

# 检测石蜡切片中鸭病毒性肠炎病毒间接原位 PCR 方法的建立

程安春<sup>1,2</sup>, 廖永洪<sup>1</sup>, 朱德康<sup>1,2</sup>, 汪铭书<sup>1,2</sup>, 罗启慧<sup>1,2</sup>, 贾仁勇<sup>1,2</sup>, 陈孝跃<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心, 四川雅安 625014; <sup>2</sup>动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014)

**摘要:**【目的】建立能对石蜡切片中鸭病毒性肠炎病毒(DEV)核酸进行定位的原位 PCR 方法, 为鸭病毒性肠炎(DVE)存档蜡块的回顾性诊断、致病机理研究等提供有效的实验手段。【方法】据 DEV 的 UL30-UL31 基因序列设计 PCR 引物和寡核苷酸探针, 以 DEV 感染死亡鸭肝脏组织石蜡标本制作切片, 经蛋白酶 K 消化、原位 PCR 扩增和生物素标记的寡核苷酸探针原位杂交, 建立了检测石蜡标本中 DEV 的间接原位 PCR 方法并应用于人工感染 DEV 不同时间的鸭肝脏、DVE 发病鸭的存档蜡块和临床病料检测。【结果】间接原位 PCR 对 DVE 死亡鸭肝脏的石蜡标本检测结果为阳性, 而鸭病毒性肝炎、鸭疫里默氏杆菌病、鸭多杀性巴氏杆菌病、鸭沙门氏菌病和鸭大肠杆菌病死亡鸭肝脏的石蜡标本检测结果为阴性; 间接原位 PCR 对人工感染 DEV 后 2、4、6、12、24、48 和 72 h 不同时间的鸭肝脏检测结果均为阳性, 阳性细胞有肝细胞、窦皮细胞和枯否氏细胞, 阳性信号多出现于坏死细胞的碎片中或细胞坏死后形成的空泡内及空泡边缘; 对存档蜡块、临床病料的检测与病毒分离鉴定吻合率为 100%。【结论】本研究建立的间接原位 PCR 方法具有直观、敏感、特异性强的优点, 在显示核酸阳性信号的同时, 还能判别含有靶序列的细胞类型以及组织细胞的形态结构特征与病理变化。可用于 DVE 的诊断、分子流行病学调查、存档蜡块的回顾性诊断和致病机理的研究。

**关键词:** 鸭病毒性肠炎病毒; 原位 PCR; 寡核苷酸探针; 石蜡标本; 检测

## Development and Application of Indirect *in situ* Polymerase Chain Reaction for Detecting Duck Enteritis Virus in Paraffin Sections

CHENG An-chun<sup>1,2</sup>, LIAO Yong-hong<sup>1</sup>, ZHU De-kang<sup>1,2</sup>, WANG Ming-shu<sup>1,2</sup>, LUO Qi-hui<sup>1,2</sup>,  
JIA Ren-yong<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-yue<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, Sichuan;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, Sichuan)

**Abstract:**【Objective】To establish methods that could be used to study the position of duck enteritis virus nucleic acid in paraffin section so that effective method could be used in duck enteritis virus infectivity and pathogenesis investigation and retrospective diagnosis.【Method】A pair of primers and an oligonucleotide probe were designed by Oligo software according to the UL30-UL31 sequence of duck enteritis virus in GenBank. The specificity of the primers was tested by PCR. The specificity of probe was tested by dot-hybridization. Indirect *in situ* polymerase chain reaction (IS-PCR) was developed for detecting duck enteritis virus in paraffin sections after digesting with protease K, DNA *in situ* amplification and *in situ* hybridization (ISH).【Results】The indirect IS-PCR main conditions were optimized as follows: tissue sections were treated by 0.2 mol/L HCl at 37°C for 20 minutes, by 100 µg·ml<sup>-1</sup> protease K at 37°C for 15 minutes; The working condition of probe and Avidin-AP of ISH were 350 ng·ml<sup>-1</sup> and 1 : 100, respectively. The positive results were gained by indirect IS-PCR for detecting the duck liver paraffin sections infected by DEV, but negative results to the duck liver paraffin sections of dead ducks infected with duck viral hepatitis virus, *Riemerella anatipestifer*,

收稿日期: 2007-11-26; 接受日期: 2008-06-30

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-04-0906/NCET-06-0818)、国家自然科学基金项目(30771598)、高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(706050)、国家“十一五”科技支撑计划(2007Z06-017)、四川省十五攻关重大生物技术项目(01NG018-01)、四川重点攻关项目(05NG002-003)和四川省基础研究项目(07JY029-016 / 07JY029-017)

