

免疫组化法检测美国青蛙组织中的蛙虹彩病毒

谢 简¹, 李正秋², 张奇亚², 李文鑫¹

(1. 武汉大学生命科学院, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 分不同时间, 收集经人工感染了蛙病毒的样蛙, 取其心、肺、肾、肠、脾、肝六种组织, 并通过免疫组化方法进行检测。结果分别在感染了病毒 3d、9d、11d 后的幼蛙这六种组织中, 由表及里观察到了深色的阳性信号, 从而测定了病毒在入侵组织中的存在部位。其中, 肺和肠组织中阳性信号最强, 呈灶性分布, 其余四种组织中的阳性信号则呈散在分布。在未注射病毒的幼蛙阴性对照组六种组织中没有检测到阳性信号。

关键词: 免疫组化法; 检测; 蛙虹彩病毒

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2002)05-0438-06

近年来虹彩病毒所引起的疾病在鱼、蛙中多次爆发, 给水产业带来了严重的经济损失。张奇亚等^[1-2]先后从患病的美国青蛙(*Rana grylio* Stejneger, 又称沼泽绿牛蛙)中发现和分离到 3 株蛙虹彩病毒(*Rana grylio* virus, RGV), 分别称为 RGV9506, RGV9807 和 RGV9808, 并对它们的组织病理、细胞病理、体外扩增、病毒与宿主细胞间的相互作用等进行了观察和研究。由于病毒寄生在宿主细胞内, 因此至今尚无有效的治疗方法。现在对其防控主要通过电镜观察、PCR、组织病理观察等检测方法。这些检测方法虽各具优势, 却也都有一定的局限性。

免疫组化法(又称免疫组织化学方法)因其操作简便、实用, 已用于鱼、虾病毒的检测与病理学研究^[3-5], 但尚未见用于两栖类动物病毒检测的报道。该方法是利用抗原抗体的特异性反应检出病毒; 它可保持待检标本的组织或细胞形态不被破坏, 特别适用于检测组织内的病毒和确定其存在位置。作者探讨和建立了蛙虹彩病毒在宿主组织中分布的免疫组化检测方法, 并将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料 由中国科学院水生生物研究所关桥实验场提供健康美国青蛙的幼蛙, 体重约 15—25g。驯养于 1m³ 的水体中, 备用。所用的蛙虹彩病毒毒株为 RGV9506。兔抗 RGV9506 由本实验室制备, 保存于 -20℃ 备用。辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 购自华美生物工程公司。

收稿日期: 2001-01-11; 修订日期: 2001-06-24

基金项目: 中国科学院生命科学与生物技术特别支持基金资助(STZ0013); 淡水生态和生物技术国家重点实验室基金资助(2001FB08); 中国科学院创新项目(KSCXZ-SW-302)资助

作者简介: 谢简(1976年—), 男; 武汉大学在读 98 级硕士研究生; 主要从事病毒学研究

通讯作者: 张奇亚

1.2 病毒液的制备 病毒粗提液和经细胞培养扩增病毒液的制备见文献^[6]。病毒的 TCID₅₀约为 10^5 。

1.3 人工感染 将40只健康幼蛙随机分为5组,每组8只。将磷酸缓冲液(对照组)或病毒液(实验组)通过腹腔,以1mL/只蛙的剂量(特别注明的除外)注射到蛙体内,注射后将1个对照组和2个实验组(病毒注射剂量不同,其中1个组注射0.5mL/只蛙,另1个组注射1mL/只蛙)分别置于 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 水箱内养殖,而另外2个组分别置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水箱中养殖。注射后每天观察记录发病及死亡情况,收集样品。

1.4 兔抗 RGV IgG 纯化 取250 μL 抗血清,用等量预冷的 PBS(pH7.4, 0.01mol/L)稀释,加入2倍体积饱和硫酸铵溶液(500mL双蒸水加热至 $70-80^\circ\text{C}$,加入400g硫酸铵,充分溶解后冷却、静置), 4°C 静置30min, 10 000r/min离心10min,弃上清,取沉淀。再用250 μL PBS悬浮,添加125 μL 饱和硫酸铵溶液,重复提取3次,沉淀用250 μL PBS悬浮。最后用 PBS在 4°C 透析2—3d, -20°C 保存备用。

