

应用激光扫描共聚焦显微镜研究卵母细胞和早期胚胎的细胞骨架

徐 莹[▲] 张庆华^{1▲} 关 娜¹ 徐燕宁¹ 闫晓飞¹ 雷 蕾^{1*}

(嘉兴学院医学院人体解剖与组织胚胎学教研室, 嘉兴 314001;

¹哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081)

摘要 介绍了应用激光扫描共聚焦显微镜, 结合免疫荧光技术研究卵母细胞和早期胚胎细胞骨架的方法。观察了 β -微管蛋白、 γ -微管蛋白、微丝以及染色体在小鼠卵母细胞和早期胚胎中的分布和形态, 讨论了实验过程中的注意事项以及实验结果的分析 and 处理方法。

关键词 激光扫描共聚焦显微镜; 细胞骨架; 卵母细胞; 早期胚胎

激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)是近年来发展起来的一项重要技术。通过这种显微镜, 可以对样品进行断层扫描和成像。因此, 能够无损伤的观察和分析细胞的三维空间结构。同时, 激光扫描共聚焦显微镜也是活细胞动态观察、多重免疫荧光标记和离子荧光标记观察的有力工具。但激光共聚焦显微镜在应用时, 对样品的处理要求比较严格, 若某一步骤操作不当就会导致整个实验的失败。

卵母细胞和早期胚胎是发育生物学的重要实验材料, 而在卵母细胞发生和早期胚胎发育过程中细胞骨架的作用非常重要^[1-4]。细胞骨架包括微管(microtubule, MT)、微丝(microfilament, MF)和中间丝(intermediate filament, IF)。微管蛋白(tubulin)、肌动蛋白(actin)和波形蛋白(vimentin)是构成三者的主要分子。在卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中, 染色体的分离依赖于纺锤体, 纺锤体出现异常, 细胞分裂就不能正常完成。纺锤体是由 β -微管蛋白和 α -微管蛋白以二聚体的形式构成的, γ -微管蛋白和微丝则是纺锤体形成和迁移的调节者。微管和微丝在卵母细胞减数分裂和早期胚胎卵裂过程中的作用已有很多报道^[5-7]。但在不同的文献中方法也各有不同且描述简单。为使广大研究者更好地利用这种先进技术, 减少摸索的时间, 我们以小鼠卵母细胞和早期胚胎为材料, 详细地讨论了应用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明品系性成熟小鼠, 8~10周龄, 饲养于光照控制(10L:14D)、恒温恒湿的饲养室, 自由采食饮水。

1.2 小鼠的超排卵与卵母细胞的收集

每只雌鼠腹腔注射7.5 IU孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG; 宁波第二激素厂产品), 48 h后再注射7.5 IU人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG; 宁波第二激素厂产品), 于注射hCG后13 h脱颈椎处死小鼠, 用眼科剪刀和眼科镊子配合, 分离输卵管, 将输卵管置于CZB-HEPES液中, 划开输卵管膨大部, 释放出卵丘卵母细胞复合体, 用透明质酸酶(300 IU/ml, Sigma公司产品)处理2~3 min, 消化掉卵丘细胞, 用CZB-HEPES操作液清洗后放入KSOM培养液滴中, 置于37 °C, 5% CO₂, 100%湿度的二氧化碳培养箱中备用。

1.3 小鼠早期胚胎的准备

雌鼠注射hCG后与雄鼠合笼, 于次晨检查阴道栓, 见栓后38~42 h处死雌鼠, 取出输卵管, 用CZB-HEPES操作液冲洗输卵管即可获得2-细胞胚胎。取部分2-细胞胚胎用于免疫荧光染色; 其他的2-细胞移入KSOM培养液滴中, 置于37 °C, 5% CO₂, 100%湿度的CO₂培养箱中继续培养, 待发育到4-细胞、8-细胞、桑椹胚和囊胚时分别固定进行免疫荧光染色。

