, 每头猪感染剂量为 5 mL, 另 5 头猪作为对照, 分别于感染后第 3、7、14、21、42 天剖杀, 每次剖杀 2 头攻毒猪和 1 头对照猪。在宰杀后 2 h 内取肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、扁桃体、脑、鼻甲骨及鼻黏膜、颌下淋巴结、肺门淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、心脏、胰腺、肌肉、会厌软骨、胃、回肠、膀胱等组织, 每份组织大小约 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.5 cm, 经 4% 多聚甲醛室温固定 4~5 h 后, 常规石蜡包埋, 制作石蜡切片, 切片厚度为 5  $\mu$ m。

临床采集的淋巴结、肺脏、脾脏、肝脏、肾脏和心脏组织样本, 按同样方法制备组织切片。

### 1.8 PCV2 的原位杂交检测

切片常规脱蜡至水化; 经 0.2 mol/L HCl 处理 10 min, PBS 洗涤 10 min $\times$ 2; 100 ng/mL 蛋白酶 K 37  $^{\circ}$ C 消化 25 min; 4% 多聚甲醛后固定 4 min, PBS 洗涤 10 min $\times$ 2; 加预杂交液, 42~46  $^{\circ}$ C 水浴箱内预杂交 1 h; 甩干预杂交液, 加含探针的变性杂交液, 每片约 40  $\mu$ L, 加盖玻片, 90~95  $^{\circ}$ C 加热 10 min, 随后迅速置于冰上 1 min, 立刻置于 42~46  $^{\circ}$ C 水浴箱

内杂交 4 h 以上或过夜。同时设立不加探针的阴性对照。

杂交结束后,切片浸入  $2\times$ SSC 和 0.1%SDS 溶液中,室温漂洗;经  $0.1\times$ SSC 和 0.1%SDS 溶液  $44^{\circ}\text{C}$  洗涤 2 次;Washing buffer 中漂洗 2 次,每次 10 min;封闭液封闭 30 min;加抗体溶液室温孵育 1 h;Washing buffer 冲去抗体溶液,并漂洗  $15\text{ min}\times 2$ ;Buffer III 中平衡切片 2~5 min;每片加  $200\ \mu\text{L}$  显色一酶作用底物溶液,置暗处显色;显微镜下观察,当出现阳性信号(组织细胞中有蓝紫色沉淀),用 TE-Buffer 终止显色;切片经双蒸水及 50%、70%、90%、95%、100%乙醇逐级快速脱水,晾干后,用中性树胶封片。

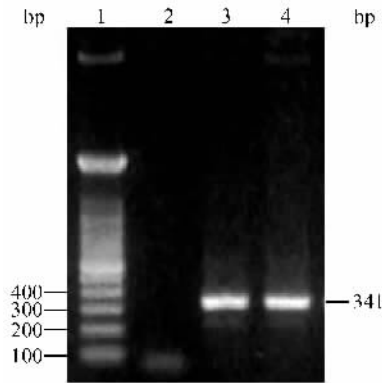
### 1.9 组织样本中 PCV2 的 PCR 检测

按已报道的 PCR 方法进行<sup>[11]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 PCV2 探针片段的扩增和鉴定

以 PCV2 ORF2 重组质粒为模板,用设计合成的引物,采用 PCR 扩增出 341 bp 片段,大小与预期一致(图 1)。PCR 扩增产物经测序证实,与 PCV2 BF 株序列一致,符合原位杂交探针要求。



1. 100 bp DNA ladder; 2. 阴性对照; 3. 探针核酸片段的 PCR 扩增产物; 4. PCV2 细胞培养物

1. 100bp DNA ladder; 2. Negative control; 3. PCR product of probe fragment; 4. PCV2 cell culture

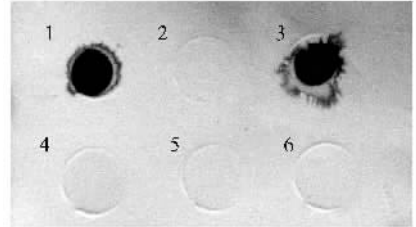
图 1 探针片段的 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Amplification of probe fragment from pGEM-T-PCV2-ORF2 by PCR

### 2.2 探针的特异性检测

经回收纯化 PCR 产物,按试剂盒说明制备标记探针。制备的探针与 PCV2 DNA、PCV1 DNA、

PPV DNA、PRV DNA、PRRSV cDNA 在硝酸纤维素(NC)滤膜上进行斑点杂交,结果(图 2)表明,制备的探针只与 PCV2 DNA 出现阳性杂交信号,而与 PCV1 DNA、PPV DNA、PRV DNA 及 PRRSV cDNA 的杂交结果均为阴性。



