

# Application of *In Situ* Hybridization in the Detection of *Cyprinus carpio* in Infected Carp

Bin Wu<sup>1</sup>, Hong Wang<sup>2</sup>, Lin Zhang<sup>1</sup>, Huijun Zhao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian Liaoning

<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning

Email: wubin69@163.com

Received: Aug. 14<sup>th</sup>, 2017; accepted: Aug. 28<sup>th</sup>, 2017; published: Sep. 11<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) is a rhabdovirus that occurs mainly in the spring, which can cause large-scale outbreaks of *Cyprinus carpio* (falciparum) in fishes or adult fish. *In vitro* expansion of SVCV infected healthy carp by artificial infection. *In situ* hybridization (ISH) was used to identify and detect SVCV molecules in the head, viscera of diseased fish that with obvious symptoms of carp spring virulence and identified as positive by PCR. The results showed that there was a high level of virus in brain and viscera of diseased fish. In this study, SVCV *in situ* hybridization detection method was established, which can initially identify the distribution of SVCV in different tissues of diseased fish.

## Keywords

Spring Viremia of Carp Virus (SVCV), Carpon Virulence (SVC), Carp, Artificial Infection, In Situ Hybridization (ISH)

---

# 应用原位杂交技术检测感染鲤鱼体内的鲤春病毒的

吴斌<sup>1</sup>, 王红<sup>2</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 肇慧君<sup>1</sup>

<sup>1</sup>辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连

<sup>2</sup>大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连

Email: wubin69@163.com

收稿日期: 2017年8月14日; 录用日期: 2017年8月28日; 发布日期: 2017年9月11日

## 摘要

鲤春病毒(Spring Viremia of Carp Virus, SVCV)是一种弹状病毒, 主要发生于春季, 它能引起鲤科鱼类的鱼苗或成鱼大规模暴发鲤春病毒血症(SVC)。体外扩增的SVCV经人工方法感染健康鲤鱼, 运用原位杂交技术(ISH), 对感染后出现明显症状并经PCR鉴定阳性的病鱼, 取其头部、内脏等组织切片进行SVCV分子定位和检测。结果显示, 病鱼体内检出病毒, 其中脑部和内脏含量较高。本文建立的SVCV原位杂交法, 可初步确定SVCV在病鱼体内不同组织的分布情况。

## 关键词

鲤春病毒(SVCV), 鲤春病毒血症(SVC), 鲤鱼, 人工感染, 原位杂交(ISH)

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

鲤春病毒(Spring Viremia of Carp Virus, SVCV)是一种弹状病毒, 主要发生于春季, 它可以引起鲤科鱼类的鱼苗或成鱼大规模暴发鲤春病毒血症(SVC)。SVC 又称鲤鱼传染性腹水症, 是一种急性、出血性传染性败血病。该病可以危害鲤鱼, 鲶鱼, 鲫鱼, 鲢鱼, 鳙鱼等, 在欧、亚两洲均有流行。SVCV 是鱼类口岸检疫的第一类检疫对象, 世界动物卫生组织(OIE)将其列为需要向申报的疫病, 我国农业部定为一类动物疫病[1]。

SVCV 传统检测方法是根据典型症状进行初步诊断, 再通过细胞分离病毒进行确认, 最后采用免疫学方法, 如中和试验和 ELISA, 或者分子生物学方法, 如 PCR 和 DNA 探针等进行鉴定[2]。原位杂交法可以对组织切片中不同细胞、不同部位靶基因进行精确定位, 具有特异性强、灵敏度高等特点, 可以作为一种很好的水生动物病毒定位检测方法[3]。本文利用 SVCV 核蛋白基因的高保守高特异性, 采用巢式 PCR 扩增出 714 bp 片段, 地高辛(DIG)标记探针, 建立测定 SVCV 的 ISH 方法, 初步确定 SVCV 在病鱼体内存在的部位, 为进一步研究 SVCV 的发病机理提供了基础材料。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 毒株

传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、鲤春病毒(SVCV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)等毒株由本实验室保存。

