

斑节对虾(*Penaeus monodon*) 卵巢组织石蜡切片自发荧光的研究

郭松^{1,2}, 赵超^{1,3}, 傅明骏^{1,3}, 江世贵^{1,3}, 杨其彬^{1,3}, 邱丽华^{1,3*} (1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300)

摘要 [目的] 利用卵巢组织石蜡切片自发荧光观察斑节对虾卵母细胞发育。[方法] 研究采用普通石蜡切片技术获得斑节对虾发育各期卵巢组织切片, 采用苏木青/伊红染色后利用 3 种自发荧光对卵巢组织切片进行观察, 探讨绿色自发荧光下观察卵母细胞不同发育阶段需要的最适曝光时间。[结果] 卵巢组织切片直接自发荧光观察卵母细胞的发育较 HE 染色后观察更为方便、有效, 且切片可以继续用于后续试验。3 种自发荧光中, 绿色自发荧光的观察效果最好。[结论] 该研究可为快速观察斑节对虾卵母细胞发育和高效利用试验材料提供了新思路和新方法。

关键词 斑节对虾; 卵母细胞发育; 组织切片; 自发荧光

中图分类号 S945.4⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-136-06

Study on the Auto-fluorescence of Paraffin Section of *Penaeus monodon*

GUO Song^{1,2}, ZHAO Chao^{1,3}, FU Ming-jun^{1,3}, QIU Li-hua^{1,3*} et al (1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510300; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou, Guangdong 510300)

Abstract [Objective] The ovarian development of *Penaeus monodon* was observed by using auto-fluorescence of oocyte paraffin section. [Method] The paraffin section of ovary in *P. monodon* indifferent development stages by using common paraffin section technology. The ovary sections were observed by using three kinds of auto-fluorescences after hematoxylin and eosin dyeing. The optimum exposure time for different development stages of oocytes under green auto-fluorescence was discussed. [Result] It was more convenient and effective to observe the development of oocyte by using auto-fluorescence of ovary sections than that by HE dyeing. And the sections could be used in further experiments. Among three kinds of auto-fluorescence, the observation effects by using green auto-fluorescence was the best. [Conclusion] The research could provide new thought and method for the rapidly observing the development of *P. monodon* oocytes and effectively utilizing the test materials.

Key words *Penaeus monodon*; Oocyte development; Tissue sections; Auto-fluorescence

斑节对虾(*Penaeus monodon*)作为世界三大对虾养殖品种之一^[1-3],在国内外都有着大量研究报道。斑节对虾的全人工繁育技术已经成功,但斑节对虾卵巢发育的分子机理仍然不十分清楚。近年来,已有多个斑节对虾卵巢发育相关的基因被研究^[4-7],组织切片观察是目前常用的鉴定卵母细胞发育的方法,以卵巢组织切片为基础的免疫组化、原位杂交等技术广泛应用于在研究卵巢发育相关因子在卵母细胞中的定位等研究中。目前采用的苏木青/伊红染色后观察操作繁琐且不利于切片的再利用,因此能够通过染色直接通过切片鉴定卵巢组织切片卵母细胞的发育成为十分实用的方法。笔者首次在斑节对虾中报道卵巢组织切片自发光及其应用,采用普通石蜡切片技术获得斑节对虾卵巢发育各期卵巢组织切片,采用 HE 染色和卵巢组织切片自发荧光对切片进行了观察,并比较了各自的优缺点;利用 3 种荧光对观察卵巢组织切片,比较 3 种荧光的观察效果,并对绿色自发荧光最适曝光时间进行了探究。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 斑节对虾来源于海南省三亚市野生捕捞,

体重 80~200 g,水温(25±1)℃、盐度为 30‰的循环水池中暂养 7 d。取发育至各期的卵巢中叶部分用 Bouin 氏液固定。

1.2 试验方法

1.2.1 组织切片 用 Bouin 氏液固定样品 24 h 以上,流水浸泡 2 h 去除固定液,参照用 Bell 方法^[8]进行染色、切片和组织学观察。脱水使用 Leica4-2429 自动脱水机完成,Leica-EG1160 组织包埋机进行石蜡包埋,Leica 转轮式切片机切片,切片厚度设定为 4 μm,使用 Leica-AUTO-STAINER·XL 染色机进行常规 HE 染色。

1.2.2 显微镜观察 HE 染色切片在 ZEISS 光学显微镜下观察并于适当倍数下拍照。未经任何处理的石蜡切片在 AMG EVOS fi (LIFE, USA) 荧光显微镜下观察并于适当倍数下拍照。3 种荧光均是在 60% 光强、曝光 250 ms 下拍照;绿色自发荧光在不同曝光时间下观察卵母细胞发育不同状态,采用的是 100% 光强比较不同曝光时间下的拍照效果;荧光照片采用 60% 光强,曝光 250 ms。