收稿日期: 2007-11-06 接收日期: 2008-01-16

国家自然科学基金项目(No.30671025)和嘉兴市科技局科研重点项目(No.2007AZ2013)资助

[▲]同为第一作者

*通讯作者。Tel: 0451-86674518, Fax: 0451-87503325, E-mail: lei1086@yahoo.com.cn

1.4 微管蛋白的免疫荧光染色

1.4.1 β -微管蛋白的免疫荧光染色 取 M₂ 期卵母细胞及早期小鼠胚胎, 按以下方法操作:

第一步, 去透明带: 将卵或胚胎移入含有盐酸的 CZB-HEPES 操作液(pH 2~3)中处理 5~10 s, 在体视镜下观察到透明带消失时, 立刻移入不含盐酸的 CZB-HEPES 操作液中清洗 3 次。

第二步, 固定: 将除去透明带的卵或胚胎移入无钙、镁 DPBS (Hyclone 公司产品)配制的 3.7% 多聚甲醛中, 室温(25 °C)固定 40 min 或在 4 °C 固定过夜。

第三步, 清洗: 将固定后的样品移入清洗液[含 0.3% BSA (Roche 公司产品)的 DPBS]中清洗 3 次, 每次 5 min。

第四步, 透膜: 将清洗后的样品移入透膜液[清洗液中加入 0.2% TritonX-100 (Amresco 公司产品)]中, 在 37 °C 温箱中温育 40 min, 增加细胞膜的通透性, 以利于抗体进入。

第五步, 清洗: 将透膜处理后的样品移入含 0.01% TritonX-100 清洗液中洗 3 次, 每次 5 min;

第六步, 封闭: 每毫升清洗液中添加 0.01125 g 甘氨酸(Amresco 公司产品)和 10 mg BSA 作为封闭液, 37 °C 温育 1 h。

第七步, 一抗结合: 样品放入 1 : 160 封闭液稀释的小鼠抗 β -微管蛋白的抗体(monoclonal anti- β -tubulin, Sigma 公司产品)中, 37 °C 温育 1 h。

第八步, 清洗: 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。

第九步, 二抗荧光标记: 样品与 1 : 100 清洗液稀释的 FITC 标记的山羊抗鼠二抗(FITC-goat-anti-mouse IgG, Sigma 公司产品) 37 °C 温育 40 min, 未经一抗处理, 只做二抗结合的样品作为阴性对照。

第十步, 清洗: 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。

1.4.2 γ -微管蛋白的免疫荧光染色 取 M₂ 期卵母细胞经过去透明带、多聚甲醛固定、透膜处理后, 移入封闭液中; 然后与 1 : 100 封闭液稀释的抗 γ -微管蛋白抗体(monoclonal anti- γ -tubulin, Sigma 公司产品)进行一抗结合(37 °C 温育 1 h); 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min; 再与 1 : 100 清洗液稀释的 FITC 标记山羊抗鼠二抗(FITC-goat-anti-mouse IgG, Sigma 公司产品) 37 °C 温育 40 min, 未经一抗处理, 只与二抗结合的样品作为阴性对照; 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。

1.5 微丝的免疫荧光染色

取 M₂ 期卵母细胞、2-细胞和囊胚经过去透明带、固定、透膜、封闭处理后, 在含有 500 mg/ml

FITC 标记的鬼笔环肽(FITC-labeled phalloidin)的 DPBS 溶液中, 37 °C 共同温育 40 min, 进行微丝染色, 用清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。

1.6 染色体的荧光染色

将经过微管和微丝染色的样品清洗后, 在含有 15 μ g/ml 碘化丙啶(PI, Sigma 公司产品)的清洗液中室温下温育 10 min。

1.7 封片

在洁净的载玻片上, 用凡士林 : 石蜡(9 : 1)混合物, 根据盖玻片的大小, 做 4 个小柱, 在 4 个小柱的中央滴一滴防荧光淬灭剂(DABCO, Sigma 公司产品), 将上述经 PI 染色后的样品在清洗液滴中稍清洗, 立即移入防荧光淬灭剂中, 将盖玻片轻放在 4 个小柱上, 小心按压盖玻片, 使样品位置固定, 并稍扩展而不被压碎, 用无色指甲油封片。