#### 2.1.2. 实验样品

人工感染的鲤鱼鱼苗为市场购买。

#### 2.1.3. 仪器和试剂

显微镜: 德国蔡氏 AXIOPHOT 显微镜。

试剂盒: Roche 生产的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, DIG Wash and Block Buffer。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 病毒液的制备

利用 FHM 细胞对 SVCV 病毒的敏感性体外扩增 SVCV 病毒, 并用 Karber 法测定病毒滴度为  $10^{-6.127}/0.1$  mL。

### 2.2.2. 人工感染

购买的鲤鱼鱼苗经过一周饲养确定没有病变症状, 将 20 条鱼分成 2 组(对照组和实验组各 10 条)。将 2 组鱼饲养在 10℃ 水箱中, 将病毒液按 1:1000 比例投入实验组, 适应性感染 3 d。用滴度为  $10^5$  左右的 SVCV 病毒液 5  $\mu$ L 对实验组斑马鱼进行背鳍基部肌肉注射, 进一步强化。注射后每天观察记录染毒鱼的状态, 并持续饲养直至实验组出现明显的病变症状。

### 2.2.3. 引物设计

根据文献设计引物并合成(见表 1)。

### 2.2.4. 病鱼的 PCR 鉴定

对出现典型症状的病鱼提取病毒 RNA, 进行 PCR 鉴定。

### 2.2.5. 探针的制备

1) 制作模板 DNA: 病毒液提取病毒 RNA, 利用设计的引物扩增出一条 714 bp 的片段。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。按照凝胶回收试剂盒说明对 PCR 扩增出的 714 bp 片段进行回收。

2) DIG 标记: 按照 DIGDNA 高效标记检测试剂盒说明, 将回收的 714 bp 片段标记成 DIG-714 探针。

3) 探针浓度的选择: 按照 DIGDNA 高效标记检测试剂盒说明, 选择适合的探针浓度。

### 2.2.6. 切片的制作

实验组病鱼经 10% 甲醛固定 24 h 后, 分成头部、内脏和尾臀三部分。经过梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 最后石蜡包埋。切片待检。头部取脑、眼处横切片, 内脏部取内脏部分中间处切片, 尾臀取有最大横切面积的切片。

### 2.2.7. ISH 检测

将载有病鱼切片的玻片 60℃ 恒温 45 min 水化, 随后经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化; 加入含 100 mg/L 蛋白酶 K 的 PBS, 37℃ 消化 15 min; 预冷的 0.4% 甲醛室温固定 5 min;  $2 \times$  SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M 枸橼酸钠, pH7.0) 室温漂洗 5 min; 500  $\mu$ L 预杂交液 ( $4 \times$  SSC, 50% 甲酰胺, 0.02% BSA, 0.02% 聚蔗糖, 0.02% PVP, 5% 硫酸葡聚糖) 37℃ 预杂交 30 min; DIG-714 探针溶液稀释到 1 ng/ $\mu$ L 42℃ 杂交 2 h。依次 37℃,  $2 \times$  SSC 漂洗 30 min,  $1 \times$  SSC 漂洗 5 min,  $0.5 \times$  SSC 漂洗 5 min; 室温 Buffer I (0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5) 洗片 5 min; 37℃ 加入 500  $\mu$ L 含 5% 阻断剂的 Buffer II 阻断 15 min; 37℃ 加入 500  $\mu$ L 含有 1/1000

Table 1. RT-PCR Primes of SVCV

表 1. SVCV RT-PCR 引物

引物名称	序列	片段长度
F1	5'-TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC-3'	714 bp
R2	5'-AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCAAY-3'	

抗 DIG 碱性磷酸酶复合物中孵育 30 min; 室温 Buffer I 洗片 10 min, Buffer III (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)平衡 5 min; 滴加 500  $\mu$ L 显色液(75 mg/mL NBT, 50 mg/mL BCIP), 室温避光显色 3 h; 室温 Buffer IV 终止反应 15 min; 0.5% 皮斯麦棕复染色 5 min。梯度乙醇脱水, 二甲苯置换 10 min。树胶封片镜检。可见阳性信号成紫色。结果用照片显示。同时设置阴性对照: 以对照组健康鲤鱼鱼苗为材料制作切片, 完全按照上述方法进行检测。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 探针的制备