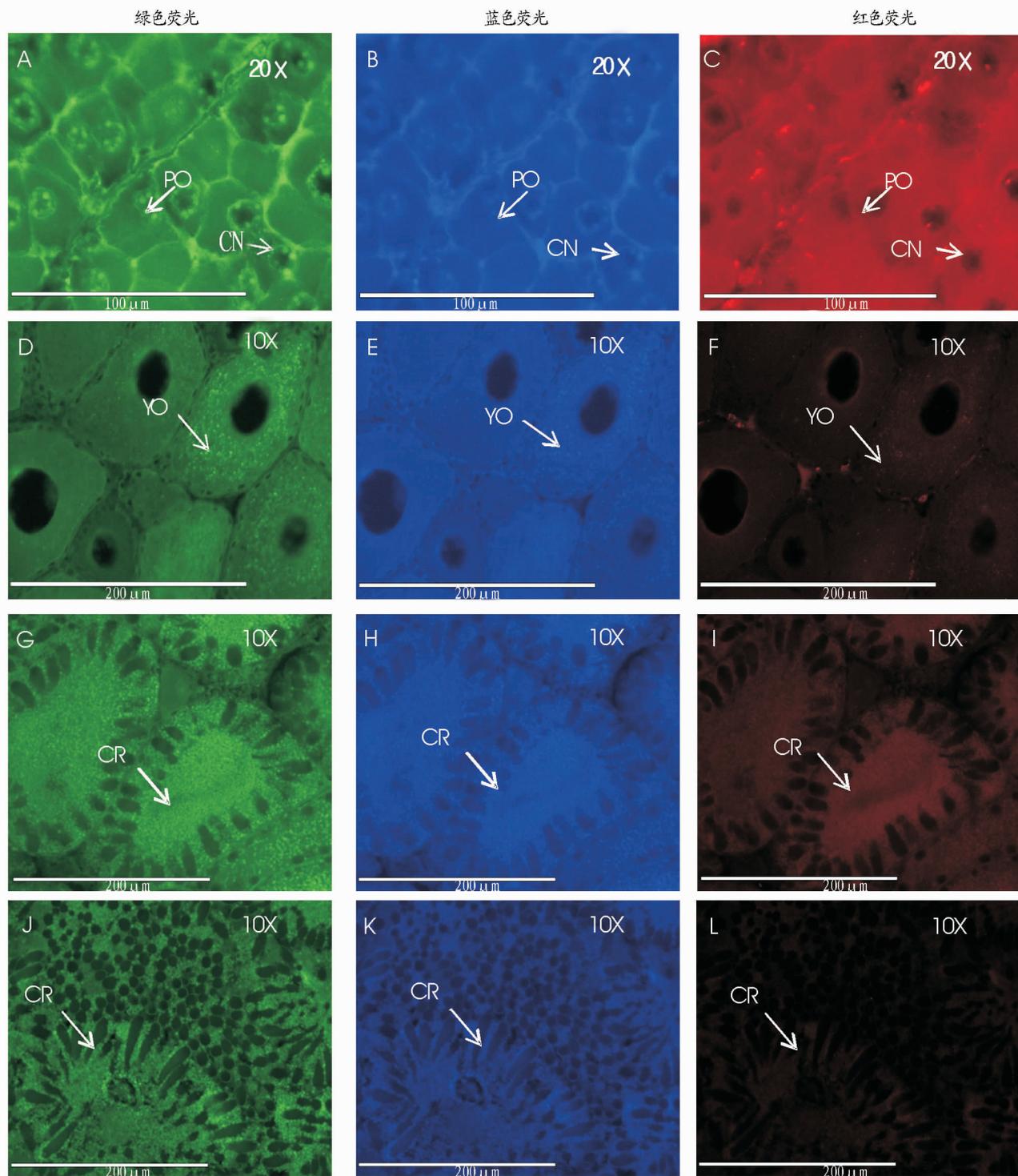
2 结果与分析

2.1 3 种荧光观察效果的比较 从图 1 可以看出,核仁期细胞和周边核仁期细胞在 3 种波段光的激发下呈现较为均匀的颜色,细胞核呈现黑色。卵黄囊卵母细胞和早期以及晚期的皮质棒期,绿色自发荧光能够较好地展示颗粒状物质。皮质棒状体在 3 种自发荧光下呈现为黑色。在相同的曝光时间和光强下,3 种颜色的自发荧光都可用于卵巢组织切片卵母细胞发育的观察。3 种颜色的自发荧光中,绿色自发荧光在清晰度和观察范围上比红色和蓝色自发荧光好。

基金项目 国家自然科学基金项目(31101903);广东省海洋渔业科技推广专项(A201300B03);广东省科技计划项目(2013B040402016);海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014057);海南省自然科学基金(313117)。

