

海水双壳类减数分裂器的一种免疫荧光显微观察方法

李永仁¹, 阙华勇², 张国范²

(1. 天津农学院 水产科学系 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 为定性并定量研究海水双壳类受精过程中纺锤体和染色体的动态, 改进了一种免疫荧光显微观察方法, 包括样品的预处理、荧光染色和荧光显微观察。本方法适用于同步观测海水双壳类的纺锤体和染色体, 具有操作简捷、清晰度高的优点。

关键词: 海水双壳类; 减数分裂器; 免疫荧光; 显微观察术

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0038-03

海洋贝类是我国海水养殖的主导种类, 在我国的海水养殖业中占有举足轻重的地位。利用生物技术培育优良的养殖品种, 是当前乃至未来发展海水贝类养殖亟待解决的关键问题之一。受精是个体发育的前提和基础, 是苗种培育的第一步。在水产养殖生产中, 受精的质量关系苗种培育的成败。

20 世纪 80 年代以来, 海水经济贝类的染色体操作和细胞工程育种技术得到广泛研究, 多倍体和非整倍体形成的受精生物学机制研究取得了许多进展^[1,2]。此外在广泛开展的贝类杂交研究中, 其受精过程的观察和研究是必要的组成部分。

国内外学者已经对牡蛎、珠母贝、贻贝、扇贝等主要经济双壳类的受精过程进行了深入细致的观察与研究, 研究手段从普通光学显微镜发展到荧光显微镜、电子显微镜、激光共聚焦显微镜, 研究内容涉及海水双壳类受精相关事件的发生过程^[3~7]。近年来, 利用免疫细胞化学技术结合荧光显微观察^[3], 对海水双壳类受精过程中相关细胞成分(如微管)的定位和动态变化的研究取得了一定进展。

作者在借鉴动物细胞骨架免疫荧光显微研究技术^[8]的基础上, 建立一种用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法。该方法特异性强, 清晰度高, 可同步观察减数分裂过程中的纺锤体和染色体动态, 是海水双壳类受精生物学的有力手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验以长牡蛎(*Crassostrea gigas*)为主要实验材料, 摸索实验条件并建立样品制备和观察方法。选用的 1 龄长牡蛎个体采自山东荣成养殖海区, 人工授精获取受精卵; 实验使用的异硫氰酸荧光素偶

联的抗 α 微管蛋白抗体(FITC-anti- α -tubulin)、碘化丙锭(PI)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、防荧光淬灭剂 DABCO 均为 Sigma 公司产品; 采用尼康 E600 荧光显微镜观察制片。

1.2 免疫荧光染色条件的确定

1.2.1 固定液的筛选

采用磷酸缓冲盐溶液(PBS)配制多聚甲醛固定液。分别设置缓冲液体系以及多聚甲醛固定液浓度梯度, 在显微镜下观测卵径以及荧光染色效果, 确定适宜的等渗透压固定液。

1.2.2 纺锤体和染色体荧光染色条件的摸索

筛选 Triton X-100 和 PI 的浓度梯度以及 FITC-anti- α -tubulin 的稀释比例, 观察染色效果。开展梯度实验, 筛选用于封闭抗体非特异性结合位点的小牛血清白蛋白(BSA)溶液适宜浓度、防荧光淬灭剂中 DABCO 浓度以及染色处理后 PBS 清洗卵子的时间。

1.3 观察方法

制片置于荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜下, 以高压汞灯产生的紫外光为激发光, 根据下述荧光探针参数选择荧光滤光片: FITC 最大吸收光谱 490~495 nm, 最大发射光谱 520~530 nm; PI 最大吸收光谱 530~540 nm, 最大发射光谱 610~620 nm, 观察分辨纺锤体和染色体的形态、位置和数量。

收稿日期: 2008-11-12; 修回日期: 2008-12-05

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA10A401); 国家自然科学基金资助项目(30471326); 山东省博士基金项目(2005BS07002)

作者简介: 李永仁(1978-), 男, 天津宁河人, 讲师, 硕士, 从事海水贝类研究, E-mail: lyr1018@163.com; 阙华勇, 通信作者, E-mail: hque@ms.qdio.ac.cn