以 SVCV 胶回收产物作为模板, 并对回收产物进行浓度测定, 平行测定两次取平均值作为探针模板的浓度(表 2)。计算结果 SVCV 的模板浓度是 352.15 ng/ $\mu$ L。

按照罗氏 DIG-DNA 高效标记检测试剂盒的说明进行模板 DNA 标记, DIG 标记后两种探针浓度均为 100 ng/ $\mu$ L。

#### 3.2. 探针浓度的选择

在硝酸纤维素(NC)膜上进行斑点杂交反应选择探针的浓度, 结果如图表明。图 1 显示, DIG 探针在 0.1 pg/ $\mu$ L 显示的亮度与对照组 1 pg/ $\mu$ L 稀释的亮度相当, 表明原标记液中探针的含量高于理论值, 按照 DIG 标记效率曲线关键点推算出大约为 2300 ng。在做 Southern blot 时, 使用稀释至 25 ng/mL 的杂交液, 做组织切片杂交实验时使用稀释至 1 ng/ $\mu$ L 的杂交液。

#### 3.3. 探针特异性检测

图 2 为转膜前电泳检测结果, 以 714 bp 的 SVCV、224 bp 的 IPNV、505 bp 的 VHSV、580 bp 的 EHNV 作为对照组, 得到相应的目的条带。

图 3 为 SVCV 探针特异性 southern blot 杂交结果图, 1 号 SVCV 出现杂交结果, 且信号强度良好, 而其他样品均没有杂交信号, 说明探针与其他样品无杂交反应, 对 SVCV 具有良好的特异性。

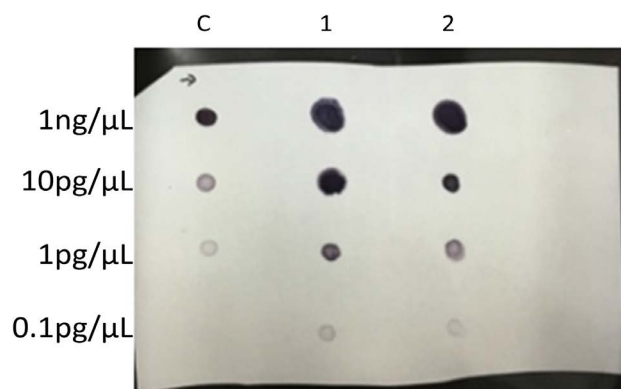
#### 3.4. ISH 结果

人工感染草鲤鱼的 SVCV 探针 ISH 检测结果(图 4)与对照组健康鱼 ISH 检测结果(图 5)对比显示, 在

Table 2. Concentration of template DNA

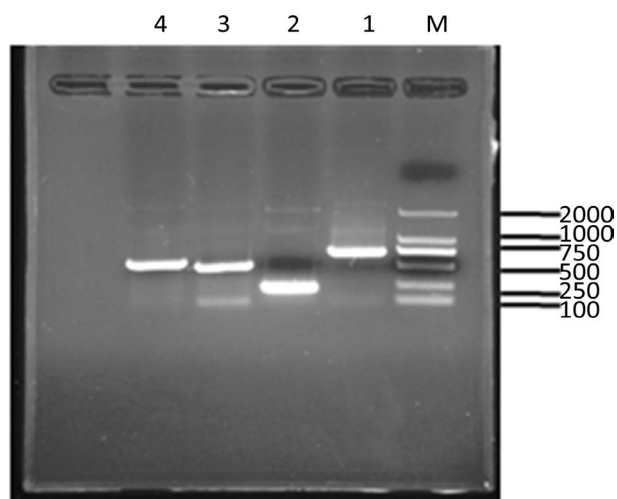
表 2. SVCV 模板浓度

测试种类	SVCV	
	平行试验 1	平行试验 2
	<dsDNA:50>	<dsDNA:50>
Abs230	4.576	5.249
Abs260	6.812	7.274
Abs280	4.143	4.552
260:230	1.489	1.386
260:280	1.644	1.598
Conc.(ng/ $\mu$ L)	340.600	363.700
平均值	352.15 ng/ $\mu$ L	