1.8 激光共聚焦显微术观察

在盖玻片样品上方滴一滴香柏油, 用 Olympus FV300 激光共聚焦荧光显微镜 20 倍油镜双光路观察, FITC 所用激发波长为 488 nm, PI 所用激发波长为 533 nm, 光切片厚度为 2 μ m, 在图象分析系统中选择目标区域取图, 并做 Z 轴方向的光切片合成。

2 结果

2.1 β -微管蛋白在成熟卵母细胞和早期胚胎中的分布和形态

如图 1 所示, 成熟卵母细胞的染色体排列在赤道板上, 经 β -微管蛋白染色后, 纺锤体清晰可辨(图 1A)。在 2-细胞和 4-细胞的分裂间期, β -微管蛋白散在分布在每个卵裂球中以及极体中(图 1B, 图 1C)。桑椹胚时期的卵裂球中, 微管蛋白在核周聚集(图 1D); 囊胚阶段, β -微管蛋白在有些细胞中形成明显的纺锤体, 而在有些细胞中则散在分布, 充分表现出早期胚胎分裂周期的不同步性。在小鼠的胞质中存在着星体, 除在纺锤体两极分布外, 胞质的其他部位也有分布, 这一点与其他哺乳动物有所不同。以往的研究中多使用抗 α -微管蛋白抗体进行免疫荧光染色, 来观察星体微管, 本研究中使用抗 β -微管蛋白抗体进行免疫荧光染色, 也能够很好地显示星体微管, 如图 1 F 中箭头所示, 在小鼠的胞质中可以观察到多个星体的存在。