1.5 制片及免疫组织化学检测 分别对3个实验组进行抽样检测:在实验组1中,选感染9d时出现病症的幼蛙,其脚趾部充血,游动缓慢;实验组2中的蛙,感染11d后发现其严重变形,腿部严重充血、溃烂,腹部有大量的出血点,不能游动,濒死;拿实验组3的蛙感染3d后发现其腿部红肿,腹部出现出血点,分别取之解剖,取心、肺、肾、肠、脾、肝6种组织,切成米粒样大小,低温酒精固定16h,包埋,切片厚度4 μm ,免疫组化检测。

载有样品的玻片先经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,用 PBS 洗涤20min。然后将玻片放于湿盒中, 37°C 在含0.3%过氧化氢的 PBS 中温育60min,以除去内源性酶, PBS 洗涤3次(5min/次)。在每片玻片上加入稀释的兔抗 RGV,置于湿盒内,盖上湿盒, 37°C 孵育60min,以 PBS 洗涤3次(5min/次)。随后加入稀释的辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG,湿盒内 37°C 孵育60min,以 PBS 洗涤3次(5min/次)。滴加二氨基联苯二胺(DAB-H₂O₂)底物溶液(染色前加30% H₂O₂,使 H₂O₂的最终浓度为0.03%),室温避光孵育20—40min,光镜观察。当样品的某些部位存在 RGV 时,兔抗 RGV 就会与之结合,随后兔抗 RGV 又会与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 结合,所以原有 RGV 的部位就会存在辣根过氧化物酶,当采用一种能产色的氢供体化合物氨基联苯二胺作为辣根过氧化物酶的底物时,在辣根过氧化物酶的作用下氧化脱氢从而在阳性反应部位生成一种不溶于水的深(棕红)色物质。对观察结果进行显微照相。

另外,同时设置两种阴性对照: A: 将对照组中的蛙分别按照以上三种方法固定、包埋、切片,然后进行免疫组化检测。 B: 以 PBS 替代兔抗 RGV 对实验组中的组织切片进行免疫组化检测。

2 结果

2.1 幼蛙感染后的发病情况

实验组1、2、3三组幼蛙在注射病毒后开始出现病症的时间分别为9d、7d、3d;幼蛙开始死亡的时间分别为11d、11d、3d;注射两周后三个实验组的累积死亡蛙数分别为3只、4只、8只;三个实验组最后的总死亡蛙数分别为6只、6只、8只,致死率分别达到75%、75%、100%。其中实验组1和实验组2由于在实验后期控温不准,水温偏低,导致死亡率

下降(表 1)。而两个对照组在实验期间均未观察到发病和死亡的情况。

表 1 幼蛙感染后发病和死亡的结果

Tab.1 The data about diseased and dead juvenile frogs by artificial infection of RGV9506

处理 Treatment	组 1: 病毒液(0. 5mL/ 只) Group 1: Virus(0. 5mL/ frog)	组 2 病毒液(1mL/ 只) Group2: Virus(1mL/ frog)	组 3: 病毒液(1mL/ 只) Group3: Virus(1mL/ frog)
实验蛙只数 No. of frogs	8	8	8
水温(℃) Temperature	21±1	21±1	28±1
开始出现病症时间(d) Time of symptom appearance after injection	9	7	3
开始死亡时间(d) Time of death appearance after injection	11	11	3
注射 2 周后累积死亡蛙只数 No. of death after 2 weeks	3	4	8
注射 4 周后总死亡蛙只数 Total No. of death after 4 weeks	6	6	8
致死率(%) Mortality	75	75	100

感染的幼蛙在发病前,主要表现为精神不振,食欲减退。发病初期,蛙逐渐失去重心,身体开始发生变形,腿部出现紫红色的斑点,随后腿部出血并肿胀,腹部皮肤出现出血点。病重的蛙体非常消瘦,解剖后观察到有的肝或胆肿大,在其他组织表面也可观察到出血点,肠中空、无食物。

