

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 21/64 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810138849.X

[43] 公开日 2010年2月3日

[11] 公开号 CN 101639441A

[22] 申请日 2008.8.1

[21] 申请号 200810138849.X

[71] 申请人 中国科学院海洋研究所

地址 266071 山东省青岛市南海路7号

[72] 发明人 阙华勇 张国范

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司

代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

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

[57] 摘要

本发明涉及细胞化学及细胞免疫学，具体应用于免疫荧光显微观察海水双壳类减数分裂器。本发明将样品经固定等预处理、染色、制片后即可观察，将样品采用质量百分比浓度2-6%多聚甲醛的磷酸缓冲液(PBS)固定，再依次进行透化和封闭处理，而后对样品纺锤体进行免疫荧光染色而后用含5-20mg/L碘化丙锭的磷酸缓冲液对染色体进行荧光染色；染色后将样品制片即可在荧光显微下观察。本发明适用于同步观测海水双壳类减数分裂器的纺锤体和染色体，具有操作简捷、清晰度高、研究效率高的优点，是一种综合定性、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。

1. 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，将样品经固定等预处理、染色、制片后即可观察，其特征在于：将样品采用质量百分比浓度 2-6%多聚甲醛的磷酸缓冲液（PBS）固定，再依次进行透化和封闭处理，而后对样品纺锤体进行免疫荧光染色而后用含 5-20 mg/L 碘化丙锭的磷酸缓冲液对染色体进行荧光染色；染色后将样品制片即可在荧光显微下观察。

2. 按权利要求 1 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：将样品经固定液固定 30-60 min，转入孵育液中透化 30-60 min，采用封闭液处理 30-60 min；所述孵育液为体积百分比浓度 0.5-1%的聚乙二醇辛基苯基醚的 PBS；所述封闭液为 1-5%小牛血清白蛋白的 PBS。

3. 按权利要求 1 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：样品的染色依次采用免疫荧光染色剂对纺锤体处理 40-60 min 和荧光染色剂对染色体处理 10 min，采用 PBS 处理 5-20 min，所述免疫荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体与 PBS 按体积比 1:1000-5000 配制。

4. 按权利要求 1、2 或 3 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：所述 PBS 缓冲溶液浓度为 0.2 mol/L，pH 7.4。

5. 按权利要求 1 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：染色后样品转移到载玻片，加入防荧光淬灭剂，封片，制成观察制片，在 -20℃ 避光条件下可保存 2 周；所述防荧光淬灭剂为体积百分比浓度 1-4% DABCO 的甘油溶液。

6. 按权利要求 1 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：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，采用 FITC 对应的滤光片，观察分辨纺锤体和染色体的形态、位置和数量。

7. 按权利要求 1 所述的用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，其特征在于：所述样品包括各种海水双壳类的未受精卵及受精卵。

## 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

### 技术领域

本发明涉及细胞化学及细胞免疫学，具体是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。

### 背景技术

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。此外在广泛开展的贝类杂交育种研究中，其受精过程的观察和受精机制的研究是必要的组成部份。

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。近年来，利用免疫细胞化学技术结合荧光显微观察，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。

在海水双壳类中开展的大量受精生物学研究表明绝大部分的海水双壳类为卵生型，雌雄配子被排放到海水中完成受精过程。排放的卵子处于第一次减数分裂前期（生发泡期）或中期。精子入卵后，受精卵恢复减数分裂，形成减数分裂器（包括减数分裂纺锤体和染色体），伴随减数分裂过程，纺锤体和染色体发生一系列动态变化，形成雌雄原核并最终启动卵裂。

目前，对受精过程的染色体动态研究采用了各种染色方法，包括采用常规碱性染料（地衣红、苏木精等）在普通光学显微镜下观察了长牡蛎、栉孔扇贝的染色体行为，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，但限于荧光强度有限，对比度较低，无法定量研究染色体。前者虽然清晰度高，但其样品处理决定了只能适用于可见光显微观察，无法开展荧光显微观察。上述技术方法均无法揭示纺锤体的动态。

迄今国内外仅有一个关于利用荧光染色的方法观察长牡蛎 *Crassostrea gigas* 减数分裂纺锤体形态的报道。该研究采用免疫荧光间接法，第一步用鼠抗 $\beta$ 微管蛋白抗体标记样品的微管，第二步用荧光素（FITC）标记的羊抗鼠抗体与第一抗体结合反应。免疫荧光间接法步骤较多，容易引起非特

