

文章编号: 1000-0615(2019)03-0679-09

DOI: 10.11964/jfc.20180511283

牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)间接原位杂交 PCR检测方法的建立与初步应用

李亚楠^{1,2}, 白昌明², 刘金兰¹, 辛鲁生²,
李晨², 刘莉², 黄博闻^{1,2}, 魏智薪², 王崇明^{2*}

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与
食物产出过程功能实验室, 农业部海水养殖病害防治重点实验室,
青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为建立实现牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)在贝类宿主组织中的精确定位方法, 基于原位杂交PCR (ISPCR)技术建立了OsHV-1的间接原位杂交PCR (indirect ISPCR)检测方法, 并利用该方法对OsHV-1在魁蚶主要器官的分布情况进行了检测和分析。首先选择适合原位杂交PCR的引物, 在载玻片上实现对原位固定靶组织内病毒DNA的稳定、特异扩增, 然后与使用相同引物制作的地高辛标记核酸探针进行原位杂交, 最后通过免疫酶标技术显示样本内OsHV-1的组织分布。为了达到最佳检测效果, 对间接ISPCR的扩增循环数以及组织消化的蛋白酶K浓度进行优化。结果显示, 最适PCR扩增循环数为20, 蛋白酶K浓度为20 μg/mL。利用经优化的间接ISPCR检测方法, 对OsHV-1在魁蚶外套膜、鳃、肝胰腺、斧足和闭壳肌5个样本中的组织分布情况和亲嗜性进行检测和分析。病毒阳性信号主要分布于魁蚶外套膜结缔组织中浸润的血细胞和成纤维细胞、肝胰腺和鳃浸润的血细胞、斧足和闭壳肌中坏死肌肉细胞的细胞核中。本研究建立的间接ISPCR检测方法具有灵敏、特异和精确定位的优点, 通过组织切片上显示的病毒核酸阳性信号, 能判别OsHV-1在不同组织部位的分布特点和受感染的细胞类型; 适用于OsHV-1感染的确诊、病毒对不同组织器官的亲嗜性、病毒侵染途径和致病机理等相关研究。

关键词: 魁蚶; 牡蛎疱疹病毒; 间接原位杂交PCR; 检测方法

中图分类号: S 944

文献标志码: A

牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)是首个被发现感染无脊椎动物的疱疹病毒, 隶属于牡蛎疱疹病毒属(*Ostreavirus*), 与鲍疱疹病毒属(*Aurivirus*)共同构成疱疹病毒目(Herpesvirales)下的软体动物疱疹病毒科(Malacoherpesviridae)^[1]。OsHV-1可以感染并导致牡蛎、扇贝、蛤仔和魁蚶等多种双壳贝类的大规模死亡^[2]。首例疱疹样病毒粒子感染贝类的案例报道于1972年, 引起美国马里兰州实验用养殖美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)

的死亡, 该病例未造成大范围传播和贝类养殖产业损失^[3]。1991年, 法国和新西兰贝类育苗场发生疱疹样病毒粒子感染引起的养殖长牡蛎(*C. gigas*)幼虫大规模死亡事件^[4-5]。随后几年里, 疱疹样病毒粒子感染引起的贝类大规模死亡案例在美国、西班牙、意大利、爱尔兰、澳大利亚、中国等16个国家和地区的12种双壳贝类中相继发生, 给贝类养殖业带来巨大经济损失^[6-8]。1997年, 我国首次发生因疱疹样病毒粒子感染引发的贝类大规模死

收稿日期: 2018-05-15 修回日期: 2018-06-04

资助项目: 国家自然科学基金(31502208, 31302233); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

通信作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

亡案例,即我国北方海区养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)在夏季高温季节(养殖区水温 $>23\text{ }^{\circ}\text{C}$)出现大规模死亡,累计死亡率高达90%以上,使我国北方栉孔扇贝养殖业濒临崩溃^[7-8]。宋微波等^[7]根据栉孔扇贝临床症状特点,将该病毒命名为急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV)。对OsHV-1和AVNV全基因组测序和比对结果显示,它们为同一种病毒,且与感染脊椎动物的疱疹病毒亲缘关系较远^[9]。2012年,国际病毒分类委员会在疱疹病毒目下增设了软体动物疱疹病毒科,将感染牡蛎等贝类的疱疹病毒正式命名为牡蛎疱疹病毒^[1]。2012年以来,我国辽宁、山东沿海贝类育苗场和出口加工企业暂养魁蚶成贝出现大规模死亡现象。由于发病魁蚶处在高密度养殖的室内养殖池内,死亡率高达90%以上,给魁蚶增殖放流和出口加工企业造成严重影响^[10]。本实验室从发病魁蚶体内分离出一种疱疹样病毒粒子,通过人工感染实验证实其为引起魁蚶大规模死亡的病原微生物^[11]。基因组测序和比对结果显示,魁蚶感染的疱疹样病毒粒子为OsHV-1的一个新变异株^[12]。

