

原位 PCR 和原位杂交检测蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒

徐镇蕊^{1*} 乔素兰¹ 董卫星² Lucy F. Lee³ LI Mao-Xiang³

(¹ 中国农业大学动物医学院 北京 100094)

(² 安徽省农业委员会畜牧局 合肥 230001)

(³ Avian Disease and Oncology Laboratory USDA East Lansing MI 48823 USA)

摘 要 根据 ALV-J 原型株 HPRS103 株 gp85 基因的内部序列和 *pol* 基因的 3' 端设计一对引物 H5/H7。从发生 ML 病死蛋用型鸡的肿瘤、骨髓、肝脏、脾脏和输卵管组织中提取总 RNA, 反转录为 cDNA 经 PCR 扩增得到长度为 545bp 的 ALV-J cDNA 特异性探针。探针定位于 5258 ~ 5802bp。将病鸡的组织石蜡切片置 Hybaid Express 原位 PCR 仪平台上, 以 H5/H7 为引物进行原位 PCR 扩增。应用地高辛标记的 cDNA 探针对原位 PCR 扩增后切片进行了原位杂交检测。结果在待检组织肿瘤组织、十二指肠、骨髓中出现明显的阳性信号。睾丸、肺、胰腺、大脑、输卵管、肾脏均检出散在的阳性信号。这是国内外首次从分子水平证明蛋鸡 J 亚群禽白血病。

关键词 原位 PCR 原位杂交 蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒 cDNA 探针

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)05-0584-04

J 亚群禽白血病病毒属 C 型反转录病毒。自 1991 年 Payne^[1] 分离出 ALV-J 原始株 HPRS-103 以来, 这种新的 ALV-J 就一直是肉鸡的重要病原^[2], 且引起肉鸡业的重大损失。它和其它亚群白血病一样, 可以通过水平和垂直传播。它与其它亚群白血病病毒不同的是 J 亚群禽白血病病毒侵害的靶细胞是骨髓细胞^[3]。过去针对 J 亚群禽白血病的研究主要是集中在自然和人工感染的肉鸡上。对于蛋鸡发生该病的自然病例则无相关报道。2002 年徐镇蕊等^[4]通过对临床病例研究发现蛋鸡也可自然感染 ALV-J 并发生该病, 造成严重损失。随后我们对根据组织病理学诊断为 J 亚群禽白血病的病鸡, 又用免疫组化和 ALV-J 的序列分析证实该病。由于蛋鸡自然发生 J 亚群禽白血病在国内外还是首次报道^[5], 本研究旨在用原位 PCR 和原位杂交方法检测发病蛋鸡 ALV-J 核酸, 从分子水平证明蛋鸡中存在 J 亚群禽白血病。

1 材料和方法

1.1 组织材料

病料取自经组织病理学和免疫组化诊断为 J 亚群禽白血病的病鸡群, 这些组织包括肿瘤组织、十二指肠、睾丸、肺、胰腺、大脑、输卵管、骨髓、肾脏。用

4% 多聚甲醛固定病料, 常规石蜡包埋切片, 5 μ m 厚的切片贴于涂有多聚赖氨酸防脱片处理的载玻片, 45 $^{\circ}$ C 烤 12h 备用。同时设两组对照, 对照组(1)替代实验的病料同实验组, 阴性样品对照组(2)的组织材料取自 SPF 鸡, 其购自北京市实验动物研究中心。

1.2 引物设计和合成

根据 GenBank 中 ALV-J 原型株 HPRS 103 株 gp85 编码基因的序列(Z46390) 参照 Smith 等^[6]的方法, 在 *pol* 基因的 3' 端和 gp85 编码基因的内部设计一对引物 H5/H7(表 1), 引物由 TaKaRa 公司合成。

