

用 DAPI 染色检出对虾肝胰腺细小样病毒*

USE OF DAPI STAINING FOR IDENTIFYING HPV

肖 天 陈 明 张 虹

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

对虾肝胰腺细小样病毒(*Hepatopancreatic parvo-like virus*, HPV)病是我国流行较广泛的一种对虾病毒性疾病,发病时可使对虾在4~8周内累积死亡率达50%~80%,野生和养殖对虾均可患此病,但有些对虾从幼体阶段携带此病毒一直到成虾阶段也不死亡。对HPV病毒的检出一般常用HE染色法和孚尔根染色法,在光学显微镜下观察细胞核内的病毒包涵体。或者用电子显微镜对可疑组织作超薄切片观察其病毒颗粒^[1]。研究发现在组织切片中用DAPI(4,6-Diamidino-2-Phenylindole)这种荧光染料染色在荧光显微镜下很容易检出对虾肝胰腺组织中细胞核内的HPV包涵体。

1 材料与方 法

1992年7~8月间作者取自山东海阳凤城对虾养殖场养成期有病状的对虾(中国对虾 *Penaeus chinensis*),体长一般5 cm以上。用Davidson固定液(95 %

乙醇 330 ml,福尔马林 220 ml,冰醋酸 115 ml,蒸馏水 335 ml,共 1 000 ml 混匀)或 2 %戊二醛固定液(0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 50 ml,25 %戊二醛溶液 8 ml,蒸馏水 42 ml,共 100 ml 混匀),注射到对虾肝胰腺周围,半小时后解剖出肝胰腺放入存 Davidson 固定液或 2 %戊二醛固定液样品瓶中,放在 4 ℃冰箱内保存备用。取已固定的样品(0.5~0.3 cm),用常规的组织石蜡包埋切片法包埋和切片,切片厚度约 5 μm,贴在载玻片上,然后用常规方法脱腊处理,把粘有样品的载玻片放入 0.05 μg/ml 的 DAPI 染色液中或将 0.05 μg/ml 的 DAPI 染色液滴在样品上,染色 3~5 min 后,用蒸馏水冲洗掉过剩的染液,可直接或封片(封片后可保存数周)在落射式荧光显微镜(OPTON 万能 I 型荧光显微镜,光源 50 W HBO,用 G365,FT390,LP395

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3603 号。

收稿日期:1998-05-27;修回日期:1998-11-04

组激发滤光片)下观察。据 Karen 1980 年报道,经 DAPI 染色的 DNA 病毒包涵体可形成 DNA-DAPI 荧光复合物容易观察检出。

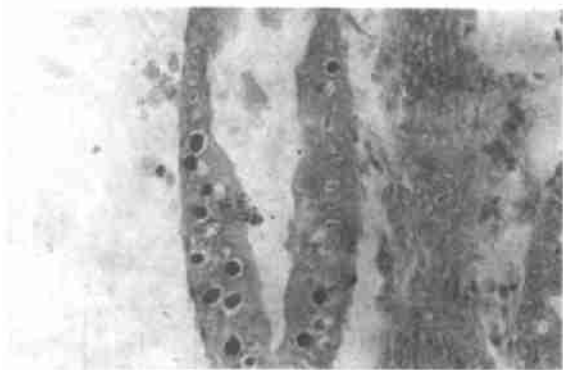


图 1 对虾肝胰腺组织切片,显示细胞核内的 HPV 包涵体 HE 染色($\times 250$)

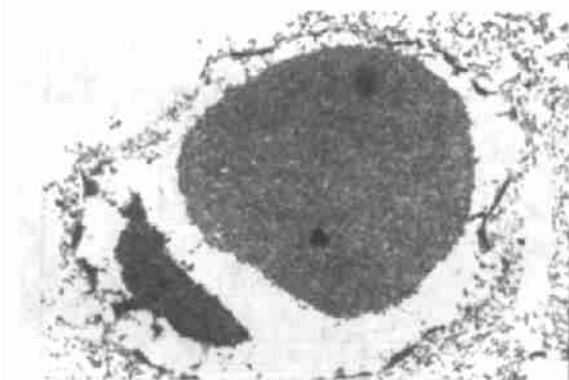


图 2 电子显微镜下肝胰腺细小样病毒(HPV)颗粒($\times 6\ 000$)

2 结果

图 1 是 HE 染色结果,箭头所指的紫红色个体是病毒包涵体。图 2 是用同一样品电镜观察结果,可看出由细小颗粒组成的包涵体。这与薛清刚、王文兴^[1]描述的 HPV 病毒较一致。图 3 是用同一样品 DAPI 染色的结果。箭头所指就是病毒包涵体,呈乳白色荧光。

3 讨论

DAPI 荧光染料易与 DNA 形成 DNA-DAPI 复合物在紫外光的激发下,很容易用落射式荧光显微镜观察。因此对检出象细小样病毒(HPV)这类的 DNA 病毒很有效。

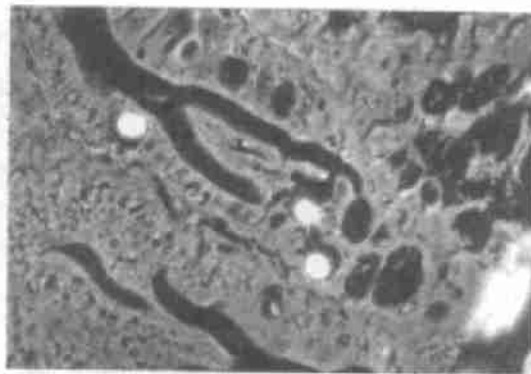


图 3 对虾肝胰腺组织切片,显示细胞核内的 HPV 包涵体 DAPI 染色($\times 400$)

DAPI 荧光染色法比 HE 染色法步骤简单。对处理好的组织切片,一般用 $0.05\ \mu\text{g/ml}$ 浓度的 DAPI 染色液,染色 $3\sim 5\ \text{min}$ 就可在显微镜下观察。避免了用 HE 染色时对每一步染色时间不易掌握的问题。

DNA-DAPI 复合物在紫外光激发下发出荧光,因此细胞核内一些小的病毒包涵体也可被检出。

使用 DAPI 染色检出病毒,仍有需要改进的方面,如果不用组织切片法,改用组织涂片后染色是否能达到检出病毒包涵体的目的?另外用 DAPI 染色需要较高级的荧光显微镜,这对推广应用此方法增加了一定的难度。这些都有进一步深入研究的必要。

主要参考文献

- 1 薛清刚、王文兴. 对虾疾病的病理与诊治. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992, 60~65