1、3. 与 PCV2 DNA 的杂交; 2. 与 PCV1 DNA 的杂交; 4. 与 PPV DNA 的杂交; 5. 与 PRV DNA 的杂交; 6. 与 PRRSV cDNA 的杂交

1, 3. Hybridization with PCV2 DNA; 2. Hybridization with PCV1 DNA; 4. Hybridization with PPV DNA; 5. Hybridization with PRV DNA; 6. Hybridization with PRRSV cDNA

图 2 探针的特异性检测

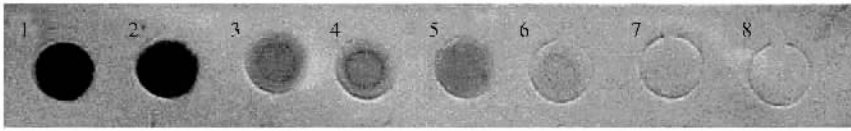
Fig. 2 Specificity detection of the probe

### 2.3 探针的敏感性检测

将 PCV2 ORF2 重组质粒转化大肠杆菌 JM109,用碱裂解法提取质粒,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检查后,用紫外分光光度计测定 DNA 含量为  $1\ 426\ \text{ng}/\mu\text{L}$ ,稀释成不同浓度后在 NC 膜上点样,用地高辛标记的核酸探针进行斑点杂交检测,结果(图 3)表明,质粒 DNA 浓度为  $1.78\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$  时斑点杂交结果仍为阳性,说明制备的探针具有较高的敏感性。

### 2.4 临床感染猪组织样本的原位杂交与 PCR 检测的比较

采集临床发病死亡猪的组织病料共 30 份,淋巴结、脾脏、肺脏、肝脏、肾脏和心脏各 5 份。同时用 PCR 和建立的原位杂交技术进行检测,结果表明(表 1):PCR 检测为阳性 18 份,阴性 12 份;原位杂交技术检测阳性 16 份,阴性 14 份。PCR 检测为阴性的,用原位杂交技术检测均为阴性,PCR 检测为阳性的样本中有 2 份(心脏和肾脏各 1 份)经原位杂交检测为阴性,阴性符合率为 100%,阳性符合率为 88.9%。由此表明,建立的原位杂交技术的特异性为 100%,敏感性为 88.9%。



1~8. 质粒 DNA 的浓度分别为 1.426 ng/ $\mu$ L, 142.6 pg/ $\mu$ L, 14.26 pg/ $\mu$ L, 7.13 pg/ $\mu$ L, 3.57 pg/ $\mu$ L, 1.78 pg/ $\mu$ L, 0.89 pg/ $\mu$ L 和 0.45 pg/ $\mu$ L

1-8. The concentration of plasmid DNA is 1.426 ng/ $\mu$ L, 142.6 pg/ $\mu$ L, 14.26 pg/ $\mu$ L, 7.13 pg/ $\mu$ L, 3.57 pg/ $\mu$ L, 1.78 pg/ $\mu$ L, 0.89 pg/ $\mu$ L and 0.45 pg/ $\mu$ L respectively

图 3 探针的敏感性检测

Fig. 3 Sensitivity detection of the probe

表 1 原位杂交与 PCR 检测的比较

Table 1 Comparison on detection of clinical tissue samples between in situ hybridization and PCR

		原位杂交 In situ hybridization			
		阳性 Positive number	阴性 Negative number	特异性 Specificity	敏感性 Sensitivity
PCR	阴性 Negative	0	12	100%	
	阳性 Positive	16	2		88.9%

2.5 人工感染猪体内 PCV2 在组织中的分布

应用建立的原位杂交技术对 PCV2 人工感染仔猪不同时期和不同组织中 PCV2 的检测结果(表 2)表明,人工感染后 3 d,可从下颌淋巴结、肺门淋巴

结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、胸腺、肺脏、脾脏、鼻黏膜(鼻甲骨)中检出杂交信号,且在淋巴结、肺脏、胸腺中阳性信号较多,而在脾脏较少(图 4);感染后 7 d,可从扁桃体检出阳性信号;感染后 21 d,

表 2 人工感染猪组织中 PCV2 原位杂交检测结果

Table 2 Detection of PCV2 in different tissues of piglets post-infection with PCV2 BF by in situ hybridization