OsHV-1感染的检测主要依赖对其病毒DNA的检测,其中聚合酶链式反应(PCR)^[13]与实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法^[14]以其快速灵敏,特异性强,能够进行大批量应用等优点被广泛采用。本实验室建立的等温扩增检测方法及其检测试剂盒也相当成熟,适用于设备条件较差的基层实验室和贝类生产企业对OsHV-1进行现场检测^[15-17]。然而液相PCR检测需要提取病毒DNA样本为模板,在样品制备过程中会破坏样本的组织结构和细胞结构,导致检测结果中病毒侵染组织部位和细胞类型等重要信息丢失。并且DNA在抽提过程中核酸损失导致病毒含量较低,使得检测时容易造成污染和出现假阳性结果^[18]。OsHV-1原位杂交方法虽然可以保存组织形态,但灵敏度较低^[15]。原位杂交PCR技术是Hasse等^[19]于1990年建立的核酸原位检测方法,即将原位杂交和液相PCR技术相结合,规避了液相PCR检测方法无法定位到具体病变组织结构和原位杂交检测灵敏度较低的缺点。使用该技术可在组织切片或细胞爬片上原位检测出单拷贝数的特定靶DNA或RNA,识别单个细胞表达和携带潜在的特定基因^[20],兼具细胞组织定位和高度敏感的优点^[21-22]。原位杂交PCR技术已被广泛

应用到多种病原微生物的检测过程中^[22-23]。

OsHV-1宿主范围广,目前,仅就OsHV-1在牡蛎和扇贝中的偏好寄生组织部位、细胞类型和病理特征有所了解,对其在蛤仔和蚶类中的寄生偏好缺乏基本认知^[2, 24]。当前,国内外尚缺乏针对OsHV-1的原位杂交PCR检测技术。本研究拟建立一种能检测和精确定位OsHV-1组织感染部位的间接ISPCR检测方法,为OsHV-1侵染途径和致病机理研究提供有效的技术手段。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

样本采集 本研究所使用魁蚶样本来源于2017年9月开展的OsHV-1人工感染魁蚶实验。根据OsHV-1在魁蚶体内增殖和感染动力学模型^[25],选取注射病毒悬液攻毒后48 h的魁蚶样本进行实验,选取注射过滤除菌海水48 h的魁蚶样本作为阴性对照。攻毒组魁蚶采集其外套膜、鳃、胰腺、斧足、闭壳肌组织,切取约 6 mm^3 大小的组织块,使用4%多聚甲醛固定24~48 h后,进行组织脱水、石蜡包埋、制成蜡块、组织切片($5\text{ }\mu\text{m}$),每个部位选连续切片中部分切片进行苏木精—伊红染色法(H.E),其他切片用于间接ISPCR实验。

主要试剂 地高辛标记探针试剂盒、抗地高辛抗体、转移核糖核酸购自罗氏生物科技有限公司;蛋白酶K、多聚甲醛、去离子甲酰胺、 $20\times\text{SSC}$ 缓冲液、 $50\times\text{Denhardt's}$ 、硫酸葡聚糖、Tween-20、封闭剂、碱性磷酸酶显色试剂盒、核固红、苯胺棕、快速硬化封片剂等购自北京索莱宝科技有限公司;KOD-Plus-Neo购自东洋纺(上海)生物科技有限公司。

主要实验仪器 包埋机、切片机与烘片机(Leica);LF-III分子杂交炉(宁波斯芝生物科技股份有限公司);数码显微照相系统(Nikon-400, Nikon);PCR仪(美国应用生物系统公司,ABI);电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-16B型);Fuji Film(LAS 3000)凝胶成像系统;NanoDrop 2000 c微量紫外分光光度计购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 引物合成及探针制备

选取世界动物卫生组织(OIE)水生动物诊断手册中推荐使用的引物^[13]。引物序列:C2/C6(C2:5'-CTCTTTACCATGAAGATACCCACC-3',C6:5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3'),

