

用原位杂交对 BHK-21 细胞中的 FMDV 定位和检测

邵军军, 常惠芸*, 林 彤, 丛国正, 独军政, 谢庆阁

(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要: 为了明确 FMDV 在细胞内的增殖部位, 建立检测细胞内低拷贝 FMDV 的方法, 对试验接种 FMDV O/Akesu/58 (10^7 TCID₅₀) 毒株的 BHK-21 细胞中 2~ 10 h 不同时间段的病毒 RNA 进行检测和定位。选用 FMDV RNA 非结构蛋白区 3D 保守序列作为寡核苷酸探针, 采用尾段标记法以地高辛-11-dUTP 标记, 用原位杂交敏感加强型试剂盒检测杂交体。结果显示, 从感染 FMDV 后 2~ 10 h 内的 BHK-21 细胞中检测出阳性染色的病毒粒子, 这些病毒粒子大多集中在核周围, 随感染时间延长阳性染色信号增强。这说明用寡核苷酸探针与敏感加强型试剂盒结合对检测细胞内低拷贝的病毒粒子是可行的, 同时也从分子水平上证明 FMDV 主要在细胞质中进行复制和繁殖。

关键词: 原位杂交; FMDV; 探针; BHK-21

中图分类号: S852. 65⁺ 9. 6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1170-04

FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) 是小 RNA 病毒科, 口蹄疫病毒属成员, 除能引起牛、猪、羊等偶蹄动物的高度接触性、传染性水疱疾病外。更重要的是牛和一些其它反刍动物感染 FMDV 后呈现持续感染, 成为潜在的感染源^[1,2]。

1969 年, Haase 等人建立的原位杂交技术^[3] (*In situ hybridization*, ISH) 是生命科学研究领域的一次技术性革命, 也成为研究口蹄疫病毒持续感染病理特征的重要分子手段^[4-9]。而我国在 FMDV 与宿主关系方面还缺乏研究, 为了研究病毒在宿主细胞内的存在部位, 本研究利用原位杂交技术对培养 BHK-21 细胞内的 FMDV 进行定位, 以期了解病毒在细胞内的增殖和存留部位, 为研究 FMDV 在自然宿主牛体内的感染和增殖部位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 试验用毒株 O/Akesu/58 (全基因组序列已登录 GenBank, 序列号为 AF511039) 为本实验室保存。

1.1.2 细胞 BHK-21 细胞为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 One-step RNA PCR Kit (Taka-

ra), 胎牛血清 (FCS) (Hyclone), DMEM (Invitrogen), DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche), 敏感加强型原位检测试剂盒 11 (碱性磷酸酶) (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将经多聚赖氨酸处理的无菌载玻片放置于直径为 60mm 平皿内, 进行 BHK-21 细胞培养, 所使用的培养液是含有 10% 胎牛血清的 DMEM (加 100 μ g/mL 的青、链霉素), 平皿置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱。当细胞生长成单层后, 接毒 FMDV O/Akesu/58 1 mL (10^7 TCID₅₀), 收集接毒后 2、4、6、8 和 10 h 的盖玻片及细胞对照玻片, 用 0.04 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 5 min, 洗涤 2 次; 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 再用 PBS 洗涤 5 min, 洗涤 2 次, DEPC 水洗 5 min。70% 乙醇中 4 $^{\circ}$ C 保存, 或自然干燥后 -20 $^{\circ}$ C 冻存储存。本试验在 P3 级实验室进行。

1.2.2 引物设计与合成 根据 O/Akesu/58 的基因组序列, 用生物学软件设计了引物, LD31 (+) 5'-CAAGGCTGGTACTGCGGAGGAG-3', LD34 (-) 5'-TTGGATTAAGGAAGCGGAAAAAC-3', 由宝生物(大连)有限公司合成。

1.2.3 寡核苷酸探针的设计与合成 通过 Oligo 4.1 和 DNAstar 序列分析软件比较 C 型 O/Akesu/58、China/1/99 和 TW/974 株序列 (序列均来自 GenBank, 序列号分别为 NC_002554、AF511039、AF506822 和 AF308157), 选择 FMDV RNA 3D 区最保守的序列作为探针。采用尾段标记技术, 在 3'

收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 国家科技攻关项目 (2004BA519A-41)