2 实验结果

2.1 适用于双壳类受精卵的固定液选择

以长牡蛎为例,各种缓冲体系下的长牡蛎卵径变化结果见表1。

表1 不同缓冲体系下长牡蛎卵径的变化

Tab. 1 Variation in diameter of egg from *Crassostrea gigas* under various buffers

固定液缓冲液类别	卵子直径(μm)
自然状态	50~60
0.1 mol/L PBS	60~70
0.1 mol/L PBS+4%蔗糖	60~70
0.1 mol/L PBS+8%蔗糖	60~70
0.1 mol/L PBS+12%蔗糖	56~65
0.2 mol/L PBS	50~60

固定剂多聚甲醛的浓度梯度实验表明,2%的多聚甲醛对纺锤体的固定效果最好。

综合缓冲体系和固定剂的筛选实验结果,采用0.2 mol/L PBS配制的2%甲醛作为固定液。

2.2 长牡蛎受精卵荧光染色各主要条件的筛选

适用于观察长牡蛎受精卵纺锤体和染色体的荧光染色的主要实验条件的筛选实验结果见表2和表3。

表2 长牡蛎受精卵免疫荧光染色3个主要条件参数的优化

Tab. 2 Optimization of three major parameters of immunofluorescent method for fertilized eggs of *C. gigas*

组别	Triton X-100	FITC-anti-α-tubulin	PI 质量
	体积分数(%)	体积比	浓度(mg/L)
1	0.2	1:1 000	2
2	0.5	1:2 000	5
3	1.0	1:4 000	10
4	1.5	1:5 000	5
最佳浓度	0.5	1:5 000	5

表3 长牡蛎受精卵免疫荧光染色荧光其他实验条件的筛选

Tab. 3 Optimization of other conditions for immunofluorescent method for fertilized eggs of *C. gigas*

组别	质量浓度(g/mL)		PBS 清洗次数和时间
	BSA	DABCD	
1	0.01	0.01	1次,5 min/次
2	0.02	0.02	1次,10 min/次
3	0.03	0.03	2次,5 min/次
4	0.04	0.04	3次,5 min/次
最佳条件	0.01~0.02	0.02	2次,5 min/次

2.3 长牡蛎纺锤体与染色体荧光染色的方法

样品的采集和固定:采用筛绢过滤和离心的方

法,去除海水,获取牡蛎特定发育阶段的受精卵10 000个左右;加入2%多聚甲醛的0.2 mol/L PBS磷酸缓冲液固定牡蛎受精卵,采用离心法更换固定液1~2次。

样品的透化:取60粒左右受精卵转入0.5%的Triton X-100的PBS溶液处理30 min。

样品的封闭:将受精卵转入1%的小牛血清白蛋白PBS溶液处理40 min。

微管荧光染色:将受精卵转入1:5 000稀释的FITC-anti-α-tubulin PBS溶液,处理40 min;再以PBS清洗受精卵5 min。

染色体荧光染色:将受精卵转入5 mg/L PI的PBS溶液,进行10 min;以PBS清洗受精卵2次,每次5 min。

制片:将受精卵转移到2% DABCO的甘油中,加盖玻片,树脂封片。

荧光显微观察:将制片置于荧光显微镜下,采用紫外光作为激发光,选择荧光滤光片,观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体(图1);-20℃下保存的制片,2周内可进行减数分裂器的观察。



图1 采用免疫荧光显微观察的长牡蛎受精卵减数分裂器
Fig. 1 Meiotic apparatus of fertilized eggs from *C. gigas* observed with an immunofluorescent method