作者简介 郭松(1987-),男,河南淮滨人,硕士研究生,研究方向:水产养殖。*通讯作者,研究员,博士,硕士生导师,从事水产养殖方面的研究。

收稿日期 2014-11-19

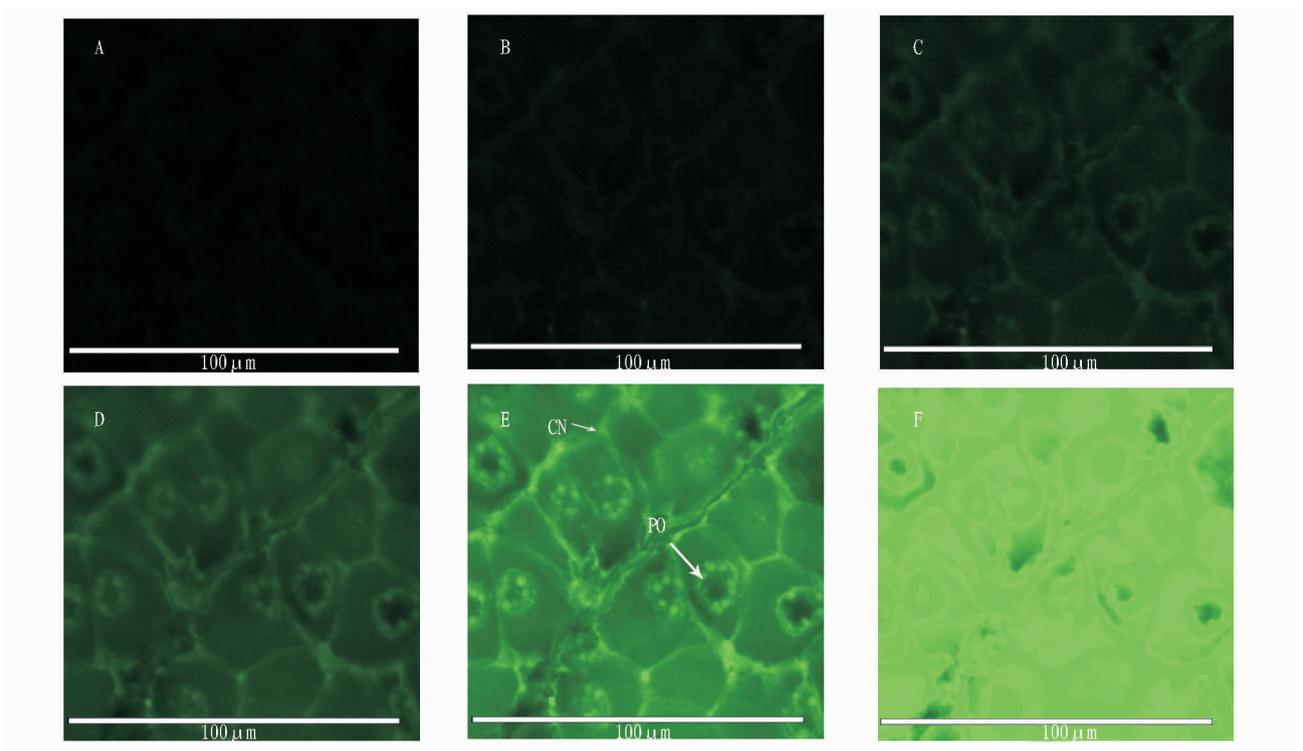


注:CN. 染色质核仁期卵母细胞;PO. 周边核仁期卵母细胞;YO. 卵黄囊卵母细胞;CR. 皮质杆状细胞。

图1 卵巢组织切片在3种荧光下自发荧光效果的比较

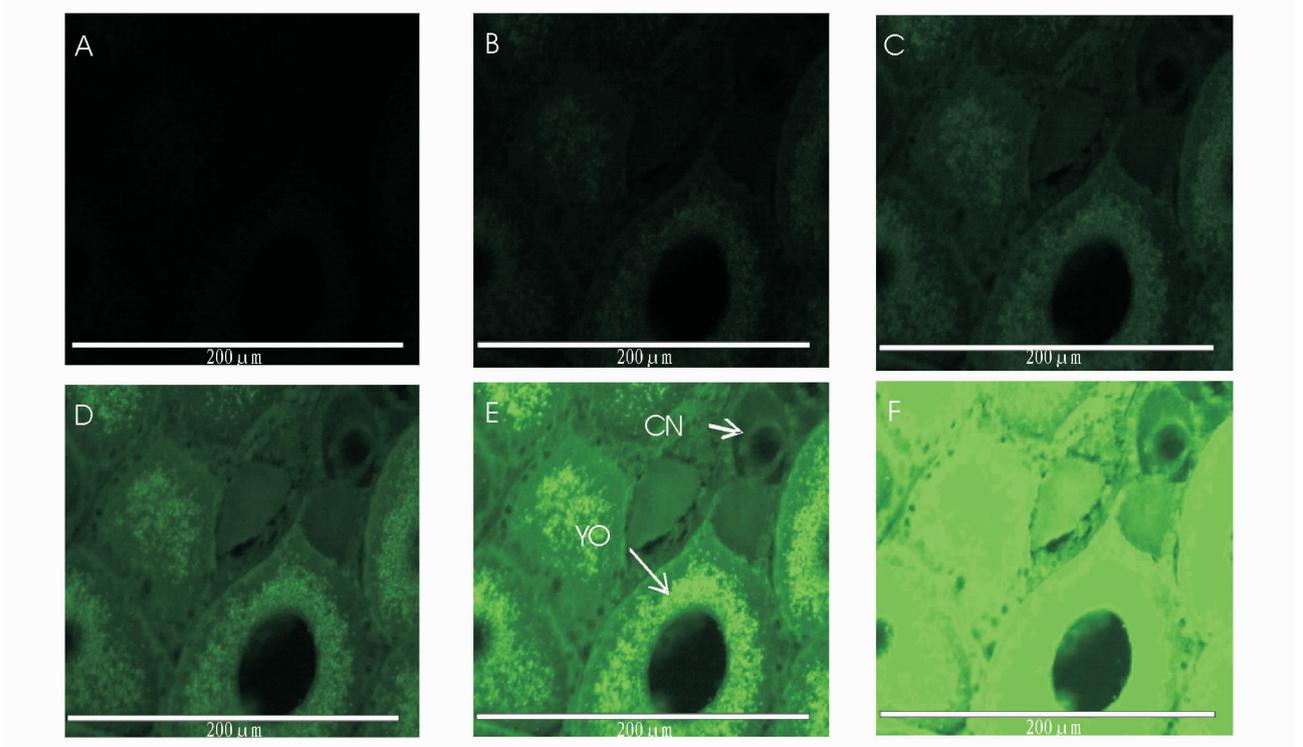
2.2 绿色荧光不同曝光时间下观察发育至各个时期的卵母细胞 从图2可以看出,在曝光时间为250 ms时观察效果最好,500 ms时出现曝光过度;从图3可以看出,在绿色自发荧光下观察卵黄囊卵母细胞需要曝光250 ms;从图4~5可以看出,在皮质棒期的卵母细胞,只需要60 ms曝光即可得到较好的观察效果。在60 ms曝光时间下,卵母细胞发育的不同形态均可以得到较为清晰的观察。

2.3 绿色荧光自发荧光与常规HE染色的效果比较 从图6可以看出,利用组织自发绿色自发荧光与常规HE染色相比能够更好地观察卵母细胞中的颗粒,且色彩鲜艳美观。在发育早期的卵母细胞中,常规HE染色观察结果背景较深;在卵黄囊卵母细胞期自发绿色自发荧光较好地展现了细胞质中的颗粒状物质及其分布的位置;在早期和晚期的皮质棒卵母细胞中,2种方法都能够很好地展示细胞中的皮质棒结



注:A. 曝光时间 15 ms; B. 曝光时间 30 ms; C. 曝光时间 60 ms; D. 曝光时间 120 ms; E. 曝光时间 250 ms; F. 曝光时间 500 ms。

图 2 绿色自发荧光下观察核仁期细胞和周边核仁期细胞(20 ×)



注:A. 曝光时间 15 ms; B. 曝光时间 30 ms; C. 曝光时间 60 ms; D. 曝光时间 120 ms; E. 曝光时间 250 ms; F. 曝光时间 500 ms。