异性染色。由于其局限性，该方法未能得到推广应用。

综上所述，已报道的海水双壳类受精生物学研究所应用的荧光染色方法多是对减数分裂器的一部分（纺锤体或染色体）进行观察，割裂了减数分裂的生物学过程，无法揭示纺锤体和染色体的相互作用，妨碍了对受精机理研究的进一步深入。在广泛借鉴动物细胞骨架免疫荧光显微研究技术的基础上，本发明提供了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，实现了同步观察减数分裂过程中的纺锤体和染色体动态，特异性强，清晰度高，突破了海水双壳类受精生物学研究的技术瓶颈，显著提高了研究效率。

### 发明内容

本发明的目的是提供了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。

为了实现上述目的，本发明所采用的技术方案如下：

用于海水双壳类减数分裂器的免疫荧光显微观察方法，将样品经固定等预处理、染色、制片后即可观察，将样品采用质量百分比浓度 2-6% 多聚甲醛的磷酸缓冲液（PBS）固定，再依次进行透化和封闭处理，而后对样品纺锤体进行免疫荧光染色而后用含 5-20 mg/L 碘化丙锭的磷酸缓冲液对染色体进行荧光染色；染色后将样品制片即可在荧光显微下观察。

将样品经固定液固定 30-60 min，转入孵育液中透化 30-60 min，采用封闭液处理 30-60 min；所述孵育液为体积百分比浓度 0.5-1% 的聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）的 PBS；所述封闭液为 1-5% 小牛血清白蛋白（BSA）的 PBS。样品的染色依次采用免疫荧光染色剂对纺锤体处理 40-60 min 和荧光染色剂对染色体处理 10 min，采用 PBS 处理 5-20 min，所述免疫荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素（FITC）偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体（FITC-anti- $\alpha$ -tubulin）与 PBS 按体积比 1:1000-5000 配制。所述 PBS 缓冲溶液浓度为 0.2 mol/L，pH 7.4。染色后样品转移到载玻片，加入防荧光淬灭剂，封片，制成观察制片，在 -20℃ 避光条件下可保存 2 周；所述防荧光淬灭剂为体积百分比浓度 1-4% DABCO 的甘油溶液。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，采用 FITC 对应的滤光片，观察分辨纺锤体和染色体的形态、位置和数量。所述样品包括各种海水双壳类的未受精卵及受精卵。

本发明具有如下优点：

1. 操作简捷。本发明方法为直接免疫荧光法，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。

2. 清晰度高。本发明方法中样品的制备方法有效降低了非特异性荧光，采用的荧光染料特异性强，利用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜观察，可满足定位和定量研究纺锤体和染色体的要求。

3. 研究效率高。本发明方法可以批量制备海水双壳类样品，批量观察

受精卵发育过程中减数分裂器动态，显著提高海水双壳类受精生物学研究效率。

综上，本发明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。

### 具体实施方式

以下实施例并不局限在本发明中。

#### 实施例 1

利用本发明方法，进行长牡蛎受精卵减数分裂器免疫荧光显微观察，具体操作为：

1) 采用孔径为 25  $\mu\text{m}$  的筛绢过滤，去除大部分的海水，获取牡蛎特定发育阶段的受精卵 10000 个左右，盛于 1.5 mL 离心管，以 2000 rpm 离心 4 min，去除上清的海水；加入约 1 mL 固定液 10 min 后，以 2000 rpm 离心 4 min，去上清，收集受精卵，而后加入 1 mL 固定液中固定 30 min，待用。所述固定液为 2% 多聚甲醛的磷酸缓冲液。

2) 取 60 粒左右受精卵转入孵育液中透化处理 30min；所述孵育液为体积百分比浓度 0.5% 的聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）的 PBS 溶液。

3) 弃掉孵育液，将受精卵转入封闭液中处理 40 min；所述封闭液为 PBS 中加入质量比 1% 的小牛血清白蛋白。

4) 将受精卵转入微管荧光染色剂中，处理 40 min；再以 PBS 清洗受精卵 5 min；所述微管荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素（FITC）偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体（FITC-anti- $\alpha$ -tubulin）与 PBS 按体积比 1:3000 配制。

5) 将受精卵转入所述染色体荧光染色剂处理 10 min；以 PBS 清洗受精卵 2 次，每次 5 min；所述染色体荧光染色剂为 PBS 配制的 5 mg/L 碘化丙锭（PI）。

6) 载玻片上滴一滴防荧光淬灭剂，将卵子转移到防荧光淬灭剂中，加盖玻片，盖玻片四周以树脂封片；所述防荧光淬灭剂为体积百分比浓度 1% DABCO 的甘油。

7) 将制片置于荧光显微镜下，采用紫外光作为荧光的激发光，观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体； $-20^{\circ}\text{C}$  下保存的制片，2 周内可进行减数分裂器的观察；荧光染色、洗卵、显微观察、保存制片应在黑暗环境下进行，避免荧光淬灭。