3 讨论

3.1 本方法的适用范围

采用上述适用于长牡蛎的方法,应用于包括长牡蛎、栉孔扇贝、海湾扇贝、菲律宾蛤仔等多种海水双壳类的受精卵的免疫荧光显微观察,在试剂的浓度和处理时间做出微调的基础上,均取得了满意的效果。适用于海水双壳类的受精卵减数分裂器的免疫荧光显微观察基本步骤如下:1)获取受精卵,固定30~60 min;2)将受精卵转入Triton X-100的PBS溶液,透化处理30~60 min;3)将受精卵转入小牛血清白蛋白PBS溶液,封闭处理30~60 min;4)以FITC-anti-α-tubulin的PBS溶液处理受精卵40~60 min,进行微管的荧光染色;5)再以PI的PBS溶液复染样品的染色体10 min;6)加入DABCO的甘油溶液作为防荧光淬灭剂,封片,置于荧光显微镜观察。

3.2 对原有减数分裂器观察方法的改进

目前,对双壳类受精过程的染色体动态研究主

要采用了如下两种染色方法,即采用常规碱性染料(地衣红、苏木精等)在普通光学显微镜观察染色体的动态^[2,7],以及采用荧光染料 DAPI 在荧光显微镜下观察栉孔扇贝和泥蚶受精过程的染色体行为^[9],上述方法均局限于观察染色体的行为,无法揭示纺锤体的组装动态。实现同步观察减数分裂器两个主要结构纺锤体和染色体的动态,是深入并完整阐明减数分裂过程及其相关机理的先决条件。

迄今国内外仅有一个关于利用免疫荧光染色的方法观察长牡蛎减数分裂纺锤体形态的报道^[3]。该研究采用免疫荧光间接法,分别采用鼠抗 β 微管蛋白抗体和 FITC 标记的羊抗鼠抗体作为第一与第二抗体,观察了长牡蛎受精卵成熟分裂过程的纺锤体以及染色体动态。免疫荧光间接法步骤较多,操作难度大,容易引起非特异性染色。作者报道的方法采用直接免疫荧光法,较之已报道的两步免疫荧光标记法,具有操作简单、省时的特点。此外,本方法制备的样品清晰度高,有效降低了非特异性荧光,可满足定位和定量显微观察纺锤体和染色体的要求。

总之,本方法是一种适用于海水双壳类减数分裂器,综合定性、定位和定量,形态和功能密切结合的细胞学免疫荧光观察方法。

参考文献:

- [1] 阙华勇,张国范,张丽瑛,等. 栉孔扇贝四倍体幼虫的诱导研究[J]. 高技术通讯, 2004, 14(12):103-105.
- [2] Que Huayong, Guo Ximing, Zhang Fusui, *et al.* Chro-

mosome segregation in fertilized eggs from triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I [J]. *Biol Bull.* 1997, 193: 14-19.

- [3] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation [J]. *Biol Bull.* 1993, 185: 197-214.
- [4] Longwell A C, Stiles S S. Fertilization and completion of meiosis in spawned eggs of the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *Caryologia.* 1967, 21 (1): 65-73.
- [5] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, *et al.* Meiosis and fertilization of the Japanese peal oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope [J]. *Nip Sui Gak.* 1990, 56 (3): 425-43.
- [6] Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. I. Polar body formation and development of the female pronucleus [J]. *J Exp Zool.* 1969, 172: 69-96.
- [7] 任素莲,王德秀,绳秀珍,等. 栉孔扇贝受精过程的细胞学观察[J]. 海洋湖沼通报, 2000, 1:24-29.
- [8] Roger S. Cell biological applications of fluorescence microscopy [M]. Illinois: The Imaging Technology Group, 2003.
- [9] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 6-甲氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 22-26.

An immune fluorescent method for observation of meiotic apparatus of marine bivalves

LI Yong-ren¹, QUE Hua-yong², ZHANG Guo-fan²

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture, Department of Fishery Sciences, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academic of Science, Qingdao 266071, China)

Received: Nov. , 12, 2008

Key words: marine bivalves; meiotic apparatus; immunofluorescence; microscopy

Abstract: An immunofluorescent method was developed to be adopted for observation of meiotic apparatus, which comprises chromosomes and the meiotic spindle, of fertilized eggs from marine bivalves. This method involves the pre-treatment of samples, fluorescent staining, and observation under fluorescence microscope. It is proved that this method is adequate for simultaneous observation of spindles and chromosomes in eggs with merits of simplicity in preparation and high definition of image of interest.

(本文编辑:刘珊珊)