2.2 γ -微管蛋白在成熟卵母细胞中的分布和形态

在成熟的卵母细胞中, 可以发现 γ -微管蛋白主要分布在纺锤体的两极(图 2)。

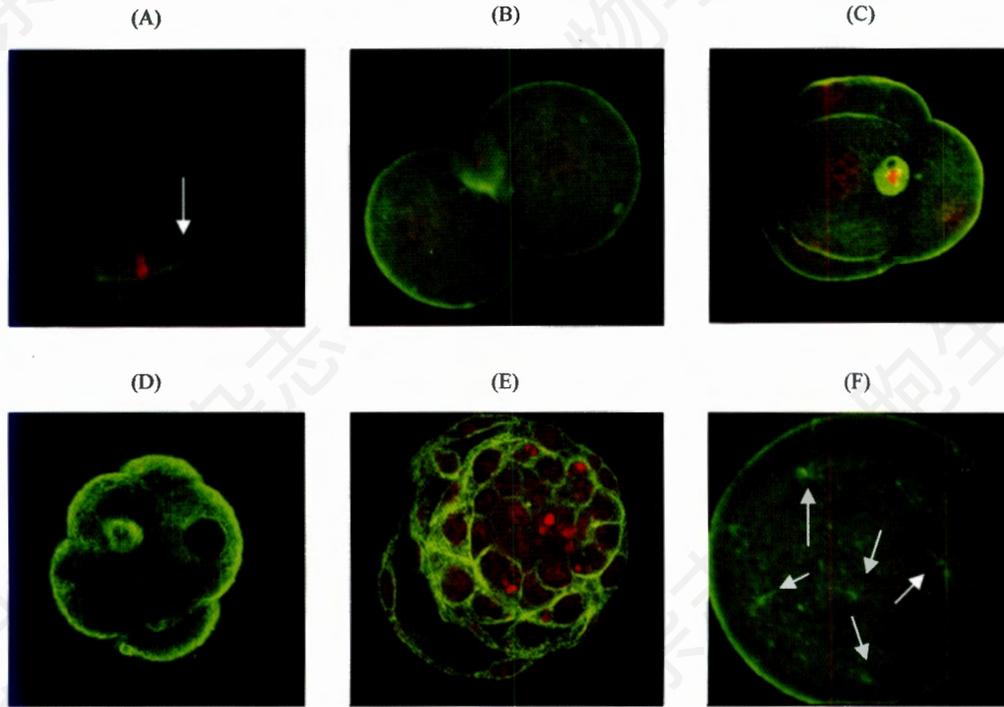


图1 β -微管蛋白在成熟卵母细胞和早期胚胎中的分布和形态

红色: 染色体; 绿色: β -微管蛋白。A: M_2 卵母细胞中, β -微管蛋白形成纺锤体(如箭头所示); B: 2-细胞胚胎中, β -微管蛋白在每个卵裂球中散在分布; C: 4-细胞胚胎中, 每个卵裂球中 β -微管蛋白散在分布, 而在极体中 β -微管蛋白在极体的核周围聚集; D: 桑椹胚中, 卵裂球中 β -微管蛋白在核周围聚集; E: 囊胚中, 有些细胞中 β -微管蛋白在核周围聚集, 在有些细胞中则散在分布; F: 在成熟卵母细胞胞质中, β -微管蛋白参与构成星体微管(如箭头所示)。



图2 γ -微管蛋白在成熟卵母细胞中的分布和形态
红色: 染色体; 绿色: γ -微管蛋白。

2.3 微丝的免疫荧光染色

成熟的小鼠卵母细胞中, 微丝主要分布于卵的表面, 靠近皮层(图 3A)。在 2-细胞胚胎中, 微丝则主要分布在卵裂球沟, 参与构成缢缩环(图 3B); 囊胚阶段胚胎中微丝在每个细胞周围均匀分布(图 3C)。

β -微管蛋白与 α -微管蛋白以二聚体的形式共同构成微管, 是纺锤体的重要组成成分。纺锤体是细胞分裂器, 在卵母细胞成熟和早期胚胎卵裂过程中不可或缺。纺锤体的形态异常往往预示卵母细胞或早期胚胎的质量和发育潜能下降, 如图 4 所示, 退化卵中出现了纺锤体解聚和多极纺锤体。所以纺锤体的

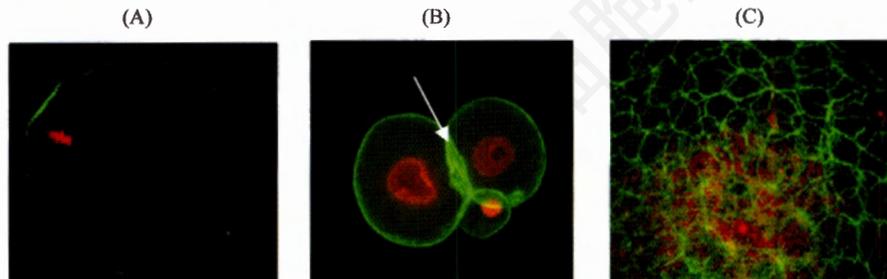


图3 小鼠卵母细胞和早期胚胎中微丝的免疫荧光染色

红色: 染色体; 绿色: 微丝。A: 成熟卵母细胞中微丝主要分布于卵的表面; B: 2-细胞胚胎中, 微丝分布于卵裂沟(如箭头所示); C: 囊胚中微丝在每个细胞周围均匀分布。