表 1 用于 ALV-J PCR 反应的一对引物

Table 1 Primers used for PCR of ALV-J				
Nucleotide sequence of the primer	Orientation	Name	Length/bp	Position/bp
5'-GGATGAGGTGACTAAGAAAG-3'	+	H5	20	5258 ~ 5277
5'-CGAACCAAAGGTAACACACCG-3'	-	H7	20	5783 ~ 5802

1.3 探针的制备

1.3.1 试剂: TRIzol Reagent 购自 Invitrogen; AMV、RNasin、Taq DNA 酶、dNTPs, 购自 TaKaRa 公司。玻璃奶回收试剂盒购自北京华绿源生物技术公司。地高辛标记和检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.3.2 总 RNA 的提取: 病料取自 -80 $^{\circ}$ C 冻存的肿瘤、骨髓、肝脏和脾脏, 100mg 于离心管中, 剪碎, 然

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30371073)

作者简介 徐镇蕊(1955 -), 女, 安徽蚌埠市人, 教授, 硕士, 主要从事动物分子病理学研究, 现就职于中国农业大学动物医学院。Tel: 86-10-62733060; E-mail: xubr@sina.com

其他作者 秦玉明¹, 李 宁¹

收稿日期 2004-02-09, 修回日期 2004-05-08

后加入 1mL TRIzol Reagent。剧烈震荡 15s 后,室温放置 5min;加入 200 μ L 氯仿,震荡 15s,室温放置 3min,将混合液于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000g 离心 15min,取上层水相到另一离心管中,然后加入 500 μ L 异丙醇,混匀后室温放置 10min;12000g 离心 10min,小心弃去上清,用 1mL 冰冷的 75% 乙醇洗涤沉淀,混悬后 7500g 离心 5min,然后弃去上清,超净台内风干 RNA 沉淀约 10min;用 DEPC 处理过的灭菌双蒸水 20 μ L 溶解沉淀,加入 1 μ L RNasin,分装成每管 5 μ L, -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3.3 反转录:在微量离心管中加入上述提取的 RNA 溶液,依次加入下游引物 2 μ L,DEPC 处理的水 2 μ L,70 $^{\circ}$ C 作用 8min,迅速冰浴 5min,然后离心并加入以下成分:RNasin 1 μ L,5 \times RT-Buffer 5 μ L,dNTP 4 μ L,AMV 2 μ L。瞬时离心混匀后 42 $^{\circ}$ C 作用 1h。

1.3.4 PCR 扩增:反应总体积为 50 μ L:10 \times buffer 5 μ L,dNTP 4 μ L,上游引物 H5 1 μ L,下游引物 H7 1 μ L,模板 cDNA 2 μ L,酶 0.5 μ L,灭菌双蒸水 36.5 μ L。以 H5 和 H7 为引物进行 PCR 扩增,降落 PCR 反应程序如下:93 $^{\circ}$ C 变性 1min,60 $^{\circ}$ C 退火 1min(每个循环降低 2 $^{\circ}$ C,降到 48 $^{\circ}$ C 共 7 个循环),72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,93 $^{\circ}$ C 1min,48 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。用 FR-200 紫外与可见分析装置凝胶成像。将 PCR 扩增产物送 TaKaRa 公司进行 DNA 测序。

1.3.5 探针回收和地高辛标记:PCR 产物的回收与纯化用玻璃奶回收试剂盒进行。纯化的探针浓度(PCR 产物)约为 50ng/ μ L。探针的标记根据地高辛标记和检测试剂盒说明进行。取溶于 15 μ L 灭菌双蒸水中的模板 DNA(约 800ng),100 $^{\circ}$ C 变性 10min,迅即冰浴 5min。再加入寡核苷酸六聚体混合物 2 μ L,标记 dNTP 混合物 2 μ L,然后再加入 1 μ L Klenow 酶,稍离心,37 $^{\circ}$ C 作用 24h,最后加 2 μ L 0.2mol/L EDTA(pH8.0)终止反应。标好的探针可直接用于杂交,也可 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.6 探针的特异性和标记效率的检测:探针的地高辛标记效率:将纯化的探针进行 10 倍梯度稀释,按试剂盒说明进行标记,结果发现该探针的标记效率相当于对照 DNA 0.1pg/ μ L,即探针的地高辛标记效率为 0.1pg/ μ L。探针的特异性检验:将地高辛标记的探针分别与鸡淋巴白血病病毒、J 亚群禽白血病病毒、鸡马立克氏病病毒、鸡传染性法氏囊病病毒、鸡新城疫病毒、鸡传染性喉气管炎病病毒的核酸进行斑点杂交,以检测该探针的特异性。结果发现

