

斑马鱼原肠胚期的深层细胞与卵黄合胞体层

黄 蓓

(安徽大学生物系 合肥 230039)

摘要 用 Brdu-Anti-Brdu 细胞免疫化学法来标记斑马鱼原肠期处于 S-期分裂球的细胞核,在荧光显微镜下通过对整体鱼卵的观察,清楚地显示出了硬骨鱼所特有的深层细胞及卵黄合胞体层的存在。与 大而圆、相对分散且在迁移中不断分裂的深部细胞相比,外围扁平紧凑的上皮细胞在原肠期开始后的分裂方面的活动则较少,而主要是细胞的伸长增大运动。另外,本实验还证明了卵黄细胞核出现于囊胚晚期,并与非卵黄颗粒的、不参加卵裂的细胞质共同形成多核的卵黄合胞体层,此种状态一直维持到原肠作用的结束。

关键词 斑马鱼、Brdu-Anti-Brdu 免疫细胞化学法、原肠期、深层细胞、卵黄合胞体

深部细胞和卵黄合胞体层是硬骨鱼胚胎发育过程中所特有的,国内对此报道较少。而斑马鱼 (*Brachydanio rerio*, 又称 Zebrafish) 因其具透明卵、发育时间短,易于饲养等优点已成为研究端黄卵胚胎发育模式的很好材料。Kimmel and Law (1985) 等人用 FD、RHRP 等方法对分裂球的谱系 (Cell lineage of blastomers) 进行过分析,但这些方法的不足之处在于较难观察到细胞核的变化情况,而何时进行 DNA 复制却是细胞进行分裂或分化的重要前提条件。

本实验的目的是尝试着用 Brdu 标记处于 S 期细胞核的方法来研究斑马鱼早期胚胎发育中的深部细胞 (Deep cell) 的发生、迁移与卵黄合胞体层 (Yolk syncytial layer) 的形成及在原肠胚期的作用。Brdu-Anti-Brdu 免疫细胞化学法是 Berking, S. 于 1986 年创始的,已在某些低等动物 (如水螅) 和植物中应用。整个操作过程只需 2—3 天。此方法克服了用同位素 H^3 -Thymidin 标记—放射自显影法的不足:如要求一定的射线防护措施、时间较长等等。此方法在鱼类的应用尚无先例,尤其是对多黄卵的早期胚胎因卵黄颗粒的存在而困难较大。作者在固定剂方面作了较大的改进。

1 材料与方 法

1.1 动物的来源及饲养 斑马鱼为鲤科 (*Cyprinidae*, *Teleostei*) 热带和亚热带鱼的代表动物,原产地为巴基斯坦及印度,后培养成为室内观赏鱼。斑马鱼的成体由鱼店买来后按其性别分离饲养于 26℃ 的水族箱内,昼夜光照比为 14 : 10 小时,定时喂以市售的鱼饵外加咸水丰年幼虫 (*Artemia salina*),虫卵购于动物食品店 ((Dohse-Aqueistik, Auf der Kaiserfuhr 39, 5300 Bonn-Lengsdorf), 德国) 放入海水或自制咸水中通气培养。咸水的配方为: 37g NaCl, 0.2g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ + 7mg Na_2EDTA 溶于 1000ml 的水中。直到雌雄体强壮到足以产健康的卵后,把一雌三雄放在装有产卵盒的水簇箱内,产卵盒为 15cm × 10cm × 2cm 长方体有机玻璃盒,盒盖用铜网做成,其上可插些水草来招引鱼儿。次日清晨 6—7 时产卵,每条雌鱼约产 100—200 个卵,直径约 1mm。从受精卵发育成可游动的鱼苗只需 4 天,且全年皆可产卵。

1.2 抗体及 Brdu 来源 Brdu 及初级抗体购于 (Becton-Dickinson, 德国)。次级抗体 Anti-Mouse IgG, FITC 购于 (Milers, Bayer Diagnostetics, 德国。)