2.2 免疫组织化学检测

肝 在三组幼蛙的肝组织切片中均检测到了深色的阳性信号颗粒,其中组 1 和组 3 幼蛙的切片中阳性信号颗粒较少,且主要位于组织外周。组 2 幼蛙的切片中阳性信号颗粒增多,在位于肝小叶间的结缔组织和肝索区、肝血窦区等呈散在分布,但在中央静脉区周围未见阳性信号(图版 I : 1)。

脾 组 1 幼蛙和组 3 幼蛙的阳性信号颗粒主要出现在脾组织的被膜区。而组 2 幼蛙在脾实质区也开始观察到病毒与抗体反应后出现的阳性结果,阳性信号颗粒主要出现在白髓区,在红髓区中则较少见(图版 I : 2)。

肠 在三组幼蛙的肠黏膜层和黏膜下层内均可以检测到阳性信号。其中组 1 和组 3 幼蛙的肠粘膜层内阳性信号颗粒较少。而在组 2 幼蛙的肠切片中阳性信号非常强烈,遍布整个肠粘膜层和粘膜下层(图版 I : 3)。

肾 组 1 幼蛙的肾组织切片中仅在少量位置检测到阳性信号颗粒, 且集中在肾被膜区。而在其余两只幼蛙中, 阳性信号反应较强烈, 但阳性信号颗粒也主要出现在被膜区, 在皮质区内仅有少量阳性信号颗粒(图版 I : 4)。

肺 组 1 幼蛙和组 3 幼蛙主要在肺组织的粘膜上皮层和间质区内检测到阳性信号。而组 2 幼蛙在组织的实质区也普遍检测到了阳性信号(图版 I : 5)。但三组幼蛙肺组织中的病毒抗原均呈局灶性分布。

心 三组幼蛙的阳性信号均主要出现在外膜区, 心肌层内几乎未见阳性信号颗粒(图版 I : 6)。

阴性对照结果: 在两种阴性对照实验中均未检测到阳性信号。

3 讨论

目前对水生动物病毒的检测主要是通过电镜、组织染色、PCR、临床症状诊断等技术进行, 但当这些技术分别使用时, 却各有其局限性。通过电镜观察, 可了解病毒感染、复制的超微结构及与宿主细胞间相互作用超微形态变化等信息, 但其费用高, 耗时长并需要具备特殊的实验器材且其视野较窄, 这都限制了它的应用。组织病理观察则不太适用于早期检测, 通常在病毒严重感染机体全身, 产生明显的、不可逆转的组织病变时, 方可得到确证, 而在本研究中, 采用免疫组化方法对存在于组织外周被膜区的病毒感染也能检测到, 说明免疫组化方法比组织病理观察能更早地确证病毒感染。而 PCR 技术需要特殊器材和训练有素的专业人员, 且对小量群体使用显得不够经济。与此同时, 免疫组织化学方法已在人类或农业的病毒性疾病诊断中得到了广泛的应用^[7]。除了它的灵敏性和准确性之外, 其费用低, 操作相对简单, 且能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究, 而不受同一组织中其它成分的影响, 可完整地保持组织的形态, 所以它不但可以成为一般实验室的病毒检测实用技术, 而且能检测到动物体内的受侵害程度以及病毒侵染的靶目标, 进而可以用于研究病毒入侵宿主的途径以及疾病的发展过程。本研究结果显示, 在感染组幼蛙的六种组织中均成功地检测到了病毒, 而在对照组幼蛙的组织切片中没有阳性信号, 这说明所建立的免疫组织化学方法用于检测蛙虹彩病毒在感染宿主中的检测与定位是成功的。