只有与 J 亚群禽白血病病毒杂交出现阳性信号,其他 5 种常见的鸡病毒性疾病均不能由该探针检测到,从而确定了该探针的特异性。

1.4 原位 PCR 扩增

石蜡切片预处理:用二甲苯脱蜡 2 次,每次 10min,置梯度浓度乙醇中脱水,95%、70%、50% 乙醇中各作用 5min;10 μ g/mL 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 15min,PBS 洗涤 5min;依次 50%、70%、95%、100% 乙醇中各作用 2min,以脱去组织中的水分。用 PAP 笔将组织切片圈起,加反转录液的切片在湿盒中 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。原位 PCR 扩增反应体系:1 \times Buffer(Mg^{2+}) dNTP 1 μ L,上游引物和下游引物各 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,加水至 20 μ L。加 20 μ L 反应液在组织切片上,覆盖硅化盖玻片使之封闭。置 Hybrid Express 原位 PCR 仪平台上进行扩增。热循环条件为 93 $^{\circ}$ C 1min,60 $^{\circ}$ C 1min(每个循环降低 2 $^{\circ}$ C,降到 48 $^{\circ}$ C 共 7 个循环),72 $^{\circ}$ C 1.5min;93 $^{\circ}$ C 1min,48 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.5 原位杂交

1.5.1 组织切片的杂交前预处理:将原位 PCR 扩增的切片置梯度浓度乙醇中脱水,100%、95%、70%、50% 乙醇中各作用 5min 之后,用 PBS(pH7.4)漂洗切片,空气中干燥^[7]。室温下,组织切片在 20% 乙酸作用 15s,DEPC 水洗 5min,0.2mol/L HCl 中浸 10min,接着 DEPC 水清洗,再用 PBS 清洗,再置于含 0.2mol/L Tris \cdot HCl(pH7.5),3mmol/L CaCl₂ 的溶液中 37 $^{\circ}$ C 作用 10min,37 $^{\circ}$ C 10 μ g/mL 蛋白酶 K 消化 15min,室温下每张切片加 0.5mL 的 50mmol/L Tris \cdot HCl(pH7.6) 2mg/mL 甘氨酸溶液作用 5min,用 4% 多聚甲醛进行后固定 15min,PBS 洗,室温下,在 50% 甲酰胺 2 \times SSC 中作用 30min,70% 甲酰胺,2 \times SSC 70 $^{\circ}$ C 作用 3min,迅即置 -20 $^{\circ}$ C 70% 乙醇中 5min,PBS 清洗,晾干。每一组织块做 3 张切片。

1.5.2 原位杂交试验:每张切片加 200 μ L 预杂交液,42 $^{\circ}$ C 预杂交 30min 至 1h。预杂交液组成:50% 5 \times SSC,2% 封闭液,50% 甲酰胺,0.1% N-lauroylsarcosine,0.02% SDS,鲑精 DNA 100 μ g/mL,5 \times Denhart's 液。杂交:取 200 μ L 预杂交液,加 20 μ L 地高辛标好的探针,在 100 $^{\circ}$ C 作用 10min,迅即冰浴冷却以变性探针,然后每张切片加杂交液 25 μ L,盖上盖玻片,Parafilm 封好切片,42 $^{\circ}$ C 水浴摇床中作用 10~16h。杂交后漂洗:用 2 \times SSC,0.1% SDS 68 $^{\circ}$ C 洗液 15min,洗两次,用缓冲液 1 洗切片 10min,缓冲液 2 处理切片 30min,在切片上滴加稀释好的酶标抗地高辛抗体溶