扩增片段大小约700 bp,由上海桑尼生物科技工程有限公司合成。

探针的制备使用Roche的地高辛标记探针试剂盒,该试剂盒提供的dNTP中5%的dTTP被地高辛标记的dUTP (digoxigenin-11-dUTP)取代,通过C2/C6引物介导的普通PCR扩增过程,被地高辛标记dUTP可以掺入到PCR产物中,从而制备成地高辛标记的DNA探针。制备探针的PCR反应体系:10×PCR Buffer 10 μL、15 mmol/L MgCl₂ 6 μL,10×PCR DIG Labeling Mix 10 μL,C2(0.1~1 μmol/L)4 μL,C6(0.1~1 μmol/L)4 μL,DNA聚合酶1 μL,DNA模板4 μL,去离子水61 μL,总体积100 μL。PCR扩增程序:94 °C 预变性2 min;95 °C变性45 s,55 °C退火45 s,68 °C延伸2 min,30个循环。通过2%琼脂糖凝胶电泳观测条带检测地高辛是否标记成功。

1.3 OsHV-1间接ISPCR方法的建立

制片与消化 载玻片经180 °C烘箱处理去除RNA酶,铺上切取的魁蚶外套膜组织切片后,65 °C烘烤过夜,冷却1 h后-20 °C保存备用。间接ISPCR方法建立时,首先对魁蚶外套膜组织切片进行常规脱蜡水化,二甲苯5 min×3,无水乙醇5 min×2,95%乙醇5 min,85%乙醇5 min,70%乙醇5 min,50%乙醇5 min;PBS缓冲液(pH=7.4)平衡10 min,0.2 mol/L HCl溶液室温处理20 min;蛋白酶K浓度20 μg/mL(浓度优化:10 μg/mL,20 μg/mL,50 μg/mL,100 μg/mL)37 °C消化25 min,PBS缓冲液浸洗10 min,酒精梯度脱水,晾干。

间接原位扩增 将预混好的PCR反应体系50 μL(10×PCR buffer 5 μL,MgCl₂ 4 μL,dNTP 5 μL,DNA聚合酶 1 μL,C2/C6引物各2 μL(0.1~1.0 μmol/L,去离子水31 μL)滴加在魁蚶外套膜组织切片上,盖上盖玻片,指甲油封边。扩增程序:94 °C 预变性2 min;95 °C变性1 min,55 °C退火1 min,68 °C延伸2 min,共20个循环(循环数优化:5、10、15、20、25次)。反应结束后将切片于4%多聚甲醛固定液固定10 min,PBS缓冲液浸洗10 min,梯度酒精脱水,晾干。

预杂交与杂交 切片加入500 μL预杂交液(50%去离子甲酰胺,4×SSC缓冲液,10%硫酸葡聚糖,10×Denhardt's,250 μg/mL转移核糖核酸)42 °C在湿盒内预杂交2 h,吸取预杂交液加入500 μL含有探针的杂交液(探针浓度2.5 ng/μL),

加盖硅化盖玻片,置于原位杂交炉中95 °C,5~6 min将靶DNA与探针变性,然后迅速至于冰上5 min后42 °C湿盒内杂交过夜。

洗涤与抗体孵育 杂交后移去盖玻片,2×SSC缓冲液室温孵育10 min,1×SSC缓冲液37 °C孵育10 min,0.5×SSC缓冲液42 °C孵育10 min,0.1×SSC缓冲液42 °C孵育10 min。马来酸平衡5 min后,使用封闭剂室温下封闭2 h,每片组织切片上滴加500 μL用封闭剂按1:1 000稀释的碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体,4 °C过夜。

显色与复染 含Tween-20的磷酸盐缓冲液充分洗涤,吸取配制好的碱性磷酸酶底物显色剂200 μL滴加在魁蚶外套膜组织切片上,湿盒内室温显色30 min,核固红复染2 min(闭壳肌使用苯胺棕复染2 min),酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光镜下阳性部位呈现蓝紫色或深紫色杂交信号。

1.4 间接ISPCR的特异性检测

以注射过滤除菌海水的健康魁蚶组织石蜡包埋块作为间接ISPCR检测的阴性对照;以OsHV-1阳性的魁蚶石蜡包埋块作为间接ISPCR检测的阳性对照;以人工感染OsHV-1 48 h后魁蚶各组织石蜡包埋块进行杂交时不加探针作为间接ISPCR检测的空白对照。

1.5 间接ISPCR检测魁蚶不同组织

采用经优化的间接ISPCR检测方法分别对魁蚶外套膜、肝胰腺、鳃、斧足和闭壳肌5个样本进行检测,使用碱性磷酸酶显色剂显色,光镜下观察蓝紫色阳性信号在不同组织中的定位,研究OsHV-1对5种不同组织的嗜性。