实验结果表明, 肠和肺的阳性反应最强, 阳性信号呈灶性分布。所以推测 RGV 可能具传染性, 当同一水体中的蛙被病毒所感染后, 它们之间又互相传染, 所以其消化系统和呼吸系统受到多重感染, 引起病灶增多, 这说明病毒在同一水体的蛙群中可迅速水平扩散, 导致病毒病的流行和爆发。蛙肺是一对中空、壁薄, 富有弹性的囊状构造。囊腔中有许多网状隔膜, 将内腔隔为若干小室, 称为肺泡, 以此而增加了肺囊与空气的接触面积。而它的这些结构特点也造成其不但易于接触病毒, 且易于被病毒所吸附, 成为传染性病毒病首先侵入的靶器官。肺泡壁上密布的微血管, 又使得病毒可迅速经血液循环系统侵入其他组织和器官。而肠作为消化器官, 首先由肠壁吸收食物经化学变化分解成的简单物质, 随后这些物质通过肠上皮细胞而进入附近的血液或淋巴后经循环系统运送到各处细胞或组织。所以经口腔进入体内的病毒不但会大量积聚于肠腔内, 而且之后复制扩增的病毒易于通过循环系统扩散到其他组织, 造成所有组织发生严重病变, 引起宿主快速死亡。

从组 2 幼蛙的检测结果显示, 与肠和肺组织相比较, 肝和脾组织的阳性反应虽不甚

强,但却较深入组织内部,不但在组织的外周与被膜层存在阳性信号颗粒,在组织的内部实质层中也能检测到阳性信号,所以可能是 RGV 感染的主要靶器官。肝细胞能吸收有毒物质,经分解或与其他物质相结合,变成无毒物质起着解毒作用,肝血窦中的枯否氏细胞也有着吞噬防御作用。所以当肝组织内部受损时,必然使得机体的保护防御功能削弱,从而有利于病毒的侵染。而脾脏是身体最大的免疫器官,也是机体最活跃的免疫器官,同时它是机体的造血器官,也是对血源性抗原产生应答的主要场所。所以当其受到病毒侵染时,必然使得体内的免疫系统产生功能性障碍,给病毒在蛙体内增殖有了可乘之机^[8-9],同时病毒可借血液循环感染机体全身组织,也使得机体的免疫力进一步下降,当病毒在同一水体中传播时,机体易受重复感染,从而使得病蛙快速死亡,也导致病毒病的流行与爆发。

以上的结果说明免疫组织化学方法得出的结论与组织病理学观测得出的结论相符^[6],但却比之更为敏感及适于病毒的早期检测,不失为一种快速有效的蛙虹彩病毒检测技术,且本研究也是首次应用免疫组织化学方法对宿主体内的蛙虹彩病毒进行分布和定位研究。

参考文献:

- [1] 张奇亚,李正秋,江育林,等.沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J].水生生物学报,1996,20(4): 390—392
- [2] Zhang Qi-Ya, Li Zheng-Qiu, Gui Jiar-Fang. Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line[J]. *Aquaculture*, 1999, 175: 185—197
- [3] Sano N, Sano M, Sano T, et al. Herpesvirus cyprini: detection of the viral genome by in situ hybridization[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1992, 15: 153—162
- [4] Sithigomgul P, Chauchuwong P, Sithigorngul W, et al. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*[J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2000, 42: 27—34
- [5] Villoing S, Castic J, Jeffroy J, et al. An RT-PCR-based method for the diagnosis of the sleeping disease virus in experimentally and naturally infected salmonids[J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2000, 40: 19—27
- [6] 张奇亚. 特种水产动物病毒病的研究[D]. 中国科学院理学博士学位论文, 1997, 51—75
- [7] 江庆萍, 周慕林, 林汉良, 等. T 细胞性淋巴瘤组织 CD56 的检测与 EB 病毒的关系[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(4): 262—264
- [8] 张奇亚, 李正秋. 中华鳖病毒病的组织病理研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4): 375—379
- [9] 张奇亚, 李正秋. 鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析[J]. 水生生物学报, 1999, 23(2): 151—154

DETECTION OF *RANA GRYLIO* VIRUS (RGV) IN HOST FROG TISSUES BY USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY ASSAY

XIE Jian¹, LI Zheng-qiu², ZHANG Qi-ya² and LI Wen-xin¹

(1. School of life sciences, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072)

Abstract: Immunohistochemistry assay has been used for detecting RGV in heart, lung, kidney, intestine, spleen, liver from the artificially infected juvenile frogs. The results showed RGV was detected

in these tissues of juvenile frogs at 3d, 9d, 11d after infection. No positive signs were observed in these tissues from negative control. Strong positive signs were detected in lung and intestine tissue specimens, distributing in local. However the positive signs distributed diffusely in the other four tissues.