所述 PBS 缓冲溶液浓度为 0.2 mol/L，pH 7.4。

#### 实施例 2

与实施例 1 不同之处在于：进行栉孔扇贝受精卵有丝分裂器免疫荧光显微观察，具体操作为：

1) 采用孔径为 30  $\mu\text{m}$  的筛绢过滤，去除大部分的海水，获取栉孔扇贝特定发育阶段的受精卵 8000 个左右，盛于 1.5 mL 离心管，以 1000 rpm 离心 5 min，去除上清的海水；加入约 1 mL 固定液 10 min 后，以 1000 rpm 离

心 5 min, 去上清收集受精卵, 而后加入 1 mL 固定液中固定 60 min, 待用。所述固定液为 4%多聚甲醛的磷酸缓冲液。

2) 取 30 粒左右受精卵, 转入孵育液中透化处理 40 min; 所述孵育液为体积百分比浓度 1%的聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 的 PBS 溶液。

3) 弃掉孵育液, 将受精卵转入封闭液中处理 60 min, 所述封闭液为 PBS 中加入质量比 3%的小牛血清白蛋白。

4) 将受精卵转入微管荧光染色剂中, 处理 60 min; 再以 PBS 清洗受精卵 10min; 所述微管荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体 (FITC-anti- $\alpha$ -tubulin) 与 PBS 按体积比 1:5000 配制。

5) 将受精卵转入所述染色体荧光染色剂处理 10 min; 以 PBS 清洗受精卵 3 次, 每次 5 min; 所述染色体荧光染色剂为 PBS 配制的 10 mg/L 碘化丙锭 (PI)。

6) 载玻片上滴一滴封片剂将卵子转移到防荧光淬灭剂中, 加盖玻片, 盖玻片四周以树脂封片; 所述防荧光淬灭剂为体积百分比浓度 4% DABCO 的甘油。

7) 将制片置于激光扫描共聚焦显微镜下, 采用紫外光作为荧光的激发光, 观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体;  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存的制片, 2 周内可进行减数分裂器的观察; 荧光染色、洗卵、显微观察、保存制片应在黑暗环境下进行, 避免荧光淬灭。

### 实施例 3

与实施例 1 不同之处在于: 进行菲律宾蛤仔受精卵有丝分裂器免疫荧光显微观察, 具体操作为:

1) 采用孔径为 30  $\mu\text{m}$  的筛绢过滤, 去除大部分的海水, 获取特定发育阶段的菲律宾蛤仔受精卵 5000 个左右, 盛于 1.5 mL 离心管, 以 1000 rpm 离心 5 min, 去除上清的海水; 加入约 1 mL 固定液 10 min 后, 以 1000 rpm 离心 5 min, 去上清收集受精卵, 而后加入 1 mL 固定液中固定 50min, 待用。所述固定液为 6%多聚甲醛的磷酸缓冲液。

2) 取 40 粒左右受精卵, 孵育液透化处理 60 min, 所述孵育液为体积百分比浓度 0.8%的聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 的 PBS 溶液。

3) 弃掉孵育液, 受精卵转入封闭液中处理 60 min; 所述封闭液为每 10mL PBS 中加入 500mg 小牛血清白蛋白。

4) 将受精卵转入微管荧光染色剂中, 处理 50 min; 再以 PBS 清洗受精卵 8min; 所述微管荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体 (FITC-anti- $\alpha$ -tubulin) 与 PBS 按体积比 1:2000 配制。

5) 将受精卵转入所述染色体荧光染色剂处理 10 min; 以 PBS 清洗受精卵 2 次, 每次 5 min; 所述染色体荧光染色剂为 PBS 配制的 10 mg/L 碘化丙锭 (PI)。

6) 载玻片上滴一滴封片剂将卵子转移到防荧光淬灭剂中, 加盖玻片,

盖玻片四周以树脂封片；所述防荧光淬灭剂按体积百分比为含 3% DABCO 的甘油。

7) 将制片置于荧光显微镜下，采用紫外光作为荧光的激发光，观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体；-20℃下保存的制片，2 周内可进行减数分裂器的观察；荧光染色、洗卵、显微观察、保存制片应在黑暗环境下进行，避免荧光淬灭。

#### 实施例 4

与实施例 1 不同之处在于：进行硬壳蛤受精卵有丝分裂器免疫荧光显微观察，具体操作为：

1) 采用孔径为 30 μm 的筛绢过滤，去除大部分的海水，获取特定发育阶段的硬壳蛤受精卵 5000 个左右，盛于 1.5 mL 离心管，以 1000 rpm 离心 4 min，去除上清的海水；加入约 1 mL 固定液 10 min 后，以 1000 rpm 离心 4min，去上清收集受精卵，而后加入 1 mL 固定液中固定 45min，待用。所述固定液为 5%多聚甲醛的磷酸缓冲液。

