



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103364570 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201310332662. 4

审查员 周露露

(22) 申请日 2013. 08. 02

(73) 专利权人 青岛农业大学

地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路
700 号

(72) 发明人 朱香萍 林正美 尤锋 吴志昊

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有
限公司 37101

代理人 王晓晓

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

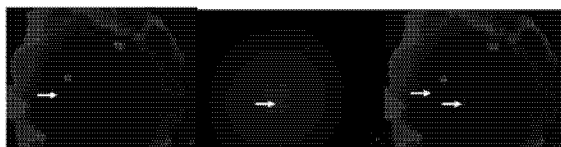
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的
荧光双标记的显微观察方法

(57) 摘要

本发明公开了一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,首先将未去膜的受精卵进行固定,然后用解剖针将固定后受精卵的胚盘从整个胚胎中剥离出来,对剥离出来的胚盘进行打孔处理,并用硼氢化钠降低或消除未结合的醛基对实验结果的影响,再对样品进行封闭及荧光双标记染色,最后用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜对样品进行观察。该发明的优点是对样品要求粗放,操作过程简单,便于观察,结果清晰度高,立体感强,可用于鲆鲽鱼类受精卵从胚盘形成到 2- 细胞、4- 细胞、8- 细胞等发育时期的微管骨架和细胞核的动态变化研究,同时也适用于类似海水鲆鲽鱼类受精卵的其他较大的端黄卵,适用范围广泛。



1. 一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在于它包括以下步骤:

(1) 将海水鲆鲽鱼类受精卵置于甲醛-戊二醛固定液中室温抚育 3-6 小时,直接用磷酸吐温缓冲溶液置换相应 $\frac{3}{4}$ - $\frac{4}{5}$ 体积的甲醛-戊二醛固定液,并于 4℃ 保存,待用;

(2) 在解剖镜下挑选出发育状态较正常的受精卵,并用解剖针将胚盘从整个受精卵中剥离出来;

(3) 用 Triton-100 对样品进行打孔处理,温度为 25-30℃,浓度为 4-5%,处理时间为 10-12 小时,再用 NaBH₄ 溶液抚育样品三次,每次不超过半小时;所述 NaBH₄ 溶液为 50% 乙醇配制的 2.5mg/L 溶液;

(4) 采用改进的间接免疫荧光标记方法步骤对样品进行标记,间接免疫荧光标记的基本步骤为:封闭→抚育一抗→清洗→抚育二抗→清洗,具体过程如下:

封闭:在室温下用封闭液对样本封闭处理 1-2 小时,所述封闭液为 PBS+0.1% Tween-20+1%DMSO+10% 山羊血清;

抚育一抗:先用抗体稀释液将单克隆鼠抗 α-微管蛋白进行稀释制成一抗悬浮液,然后将封闭后的样品在一抗悬浮液中 4℃ 抚育过夜,所述抗体稀释液为含有浓度百分比为 10% 的山羊血清和 5% 的二甲亚砜(DMSO)的 Tris 盐酸缓冲液;

清洗:将样品用清洗液清洗 3-4 次,每次 10 分钟,所述清洗液为 PBS+0.1% Tween-20;

抚育二抗:用所述抗体稀释液将 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG 进行稀释,制成二抗抚育液,同时加入 DNA 荧光染料 DAPI,然后在避光条件下将样品室温抚育 0.5-1 小时,再用清洗液清洗 5-6 次,每次 10 分钟;

(5) 制作胚胎整装片,用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜进行观察拍照;制作胚胎整装片时加入抗荧光淬灭剂,盖上盖玻片,用指甲油封片,使荧光信号更强,保存时间更持久。

2. 根据权利要求 1 所述的一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在於:所述步骤(1)中固定的受精卵未进行去膜处理。

3. 根据权利要求 1 所述的一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在於:所述步骤(1)中使用的甲醛-戊二醛固定液配方为:80 mM K-PIPES, 5 mM EGTA, 100 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 3.7% 甲醛、0.25% 戊二醛和 0.5% Triton X-100。

4. 根据权利要求 1 所述的一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在於:所述步骤(1)中磷酸吐温缓冲溶液的组分为:128 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH 7.2。

5. 根据权利要求 1 所述的一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在於:所述步骤(4)中用抗体稀释液将单克隆鼠抗 α-微管蛋白进行稀释,稀释比例为 1:500-1000。