1.3 Brdu-Anti-Brdu 免疫细胞化学法 下面所介绍的方法能够清楚地显示出在某一指定的时刻处于 S-期的细胞核。因为 Brdu 可在合成新的核苷酸链过程中取代 Thymidin, 结合上 Brdu 的核苷酸片断可用 Anti-Brdu 初级抗体识别, 再通过连接异硫氰酸荧光素 FITC 的次级抗体 (Brdu-Anti-Mouse IgG, FITC), 最后在荧光显微镜下观察其结果。由于 Brdu 为潜在的致癌剂, 操作时应带上防护手套。

1.3.1 在解剖镜下用眼科镊子小心去掉鱼卵外层透明亮膜后, 放入 500 μ mol/L Brdu 中培养 1 小时, 换上新鲜培养液。

1.3.2 放入固定剂中固定 12 小时以上。

2%多聚甲醛 (Paraformaldehyde)

3%戊二醛 (glutaraldehyde)

0.05%丙烯醛 (acrolein)

0.5%二甲亚砜 (dimethylsulfoxide)

2m mol/L 氯化钙 (CaCl₂)

0.1mol/L 二甲胍酸钠-盐酸 (Sodium

Cacody late-HCl) pH = 7.0。

1.3.3 在 0.1mol/L 二甲胍酸钠-盐酸缓冲液中清洗 2 小时或过夜。

1.3.4 甘油中清洗 2 小时。

1.3.5 在 2N 盐酸中培养 30 分钟。

1.3.6 PBS-Triton 液中清洗 1—2 小时。

0.13mol/L NaCl, 0.1mol/L Na₂HPO₄

0.026mol/L KCl, 0.25% Triton-X

1.3.7 把鱼卵放入 Anti-Brdu 初级抗体稀释液中 (1:25 溶于 0.25% HSA-Triton-PBS) 培养 12 小时以上 (0℃)。

1.3.8 换上 PBS-0.25% Triton 液清洗 3 小时。

1.3.9 在次级抗体稀释液中培养 2 小时。

Brdu-Anti-Mause IgG, FITC 以 1:40 稀释于 0.25% HSA-Triton-PBS 液。

1.3.10 放入 PBS-0.25% Triton 液中反复清洗 1 小时。

1.3.11 在 0.5%伊文兰-PBS-Triton 液中染色 7 分钟。

1.3.12 用吸管小心地把鱼卵放到干净的载玻

片上, 用滤纸吸走多余的水分, 加一滴 PBS-Glycerin DABCO 混合液 (1+9 PBS/Glycerin; 加入 25mg/ml 1, 4 Diazabicyclol 2, 2, 2), 盖上盖玻片, 拿到荧光显微镜下观察 (Zeiss IM35, BP450—490, FT510, LP520)。

2 结果与分析

根据 Kimmel and Law (1985) 的研究得知: 深部细胞及卵黄细胞核发生于囊胚晚期 (Late blastula stage), 原肠期开始之前。因此, 作者选择了发育 4.5 小时至 10 小时之间的鱼胚作为研究对象。尽管由于卵黄颗粒易染上荧光素而给观察带来了不便, 但还是得出了一些令人满意的结果: 图 1(a) 为图 1(b) 上半部分的实物照片, 图 1(b) 为图 1(a) 的整体图解。把发育到囊胚晚期的鱼卵 (约 4.5 小时以后) 在 Brdu 液中培养 1.5 小时后固定, 即原肠期开始初期 (6 小时) 固定。由于鱼卵有一定的厚度, 图 1(a) 所显示的只是某一个焦距下处于 S 期的细胞核图, 随着荧光显微镜焦距的改变可见处于不同深度层次的细胞核。图 1(a) 中大而圆的清晰亮点为深层细胞的细胞核, 下面一大片亮区为植物极的卵黄。界于两片亮区之间较暗的部分为扁平的边缘胚周区细胞 (marginal periblast)。图 1(b) 还显示了边缘胚周区以下的一些细胞核, 即卵黄细胞核。左右两旁的卵黄细胞核还顺着细胞质流相连。图 2(a) 为发育至 9 小时的原肠胚后期卵黄合胞体层 (Yolk syncytium), 图 2(b) 为其整体观图解。图中清楚地表明卵黄细胞是多核的, 并由非卵黄颗粒的, 处于中心部位的细胞质参与共同形成卵黄合胞体。围绕合胞体层外的是卵黄颗粒, 其边缘为正在形成中的卵黄细胞。