液 1~2h,接着用缓冲液 1 洗 15min,洗两次,加缓冲液 3 作用 3~5min,以激活结合在抗体上的碱性磷酸酶,倾去切片上的缓冲液 3。显色:加入现配的显色液,放于暗处显色,几分钟后显色反应开始,约于 10h 内完成。终止反应:于缓冲液 1 中作用 5min,50mL 缓冲液 4 洗 5min 终止反应。快速在梯度浓度乙醇中脱水,风干后用中性树脂封片,OLYMPUS-BHS 显微观察并照相。

2 结果

检测出阳性信号的切片表明特异性探针已与病理组织切片中 ALV-J 核酸发生结合。肿瘤组织(图版 I-A-a)、十二指肠(图版 I-A-b)、骨髓中有明显而广泛的阳性信号检出,其阳性信号呈集团分布。睾丸、肺、胰腺、大脑、输卵管(图版 I-A-c)和肾脏均检出散在阳性信号,阳性结果呈兰紫色颗粒。对照组的十二指肠(图版 I-A-d)、骨髓、睾丸、肺、胰腺、大脑、输卵管、肾脏均未检出阳性信号。

3 讨论

本研究采用原位 PCR 扩增检测 J 亚群禽白血病病毒。对于传统的分离 ALV-J 的方法而言,原位 PCR 提供了检测 ALV-J 特异和敏感的替代方式。用免疫学和分子生物学方法确诊该病的方法很多。PCR 是常用方法^[8],其敏感性比 ELISA 高出 5 倍^[9]。国外分子生物学的原位杂交方法已广泛用于检测各种病毒病原^[10]。本研究所用的探针序列是决定该病毒亚群特异性的部分囊膜基因的编码序列和 ALV-J *pol* 基因的部分序列,通过原位杂交可检测病毒 RNA 和前病毒 DNA。实验结果表明地高辛标记的 cDNA 探针对 ALV-J 是特异的,可用于检测多聚甲醛固定组织的石蜡切片。通过组织病理组织学观察到 ML 特征性的肿瘤细胞,再用原位杂交方法检出病毒核酸,是从分子水平确诊蛋鸡群中发生 J 亚群禽白血病行之有效的方法。与我们先前实验利用单克隆抗体进行免疫荧光检测,免疫组化检测的是病毒蛋白的实验相比,本研究采用的原位 PCR 和原位杂交方法检测病毒核酸方法更敏感,从而在国内外首次发现蛋鸡 J 亚群禽白血病^[11]。

原位杂交的技术关键是探针,本实验所用的探针直接从病变组织中的病毒反转录 cDNA 获得,经过特异性和标记效率的检测都很好,地高辛标记效率也高,这就为待检病毒原位定位取得理想的结果

奠定了基础。但是要获得原位杂交的可靠结果,操作技术上仍然要注意几点。

经以下途径避免非特异着色,减低背景:(1)杂交前将标本浸入 20% 乙酸(4℃)15s 或用 0.01g/mL 过碘酸淋洗,以破坏内源性碱性磷酸酶的活性。(2)预杂交和杂交过程中使用 100ng/mL 鲑精 DNA 封闭。(3)每一步骤间充分洗涤。(4)尽量缩短显色时间,8~10h 比较理想。

病料固定时间和切片的蛋白酶 K 消化时间是影响探针穿透性的重要因素。本实验采用 4% 多聚甲醛固定病料,采用 10μg/mL 蛋白酶 K 消化切片 15min,取得了良好的结果。