作者简介: 程安春(1965—), 男, 贵州长顺人, 教授, 博士, 研究方向为水禽传染病致病机理、免疫及分子生物学。Tel: 0835-2885774; E-mail: chenganchun@vip.163.com。并列第一作者廖永洪(1976—), 男, 四川人, 硕士, 研究方向为禽病学, 与第一作者同等贡献。通讯作者汪铭书(1964—), 女, 贵州凯里人, 教授, 博士, 研究方向为动物病毒分子生物学。Tel: 0835-2885774; E-mail: mshwang@163.com

*Pasteurella multocida*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* (O78). The positive signals were detected from hepatocyte, sinusoidal endothelial cell and Kupffer's cell of duck liver infected artificially with DEV by indirect IS-PCR at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. Most of them appeared in debris of cellular necrosis or vacuole formed in infected cells. Five archival paraffin and eighteen clinical samples which came from ducks infected with DEV were detected, the results of indirect IS-PCR and isolate identification method were identical completely. 【Conclusion】 The results show that the method is rapid, sensitive and specific for detecting DEV. The method could be widely used for diagnosis, molecular epidemiological survey, pathopoiesis and retrospective diagnosis of archival paraffin samples.

**Key words:** Duck viral enteritis virus; *in situ* PCR; Oligonucleotide probe; Paraffin sample; Detection

## 0 引言

【研究意义】鸭病毒性肠炎（duck viral enteritis, DVE）是由鸭病毒性肠炎病毒（duck enteritis virus, DEV）引起鸭、鹅和天鹅等禽类的一种急性败血性传染病，DVE 发病率和死亡率都甚高，是养鸭业的一大危害<sup>[1-2]</sup>。原位 PCR 可在组织细胞原位检测单拷贝的特定 DNA 或 RNA 序列，在显示阳性杂交信号的同时，还能判别含有靶序列的细胞类型以及组织细胞的形态结构特征与病理变化，因此如果建立能对石蜡切片中鸭 DEV 核酸的原位 PCR 方法，将可为 DVE 存档蜡块的回顾性诊断、致病机理研究等提供有效的实验手段，有助于 DVE 的诊断和致病机理的深入研究，从而更好地对 DEV 进行有效的防治。【前人研究进展】DVE 的检测方法较多，主要为血清学检测，如免疫荧光、免疫酶和乳胶凝集试验<sup>[3-5]</sup>。随着分子生物学的发展，近几年国内外先后根据已经报道的 DEV 基因片段序列设计引物，建立了检测细胞、禽胚尿囊液及组织样品中 DEV 的常规液相 PCR 诊断方法<sup>[6-9]</sup>。在 DEV 致病机理方面，国内外主要利用光镜和电镜观察技术进行病理、形态学研究<sup>[10-13]</sup>。致病机理的研究在一定程度上是随着检测技术的不断发展而深入的。1995 年 Islam 等<sup>[14]</sup>利用免疫组织化学方法对 DEV 经口服感染途径在鸭体内的分布进行了研究，2004 年动物疫病与人类健康四川省重点实验室报道利用 PCR 技术在分子水平上对 DEV 免疫和致病机理进行研究<sup>[15]</sup>。上述诊断方法和致病机理的研究在一定程度上为 DVE 的控制提供了可靠的依据，但到目前为止，还未见到用原位 PCR 检测石蜡切片中的 DEV 和核酸定位以用于 DEV 的回顾性诊断检测或研究 DEV 的侵染过程和致病机理的报道。【本研究切入点】根据本实验室获得的 DEV 的 UL30-UL31 基因序列设计 DEV 特异的 PCR 引物和寡核苷酸探针，建立一种能对组织中 DEV 核酸进行检测和定位的方法，以期对 DEV 的致病机理

研究提供有效的实验技术手段。【拟解决的关键问题】通过设计/选择适合的探针和标记方法，优化样品处理、原位 PCR 扩增和原位杂交等条件，建立检测石蜡组织切片中 DEV 核酸的间接原位 PCR 方法（indirect *In situ* polymerase chain reaction, Indirect IS-PCR），并通过对比 DVE 发病鸭存档肝脏蜡块、临床肝脏病料和人工感染 DEV 不同时间鸭肝脏的检测，初步将间接原位 PCR 用于 DEV 的检测、阐明 DEV 的致病机理研究以及存档蜡块的回顾性诊断研究和流行病学调查等。

## 1 材料与方 法

### 1.1 毒株和菌株

DEV 强毒 CHv 株，对 2~3 月龄鸭最小致死量（MLD）为  $10^{-8}$ ·ml<sup>-1</sup>，由作者所在实验室保存和提供；鸭病毒性肝炎病毒 QL79 株、鸭疫里默氏杆菌（血清 1 型）、鸭源多杀性巴氏杆菌（5: A）、鸭沙门氏菌（3, 10:e, h:1, 6）和鸭大肠杆菌（O128），由四川农业大学禽病防治研究中心提供。