在硬骨鱼胚胎发育早期出现了三种不同类型的分裂球: 较厚的外胚层上皮细胞、藏在外胚层上皮细胞里面的深层细胞及卵黄合胞体层 (Armstrang 1965, Ballard 1973, Luther 1966, Wourms 1972)。其中, 外胚层上皮细胞与卵黄

合胞体层沿经线朝植物极方向移动,而处于它们两层之间的深层细胞先沿纬线集中后再向胚后方位迁移(Trinkaus 1973)。本实验结果明确了以下几个问题:(1) 卵黄细胞核是由囊胚晚期的边缘胚周区细胞产生的,并经细胞质通道向卵黄方向释放(图 1(b))。而这种由细胞质不完全卵裂所形成的胚胎与卵黄间的细胞质联系在第 10 次卵裂后便消失(Kimmel and Law 1985)。(2) 释放后的卵黄细胞核通过核的有丝分裂而不断增殖(图 1(b)所示),然后与非卵黄颗粒的,不参加卵裂的细胞质共同形成

多核的卵黄合胞体层(图 2(b)所示, Betehaku and Trinkaus 1978)。(3) 直到原口封闭之前,卵黄合胞体层仍然存在(图 2(b)),可见其在原肠期的作用是不容忽视的。(4) 也是在囊胚晚期出现的由外层细胞向囊胚腔内所产生的深层细胞则大而分散,它们是以后器官发生的主要前体(Heinig 1975),在边缘胚外周区上方集中的深部细胞有向动物极边缘移动的趋势(图 1(b)所示)。与迁移中增殖的深部细胞相比,周围较暗的外层上皮细胞却未见 DNA 复制的迹象(图 1(a)所示)。