Key words: Immunohistochemistry assay; Detection; *Rana grylio* virus

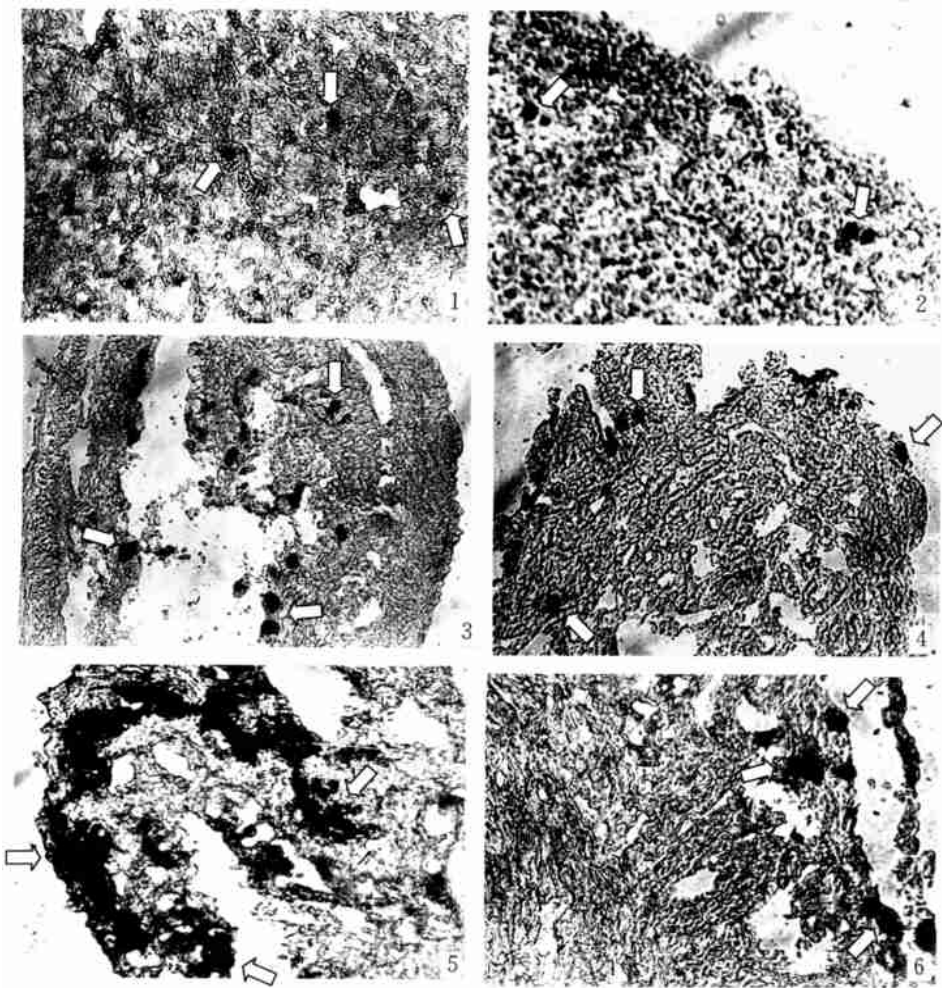


图 版 I

1. RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的肝组织中, $\times 200$; 2 RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的脾组织中, $\times 400$; 3 RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的肠组织中, $\times 200$; 4. RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的肾组织中, $\times 200$; 5. RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的肺组织中, $\times 400$; 6. RGV(箭头) 定位于组 2 幼蛙的心组织中, $\times 400$
1. The position of RGV(arrow) in liver of juvenile frog in group 2, $\times 200$; 2. The position of RGV(arrow) in spleen of juvenile frog in group 2, $\times 400$; 3 The position of RGV(arrow) in intestine of juvenile frog in group 2, $\times 200$; 4 The position of RGV(arrow) in kidney of juvenile frog in group 2, $\times 200$; 5. The position of RGV(arrow) in lung of juvenile frog in group 2, $\times 400$; 6. The position of RGV(arrow) in heart of juvenile frog in group 2, $\times 400$