### 1.2 主要仪器和试剂

切片机（RM2128, leica）和一次性刀片（FEATHER R35, STAINLESS JAPAN）；数码显微照相系统（Nickon-400, Nickon）；原位杂交仪（HBOSBB220, Thermo Omnislide）；APES（3-aminopropyltriethoxysilane）、DMDC（dimethyldichlorosilane）、蛋白酶 K（Merck 产品，LOT: VX592368 128）、鲑鱼精 DNA、硫酸葡聚糖、BSA、亲和素-碱性磷酸酶（Avidin-AP）、NBT/BCIP 等均购自成都天泰公司。

### 1.3 石蜡标本和临床送检样品

正常鸭肝脏（常规液相 PCR 检测<sup>[9]</sup>为 DEV 阴性）石蜡包埋标本，鸭病毒性肝炎、鸭疫里默氏杆菌病、鸭多杀性巴氏杆菌病、鸭沙门氏菌病和鸭大肠杆菌病死亡鸭肝脏石蜡包埋标本，5 份 1992~2003 年四川的绵阳、广汉、乐山和重庆等地送检的鸭病毒性肠炎发

病鸭肝脏组织石蜡包埋标本和 18 份 2004~2006 年四川、重庆、贵州、广西、云南、福建等 11 个省(市、区)送检发病鸭群的 DEV 临床病料(病毒分离鉴定确诊为 DEV),均由四川农业大学禽病防治研究中心提供。

#### 1.4 引物及探针

**1.4.1 引物及探针的设计** 据本实验室提交 GenBank 中 DEV 的 UL30-UL31 基因序列(EF643560, EF643559),应用 Oligo 设计软件设计一对 PCR 引物(上游引物序列: 5'-ACA AAT CCC AAG CGT AG-3', 位于 UL30 基因的 3177~3193 bp; 下游引物序列: 5'-GGA CAG CGT ACC ACA GAT AA-3', 位于 UL31 基因的 804~823 bp; PCR 扩增产物长度为 498bp); 另外在扩增片段序列内部,应用 Oligo 软件设计长度为 37 bp 的寡核苷酸探针(序列为: 5'-TAG AGT CCC CAA CAG ATG CGA AAA GTA GTA GTC GGT G-3', 位于 UL30 基因的 3351~3387 bp)并于 5'端标记生物素。引物和探针经网上在线分析其特异性后由上海生物工程公司合成和标记。

**1.4.2 引物及探针的特异性** 分别提取 DEV-CHv 株 DNA、鸭病毒性肝炎病毒 QL79 株 RNA、血清 1 型鸭疫里默氏杆菌 DNA、鸭源多杀性巴氏杆菌 DNA、鸭沙门氏菌 DNA 和鸭大肠杆菌 DNA,以常规 PCR 检测引物的特异性,以斑点杂交方法检测探针的特异性。

#### 1.5 切片

载玻片涂以粘片剂 APES,盖玻片则以 DMDC 硅化,载、盖玻片处理后高压灭菌备用;按常规方法将已包埋好的组织块切片(5  $\mu\text{m}$ ),粘附于涂有 APES 粘片剂的载玻片上。

#### 1.6 检测 DEV 间接原位 PCR 方法的建立

**1.6.1 消化** 将切片置 60℃烤箱中过夜,之后脱蜡入水,0.01 mol·L<sup>-1</sup> pH7.4 的 PBS 平衡 10 min,0.2 mol·L<sup>-1</sup> HCl 37℃处理后蛋白酶 K 消化,PBS 洗 10 min,梯度酒精脱水,晾干。

**1.6.2 原位扩增** 将配制好的 PCR 反应介质 50  $\mu\text{l}$  滴加到组织上,盖上盖玻片,以指甲油封边,进行 PCR 反应。反应结束后用 4%的多聚甲醛 PBS 室温后固定 10 min,将切片于 0.01 mol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 的 PBS 平衡 10 min,之后梯度酒精脱水,晾干。

**1.6.3 原位杂交** 切片加入预杂交液(50%去离子甲酰胺、5×SSC、5×Denhardt's、0.5%SDS、500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  鲑鱼精子 DNA)并放湿盒内 42℃预杂交 30 min;去掉预杂交液,据组织块大小加上适量的杂交液(50%

去离子甲酰胺、5×SSC、5×Denhardt's、0.5%SDS、100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  鲑鱼精子 DNA、10%硫酸葡聚糖、一定浓度探针),加盖硅化盖玻片,切片置原位杂交仪上 95℃ 10 min,然后迅速置于冰上 2 min,再置 2×SSC 湿盒内 42℃杂交过夜(16~18 h)。