2 结果

2.1 地高辛标记DNA探针

将人工合成的digoxigenin-11-dUTP寡核苷酸(DIG)在PCR扩增过程中掺入到DNA链中,配制反应体系按照常规PCR进行扩增,DIG掺入成功其分子量将会变大(图1),探针条带比常规PCR目的片段700 bp分子量稍大,即DIG成功掺入到DNA链中,探针制作成功。

2.2 间接ISPCR条件优化

组织切片在PCR仪上扩增时,对扩增循环数进行优化。经多次实验,扩增循环数为20时具有

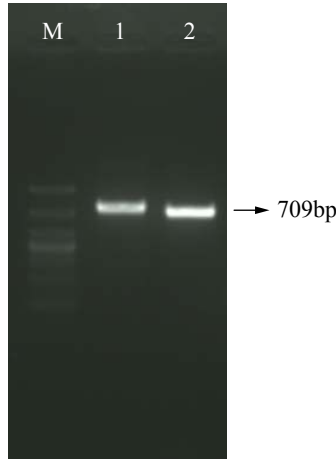


图1 Digoxigenin-11-dUTP标记DNA探针

M. DL1000 Marker; 1.探针; 2.常规PCR扩增目的条带

Fig. 1 DNA probe labeling with digoxigenin-11-dUTP

M. DL1000 Marker; 1. probe; 2. the purpose of bands of ordinary PCR amplification

最佳的间接ISPCR杂交结果，组织中蓝紫色阳性信号清晰可见，无杂信号。当扩增循环数为25时，组织中杂信号较多(图2-a)。当蛋白酶K浓度为20 μg/mL时间接ISPCR检测结果较好，而浓度为10 μg/mL对组织消化不彻底导致检测不出阳性信号(图2-b)，浓度为50 μg/mL时对组织消化过度，大量细胞组织结构破坏(图2-c)。

2.3 间接ISPCR的特异性

空白对照(图3-d, 图4-d, 图5-d, 图6-d和图7-d)、阴性对照(图3-b, 图4-b, 图5-b, 图6-b和图7-b)检测结果均为阴性，无蓝紫色阳性信号，表明建立的间接ISPCR检测方法对OsHV-1具有特异性。

2.4 间接ISPCR检测魁蚶不同组织的初步应用

使用经优化的OsHV-1间接ISPCR检测方法对魁蚶主要组织器官进行检测，探究OsHV-1对不同组织的亲嗜性。结果显示，在魁蚶外套膜、鳃、肝胰腺、闭壳肌和斧足中均出现不同程度的蓝紫色阳性信号，说明这些部位被OsHV-1感染。阳性信号主要出现在结缔组织中。通过与组织切片H.E染色结果比对，发现阳性信号主要出现在血细胞细胞核中。

在肝胰腺中(图3-a, c)，肝胰腺小管周围结缔组织中发现严重的血细胞浸润，阳性信号也主要聚集在这些浸润的血细胞中，细胞外也出现微弱阳性信号，而肝胰腺小管的间质细胞无杂交信号出现。在外套膜中(图4-a, c)，结缔组织中出现中度血细胞浸润，这些血细胞中以及细胞外均观察到OsHV-1阳性信号，但也有部分血细胞呈OsHV-1阴性；在鳃中(图5-a, c)，鳃弓结缔组织以及鳃丝毛细血管腔中出现轻微血细胞浸润，浸润的部分血细胞中发现OsHV-1；在斧足中(图6-a, c)和闭壳肌中(图7-a, c)，未观察到明显血细胞增多和聚集现象，但OsHV-1阳性信号仍然在这些组织中的细胞核中检测到，出现阳性信号的细胞可能为这些组织中正常分布的血细胞和部分肌细胞。