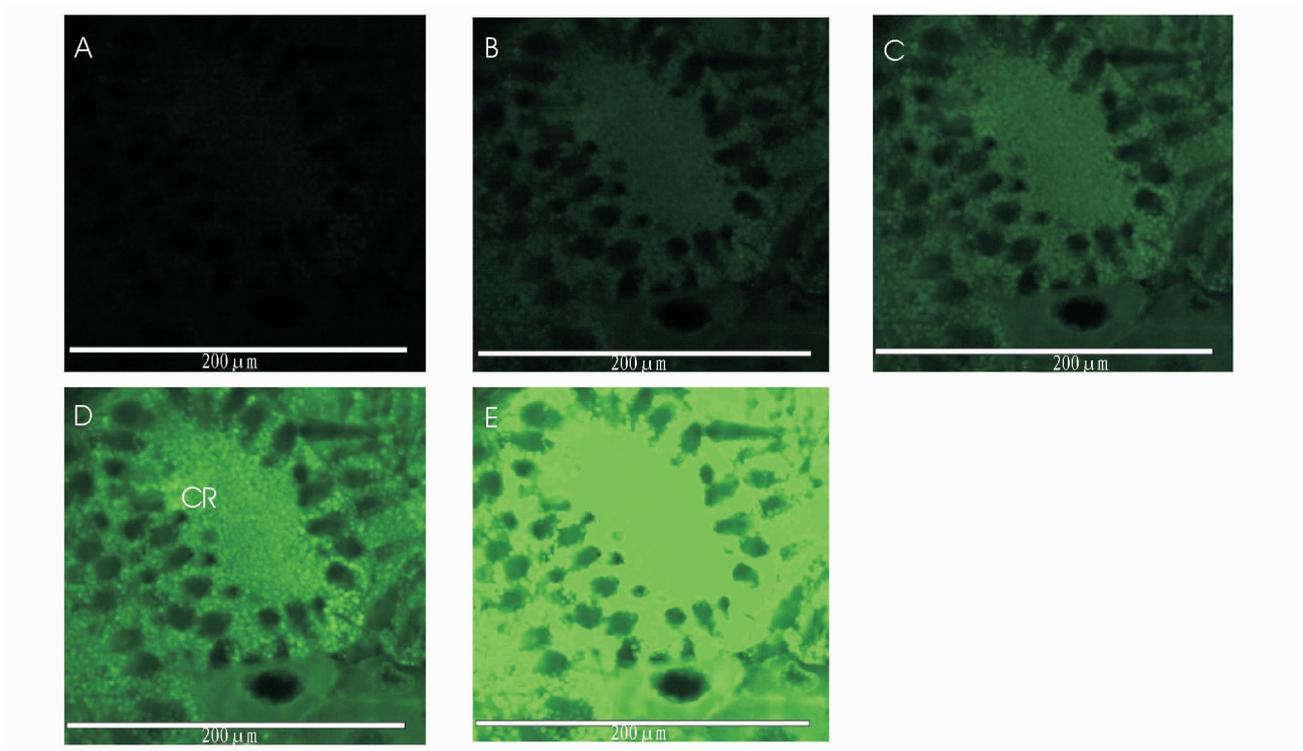
图 3 绿色自发荧光下观察卵黄囊卵母细胞(10 ×)

构,但在皮质棒间隙中的颗粒状物质的展示上,组织自发绿色荧光的观察效果优于常规 HE 染色。

3 讨论

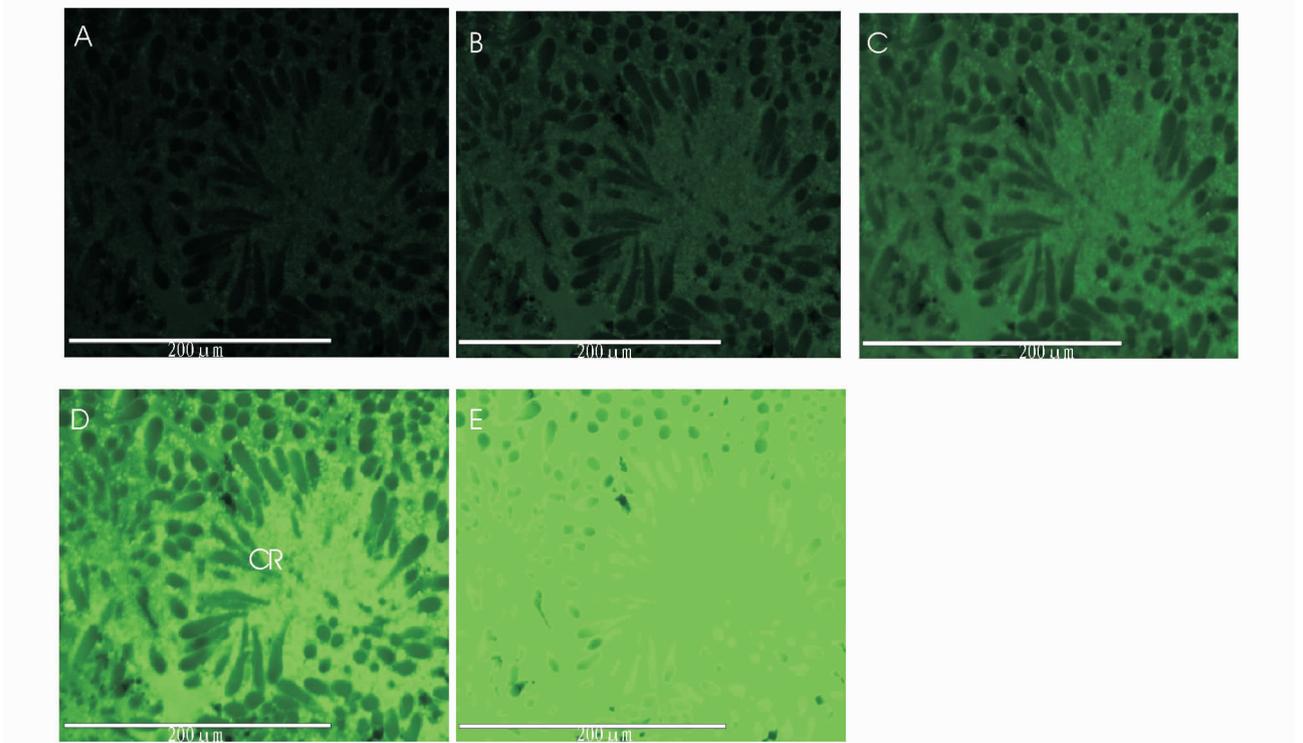
海洋生物或者其组织能够激发后发出荧光是较为普遍的现象,如目前广泛应用的绿色荧光蛋白(GFP)^[9-12]。与生