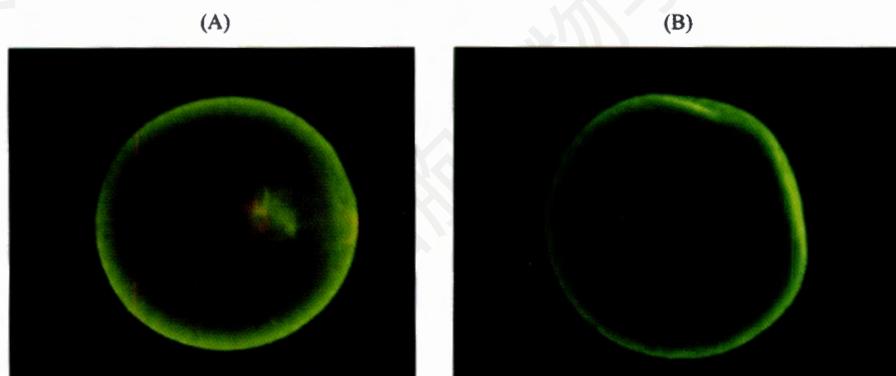


图4 退化卵中的异常纺锤体结构
红色: 染色体; 绿色: β -微管蛋白。A: 纺锤体解聚; B: 出现多极纺锤体。

形态检查也可以作为卵母细胞质量检查的重要指标。

γ -微管蛋白定位于中心体附近, 是卵母细胞微管组装的重要调节因子, 并且是受精卵中心体的组成成分, 而微丝的富集是维持纺锤体位置及迁移的重要因素^[8,9]。小鼠的细胞质中存在着多个星体微管, 用我们的实验程序能够清楚地观察到, 其中有两个星体微管在中心体附近形成, 在核膜的组装过程中发挥着重要的作用^[10]。

3 讨论

激光共聚焦显微镜选用单色和单向性都好的激光作为光源, 可减少对样品的荧光漂白, 较传统显微镜具有不可比拟的优势。显微镜的载物台沿着Z轴方向移动, 可以获得不同光切面上无损伤的图象, 因其研究中的优越性, 近年来的在哺乳动物、尤其是人类卵母细胞和早期胚胎的细胞骨架研究中有逐渐增多的趋势^[11-13], 总结我们的经验, 在应用激光共聚焦显微镜结合免疫荧光研究中需要注意以下几个方面。

3.1 样品的处理

3.1.1 溶液的处理 在整个实验过程中, 一些药品(如BSA和多聚甲醛)中含有杂质颗粒, 样品因为无透明带, 所以很容易粘上这些颗粒, 产生非特异荧光, 所以在使用前有必要使用针头式滤器过滤。

3.1.2 抗体和样品保存 抗体购回后应分装保存, 分装的量视抗体的使用浓度和每次实验样品而定。样品可以在清洗液中于4℃冰箱中保存1周左右。

3.1.3 及时剔除异常样品 在使用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架时, 实验材料的准备非常重要, 首先要在实验之初就将异常的样品(发育迟缓的胚胎、实验过程中粘到了杂质的样品、透明带处理时间过长的样品等)剔除, 以减少实验结果分析判断时

可能产生的误判。

3.1.4 透明带处理 有些研究者认为透明带的去除可以省略, 固定和去透明带的步骤可以互换^[14,15], 我们认为, 为了获得稳定、理想的实验结果, 在最初去除透明带是必要的。在去透明带时操作一定要迅速, 透明带一旦溶解, 马上要移入不含盐酸的CZB-HEPES操作液中清洗, 以免样品被破坏。

3.1.5 封片时注意 封片时适度按压, 可以使观察效果更理想, 压盖玻片时可以按四角有凡士林石蜡小柱的地方, 这样可以保证液体的均匀流动, 便于观察样品的受压状态。

3.1.6 石蜡油的使用 为了节约抗体, 一般温育所使用的液体量较少, 同时为了节约时间, 抗体温育过程一般在37℃下完成。为防止液体蒸发, 实验者往往选择在湿盒中处理, 我们的研究中使用液滴上覆盖液体石蜡油, 这样使液体量很小, 在温育中也可以保证液体不被蒸发, 同时保持抗体浓度的恒定。

3.1.7 其他 在整个实验过程中, 透膜、封闭、一抗处理要严格把握时间和处理溶液的浓度。除封闭紧接一抗外, 其他步骤间都需要严格的清洗, 这样才能保证获得满意的实验结果, 至于清洗的时间, 不同的研究者有很大的差异, 清洗处理的时间越长, 可能效果会更好, 但从经济利用时间的角度来说, 我们认为清洗3次, 每次清洗5 min就可以满足实验的要求。

透膜处理就是提高细胞膜的通透性, 这对于抗体进入卵母细胞或早期胚胎与特异蛋白充分结合非常重要。透膜不理想时可适当提高TritonX-100的浓度(一般使用0.1%~1%)和延长处理时间(一般情况下在37℃下温育30~40 min, 也可在4℃中过夜), 以获得理想的实验结果。

封闭时理论上用与二抗相同的动物血清效果最

佳,但为了实验方便,一般采用牛血清白蛋白,也可以考虑使用其他动物的血清。常用的有山羊血清和胎牛血清等,血清浓度一般为10%。在采取以上封闭仍然出现较高背景时则应考虑使用叠氮化钠和特定的去背景试剂盒。