作者简介: 邵军军 (1974-), 男, 甘肃秦安人, 硕士, 主要从事动物病毒分子生物学研究

* 通讯作者: 常惠芸, Tel: 0931-8342587, 8342052

尾段标记非放射性标记物地高辛分子,合成与标记 工作由武汉博士德生物工程有限公司完成(表 1)。

表 1 使用的寡核苷酸探针
Table 1 Oligodeoxynucleotide probes used

名称 Name	探针序列(5'-3') Sequence of probe	长度/bp
NG-1	5'-GGCGTAGAGCACGTAGATGTTG-3'	22
NG-2	5'-CTCCTGTTTCGCGACAAGCGCGGCGACGCG-3'	29
NG-3	5'-AAGCTCTTGCCGTGCCAGCCTGGGCTCG-3'	28
NG-4	5'-GAGGCACCGTCCTGAGCGGCAGGTGAGACC-3'	30

1.2.4 Southern blot 杂交 在 P3 级实验室从接种 FMDV 并发生明显细胞病变(CPE)的 BHK-21 细胞培养物中提取 FMDV RNA,按 One-step RNA PCR kit (Takara) 进行 RT-PCR 扩增。反应体系为:5 × buffer 5 μL; MgCl₂ 10 μL; dNTP 5 μL; RNAsin 1 μL; LD31 1 μL; LD34 1 μL; AMV 1 μL; AMV-*Taq* 1 μL, RNA 10 μL, 无 RNA 酶水 15 μL)。扩增程序:50 °C 30 min; 94 °C 5 min, 94 °C 2 min, 56 °C 1.30 min, 72 °C 1.30 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物电泳后的转膜参考《分子克隆》第 3 版^[10],杂交按 DIG Nucleic Acid Detection Kit(Roche)说明操作。

1.2.5 原位杂交 在 P3 级实验室按照敏感加强型原位杂交检测试剂盒 II(碱性磷酸酶)说明操作(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2.5.1 暴露 mRNA 核酸片段:切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,室温消化 5~120 s, 0.5 mol/L TBS(NaCl 30 g, Tris 1.2 g, 纯乙酸 0.4 mL, pH 7.2~7.4)洗 3 次 × 5 min, 蒸馏水洗 1 次。

1.2.5.2 预杂交:每张切片滴加 20 μL 预杂交液,恒温箱 42 °C 2 h(湿盒内进行),吸取多余液体,不洗。

1.2.5.3 杂交:用杂交液将探针稀释为 1.5 μg/mL,按每张贴片加 20 μL 杂交液于 42 °C 杂交过夜(湿盒内进行)。

1.2.5.4 杂交后漂洗:用 37 °C 左右水温的 2 × SSC (NaCl 17.6 g, 柠檬酸三钠 8.8 g 于 1 000 mL 蒸馏水中)洗涤 5 min × 2 次; 0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1 次; 0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1 次。

1.2.5.5 封闭:滴加封闭液,37 °C 30 min,甩去多余液体,不洗。

1.2.5.6 滴加生物素化鼠抗地高辛,37 °C 60 min。

0.5 mol/L TBS 洗 5 min × 4 次。

1.2.5.7 滴加 SABC-AP, 37 °C 30 min, 0.5 mol/L TBS 洗 5 min × 4 次。

1.2.5.8 显色:BCIP/NBT(20 ×)按 1:20 的比例用 0.01 mol/L TBS(pH 7.9)稀释,混匀;显色液加至标本上,显色 30 min,充分水洗。

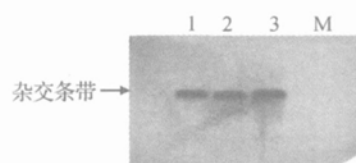
1.2.5.9 核固红复染 5~15 min,充分水洗。

1.2.5.10 中性树胶封片,镜下观察。

2 结果

2.1 Southern blot 结果

如图 1 示,只有 FMDV 目标条带的区域有清晰的杂交条带,而 Marker 则没有条带出现,这说明探针的敏感性好,特异性高。



1~3. 靶基因; M. Marker DL2000
1~3. Target genes; M. Marker DL2000

图 1 Southern blot 结果

Fig. 1 Result of southern blot

2.2 细胞爬片原位杂交结果

BHK-21 细胞接种 FMDV 后 2 h(图 2a)观察到有少量细胞的胞浆中有强阳性蓝染颗粒,而且这些细胞的形态已发生变化,由正常生长的柳叶形变圆,细胞边缘不规则,大多数细胞的胞质中未观察到阳性染色。4 h 已有较多细胞的胞质中有强阳性蓝染颗粒(图 2b),但与 2 h 相比差别不是很明显。6 h 已有大量细胞脱落(图 2c),剩余细胞大多已经变圆