3 讨论

ISPCR具有灵敏度高、特异性好和实现精确组织定位的众多优点，适用于病原感染的确诊，病原对不同组织器官的亲嗜性、侵染途径和致病机理等相关研究；同时适用于动物、植

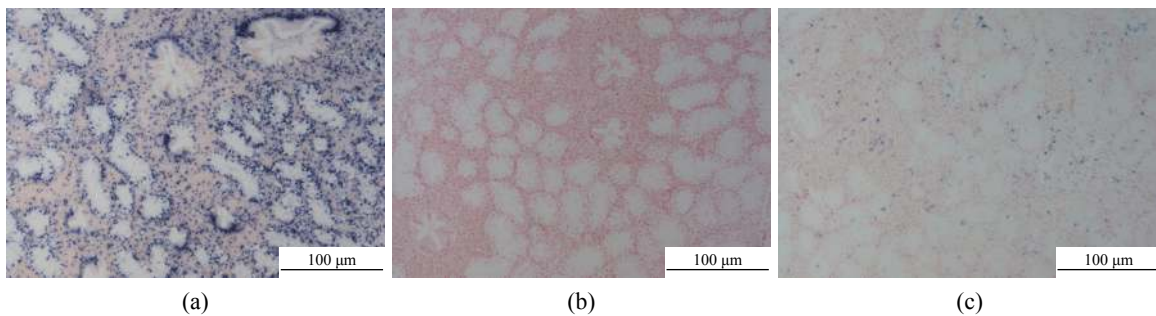


图2 间接ISPCR扩增循环数与蛋白酶K浓度条件优化

a. 原位扩增循环数为25时对肝胰腺的检测; b. 蛋白酶K为10 μg/mL时对肝胰腺的检测; c. 蛋白酶K浓度为50 μg/mL时对肝胰腺的检测

Fig. 2 Optimization of Indirect ISPCR amplification cycles and proteinase K concentration

a. detection of hepatopancreas at in situ amplification cycles of 25; b. detection of hepatopancreas at a proteinase K concentration of 10 μg/mL; c. detection of hepatopancreas at a proteinase K concentration of 50 μg/mL

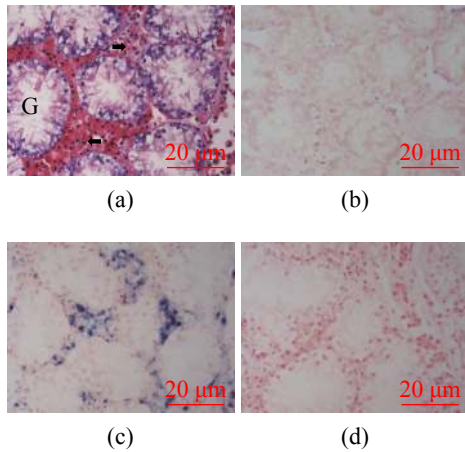


图 3 间接ISPCR对魁蚶肝胰腺中OsHV-1的检测
 (a) H.E, (b)阴性对照, (c)间接ISPCR, (d)空白对照; G. 肝胰腺小管, 黑色箭头指向血细胞浸润处; 下同

Fig. 3 The detected results of *S. broughtonii* hepatopancreas with OsHV-1 by indirect ISPCR

(a) H.E; (b) negative control; (c) indirect ISPCR; (d) blank control; G. collecting tubules, black arrow pointing to haemocyte infiltration; the same below

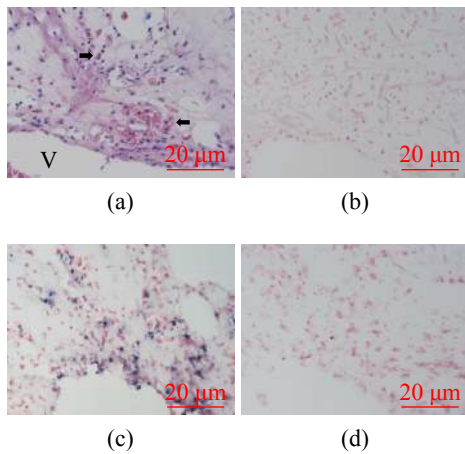


图 4 间接ISPCR对魁蚶外套膜中OsHV-1的检测
 V. 淋巴血管, 黑色箭头指向血细胞浸润处

Fig. 4 The detected results of *S. broughtonii* mantle with OsHV-1 by indirect ISPCR

V. haemolymph vessel, black arrow pointing to haemocyte infiltration

物等内源性基因与外源性基因表达情况的原位检测与分析^[20-21]。Lin等^[23]建立了猪(*Sus scrofa clomesticus*)圆环病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)的间接原位杂交PCR方法, 并利用该方法对PCV2在猪腹股沟淋巴结组织中的分布进行研究。徐宾蕊等^[26]利用间接原位杂交PCR方法从病鸡(*Gallus gallus*)组织石蜡切片中检测出J亚群禽白血病病毒, 是国内首次从分子水平证明蛋鸡受

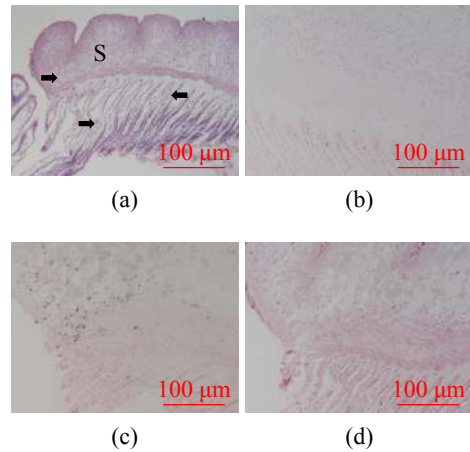


图 5 间接ISPCR对魁蚶鳃中OsHV-1的检测
 S. 鳃弓, 黑色箭头指向血细胞浸润处

Fig. 5 The detected results of *S. broughtonii* gill with OsHV-1 by indirect ISPCR