一抗的浓度由于抗体提供的公司不同,可能略有差异,可在实验中采用不同浓度的一抗进行预试验,以摸索最佳的一抗条件。

由于共聚焦显微镜观察的是荧光,二抗采用荧光标记的抗体,所以在操作过程中一定要注意避光。DABCO是一种防荧光淬灭剂,在封片时将样品置于其中可有效地防止荧光淬灭,延长样品的保存时间。封片时应采用无色的指甲油,以免产生背景荧光。

3.2 PI染色

在PI染色时,有两种方法可以采用,一是在含PI溶液中染色后,经快速清洗后封片;二是将含PI的溶液与样品一同移入防荧光淬灭剂中共同封片^[16]。两种方法都可取得很好的染色效果,但相比较之下,第一种方法应用时不易产生背景荧光,所以应用更为广泛。

3.3 关于图像处理

在观察取图时激光的能量选择要适中,并不是激光越强越好,过强的激光可能掩盖重要的实验信号;光切片的厚度要选择适宜,小鼠的核较大,有十几微米,

所以在扫描时光切片的厚度可以选择2 μm左右,在做其他动物的样本时需要做合理的调整。光切片的合成步骤不可少,经过激光扫描共聚焦三维合成后可以获得目标位置的立体结构,而且经过合成后可以使较弱的荧光信号得到加强,同时注意单张切片和合成图同时保存,以便更详细地对实验信息进行分析。

感谢苏州大学朱子玉老师的大力协助和有益的讨论。

参考文献 (References)

- [1] Matsumoto H *et al.* *J Exp Zool*, 1998, **281**: 149
- [2] Kozłowski C *et al.* *Cell*, 2007, **129**: 499
- [3] Kim NH *et al.* *J Reprod Fertil*, 1997, **111**: 143
- [4] Rawe VY *et al.* *Hum Reprod*, 2006, **21**: 1143
- [5] Meng XQ *et al.* *J Reprod Dev*, 2004, **50**: 97
- [6] Almeida PA *et al.* *Zygote*, 1995, **3**: 357
- [7] Chatzimeletiou K *et al.* *Hum Reprod*, 2005, **20**: 672
- [8] Yao LJ *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**: 1392
- [9] Kim NH *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1996, **43**: 248
- [10] 杨宁等. *科学通报*, 2003, **48**: 1622
- [11] Boiso I *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 1885
- [12] Zucker RM *et al.* *J Histochem Cytochem*, 2000, **48**: 781
- [13] Riparbelli MG *et al.* *Dev Dyn*, 2007, **236**: 662
- [14] 范衡宇等. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**: 900
- [15] Rufas O *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2000, **6**: 163
- [16] 陈亚隽等. *哈尔滨医科大学学报*, 2006, **41**: 196

Studies of Cytoskeleton in Oocytes and Preimplantation Embryos by Confocal Laser Scanning Microscopy

Ying Xu[▲], Qing-Hua Zhang^{1▲}, Na Guan¹, Yan-Ning Xu¹, Xiao-Fei Yan¹, Lei Lei^{1*}

(Department of Anatomy and Histology, College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China;

¹Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract This study systematically introduced the method of cytoskeleton detection in mouse oocytes and preimplantation embryos by confocal laser scanning microscopy and immunofluorescent staining technique. We observed the configuration, distribution and localization of β -tubulin, γ -tubulin, microfilaments and chromosomes in mouse oocytes and preimplantation embryos. We also described some key points and tricks of this technique, and discussed analysis method of the experiment results as well.

Key words confocal laser scanning microscopy; cytoskeleton; oocyte; preimplantation embryos

Received: November 6, 2007 Accepted: January 16, 2008

This work was supported by the Natural Sciences Foundation of China (No.30671025) and the Major Scientific Research Project of the Jiaxing Science and Technology Bureau (No.2007AZ2013)

[▲]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-451-86674518, Fax: 86-451-87503325, E-mail: lei1086@yahoo.com.cn