物发光现象不同,自发荧光一般需要荧光蛋白被一定范围波长的激光激发。荧光蛋白主要应用在与抗体、生物素、免疫蛋白等物质结合作为荧光探针,通过激发发出的荧光对相关物质的分布等进行研究。斑节对虾卵巢组织石蜡切片能够自发荧光的现象对于研究斑节对虾卵母细胞的发育具有重



注:A. 曝光时间 15 ms; B. 曝光时间 30 ms; C. 曝光时间 60 ms; D. 曝光时间 120 ms; E. 曝光时间 250 ms; F. 曝光时间 500 ms。

图 4 绿色自发荧光下观察卵黄囊卵母细胞早期皮质棒期卵母细胞(10 ×)



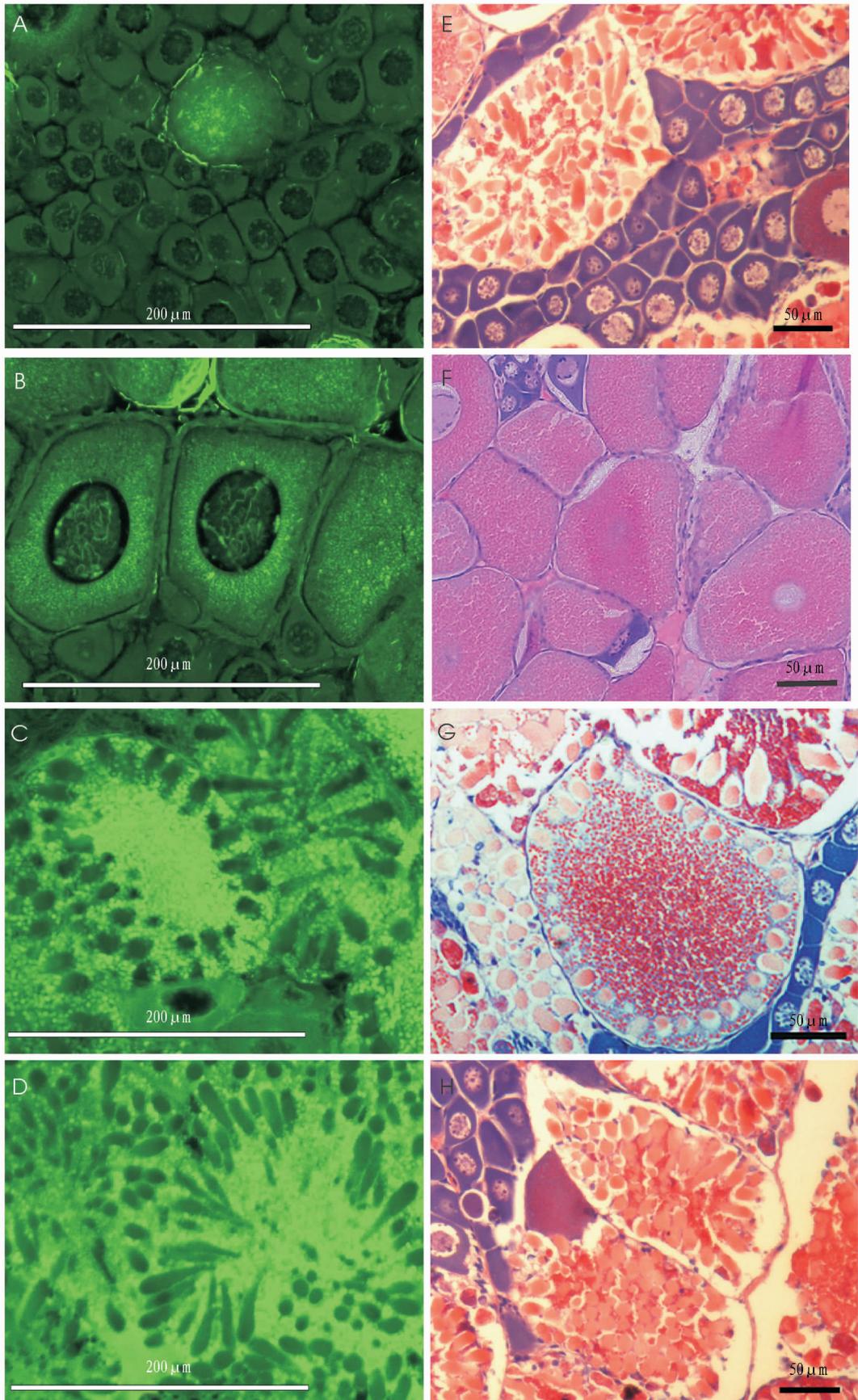
注:A. 曝光时间 15 ms; B. 曝光时间 30 ms; C. 曝光时间 60 ms; D. 曝光时间 120 ms; E. 曝光时间 250 ms; F. 曝光时间 500 ms。