S. gill arch, black arrow pointing to haemocyte infiltration

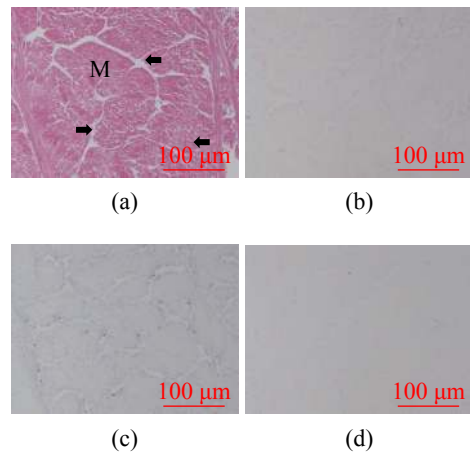


图 6 间接ISPCR对魁蚶斧足中OsHV-1的检测
 M. 肌肉, 黑色箭头指向肌细胞处

Fig. 6 The detected results of *S. broughtonii* foot with OsHV-1 by indirect ISPCR

M. muscle, black arrow pointing to muscle cells

到禽白血病病毒J亚群白血病感染。Maria等^[27]通过原位PCR检测出番茄(*Lycopersicon esculentum*)黄萎病毒主要侵染植物的叶片以及植物茎花等组织。目前, 尚未有报道将ISPCR方法应用于贝类病原检测和致病机理的研究当中。

OsHV-1是首个被发现感染无脊椎动物的疱疹病毒。与脊椎动物疱疹病毒相比, OsHV-1的一个显著特点即缺乏宿主专一性, 其宿主跨越牡蛎、扇贝、蛤仔和蚶类等多个分类单元^[24]。研究表明, OsHV-1感染可以引起长牡蛎外套膜、

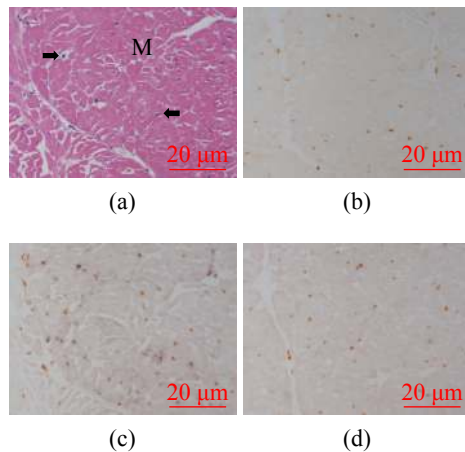


图7 间接ISPCR对魁蚶闭壳肌中OsHV-1的检测

Fig. 7 The detected results of *S. broughtonii* adductor muscle with OsHV-1 by Indirect ISPCR

口唇和肝胰腺等主要器官的结缔组织出现大量血细胞渗出、组织坏死，肝胰腺小管腔体中也能见到浸润的血细胞。浸润的血细胞和组织中的成纤维细胞出现核肿大、染色质边集或核浓缩等病理变化。外套膜上皮组织的成纤维细胞、间质细胞也偶见类似病理变化^[28-29]。但疱疹病毒感染伴有的核内嗜酸性包涵体只在OsHV-1感染的个别案例中被发现^[30]。

本研究建立了OsHV-1的间接ISPCR检测方法，利用该检测技术成功在魁蚶5种组织器官中检测出OsHV-1阳性信号。实验中，蛋白酶K的消化程度是间接ISPCR成功与否的关键步骤，其作用浓度、处理时间、处理温度对杂交结果的准确性具有直接影响^[29]。处理过度可造成细胞形态损坏，阳性信号难以辨认；处理不足则造成引物与探针无法穿透膜蛋白，阻碍引物对目的片段的扩增^[30]。因此，本实验对蛋白酶K浓度进行优化，当组织切片为5 μm时，蛋白酶K的浓度为20 μg/mL，37 °C作用20 min实验结果最佳。间接ISPCR的扩增循环数是影响最终检测结果的另一个重要因素，循环次数较少时，病毒DNA序列未被充分扩增，拷贝数较少，可能导致杂交时检测到的阳性信号偏弱；若循环数过多，可能导致破碎细胞中被扩增的病毒DNA外溢到其他细胞结构中，产生过多的杂信号，而且PCR扩增循环中的反复升降温会对细胞有一定的破坏。本实验中20个循环时结果最佳。