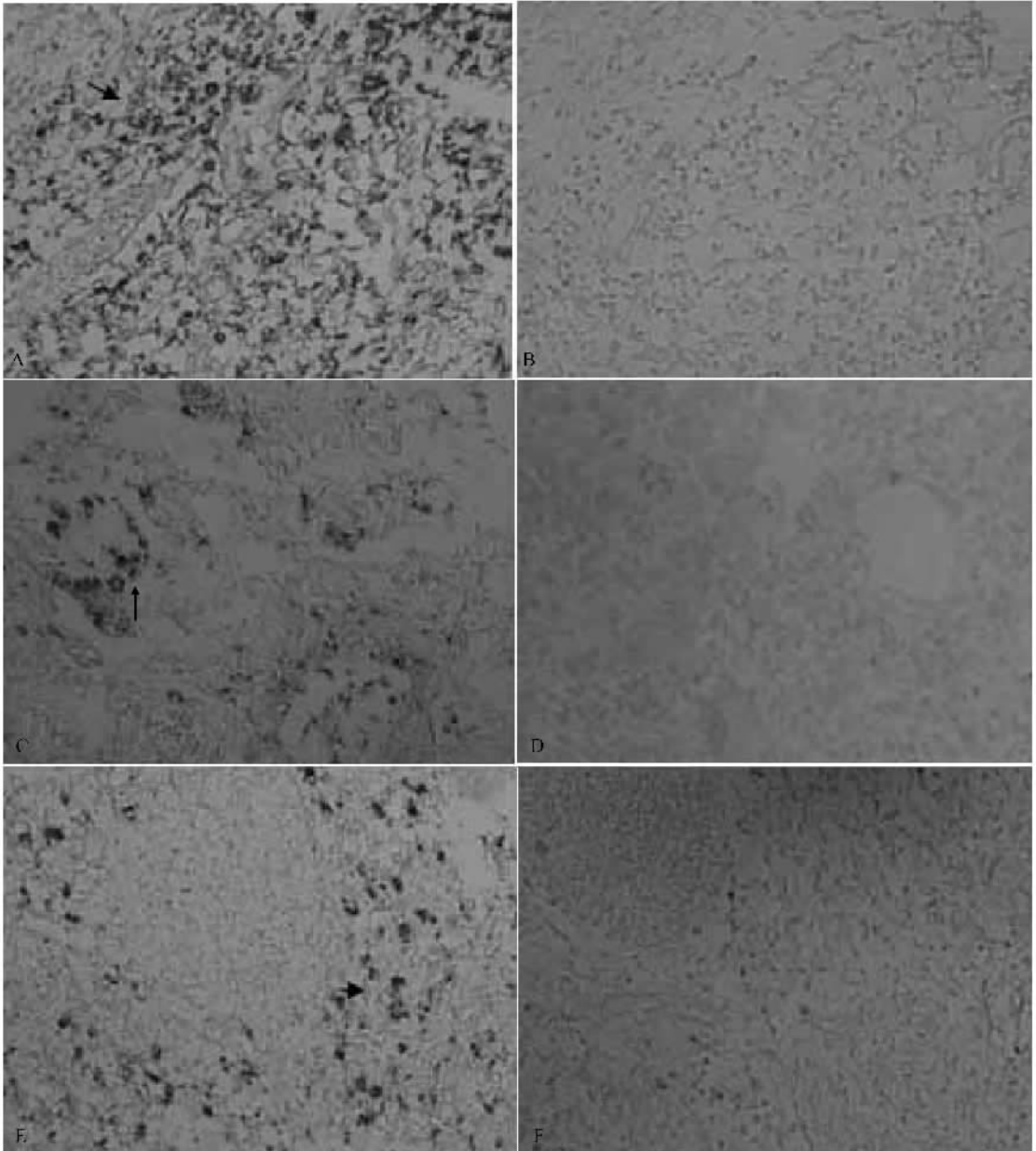
组织 Tissue	感染后时间/d Days post-infection				
	3	7	14	21	42
下颌淋巴结 Mandibular lymph node	2*/2**	2/2	2/2	2/2	2/2
肺门淋巴结 Bronchopulmonary hilar lymph node	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
肠系膜淋巴结 Mesenteric lymph node	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
腹股沟淋巴结 Inguinal lymph node	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
胸腺 Thymus	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
肺脏 Lung	2/2	2/2	0/2	1/2	2/2
脾脏 Spleen	1/2	1/2	2/2	1/2	2/2
扁桃体 Tonsil	0/2	1/2	1/2	1/2	2/2
鼻甲骨 Turbinal bone	2/2	1/2	0/2	1/2	1/2
肝脏 Liver	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2
肾脏 Kidney	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2
胰脏 Pancreas	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2
回肠 Ileum	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2
脑 Brain	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
心脏 Heart	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
胃 Stomach	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
会厌软骨 Epiglottis cartilage	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
皮肤 Skin	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
肌肉 Muscle	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
膀胱 Bladder	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

\* 检出的阳性样本数; \*\* 检测样本数

\* Number of positive sample; \*\* Number of the detected sample

肝脏、肾脏、胰腺和回肠可检出阳性信号;至感染后 42 d,可从心脏、胃、脑检测阳性信号。会厌软骨、膀胱、皮肤和肌肉在试验期内一直没有检测到阳性信号。攻毒后 42d,仍可从淋巴结、胸腺、脾脏等组织检测出阳性信号。淋巴结中阳性信号较集中于淋巴小结的