杂交后 2×SSC 液内振动移除盖片,2×SSC 液内常温洗涤 2 次×10min,加 100  $\mu\text{l}$  封阻液(100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris·HCl, pH 7.8; 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; 50 mg·ml<sup>-1</sup> BSA; 0.2 mg·ml<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>)并置湿盒中室温下温育 15 min 以封闭非特异性结合位点;用吸水纸接触载玻片边缘吸去封阻液,加 100  $\mu\text{l}$  的 Avidin-AP 溶液,置湿盒中室温下温育 1 h;将玻片于 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris·Cl pH 7.5/150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 中洗片 2 次×15 min,再以碱性磷酸酶底物缓冲液洗片 5 min。

将配好的 NBT/BCIP 底物溶液取 100  $\mu\text{l}$  加于切片上,于 37℃湿盒内显色,去离子水中终止反应,核快红衬染,脱水,透明,树脂胶封片。

对检测 DEV 间接原位 PCR 反应的各步骤(扩增条件和表 1 中组合的条件)进行优化。

**1.6.4 结果判断** 光镜下阳性部位或细胞为蓝紫色。

#### 1.7 间接原位 PCR 特异性试验

以 DEV 阴性的正常鸭肝脏石蜡包埋标本间接原位 PCR 检测作为阴性对照;以 DEV 阳性的鸭肝脏石蜡包埋标本间接原位 PCR 检测作为阳性对照;以 DEV 阳性的鸭肝脏石蜡包埋标本间接原位检测,杂交时杂交液中不加探针进行检测作为空白对照;以鸭病毒性肝炎、鸭疫里默氏杆菌病、鸭多杀性巴氏杆菌病、鸭沙门氏菌病和鸭大肠杆菌病死亡鸭肝脏石蜡包埋标本间接原位 PCR 检测作特异性对照。

#### 1.8 间接原位 PCR 对工感染 DEV 后不同时间鸭肝脏中 DEV 的检测

健康 2 月龄樱桃谷鸭 50 只,源于无 DVE 感染史地区并且未免疫接种过 DVE,经 ELISA 检测 DEV 血清抗体阴性。其中正常对照组 2 只,皮下接种生理盐水 0.2 ml;人工感染 DEV 组 48 只,皮下接种 DEV-CHv 强毒株,10<sup>4</sup>MLD/只。接种后 2、4、6、12 和 24h 各剖杀 2 只,以后每 24 h 剖杀 2 只,至接种鸭发生死亡后停止剖杀而解剖死亡鸭。样品材料置 10%中性福尔马林缓冲液中固定,按常规石蜡包埋组织的步骤包埋。以所建立的检测 DEV 间接原位 PCR 方法对工感染 DEV 后不同时间鸭肝脏中的 DEV 进行检测和分析。

#### 1.9 间接原位 PCR 对确诊为鸭病毒性肠炎存档蜡块和临床病料的检测

表 1 间接原位 PCR 条件优化组合

Table 1 The optimization of indirect *in situ* PCR

稀释度 Avidin-AP dilution	探测浓度 Probe concentration (ng·ml <sup>-1</sup> )				消化时间 Proteinase K digestion time
	B1 200	B2 250	B3 300	B4 350	
A1 1 : 50	A1B1C1 D	A1B2C1D	A1B3C1D	A1B4C1D	C1 10 min
	A1B1C2D	A1B 2C2D	A1B3C2 D	A1B4C2D	C2 15 min
	A1B1C3D	A1B2C3D	A1B3C3D	A1B4C3D	C3 20 min
	A1B1C4 D	A1B2C2D	A1B3C4D	A1B4C4D	C4 25 min
A2 1 : 100	A2B1C1 D	A2B2C1D	A2B3C1D	A2B4C1D	C1 10 min
	A2B1C2D	A2B 2C2D	A2B3C2 D	A2B4C2D	C2 15 min
	A2B1C3D	A2B2C3D	A2B3C3D	A2B4C3D	C3 20 min
	A2B1C4 D	A2B2C2D	A2B3C4D	A2B4C4D	C4 25 min
A3 1 : 150	A3B1C1 D	A3B2C1D	A3B3C1D	A3B4C1D	C1 10 min
	A3B1C2D	A3B 2C2D	A3B3C2 D	A3B4C2D	C2 15 min
	A3B1C3D	A3B2C3D	A3B3C3D	A3B4C3D	C3 20 min
	A3B1C4 D	A3B2C2D	A3B3C4D	A3B4C4D	C4 25 min
A4 1 : 200	A4B1C1 D	A4B2C1D	A4B3C1D	A4B4C1D	C1 10 min
	A4B1C2D	A4B 2C2D	A4B3C2 D	A4B4C2D	C2 15 min
	A4B1C3D	A4B2C3D	A4B3C3D	A4B4C3D	C3 20 min
	A4B1C4 D	A4B2C2D	A4B3C4D	A4B4C4D	C4 25 min

D HCl/0.2mol·L<sup>-1</sup> 20min (37℃) 消化时间 Digestion time

以所建立的检测 DEV 间接原位 PCR 方法对病毒分离鉴定确诊为鸭病毒性肠炎发病鸭的 5 份存档蜡块和 18 份临床病料检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物及探针的特异性