且边缘不规则,杂交后在这些细胞内可见大量的强阳性蓝染颗粒,主要颗粒集中在红染的核周围,在还未完全变圆的细胞中也有强阳性染色。接毒后 8 h 和 10 h 的大多数细胞的胞质中可见到大量蓝染颗

粒(图 2e、图 2f、2g)。阴性对照未观察到细胞内有蓝染颗粒出现,细胞形态也未发生明显变化(图 2d、2h),也未发现有明显的背景染色。

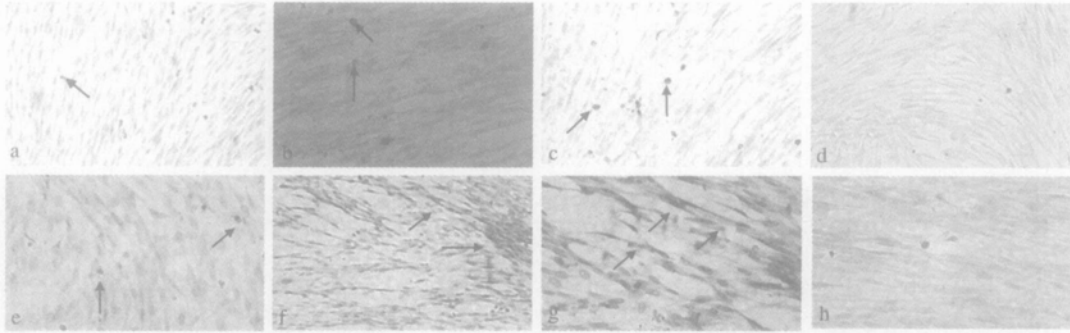


图 2 细胞爬片原位杂交,接毒细胞在 2、4、6、8 和 10 h 的原位杂交结果见 a、c、e、g
阴性对照细胞见 d(200×)和 h(400×);接毒后 6(c,400×)、8(e,200×)和 10 h
(f,200×;g,400×)的细胞有明显的细胞内染色(箭头),2h(a,200×)和 4h(b,400×)
不明显;阴性对照 d、h 细胞内没有蓝染颗粒,也没有背景染色

Fig. 2 BHK-21 cells were infected with FMDV(10^7 TCID₅₀), FMDV RNA were detected at 2, 4, 6, 8 and 10 hours post-infection, respectively (a, c, e, g). There was strong signals(arrows) showed in the cytoplasm at 6(c, 400×), 8(e, 200×), and 10(f, 200×; g, 400×) hours post-infection. Faint signals showed at 2 and 4 hours post-infection (a 200×, b 400×). No signal was observed in the cytoplasm of the negative cells(d 200×; h 400×)

3 讨论

对病毒性疾病的研究一般要求能鉴别感染细胞类型的敏感方法。这对 FMDV 持续感染的机理研究尤为重要,因为 FMDV RNA 在宿主体内持续感染的细胞位点还不清楚。虽然早期研究已证明原位杂交是在分子水平定位 FMDV RNA 的有用手段^[4,9]。然而,由于高背景及敏感性差,要求病毒达到较高的拷贝时才能检出。

本研究为了避免探针过长引起高背景,同时在不降低探针敏感性和特异性的前提下,采用地高辛分子标记的寡核苷酸探针对人为感染 FMDV 的 BHK-21 培养细胞中的病毒进行了检测和定位。结果表明,用 3'-尾段带有 DIG-11-dUTP 寡脱氧核苷酸探针的原位杂交和敏感加强型原位杂交检测信号放大方法相结合,在感染 FMDV 的 BHK-21 细胞内成功地检测出了 FMDV RNA。而且证明,病毒是在细胞的胞质中进行复制和繁殖。细胞爬片原位杂交结果都显示出在核周围的胞浆中有大量的强阳性蓝染颗粒,这种蓝染颗粒主要出现在已经发生病变且细胞形态已经变圆,而在正常的柳叶形细胞中则较少,同时染色较弱。这说明在已经病变的细胞中