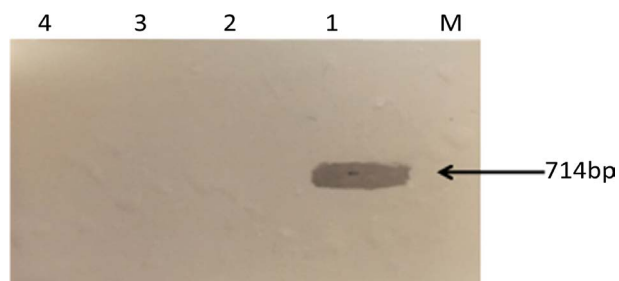
**Figure 1.** Quantification of labeling efficiency with DIG-SVCV; C: Positive control; 1,2: DIG-SVCV

**图 1.** SVCV 探针浓度的选择; C: 阳性对照; 1,2: 标记的 DIG 探针



**Figure 2.** Electrophoresis map for RT-PCR product; M: Marker 2000; 1: SVCV714 bp; 2: ipnv224 bp; 3: VHSV505 bp; 4: EHNV580 bp

**图 2.** PCR 产物电泳图; M: Marker 2000; 1: SVCV714 bp; 2: ipnv224 bp; 3: VHSV505 bp; 4: EHNV580 bp



**Figure 3.** The result of DIG-SVCV Southern blot hybridization; M: Marker 2000; 1: SVCV714 bp; 2: ipnv224 bp; 3: VHSV505 bp; 4: EHNV580 bp

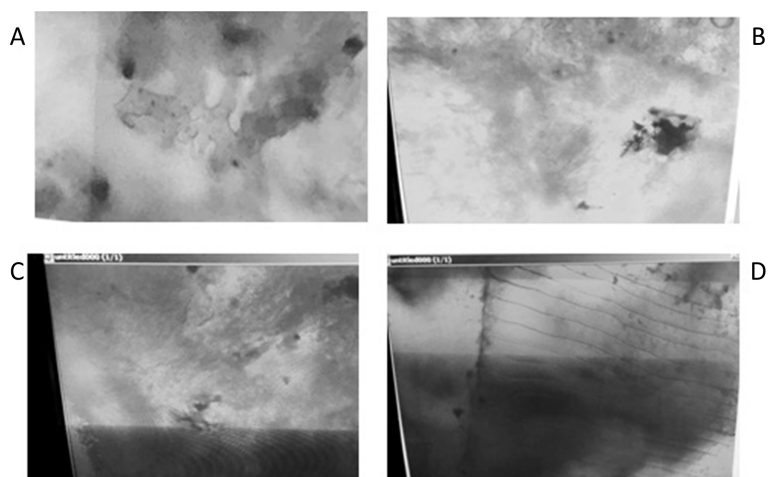
**图 3.** SVCV 探针特异性 southern blot 杂交结果图; M: Marker 2000; 1: SVCV714 bp; 2: ipnv224 bp; 3: VHSV505 bp; 4: EHNV580 bp

内脏、眼、脑、肌肉组织切片中均检测到了深紫色的阳性信号斑点(显微照片中为黑色小圆形斑点,能够明显的与组织复染后照片中的颜色区分)。其中,整个脑、肌肉组织的阳性斑点较多,眼组织中也可观察到较少的阳性信号,但总体信号较弱。

对健康草鲤鱼切片进行 SVCV 探针混合液的 ISH,显微结果(图 5)表明健康鱼各组织切片中均没有出现杂交斑点,证明病鱼组织切片中的蓝紫色斑点是病鱼组织中 SVCV 与探针产生的杂交斑点。