图 5 绿色自发荧光下观察晚期皮质棒期卵母细胞(10 ×)

要意义。

该试验中使用的荧光显微镜 3 种荧光模块(DAPI、GFP、RFP)分别能够产生 360、470 和 530 nm 的激发光,分别激发产生 447 nm 的蓝色荧光、525 nm 的绿色荧光和 593 nm 的红色荧光。3 种激发光分别属于荧光显微镜常用激发片组:360

nm 的激发光属于紫外光范围(330 ~ 400),470 nm 属于蓝色片组(420 ~ 485),530 nm 属于绿色激发片组(460 ~ 550)。斑节对虾卵巢组织石蜡切片能够被 3 种激发光激发,可能是因为自发荧光的物质的激发波长范围较广,根据该试验结果可



注:A~D:自发光;E~H:常规 HE 染色。

图6 绿色荧光组织自发荧光与常规 HE 染色的效果比较(10 ×)

以判断为 360 ~ 530 nm, 其中 470 nm 波长激发光激发发出的绿色荧光最为清晰。470 nm 左右的激发光可用于斑节对虾卵巢组织石蜡切面中卵母细胞的发育的观察。绿色荧光在实验中是较为常用的荧光标记。Kunwadee P 等利用绿色荧光标记的蛋白研究了重组核糖体蛋白 L10a 在墨迹对虾卵巢发育中的作用^[13]。Mahattanee P 等利用绿色荧光标记的二抗研究了 CDK7 在斑节对虾卵母细胞中的定位^[14]。斑节对虾卵巢组织石蜡切片能够自发荧光的现象表明在荧光免疫组化等实验中需排除组织自发荧光的干扰。

在绿色自发荧光下核仁期和周边核仁期细胞在曝光 250 ms 时观察效果最好, 细胞质均匀, 呈现淡绿色。周边核仁期细胞细胞核中核仁分布于细胞核的周围清晰可见。卵黄囊卵母细胞在曝光 120 ms 时即可清晰观察到细胞质中的颗粒状发光物质。周边皮质杆和后期皮质杆卵母细胞中的自发荧光颗粒相比卵黄囊卵母细胞有较大的增多, 需要的曝光时间也有较大的缩短。在曝光 250 ms 时得到最清晰的图片。黄建华等^[15-16]研究表明卵母细胞的发育实际上是卵黄积累的过程。卵母细胞发育后期细胞中的卵黄进一步增多, 卵黄的积累是卵母细胞发育的重要标志。卵黄是由蛋白质、脂肪和糖类胡萝卜素等化合物组成。卵黄蛋白为主要成分, 占蛋白质总量的 60% ~ 90%, 是一种高密度的脂蛋白, 并含有糖和类胡萝卜素等辅基, 其中类胡萝卜素可以影响卵黄蛋白的颜色。自发荧光的颗粒物质可能与卵黄蛋白中的类胡萝卜素有关。

在斑节对虾卵巢组织石蜡切片自发荧光和 HE 染色观察卵母细胞发育的比较试验中, 发现核仁期和周边核仁期卵母细胞使用 2 种方法虽有不同, 但信息量并无差别。在卵母细胞发育的后面几个时期中, 利用自发荧光能够更好的观察卵母细胞中的颗粒物质。

该试验中用于自发荧光观察的斑节对虾卵巢组织石蜡切片未经任何处理, 因此可以继续用于后续试验。在进行免疫组化等试验前, 首先对卵巢组织石蜡切片进行镜检将会为后续试验的准确性提供保障, 而且这种分析方法更加廉价和节省试验材料。确认能够自发荧光的物质以及这种物质和