利用经优化的OsHV-1间接ISPCR方法，对OsHV-1感染的魁蚶不同组织器官中OsHV-1分布

特点，感染的细胞类型进行了检测和分析；同时对相同部位的组织切片进行H.E染色了解其病变情况。不同程度的血细胞浸润现象分别在魁蚶的肝胰腺、外套膜和鳃中观察到，而闭壳肌和斧足中未检测到明显的血细胞浸润现象。与OsHV-1感染的牡蛎外套膜和鳃组织相比，血细胞浸润数量相对较少，而病变比较严重的魁蚶肝胰腺血细胞浸润最为严重。实验中所检测5种组织中，均有不同程度的OsHV-1阳性信号出现，其中肝胰腺，外套膜和鳃的阳性信号最明显，这一分布规律也与观察到的这些组织发生病理变化程度强弱相吻合。阳性信号主要出现在血细胞中，偶尔在肌细胞和成纤维细胞中也观察到OsHV-1阳性信号，这一结果与OsHV-1感染长牡蛎和扇贝的研究结果一致^[29-31]。以上研究表明，OsHV-1主要感染贝类的血细胞，血细胞外组织间隙中同样能观察到OsHV-1阳性信号，且血细胞浸润越严重的区域，细胞间隙OsHV-1阳性信号越明显；根据这一结果，推测魁蚶血细胞为OsHV-1复制主要场所，随着病毒在细胞中的不断复制和增殖，细胞坏死、破碎，病毒粒子扩散到组织中，进一步感染新的细胞。OsHV-1对魁蚶血细胞的强亲嗜性，有助于该病毒随魁蚶血淋巴系统快速扩散到魁蚶各组织器官、感染细胞和组织器官病变，进而加速牡蛎疱疹病毒病的进程。这一结果与魁蚶牡蛎疱疹病毒病表现为急性病的临床表现相吻合^[10]。

综上所述，本实验建立的OsHV-1间接ISPCR检测方法具有的高敏感性、高特异性，综合了PCR和原位杂交的优点，可在魁蚶组织中精确定位OsHV-1靶核酸，能与正常细胞、病变细胞、早期感染和潜在的有活性的病毒的复制从各方面做直观分析。但是，间接ISPCR检测法依赖于组织固定、切片、杂交和显微镜观察等流程和主观判断，实验操作相对繁琐，不易实现检测标准化。因此，本方法不适用于大规模流行病学调查，比较适用于OsHV-1感染的确诊，以及病毒对不同组织器官的亲嗜性。

参考文献：

- [1] King A M Q, Adams M J, Carstens E B, *et al.* Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses[C]// Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press,

- 2012.
- [2] Mandas D, Salati F. Ostreid herpesvirus: a pathogen of oysters[J]. *Virology: Research & Reviews*, 2017, 1(2): 1-5.
- [3] Farley C A, Banfield W G, Kasnic G Jr, *et al.* Oyster herpes-type virus[J]. *Science*, 1972, 178(4062): 759-760.
- [4] Hine P, Wesney B, Hay B. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea-gigas*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, 12(2): 135-142.
- [5] Nicolas J, Comps M, Cochenne N. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1992, 12(1): 11-13.
- [6] Whittington R, Hick P, Evans O, *et al.* Pacific oyster mortality syndrome: a marine herpesvirus active in Australia[J]. *Microbiology Australia*, 2016, 37(3): 126-128.
- [7] 宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡病的病原研究新进展[J]. *海洋科学*, 2001, 25(12): 23-26.
Song W B, Wang C M, Wang X H, *et al.* New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*[J]. *Marine Science*, 2001, 25(12): 23-26(in Chinese).
- [8] 王崇明, 王秀华, 宋晓玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. *水产学报*, 2002, 26(2): 180-184.
Wang C M, Wang X H, Song X L, *et al.* Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 180-184(in Chinese).
- [9] Ren W C, Chen H X, Renault T, *et al.* Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 110.
- [10] Bai C, Gao W, Wang C, *et al.* Identification and characterization of ostreid herpesvirus 1 associated with massive mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks in China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 118(1): 65-75.
- [11] Bai C M, Wang Q C, Morga B, *et al.* Experimental infection of adult *Scapharca broughtonii* with Ostreid herpesvirus SB strain[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 143: 79-82.
- [12] Xia J Y, Bai C M, Wang C M, *et al.* Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 110.
- [13] Renault T, Arzul I. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(3): 161-167.
- [14] Martenot C, Oden E, Travaillé E, *et al.* Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1-2): 86-89.
- [15] Lipart C, Renault T. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes[J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 101(1-2): 1-10.
- [16] Segarra A, Baillon L, Faury N, *et al.* Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 59-65.
- [17] Ren W C, Renault T, Cai Y Y, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 DNA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1-2): 30-36.
- [18] O'Leary J J, Chetty R, Graham A K, *et al.* *In situ* PCR: pathologist's dream or nightmare?[J]. *The Journal of Pathology*, 1996, 178(1): 11-20.
- [19] Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells[J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1990, 87(13): 4971-4975.
- [20] Bagasra O, Seshamma T, Pomerantz R J. Polymerase chain reaction in situ: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 158(1): 131-145.
- [21] Bagasra O. Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 2782-2795.
- [22] Muro-Cacho C A. *In situ* PCR. Overview of procedures and applications[J]. *Frontiers in Bioscience*, 1997, 2(3): c15-c29.
- [23] Lin C M, Jeng C R, Hsiao S H, *et al.* Development and evaluation of an indirect *in situ* polymerase chain reaction for the detection of porcine circovirus type 2 in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