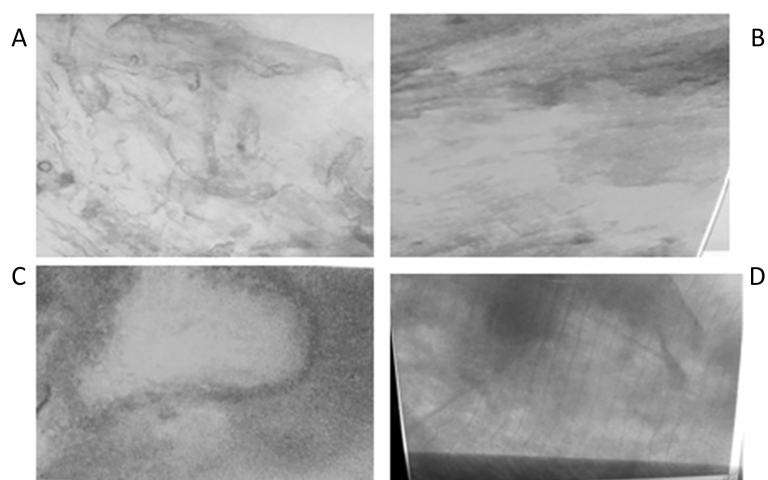
#### 4. 结论

ISH 是分子生物学与组织学相结合的一种技术,它从细胞水平上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,可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为有效的方法。ISH 技术在医学上应用很广泛[4],并且 BP、IHHNV



**Figure 4.** The result of ISH with DIG-SVCV for infected samples A: internal organs; B: brain; C: eyes; D: muscle

**图 4.** SVCV 感染草鲤鱼组织石蜡切片 ISH 结果图 A: 内脏; B: 脑; C: 眼; D: 肌肉



**Figure 5.** The result of ISH with DIG-SVCV for healthy samples A: internal organs; B: brain; C: eyes; D: muscle

**图 5.** 健康草鲤鱼组织石蜡切片 ISH 结果图 A: 内脏; B: 脑; C: 眼; D: 肌肉

等核酸探针已商品化, 为 SVCV 的检测提供了有利工具。ISH 靠探针的渗透作用进入细胞内与特异的核酸片段杂交。探针长度影响其渗透力, 从而使结果产生偏差, 甚至可能出现假阴性结果。据报道, 大致 700 bp 探针有良好的渗透力[5]。

本文根据糖蛋白基因设计的特异性引物, 对 SVCV 进行扩增, 并对扩增产物进行 DIG 标记, 得到探针 DIG-714。通过比较对照标记反应产生的点的强度差异, 计算出 DIG 标记 DNA 的量, SVCV 探针稀释至 0.1 pg 的点与对照 DNA 的点均可见, 说明标记的探针达到了预期的标记效率, 按照标记效率曲线关键点推算出大约为 2300 ng。在做 Southern blot 时, 使用稀释至 25 ng/mL 的杂交液, 做组织切片杂交实验时使用稀释至 1 ng/ $\mu$ L 的杂交液。探针的特异性实验结果表明, 两种探针能够标记相应的病毒, 对其他的对照组并没有交叉反应, DIG-SVCV 特异性良好。人工感染实验结果表明, 鱼内脏、眼、脑、肌肉组织切片中均检测到深紫色的阳性信号斑点, 其中整个脑、肌肉组织的阳性斑点较多, 眼组织中也可观察到较少的阳性信号。因此, 本文建立的方法是一种用于检测鲤春病毒在感染宿主中的分布、定位、以及细胞和分子病理的有效方法, 也适用于其他水生动物病毒的检测和诊断。

### 基金项目

国家质检公益项目(201410059)。

### 参考文献 (References)

- [1] 王姝, 徐立蒲, 王静波, 等. 鲤春病毒血症风险分析[J]. 北京农业, 2012(18): 107-110.
- [2] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 鲤春病毒血症[J]. 中国水产, 2010, 2010(9): 63-64.
- [3] 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.
- [4] 路建平, 野村慎太郎, 稻泽壤治, 等. 非放射性杂交技术[M]. 海口: 南海出版公司, 1996: 67 -78.
- [5] 何建国, 周化民, 姚泊, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65-69.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ojfr@hanspub.org](mailto:ojfr@hanspub.org)