引物和探针经在线比对分析, 具有较好的特异性。

引物对 DEV 强毒 CHv 株 DNA 进行常规 PCR 检测, 扩增出了 498 bp 的特异性片段; 而对鸭病毒性肝炎病毒 QL79 株 RNA、血清 1 型鸭疫里只默氏杆菌 DNA、鸭源多杀性巴氏杆菌 DNA、鸭沙门氏菌 DNA 和大肠杆菌 DNA 进行常规 PCR 检测, 未扩增出任何条带, 表明该引物为 DEV 特异性引物。

探针对 DEV 强毒 CHv 株 DNA 行斑点杂交, 检测到了阳性杂交信号; 而对鸭病毒性肝炎病毒 QL79 株 RNA、血清 1 型鸭疫里只默氏杆菌 DNA、鸭源多杀性巴氏杆菌 DNA、鸭沙门氏菌 DNA 和大肠杆菌 DNA 进行斑点杂交, 未检测到杂交信号, 表明该探针为 DEV 特异性探针。

### 2.2 检测 DEV 间接原位 PCR 的条件

#### 2.2.1 原位扩增条件 经优化, 最后得到原位扩增的

最佳条件为: 反应介质中含 1×PCR buffer、2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP、上下游引物各 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 和 Taq 酶 2.5 U; PCR 反应循环参数为 95℃ 变性 5 min, 然后进入 94℃ 1 min, 51.8℃ 1 min, 72℃ 2 min 的循环, 共进行 35 个循环, 最后经 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

2.2.2 间接原位 PCR 的其它条件 其它优化条件为 A2B4C2D, 即组织切片先用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> HCl 37℃ 处理 20 min, 然后用 100 μg·ml<sup>-1</sup> 的蛋白酶 K 37℃ 消化 15 min 左右, 组织不同, 消化条件在此基础上略有不同; 杂交时探针的工作浓度为 350 ng·ml<sup>-1</sup>, Avidin-AP 的工作稀释度为 1 : 100。

### 2.3 间接原位 PCR 的特异性

所设置的阴性对照、空白对照和特异性对照标本检测结果均为阴性, 阳性对照标本检测结果为阳性, 表明所建立的原位 PCR 对 DEV 具有特异性。

### 2.4 间接原位 PCR 对工感染 DEV 后不同时间鸭肝脏中 DEV 的检测

以所建立的检测 DEV 原位 PCR 方法对工感染 DEV 后不同时间的鸭肝脏进行检测, 结果在人工感染 DEV 后 2、4、6、12、24、48、72 h 和死亡鸭的肝脏

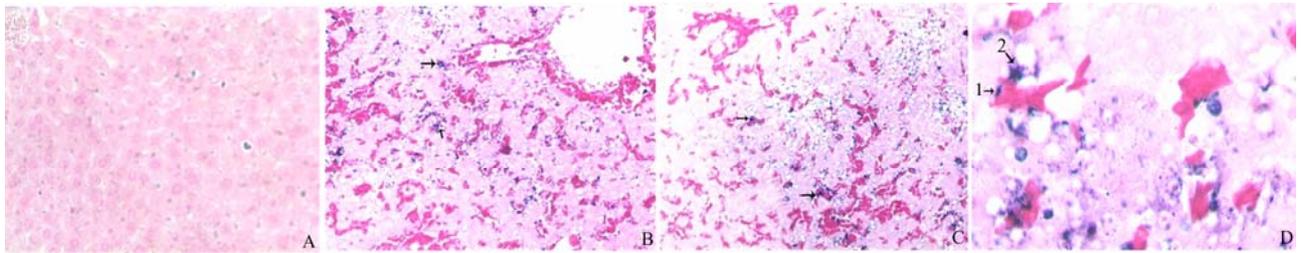
中均测出阳性信号(表2)。主要感染细胞有肝细胞、窦皮细胞和枯否氏细胞, 阳性信号多出现于坏死细胞

的碎片中或细胞坏死后形成的空泡内及空泡边缘(图)。

表2 间接原位 PCR 对人工感染 DEV 后不同时间鸭肝脏中 DEV 的检测

Table 2 The detected results of duck liver artificial challenged with duck enteritis virus at different times by IS-PCR

时间 Time	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	死亡数 Dead duck
结果 Result	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	20/20



A: 阴性对照,  $\times 200$ ; B: 阳性对照,  $\times 200$ ; C: 感染 DEV 肝脏 (24 h),  $\times 200$ ; D: 阳性枯否氏细胞 (箭头 1) 和肝窦皮细胞 (箭头 2)  $\times 1000$   
A: Negative control liver tissue,  $\times 200$ ; B: Positive liver tissue (arrow),  $\times 200$ ; C: Liver infected artificially with DEV (24 h),  $\times 200$ ; D: Potive kupffers cell (arrow 1) and epithelial cells (arrow2) of liver sinusoid,  $\times 1000$