生发中心。脾脏中的阳性信号分布在脾小结生发中心以外的脾组织中。从心脏和脑组织中检测出的阳性信号呈散在零星分布,肌纤维细胞未见阳性信号。在 21 d 和 42 d 检测的组织中阳性信号相对较多,分布也更为广泛。未感染对照猪所有组织均为阴性。



A,C,E. 分别为淋巴结、肺脏、脾脏(阳性);B,D,F. 分别为未感染健康猪淋巴结、肺脏、脾脏

A,C,E. Positive lymphoid node, lung and spleen detected by in situ hybridization respectively; B,D,F. Lymphoid node, lung and spleen from the uninfected healthy piglets detected by in situ hybridization respectively

图 4 淋巴结、肺脏和脾脏中 PCV2 原位杂交检测阳性信号 66×

Fig. 4 Positive lymphoid node, lung and spleen detected by in situ hybridization 66×

### 3 讨论

感染猪组织中猪圆环病毒 2 型的直接检测和在

细胞中的定位,对 PMWS 及其他 PCV2 感染相关疾病的诊断十分重要。Larochelle 等对加拿大魁北克省 5 个发生 PMWS 的猪群和 2 个没有表现 PMWS

的猪群的猪进行血清学和病原学比较研究,结果发现有无 PMWS 的猪群抗体水平近似,因此抗体检测也难以反映出疾病的发生<sup>[12]</sup>。核酸探针原位杂交可准确地反映病毒在组织中的状态与细胞的分布,对疾病的诊断更有价值。因此,本研究建立了直接从组织中检测和定位 PCV2 的原位杂交检测方法,经特异性和敏感性检测表明建立的方法具有特异性强和敏感性高的优点,可以作为 PCV2 感染猪的实验室诊断手段。

应用原位杂交技术对人工感染 PCV2 猪组织的检测表明,在人工感染后 3 d,即可从淋巴结、胸腺、肺脏、脾脏等组织中检出阳性杂交信号,而且在淋巴结、肺脏、胸腺中阳性信号较多,并一直持续到 42 d,说明这些器官是 PCV2 最早侵染的组织,也是 PCV2 滞留的组织器官,提示 PCV2 感染的早期诊断与发病猪的确诊可以采集这些组织进行检测。从检测结果来看,组织中的 PCV2 阳性信号一般呈散在分布,即使在阳性信号较多的免疫器官(如淋巴结、脾脏等组织)也不例外。笔者对 PCV2 在组织器官中分布的检测方法与国外报道的相似,但检出时间有差异。Kim 等认为在 PCV2 感染后 20~24 d 病毒的阳性信号最强<sup>[13]</sup>,而在我们的研究中,感染后 21 d 还不能从所有可能分布的组织中检出病毒,这可能与所用的 PCV2 毒株有关。

笔者同时比较了临床 PMWS 疑似病例组织样本与人工感染组织样本杂交信号的差异,显示临床组织样本的阳性信号强于人工感染猪组织样本,且分布密集,这说明自然发病猪组织中 PCV2 感染的靶细胞数量明显多于人工感染试验猪。已有的研究表明,一些病原体,如猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)、副猪嗜血杆菌等与 PCV2 有协同致病作用,对 PCV2 在猪体内的复制和在 PMWS 的发生上有重要作用。这些病原体与 PCV2 的联合感染能够加重感染猪的 PMWS 临床症状和病理损伤。笔者的研究结果也说明了 PMWS 自然发病猪和人工感染猪的 PCV2 病原感染状况存在一定差异。因此,PCV2 感染与 PMWS 的发生之间的关系尚待进一步深入研究。

#### 参考文献:

[1] Harding J C, Clark E G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. *Swine Health Prod*, 1997, 5: 201~203.

- [2] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, *et al.* Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10: 3~10.
- [3] Ellis J, Hassard L, Clark E, *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Can Vet J*, 1998, 39: 44~51.
- [4] Choi C, Chae C. In situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Comp Pathol*, 1999, 121(3): 265~270.
- [6] Chianini F, Majo N, Segales J, *et al.* Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 94: 63~75.
- [7] McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, *et al.* A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. *J Virol Methods*, 1999, 80: 123~128.
- [8] Nawagitgul P, Harms P A, Morozov I, *et al.* Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 33~40.
- [9] Ouardani M, Wilson L, Jette R, *et al.* Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 1 707~1 712.
- [10] 吕艳丽, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(2): 14~18.
- [11] 吕艳丽, 杨汉春, 郭鑫. 用 PCR 方法检测猪圆环病毒 II 型 [J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(6): 552~554.
- [12] Larochelle R, Magar R, D'Allaire S, *et al.* Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Can J Vet Res*, 2003, 67: 114~120.
- [13] Kim J, Chae C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization [J]. *J Virol Methods*, 2001, 92(2): 105~111.