有大量的病毒,而且病毒核酸的拷贝数足以用原位杂交检测出,而那些可能已经被病毒感染但形态正常的细胞中几乎没有阳性蓝染颗粒,出现这种结果最可能的原因是病毒在感染细胞中的拷贝数还未达到原位杂交能够检测出的水平,即 10~20 拷贝。培养细胞原位杂交的结果表明细胞核周围胞浆是病毒复制和增殖部位,这与国外对 FMDV 的定位结果相一致^[8,11]。因此认为核周围的细胞浆是 FMDV RNA 的贮存和复制位点。细胞爬片试验结果表明,最早可以在接毒后 2 h 检测到细胞内病毒颗粒的存在,随着接毒细胞病变时间延长细胞内染色明显增强,阳性细胞数量也明显增多,但并没有因此而出现背景染色增强现象,这说明原位杂交的敏感性随细胞内 FMDV 的拷贝数的增加而有明显提高。所有结果显示,多相寡脱氧核苷酸探针在检测感染细胞内基因方面具有较高的敏感性,作为检测方法是可行的,而且克服了由于探针过长引起的高背景染色,这与一些研究者试验结果一致^[8,12,13]。本研究有望实现用原位杂交对自然或试验感染牛体内的 FMDV RNA 检测和定位,从而进一步研究 FMDV 在牛体内的持续感染部位,为阐明 FMDV 持续感染的分子机理奠定基础。

参考文献:

- [1] Burrows R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease [J]. Hygiene, 1966, 64: 81~ 90.
- [2] Egholm M, Buchardt O, Christensen L, et al. DNA hybridises to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules [J]. Nature, 1993, 365: 566 ~ 568.
- [3] Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 4 971~ 4 975.
- [4] Woodbury E L, Iltott M C, Brown C C, et al. Optimisation of an *in situ* hybridisation technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system [J]. J Virol Methods, 1995, 51: 89~ 93.
- [5] Murphy M L, Forsyth M A, Belsham G J, et al. Localization of foot-and-mouth disease virus RNA by *in situ* hybridization within bovine tissues [J]. Virus Res, 1999, 62: 67~ 76.
- [6] Brown C C, Meyer R F, Olander H J, et al. A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using *in situ* hybridization [J]. Vet Pathol, 1992, 56: 189~ 193.
- [7] Brown C C, Olander H J, Meyer R F. A preliminary study of the pathogenesis of foot-and-mouth disease virus using *in situ* hybridization [J]. Vet Pathol, 1991, 28: 216~ 222.
- [8] Zhang Z D, Kitching R P. A sensitive method for the detection of FMDV by *in situ* hybridization using biotin labelled oligodeoxynucleotides signal amplification [J]. J Virol Meth, 2000, 88: 187~ 192.
- [9] Zhang Z D, Kitching R P. The localization of persistent foot-and-mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx [J]. J Comp Path, 2001, 124: 89~ 94.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆[M]. 黄培唐, 王嘉玺, 朱厚础, 等. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 495~ 507.
- [11] Meyer R F, Brown C C, Molitor T W, et al. Use of *in situ* hybridization for the detection of foot-and-mouth disease virus in cell culture [J]. J Vet Diagn Invest, 1989, 1(4): 329~ 332.
- [12] Kerstens H M J, Poddighe P J, Hanselaar A G J M. A novel *in situ* hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramide [J]. J Histochem Cytochem, 1995, 43: 347~ 350.
- [13] 孙幼芳, 曾桃英. 三相寡核苷酸探针原位杂交方法研究 [J]. 中华试验外科杂志, 2003, 20(1): 20.

The Localization and Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus in BHK-21 Cells by *in situ* Hybridization

SHAO Jun-jun, CHANG Hu-ryun*, LIN Tong, CONG Guo-zheng, DU Jun-zheng, XIE Qing-ge
(Key Laboratory of Animal Virology of the Ministry of Agriculture of the P. R. China,
Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou 730046, China)

Abstract: A *in situ* hybridization (ISH) method was used to detect low copy FMDV in infected cells, in order to illuminate FMDV multiplication site. In this study, FMDV RNA was located and detected in BHK-21 cells by ISH. Cells infected experimentally with O/Akesu/58 (10^7 TCID₅₀) at 2, 4, 6, 8 and 10 hours post-inoculation. Oligonucleotide sequences were chosen from the highly conserved regions of 3D gene of FMDV RNA. Probes were labeled with digoxigenin-11-dUTP at the 3'-end. Hybrids were detected by enhanced sensitive ISH detection kit II (AP). Results showed that positive signals were found in the cytoplasm of infected cells post-inoculation, lots of viruses gathered periphery nucleus. Intensive positive signals showed in the cytoplasm of infected cells at 6, 8 and 10 hours post-inoculation. So, we suggested ISH combined with enhanced sensitive ISH detection kit II (AP) is a sensitive method, which was a reliable method for detection and localization of low copy viruses in infected cells. Results indicated multiplication and duplication of FMDV were in the cytoplasm of infected cells.

Key words: *in situ* hybridization; FMDV; probe; BHK-21

* Corresponding author