图 间接原位 PCR 对人工感染 DEV 死亡鸭肝脏中 DEV 的检测

Fig. The detected results of died duck liver artificial challenged with DPV by indirect *in situ* PCR

## 2.5 间接原位 PCR 对确诊为鸭病毒性肠炎存档蜡块和临床病料的检测

以所建立的检测 DEV 间接原位 PCR 方法对病毒分离鉴定确诊为鸭病毒性肠炎发病鸭的 5 份存档肝脏蜡块和 18 份肝脏临床病料检测, 结果均为阳性, 间接原位 PCR 检测与病毒分离鉴定的吻合率为 100%。

## 3 讨论

原位 PCR 技术在发展过程中出现了直接法和间接法。直接原位 PCR 是使用带有标记的引物或三磷酸核苷酸, 使扩增产物直接携带标记分子, 根据标记物的性质检测扩增产物, 其优点是操作简便、流程短、省时, 缺点是特异性较差、容易出现假阳性, 且扩增效率较低, 假阳性问题在切片标本上比完整细胞标本更为严重<sup>[16]</sup>。间接原位 PCR 目前应用广泛, 其所用的引物和三磷酸核苷酸不带任何标记, PCR 原位扩增后, 再用原位杂交技术检测特异性扩增产物。与直接法相比, 间接法虽然复杂些, 多了原位杂交步骤, 但效率较高, 更重要的是特异性比直接法强<sup>[17]</sup>。因为原位杂交所用的探针可特异性地检出扩增产物中的靶序列。这样, 即使扩增产物中有非序列成分也不会呈现阳性反应, 因而提高了原位 PCR 的特异性。因此, 本研究

采用了间接原位 PCR 法, 以提高试验结果的可信度。对病毒分离鉴定确诊为鸭病毒性肠炎发病鸭的 5 份存档肝脏蜡块和 18 份肝脏临床病料进行检测, 结果间接原位 PCR 检测与病毒分离鉴定一致, 也说明了接原位 PCR 将 PCR 的高效扩增与原位杂交的细胞定位特异性相结合的优势和特点。

引物和探针的设计是建立间接原位 PCR 的基础, 由于 DEV 基因组结构的特殊性, 目前已知的 DEV 基因序列相对较少。一般认为探针的长度为 50~200 bp, 但 Zhang 等<sup>[18]</sup>利用寡核苷酸探针检测口蹄疫病毒获得较好效果。笔者通过筛选序列和选择适合长度的序列 (>30 bp), 设计出了 DEV 特异 PCR 引物和长度为 37 bp 寡核苷酸探针。寡核苷酸探针采用非放射性生物素 5'端标记, 避免了放射性标记物对人体的损害, 而灵敏性与放射性原位杂交相当。最适宜的探针浓度应能获得最强的信号, 同时背景又低。参考其它研究者应用寡核苷酸探针检测病毒的探针浓度<sup>[19]</sup>, 经过方阵试验, 确定了检测 DEV 的探针工作浓度为 350 ng·ml<sup>-1</sup>。

间接原位 PCR 的待检样本一般需化学固定, 以保持组织细胞良好的形态结构。固定时间太短, 组织细胞固定不良, 不论是形态结构还是核酸的保存都不理想; 固定时间过长, 可能会减低靶核酸对探针的可及

性,从而使杂交信号减弱。因此,在试验时应优化固定时间,在获得良好固定的同时又要有利于酶的消化<sup>[17]</sup>。一旦标本固定、包埋后,对不同标本消化条件的确定就非常关键,适当消化的细胞膜和核膜有一定通透性,PCR扩增所必需的各种成分进入细胞或核内,以固定的DNA或RNA为模板原位扩增,PCR反应在由细胞膜组成的“囊袋”内进行;而扩增产物因分子较大或互相交织,不易透过细胞膜向外弥散而能保留在原位。经PCR反应,原来细胞内单拷贝或低拷贝的特定DNA或RNA序列呈指数扩增,这样就很容易应用原位杂交技术将其检出。间接原位PCR综合了PCR和原位杂交的特点,既能检出细胞内单拷贝或低拷贝的DNA或RNA序列,而且同时还可对含靶序列的组织细胞进行形态学分析。国内在兽医学研究方面,原位PCR技术发展较慢,应用较少。刘雪燕等<sup>[20]</sup>建立了原位PCR方法检测猫肾F<sub>81</sub>传代细胞中犬细小病毒。黄广明等<sup>[21]</sup>应用原位PCR检测鸡传染性法氏囊病病毒,并对鸡传染性法氏囊病病毒的早期侵染过程进行了研究。徐滨蕊等<sup>[22]</sup>应用原位PCR检测了蛋鸡J亚群禽白血病病毒。