卵母细胞发育的关系是今后研究的方向。

参考文献

- [1] 张家润, 江世贵, 林黑着, 等. 不同品牌饲料对斑节对虾生长及水质影响的研究[J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 20-26.
- [2] 温为庚, 林黑着, 牛津, 等. 野生斑节对虾卵巢发育过程中不同组织的氨基酸组成[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 32-36.
- [3] PREECHAPHOL R, LEELATANAWIT R, SITTIKANKEAW K, et al. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of sex-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Biochemical Molecule Biology*, 2007, 40: 501-510.
- [4] 赵超, 傅明骏, 江世贵, 等. 斑节对虾细胞周期蛋白 E 基因的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 464-473.
- [5] ZHOU F L, ZHENG L M, YANG Q B, et al. Molecular analysis of a ras-like nuclear (Ran) gene from *Penaeus monodon* and its expression at the different ovarian stages of development [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3821-3827.
- [6] WITCHULADA T, BAVORNLAK K, PACHUMPORN N, et al. Characterization, expression and localization of valosin-containing protein in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 188-198.
- [7] MAHATTANEE P, PACHUMPORN N, RACHANIMUK H, et al. Characterization and expression analysis of Cyclin-dependent kinase 7 gene and protein in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 286-294.
- [8] BELL T A, LIGHTNER D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology [M]. Hawaii: World Aquaculture Society, 1988: 84-86.
- [9] ATSUSHI H, TATSUO K, KENJIRO K, et al. Green fluorescent protein (GFP) expression patterns in the olfactory epithelium of GFP transgenic cloned Jinhua pigs [J]. *Acta Zoologica*, 2014, 95(3): 319-329.
- [10] 关新刚, 苏维恒, 王欣, 等. Tat-GFP 融合蛋白的表达纯化及其穿膜活性[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014(4): 725-728, 914.
- [11] 王大涛, 赵海平, 褚文辉, 等. 用 GFP 基因标记梅花鹿生茸骨膜细胞[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(7): 1-2, 6, 228.
- [12] LO M K, NICHOL S T, SPIROPOULOU C F. Evaluation of luciferase and GFP-expressing Nipah viruses for rapid quantitative antiviral screening [J]. *Antiviral Research*, 2014, 106: 53-60.
- [13] KUNWADEE P, WALAIPOORN M, TAWATCHAI T, et al. Stimulation of ovarian development in white shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* De Man, with a recombinant ribosomal protein L10a [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 38-45.
- [14] MAHATTANEE P, PACHUMPORN N, RACHANIMUK H, et al. Characterization and expression analysis of Cyclin-dependent kinase 7 gene and protein in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 286-294.
- [15] 黄建华, 马之明, 周发林, 等. 南海北部野生斑节对虾卵巢解剖结构及组织学的研究[J]. 南方水产, 2005, 1(3): 49-52.
- [16] 黄建华, 周发林, 林黑着, 等. 池塘养殖斑节对虾卵巢发育过程中的脂肪酸组成及变化[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 341-346.
- [17] 白桂芬, 王强. 多菌灵对蚯蚓体内几种抗氧化酶活性的影响[J]. 河南农业科学, 2013, 42(9): 83-86.
- [18] 于功昌, 谢琳, 刘衍忠. 多菌灵对大鼠睾丸发育和生精功能影响的研究[J]. 中国男科学杂志, 2009, 15(6): 505-510.
- [19] 郑航, 郑新民, 李世文, 等. Bcl-2/Bax 基因表达对隐睾生殖细胞凋亡的影响[J]. 中国男科学杂志, 2001, 14(20): 81-82.
- [20] Scientific Committee on Plants, Preliminary opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of benomyl, carbendazim and thiophanate-methyl in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of the plant protection products on the market [R]. 2000.
- [21] FLEER J R, LACY H M. Photolysis of methyl-2-benzimidazole-carbamate [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 25: 51.
- [22] 朱凤晓, 孔洁, 由焦化, 等. 高效复合菌对多菌灵的生物降解[J]. 环境科学学报, 2011, 31(5): 1045-1050.
- [23] 王秀国, 王一奇, 严虎, 等. 多菌灵重复施药对持久性即土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 土壤学报, 2010, 47(1): 131-135.

(上接第 127 页)

- [13] 陈伟, 刘红彦, 范芳婷, 等. 芝麻中甲基硫菌灵及代谢物多菌灵残留测定及安全性评价[J]. 农药, 2011, 50(12): 911.
- [14] 董爱军, 杨鑫, 马莺, 等. 食用菌中多菌灵残留的分散固相萃取-高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 573-577.
- [15] 刘晓松, 郑玲, 黄文雯, 等. 浓缩果汁中甲基硫菌灵、2-氨基苯并咪唑、多菌灵、噻菌灵及 5-羟基噻菌灵残留量的液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 86-88.
- [16] 郑志琴, 魏朝俊, 张志勇, 等. 多菌灵在草莓与土壤中的残留动态研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10): 1948-1952.
- [17] 张念洁, 吴信子, 姜旭. 高效液相色谱法同时测定人参中多菌灵和甲基硫菌灵农药残留的含量[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 907-910.
- [18] 胡梅, 王骏, 张卉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定蒜苔中多菌灵和噻菌灵的残留量[J]. 山东农业科学, 2010(4): 89-91.
- [19] 杨媛, 石磊, 李文生, 等. 高效液相色谱法测定苹果中多菌灵残留量的测量不确定度分析[J]. 农药学报, 2010, 12(3): 349-354.
- [20] 吴加伦, 王天玉, 王怀昌, 等. 高效液相色谱法测定元参、黄芩和杭白菊中的多菌灵残留[J]. 农药学报, 2010, 12(4): 489-493.