6. 根据权利要求 1 所述的一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,其特征在於:所述步骤(4)中用抗体稀释液将 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG 进行稀释的比例为 1:250-500;加入的 DNA 荧光染料中 DAPI 占总体积的比例

为 1 :10000-100000。

一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记 的显微观察方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫细胞化学技术和荧光显微技术,具体涉及一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法。

背景技术

[0002] 免疫细胞化学是根据免疫学原理,利用抗体同特定抗原结合对抗原进行专一定位测定的技术。如果将抗体结合上标记物,再与组织中的抗原发生反应,即可在光镜或电镜下显示出该抗原存在于组织中的部位。因此,该技术是将免疫学中抗原、抗体以及补体间专一性反应结合显微或亚显微组织学的一些研究方法的统称,是免疫学原理与光镜或电镜技术的结合。荧光显微技术是利用特异性的荧光染料与细胞内特定成分结合后能够呈现一定颜色的荧光,然后在荧光显微镜下观察该细胞成分在细胞中的定位与分布情况。荧光双标记显微观察技术是指利用荧光标记技术同时标记细胞内两种生物大分子的技术方法。荧光双标记显微观察技术在卵细胞骨架和细胞核方面的应用研究在哺乳动物方面较多,主要集中于鼠、猪、兔等。在果蝇和爪蟾(Xenopus)方面也有相关报道。在海洋生物卵细胞骨架和细胞核方面的应用主要集中于海胆、海参、和对虾等方面。荧光双标记显微观察技术在鱼类卵细胞骨架和细胞核方面的应用研究较少,目前仅见青蒋(Abraham等,1995)和斑马鱼(Suresh等,1996;Karen W. Lee等,2004;Robin E. Lindeman等,2012)等淡水鱼,在海水鱼卵细胞骨架和细胞核方面的应用研究至今未见报道。

[0003] 由于受精卵微管蛋白分子的免疫荧光标记技术是利用抗原-抗体特异性反应来进行的,所以该标记技术在卵细胞方面的应用,均需先将卵膜去掉,以便于相应的微管蛋白大分子抗体进入卵细胞内部与相应抗原结合,再进行标记和显微观察。上述已报道的利用荧光双标记显微观察技术研究受精卵细胞骨架和细胞核的相关研究均为先将卵膜去掉,再进行固定、荧光标记和显微观察。海水鲆鲽鱼类受精后,原生质在受精卵动物极形成较扁且薄的圆盘状胚盘,原生质较致密;而且受精膜薄而坚韧,其与卵黄膜之间的卵周隙窄小几乎不可见。很难将活着的海水鲆鲽鱼类受精卵的受精膜去掉,再将去膜的受精卵进行固定。因此,已报道的常规均黄受精卵(哺乳动物)早期胚胎发育过程中微管蛋白和DNA的荧光双标记显微观察技术方法在海水鲆鲽鱼类受精卵方面的应用受到限制,需要建立一种海水鲆鲽鱼类受精卵早期胚胎发育过程中微管蛋白和DNA的荧光双标记显微观察方法。

发明内容

[0004] 针对上述荧光双标记显微观察技术在海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核方面的应用限制,本发明提供了一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,该方法是先用固定液对样品进行固定,再在普通解剖镜下挑选出发育状态较正常的受精卵,用尖头镊子将胚盘从整个受精卵中剥离出来,然后再进行打孔、封闭和荧光双标记,最后用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜观察拍照。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用下述技术方案予以实现:

[0006] 一种海水鲑鳟鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法,它包括以下步骤:

[0007] (1) 将海水鲑鳟鱼类受精卵置于甲醛-戊二醛固定液中室温抚育 3-6 小时,直接用磷酸吐温缓冲溶液置换相应 $\frac{3}{4}$ - $\frac{4}{5}$ 体积的甲醛-戊二醛固定液,并于 4℃ 保存,待用;

[0008] (2) 在解剖镜下挑选出发育状态较正常的受精卵,并用解剖针将胚盘从整个受精卵中剥离出来;

[0009] (3) 用 Triton-100 对样品进行打孔处理,再用 NaBH₄ 溶液抚育样品三次,每次不超过半小时;

[0010] (4) 采用改进的间接免疫荧光标记方法步骤对样品进行标记,间接免疫荧光标记的基本步骤为:封闭→抚育一抗→清洗→抚育二抗→清洗,具体过程如下:

[0011] 封闭:在室温下用封闭液对样本封闭处理 1-2 小时,所述封闭液为 PBS+0.1% Tween-20+1%DMSO+10% 山羊血清;

[0012] 抚育一抗:先用抗体稀释液将单克隆鼠抗 α -微管蛋白进行稀释制成一抗悬浮液,然后将封闭后的样品在一抗悬浮液中 4℃ 抚育过夜,所述抗体稀释液为含有浓度百分比为 10% 的山羊血清和 5% 的二甲亚砷(DMSO)的 Tris 盐酸缓冲液;

[0013] 清洗:将样品用清洗液清洗 3-4 次,每次 10 分钟,所述清洗液为 PBS+0.1%Tween-20;

[0014] 抚育二抗:用所述抗体稀释液将 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG 进行稀释,制成二抗抚育液,同时加入 DNA 荧光染料 DAPI,然后在避光条件下将样品室温抚育 0.5-1 小时,

[0015] 再用清洗液清洗 5-6 次,每次 10 分钟;

[0016] (5) 制作胚胎整装片,用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜进行观察拍照。

[0017] 进一步的,所述步骤(1)中固定的受精卵未进行去膜处理。

[0018] 进一步的,所述步骤(1)中使用的甲醛-戊二醛固定液配方为:80 mM K-PIPES, 5 mM EGTA, 100 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 3.7% 甲醛、0.25% 戊二醛和 0.5%Triton X-100。

[0019] 进一步的,所述步骤(1)中磷酸吐温缓冲溶液的成分为:128 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH 7.2。

[0020] 进一步的,所述步骤(3)中用 Triton-100 对样品进行打孔处理的温度为 25-30℃,浓度为 4-5%,处理时间为 10-12 小时。

[0021] 进一步的,所述步骤(3)中 NaBH₄ 溶液为 50% 乙醇配制的 2.5mg/L 溶液。

[0022] 进一步的,所述步骤(4)中用抗体稀释液将单克隆鼠抗 α -微管蛋白进行稀释,稀释比例为 1:500-1000。

[0023] 进一步的,所述步骤(4)中用抗体稀释液将 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG 进行稀释的比例为 1:250-500;加入的 DNA 荧光染料中 DAPI 占总体积的比例为 1:10000-100000。

[0024] 进一步的,所述步骤(5)中制作胚胎整装片时加入抗荧光淬灭剂,使荧光信号更强,保存时间更持久。

[0025] 与现有的鲟鳆鱼类受精卵荧光标记技术相比,本发明的优点和积极效果如下:

[0026] 1. 发明中将固定方案进行了改进:

[0027] 原固定方案:受精卵在固定液中室温抚育 3-6 小时后,用磷酸吐温缓冲溶液(PBST)(PBST: 128 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH 7.2)清洗两次,最后于 PBST 中 4℃ 保存,待用。

[0028] 改进固定方案:受精卵在固定液中室温抚育 3-6 小时后,直接用磷酸吐温缓冲溶液(PBST)(PBST: 128 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH 7.2)置换相应 $\frac{3}{4}$ - $\frac{4}{5}$ 体积的固定液,并于 4℃ 保存,待用。

[0029] 改进后的固定方案有利于固定后受精卵的长期保存。

[0030] 2. 发明中采用解剖针将固定后的受精卵的胚盘从整个卵中剥离出来,一方面使得免疫荧光技术得以在海水鲟鳆鱼类受精卵的细胞骨架研究方面进行应用;另一方面避免了卵黄和油球在观察时对实验结果的影响,同时将胚盘从整个卵中剥离出来也可使得该类受精卵的其他生物大分子的免疫组化研究得以进行。

[0031] 3. 发明中将样品进行打孔处理的 Triton-100 的使用浓度和温度以及硼氢化钠(NaBH₄)溶液的处理方案进行了相应的改进。

[0032] 原方案:常温下用浓度百分比 1-2% Triton-100 对样品进行打孔处理,再在含有 80-200mM NaBH₄ 磷酸缓冲溶液(PBS)中室温下抚育 6-16 小时,

[0033] 改进方案:在 25-30℃ 温度下用 4-5% 的 Triton-100 对样品进行打孔处理。再用 50% 乙醇配置的 2.5mg/L 硼氢化钠(NaBH₄)溶液抚育样品三次,每次不超过半小时。