原位PCR的优势之一就是能够直观地应用光学显微镜观察到病原核酸在组织器官内细胞水平的确切分布和定位,是研究病原致病机理的有效手段。本研究以建立的检测石蜡标本中DEV的间接原位PCR方法对DEV感染不同时间的鸭肝组织进行检测,结果从DEV感染后2h至死亡鸭的肝组织中均检测到DEV,肝脏中主要的感染细胞有肝细胞、窦皮细胞和枯否氏细胞,阳性信号多出现于坏死细胞的碎片中或细胞坏死后形成的空泡内及空泡边缘。表明原位PCR可用于观察DEV在组织器官内细胞水平的确切分布和定位,可作为DEV致病机理研究的有效手段。

研究病毒在体内分布的方法主要有电镜、免疫组化(或免疫荧光)、原位PCR(或原位杂交),其检测的目的和意义各不相同,也各有优势。其中电镜观察可直观地了解病毒侵入、复制、装配及超微结构、病毒与宿主细胞间相互关系等信息,由于其费用高、耗时长并需要电子显微镜等特殊仪器设备使其应用受到一定程度限制。免疫组化(或免疫荧光)是对组织细胞中的病毒抗原进行检测,定位准确,操作相对简便,成本相对较低,因此使用较普遍。而原位PCR(或原位杂交)可以检测病毒的核酸在组织细胞中的具体分布,检测时对操作者的要求相对较高,但原位PCR的敏感性较高,特别是在病毒感染早期,病毒复制活

跃,病毒基因组含量可能比病毒抗原丰富,Islam<sup>[14]</sup>和Tantaswasdi<sup>[23]</sup>的研究表明,试验鸭感染DEV后2~4d抗原才分布至胸腺、脾脏和肝脏,而本研究2h即从肝脏中检测到DEV,进一步表明了原位PCR的敏感性和在检测病毒感染早期的优势。

本研究以所建立的间接原位PCR方法对病毒分离鉴定确诊为鸭病毒性肠炎发病鸭的5份存档肝脏蜡块和18份肝脏临床病料检测,结果均为阳性,间接原位PCR检测与病毒分离鉴定的吻合率为100%。将40张阳性染色切片保存4年仍然可观察阳性染色,结果便于保存。表明本研究建立的间接原位PCR方法除了可以作为DEV核酸定位检测和致病机理研究的有效手段外,也可对甲醛保存的历史样本和存档蜡块进行回顾性诊断研究和分子流行病学的调查。

## 4 结论

本研究建立的检测DEV的间接原位PCR方法具有直观、敏感、特异性强的优点,在显示核酸阳性信号的同时,还能判别含有靶序列的细胞类型以及组织细胞的形态结构特征与病理变化。可用于DVE致病机理研究、分子流行病学调查、甲醛保存样本和存档蜡块的回顾性研究。

## References

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学. 北京: 中国农业出版社, 1999: 109-119.  
Gan M H. *Poultry Diseases in China*. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 109-119. (in Chinese)
- [2] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, Fadly A M, McDougald L R, Swayne D E. *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003: 354-363.
- [3] 程安春, 韩晓英, 汪铭书, 袁桂萍, 徐超, 廖永洪. 用间接免疫荧光染色法检测鸭病毒性肠炎病毒在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 942-946.  
Cheng A C, Han X Y, Wang M S, Yuan G P, Xu C, Liao Y H. Research on the invading process and distribution of duck enteritis virus in artificially infected ducks by indirect immuno-fluorescent staining method. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(9): 942-946. (in Chinese)
- [4] Chandrika P, Kumanan K, Jayakumar R, Nachimuthu K. Latex agglutination test for the detection of duck plague viral antigen. *Indian Veterinary Journal*, 1999, 76(5): 372-374.
- [5] Malmarugan S, Sulochana S. Detection of duck plague viral antigen in tissues by immunoperoxidase test. *Indian Veterinary Journal*, 2002,