参 考 文 献

- [1] Payne L N, Brown S R, Bumstead N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chickens. *Gen Virol*, 1991, **72**: 801-807.
- [2] Venugopal K, Smith L M, Howes K, et al. Antigenic Variants of subgroup J avian leucosis virus: Sequence analysis reveals multiple changes in the *env* gene. *Gen Virol*, 1998, **79**(4): 575-766.
- [3] Payne L N, Fadly A M. In: Diseases of Poultry. Calnek B W, et al. ed. USA: Iowa State University Press, 1997, 414-466.
- [4] 徐镛蕊, 吕艳丽, 董卫星, 等. 鸡骨髓细胞瘤病的病理学诊断. *畜牧兽医学报*, 2002, **133**(6): 562-564.
- [5] Binrui Xu, Weixing Dong, Chunming Yu, et al. Occurrence of avian leucosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China. *Avian Pathol*, 2004, **33**(1): 13-17.
- [6] Smith L M, Brown S R, Howes K, et al. Development and application of polymerase chain reaction tests for the detection of subgroup J avian leucosis virus. *Virus Res*, 1998, **54**(1): 87-98.
- [7] 蔡文琴, 王泊云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994, 404-466.
- [8] Smith E J, Williams E J, Fadly A M. Detection of avian leucosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 1998, **92**(2): 375-380.
- [9] Thuy D Pham, Spencer J L, Vicki L Traina-Dorge. Detection of exogenous and endogenous avian leucosis virus in commercial chicken eggs using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *Avian Pathol*, 1999, **28**: 385-392.
- [10] Arshed S S, Smith L M, Howes K. Detection of avian leucosis virus subgroup J (HPRS-103) using *in situ* hybridization. *Avian Pathol*, 1998, **27**: 91.
- [11] 徐镛蕊, 董卫星, 何召庆, 等. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡 J 亚群禽白血病的研究. *中国兽医杂志*, 2002, **38**(9): 7-9.

Detection of Avian Leukosis Virus Subgroup J in Egg-type Chickens Using *In situ* PCR and *In situ* Hybridization

XU Bin-Rui^{1*} QIAO Su-Lan¹ DONG Wei-Xing² Lucy F. Lee³ LI Mao-Xiang³

(¹ College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(² Animal Husbandry Bureau, Anhui Agriculture Committee, Hefei 230001, China)

(³ Avian Disease and Oncology Laboratory USDA, East Lansing, MI 48823, USA)

Abstract: A pair of primers H5/H7 was designed according to the sequence of encoding gene for partial gp85 encoded gene and 3' region of *pol* gene of prototype ALV-J strain HPRS-103. A 545bp special probe of ALV cDNA, located in the 5258 ~ 5802 was obtained by amplifying of total RNA extracted from the tumor, bone marrow, oviduct, liver, and spleen from the diseased chickens with various flocks and was transformed reversely to cDNA. *In situ* PCR with H5/H7 primers was carried out in the paraffin section of diseased chickens, then *in situ* hybridization was carried out with the digoxigenin-labeled special cDNA probe over the amplified paraffin section. Marked positive signals were present in tumor, duodenum, bone marrow, and widespread positive signals were detected in the testis, lung, pancreas, cerebrum, oviduct, kidney. This is the first confirmed at the molecular level that avian leukosis subgroup J occurred in the egg-type chickens in the world.

Key words: *In situ* PCR, *In situ* hybridization, Avian leukosis virus subgroup J, cDNA probe

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30371073)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62733060; E-mail: xubr@sina.com

Other authors: QIN Yu-Ming¹, LI Ning¹

Received date: 02-09-2004

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-Ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-Quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-Bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-Guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng

CHEN Yong-Qing

CHENG Chi

DONG Xiu-Zhu

FAN Yun-Liu

GUO Jun

HU Fu-Quan

HU Yuan-Yang

HUANG Li

LU Cheng-Ping

MIN Hang

QIAN Shi-Jun

SHAO Yi-Ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-Ming (USA)

XIE Hong

YANG Su-Sheng

ZHAI Zhong-He

ZHANG Yao-Ping (USA)

ZHENG Tian-Ling

ZHU Bao-Quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang

WANG Min