- specimens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 138(3-4): 225-234.
- [24] Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 2-10.
- [25] 汪清晨, 白昌明, 张天文, 等. 牡蛎疱疹病毒对魁蚶的致病性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 468-474.
Wang Q C, Bai C M, Zhang T W, *et al.* Pathogenicity of ostreid herpesvirus-1 to *Scapharca broughtonii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 468-474(in Chinese).
- [26] 徐镔蕊, 乔素兰, 董卫星, 等. 原位PCR和原位杂交检测蛋鸡J亚群禽白血病病毒[J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 584-587.
Xu B R, Qiao S L, Dong W X, *et al.* Detection of Avian leukosis virus subgroup J in egg-type chickens using in situ PCR and in situ hybridization[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 584-587(in Chinese).
- [27] Rojas M R, Jiang H, Salati R, *et al.* Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus[J]. *Virology*, 2001, 291(1): 110-125.
- [28] Renault T, Cochenne N, Le Deuff R M, *et al.* Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat[J]. *Bulletin of the European Association of Fish pathologists*, 1994, 14(2): 64-66.
- [29] Arzul I, Nicolas J L, Davison A J, *et al.* French scallops: a new host for Ostreid herpesvirus-1[J]. *Virology*, 2001, 290(2): 342-349.
- [30] da Silva P M, Renault T, Fuentes J, *et al.* Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 78(3): 181-188.
- [31] Renault T, Le Deuff R M, Chollet B, *et al.* Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(3): 173-183.

Establishment and application of indirect *in situ* polymerase chain reaction for detection of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1)

LI Yanan^{1,2}, BAI Changming², LIU Jinlan¹, XIN Lusheng²,
LI Chen², LIU Li², HUANG Bowen^{1,2}, WEI Zhixin², WANG Chongming^{2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fishery,
Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China;

2. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: To detect the localization of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in tissues of shellfish host, a sensitive method was first established based on indirect *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) technology. Then the method was employed to investigate OsHV-1 distribution pattern in different types of organs of *Scapharca broughtonii*. To establish the detection method, suitable PCR primers and amplification cycles for indirect ISPCR were selected, which could generate stable and specific amplification of viral DNA in fixed tissues on sections. The concentrations of proteinase K for digesting different types of tissues were also optimized. Finally, *in situ* hybridization was conducted with digoxigenin-labeled nucleic acid probes prepared using the same primers, and the distribution of OsHV-1 in the sample tissues was shown by immunoenzyme labeling technology. The results showed the optimum number of amplification cycles was 20, and the optimum concentration of proteinase K was 20 µg/mL. We used the optimized indirect ISPCR method to detect and analyze the distribution pattern of OsHV-1 in five different tissues of ark shells (mantle, gill, hepatopancreas, foot and adductor muscle). The results showed that the virus positive signals were mainly distributed in infiltrated hemocytes and fibroblasts in connective tissues of the mantle, infiltrated hemocytes in hepatopancreas and gills, necrotic muscle cells in foot and adductor muscle. These results showed that the established indirect ISPCR method for detecting OsHV-1 had the advantages of high sensitivity and specificity in fixing the viral position. The method could be used for studying the distribution of OsHV-1 in different tissues and targeted cell types by investigating positive signals of viral nuclear acid in tissue sections. The method could be used for confirmatory diagnosis of OsHV-1 infection, the tissue tropism, invasion routes and pathogenic mechanism of OsHV-1.

Key words: *Scapharca broughtonii*; Ostreid herpesvirus-1; indirect ISPCR; detection method

Corresponding author: WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-48); National Natural Science Foundation of China (31502208, 31302233)