- 79(2): 103-105.
- [6] Plummer P J, Alefantis T, Kaplan S, O'Connell P, Shawky S, Schat K A. Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction. *Avian Disease*, 1998, 42: 554-564.
- [7] Hansen W R, Brown S E, Nashold S W, Knudson D L. Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Disease*, 1999, 43: 106-115.
- [8] Pritchard L I, Morrissy C, Van Phuc K, Daniels P W, Westbury H A. Development of a polymerase chain reaction to detect vietnamese isolates of duck virus enteritis. *Veterinary Microbiology*, 1999, 68: 149-156.
- [9] 宋 涌, 程安春, 汪铭书, 刘 菲, 廖永洪, 袁桂萍, 韩晓英, 徐超, 陈孝跃. 聚合酶链反应检测鸭病毒性肠炎病毒方法的建立和应用. *中国兽医杂志*, 2005, 41(2): 17-20.
- Song Y, Cheng A C, Wang M S, Liu F, Liao Y H, Yuan G P, Han X Y, Xu C, Chen X Y. Establishment and application of the polymerase chain reaction( PCR) assay for detecting duck viral enteritis virus. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(2): 17-20. (in Chinese)
- [10] Proctor S J, Ritchie A E, Erickson G A. Ultrastructural characterization and hepatic pathogenesis of duck plague virus. *Archives of Virology*, 1976, 50(1-2): 83-95.
- [11] 袁桂萍, 程安春, 汪铭书, 周 毅, 刘 菲, 韩晓英, 廖永洪, 徐超, 郭宇飞, 周伟光, 文 明, 贾仁勇, 陈孝跃. 鸭病毒性肠炎病毒强毒株的形态发生学与超微病理学研究. *病毒学报*, 2004, 20(4): 339-345.
- Yuan G P, Cheng A C, Wang M S, Zhou Y, Liu F, Han X Y, Liao Y H, Xu C, Guo Y F, Zhou W G, Wen M, Jia R Y, Chen X Y. Morphogenesis and ultrastructural pathology of duck enteritis virus virulent strain. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(4): 339-345. (in Chinese)
- [12] Yuan G P, Cheng A C, Wang M S, Liu F, Han X Y, Liao Y H, Xu C. Electron microscopic studies of the morphogenesis of duck enteritis virus. *Avian Diseases*, 2005, 49(1): 50-55.
- [13] Yuan G P, Cheng A C, Wang M S, Han X Y, Zhou Y, Liu F. Preliminary study on duck enteritis virus-induced lymphocyte apoptosis *in vivo*. *Avian Diseases*, 2007, 51(2): 546-549.
- [14] Islam M R, Khan M A. An immunocytochemical study on the sequential tissue distribution of duck plague virus. *Avian Pathology*, 1995, 24: 189-194.
- [15] 程安春, 汪铭书, 刘 菲, 宋 涌, 袁桂萍, 韩晓英, 徐 超, 廖永洪, 周伟光, 文 明, 贾仁勇, 陈孝跃. PCR 在鸭瘟临床诊断和免疫及致病机理研究中的初步应用. *病毒学报*, 2004, 20(4): 391-397.
- Cheng A C, Wang M S, Liu F, Song Y, Yuan G P, Han X Y, Xu C, Liao Y H, Zhou W G, Wen M, Jia R Y, Chen X Y. The preliminary application of PCR in research of clinical diagnosis and mechanisms of immunity and pathogeny of duck plague virus(DPV). *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(4): 391-397. (in Chinese)
- [16] Long A A, Kommlnoth P. *In Situ* PCR: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 71: 141-161.
- [17] Carlos A, Muro-Cacho. *In situ* PCR: Overview of procedures and Applications. *Frontiers in Bioscience*, 1997, 2: 15-29.
- [18] Zhang Z D, Kitching P. A sensitive method for the detection of FMDV by *in situ* hybridization using biotin labelled oligodeoxynucleotides signal amplification. *Journal of Virology Method*, 2000, 88: 187-192.
- [19] Hassan N. *In situ* PCR for detection of HIV using digoxigenin-labeled oligonucleotides. *Biochemica*, 1995, 3: 23-24.
- [20] 刘雪燕, 黄 韧, 刘忠华, 程树军. 猫肾 F81 传代细胞中犬细小病毒原位 PCR 检测. *中国实验动物学报*, 2001, 9(3): 146-149.
- Liu X Y, Huang R, Liu Z H, Cheng S J. Study of *in situ* polymerase chain reaction assay for detection of canine parvovirus (CPV) in feline kidney F81 cells. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2001, 9(3): 146-149. (in Chinese)
- [21] 黄广明, 张曼夫, 乔素兰. 应用原位 PCR 对鸡传染性法氏囊病病毒早期侵染过程的研究. *病毒学报*, 2001, 17(1): 60-64.
- Huang G M, Zhang M F, Qiao S L. Study on the early infecting process of infectious bursal disease virus in chicken by *in situ* RT-PCR. *Chinese Journal of Virology*, 2001, 17(1): 60-64. (in Chinese)
- [22] 徐银蕊, 乔素兰, 董卫星, Lucy F L, 秦玉明, 李 宁. 原位 PCR 和原位杂交检测蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒. *微生物学报*, 2004, 44(5): 584-587.
- Xu B R, Qiao S L, Dong W X, Lucy F L, Qin Y M, Li N. Detection of avian leukosis virus subgroup J in egg-type chickens using *in situ* PCR and *in situ* hybridization. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 584-587. (in Chinese)
- [23] Tantaswasdi U, Wattanavijarn W, Methiyapun S, Kumagai T, Tajima M. Light, immunofluorescent and electron microscopy of duck virus enteritis (duck plague). *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1988, 50(6): 1150-1160.