2) 取 30 粒左右受精卵，孵育液透化处理 45min，所述孵育液为体积百分比浓度 0.6%的聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 的 PBS 溶液。

3) 弃掉孵育液受精卵转入封闭液中处理 50 min；所述封闭液为每 10mL PBS 中加入 400mg 小牛血清白蛋白。

4) 将受精卵转入微管荧光染色剂中，处理 45 min；再以 PBS 清洗受精卵 6min；所述微管荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的抗 α 微管蛋白抗体 (FITC-anti-α-tubulin) 与 PBS 按体积比 1:4000 配制。

5) 将受精卵转入所述染色体荧光染色剂处理 10 min；以 PBS 清洗受精卵 2 次，每次 5 min；所述染色体荧光染色剂为 PBS 配制的 20 mg/L 碘化丙锭 (PI)。

6) 载玻片上滴一滴封片剂将卵子转移到防荧光淬灭剂中，加盖玻片，盖玻片四周以树脂封片；所述防荧光淬灭剂按体积百分比为含 4% DABCO 的甘油。

7) 将制片置于荧光显微镜下，采用紫外光作为荧光的激发光，观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体；-20℃下保存的制片，2 周内可进行减数分裂器的观察；荧光染色、洗卵、显微观察、保存制片应在黑暗环境下进行，避免荧光淬灭。

#### 实施例 5

与实施例 1 不同之处在于，进行海湾扇贝受精卵有丝分裂器免疫荧光显微观察，具体操作为：

1) 采用孔径为 30 μm 的筛绢过滤，去除大部分的海水，获取海湾扇贝特定发育阶段的受精卵 8000 个左右，盛于 1.5 mL 离心管，以 1000 rpm 离心 4 min，去除上清的海水；加入约 1 mL 固定液 10 min 后，以 1000 rpm 离心 4min，去上清收集受精卵，而后加入 1 mL 固定液中固定 55min，待用；

所述固定液为 3%多聚甲醛的磷酸缓冲液。。

2) 取 40 粒左右受精卵, 孵育液透化处理 55min; 所述孵育液为体积百分比浓度 0.7%的聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 的 PBS 溶液。

3) 弃掉孵育液, 将受精卵转入封闭液中处理 55 min, 所述封闭液为每 10mL PBS 中加入 500mg 小牛血清白蛋白。

4) 将受精卵转入微管荧光染色剂中, 处理 55 min; 再以 PBS 清洗受精卵 7min; 所述微管荧光染色剂是由异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的抗  $\alpha$  微管蛋白抗体 (FITC-anti- $\alpha$ -tubulin) 与 PBS 按体积比 1:1000 配制。

5) 将受精卵转入所述染色体荧光染色剂处理 10 min; 以 PBS 清洗受精卵 2 次, 每次 5 min; 所述染色体荧光染色剂为 PBS 配制的 15 mg/L 碘化丙锭 (PI)。

6) 载玻片上滴一滴封片剂将卵子转移到防荧光淬灭剂中, 加盖玻片, 盖玻片四周以树脂封片; 所述防荧光淬灭剂按体积百分比为含 4% DABCO 的甘油。

7) 将制片置于激光扫描共聚焦显微镜下, 采用紫外光作为荧光的激发光, 观察构成减数分裂器的纺锤体和染色体;  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存的制片, 2 周内可进行减数分裂器的观察; 荧光染色、洗卵、显微观察、保存制片应在黑暗环境下进行, 避免荧光淬灭。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 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                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101639441A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-02-03 |
| 申请号            | CN200810138849.X                               | 申请日     | 2008-08-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国科学院海洋研究所                                     |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国科学院海洋研究所                                     |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国科学院海洋研究所                                     |         |            |
| [标]发明人         | 阙华勇<br>张国范                                     |         |            |
| 发明人            | 阙华勇<br>张国范                                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N21/64 G01N33/53                            |         |            |
| 代理人(译)         | 许宗富<br>周秀梅                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及细胞化学及细胞免疫学，具体应用于免疫荧光显微观察海水双壳类减数分裂器。本发明将样品经固定等预处理、染色、制片后即可观察，将样品采用质量百分比浓度2 - 6%多聚甲醛的磷酸缓冲液(PBS)固定，再依次进行透化和封闭处理，而后对样品纺锤体进行免疫荧光染色而后用含5 - 20mg/L碘化丙锭的磷酸缓冲液对染色体进行荧光染色；染色后将样品制片即可在荧光显微下观察。本发明适用于同步观测海水双壳类减数分裂器的纺锤体和染色体，具有操作简捷、清晰度高、研究效率高的优点，是一种综合定性、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。