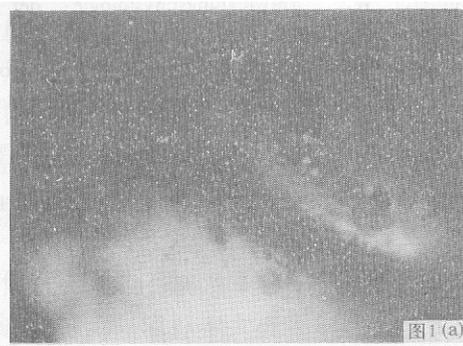


图 1(a) 原肠胚初期(6 小时)深部细胞及边缘外周区

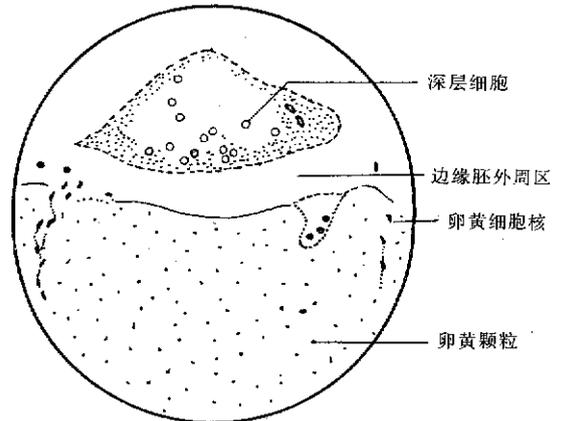


图 1(b) 原肠胚初期(6 小时)整体观图解

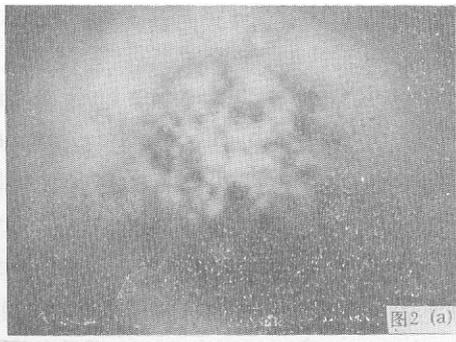


图 2(a) 原肠胚后期(9 小时)的卵黄合胞体层

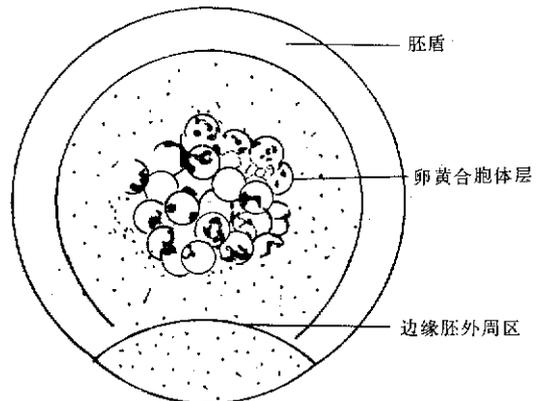


图 2(b) 原肠胚后期(9 小时)整体观图解

1cm 相当于 0.125mm 实际长度

以上的观察表明, Brdu-Anti-Brdu 细胞

免疫化学法在鱼类是可行的。只是由于早期鱼

胚(24小时以前)的卵黄具一定的厚度,且深层细胞及卵黄合胞体层都处在外层上皮细胞内层,给观察带来一些不便,而对于中后期的鱼胚(24小时以后)所显示的效果会更佳(如图3所示)。此外,由于此方法的成功率较低(重复10次,成功5次),它在细节上还有待于进一步改进。



图3 示发育至48小时鱼胚尾部中段,用BrdU-Anti-BrdU法显示处3S-期的细胞核

参 考 文 献

- 1 Armstrong, P. B. et. al. Stage in the normal development of fundulus heteroclitus. *Biol. Bull.* 1965, **128**: 143—168
- 2 Ballard, W.W. Normal embryonic stages for Salmonid fishes, based on salmo gairdneri Richardson and Salvelinus fontinalis. *J. exp. zool.* 1973, **184**: 7—26.
- 3 Berking, S. Transmethylation and control of pattern formation in hydrozoa. *Differentiation.* 1986, **32**: 10—16.
- 4 Betchaku, T., and J.P. Trinkaus. Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of the yolk syncytical and yolk cytoplasmic layers of Fundulus before and during epiboly. *J. exp. zool.* 1978, **206**: 381—426.
- 5 Heinig, S. Epiplatys dageti (cyprinodontidae)—Embryonal entwicklung: Epibolie. Film E 2148 des Inst. Wiss. Film, Gottingen 1975.
- 6 Kimmel, C. B., and R.D. Law Cell lineage of zebrafish blastomers. *Dev. Biol.* 1985, **108**: 78—108.
- 7 Luther, W. Entwicklungsphysiologie der Fische. Fortschritte der Zoologie 1966, **17**: 313—340.
- 8 Trinkaus, J.P. Surface activity and locomotion of Fundulus deep cells during blastula and gastrula stages. *Dev. Biol.* 1973, **30**: 68—103.
- 9 Wourms, J.P. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomers during the development of annual fish eggs. *J. exp. zool.* 1972, **182**: 169—200

DEEP CELL AND YOLKSYNCYTIUMS IN THE GASTRULA STAGE OF ZEBRAFISH

HUANG Bei

(Department of Biology, Anhui University Hefei 230039)

ABSTRACT In the blastula of teleost eggs, the marginal cell nuclei of the enveloping layer enter the uncleaved cytoplasm of yolk through blastomeres bridge, which is builded by incomplete cleavage between 9th and 10th divisions, and forms a multinucleate yolk layer, the yolk syncytial layer. Gastrula possesses two types of cells, epithelial cells, that form a flat, tightly joined, surface epithelium and more loosely associated deep cells underlying this epithelium. Deep cells both migrated and divided more frequently than epithelial cells. BrdU labelled nuclei in S-phase by BrdU-anti-BrdU immocytochemical method showed clearly the presence of deep cells and yolk syncytium in the gastrula stage of Zebrafish.

Key words Zebrafish BrdU-anti-BrdU immocytochemical method Deep cell Yolk syncytium Gastrula stage