[0034] 改进后的处理方案能够更有效地消除未结合的醛基对试验结果的影响,使得荧光信号更强,背景更低,受精卵的微管骨架和细胞核结构更加清晰地显现出来。

[0035] 4. 发明中将间接免疫荧光标记方法步骤中的抚育二抗过程进行了相应的改进:在含有 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L)的二抗抚育液中同时加入 DNA 荧光染料 DAPI。

[0036] 改进后的处理方法能够同时对受精卵的微管蛋白和 DNA 分子进行标记,便于研究探讨微管蛋白和 DNA 分子的动态变化及其相互关系,为其分子细胞生物学的相关研究提供技术支持。

[0037] 5. 标记后样品的观察处理方法进行了改进:将标记并清洗后的样品加入抗荧光淬灭剂,并用指甲油封片,制成整装片后再进行观察。

[0038] 经过改进而制成胚胎整装片既可以直接在正置的荧光显微镜下观察拍照,也可以用倒置的激光扫描共聚焦显微镜进行扫描观察。利用激光扫描共聚焦显微镜的无损伤连续的光学切片和从连续的切片中构筑三维图像功能,先进行连续的多层扫描观察,再构筑三维立体构象,使得试验结果图片清晰,立体感强。还可以利用共聚焦显微镜的多色荧光图像采集功能,采用微管蛋白和 DNA 的荧光双重标记技术,研究鲟鳆鱼类受精卵早期胚胎发育过程中微管蛋白和 DNA 的共定位及相互作用。另外,在制片时加入抗荧光淬灭剂,可以有效地防止荧光淬灭,既方便操作,也可使荧光信号更强、保持更持久。

[0039] 6. 该方法的应用范围广泛,可用于从两性融合到 2-细胞、4-细胞、8-细胞等发育时期受精卵的免疫细胞化学研究,同时适用于类似海水鲟鳇鱼类受精卵的其他较大的端黄卵。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明一个大菱鲆 1-细胞间期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察图片。

[0041] 图 2 为本发明一个大菱鲆 2-细胞中期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察图片。

[0042] 图 3 为本发明一个大菱鲆 4-细胞中期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察图片。

[0043] 图 4 为本发明一个牙鲆 1-细胞前期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察图片。

具体实施方式

[0044] 下面结合附图和实施例详述本发明的技术方案。

[0045] 本发明的原理为:荧光双标记技术中的免疫荧光技术是利用抗原-抗体特异性反应来研究特定蛋白质或核酸在组织、细胞中表达时间和部位的有效方法。其基本原理是利用特定蛋白质的抗体,即第一抗体,使之与组织切片或整装片中的该种蛋白质结合,然后加入荧光素标记的抗第一抗体的抗体,即第二抗体,在显微镜下用合适的入射光观察,由于抗原-抗体的结合是高度专一性的,只有在具有该种蛋白质的部位才可见荧光,由此可研究蛋白质的表达规律。荧光标记技术是利用特定荧光染料与 DNA 结合,在显微镜下用合适的入射光观察,由于该结合是高度专一性的,只有在该部位才可见荧光,由此可研究细胞核的表达规律。

[0046] 实施例 1 大菱鲆 1-细胞间期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察方法

[0047] 1、采用 Pipes 配制的甲醛-戊二醛固定液对样品进行固定,未去膜的大菱鲆受精卵在固定液中室温抚育 3 小时后,直接用磷酸吐温缓冲溶液(PBST)(PBST: 128 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH 7.2)置换相应 $\frac{3}{4}$ - $\frac{4}{5}$ 体积的固定液,并于 4℃ 保存,待用。

[0048] 2、在解剖镜下挑选出发育状态较正常的受精卵,并用解剖针将胚盘从整个受精卵中剥离出来。

[0049] 3、在 25℃ 温度下用 4% 的 Triton-100 对样品进行打孔处理 12 小时。再用 50% 乙醇配置的 2.5mg/L 硼氢化钠(NaBH₄)溶液抚育样品三次,每次不超过半小时,降低或消除未结合的醛基对实验结果的影响。

[0050] 4、采用改进的间接免疫荧光标记方法步骤对样品进行标记。间接免疫荧光标记的基本步骤为:封闭→抚育一抗→清洗→抚育二抗→清洗。具体过程如下:

[0051] 封闭:在室温下用封闭液(封闭液: PBS+0.1% Tween-20+1%DMSO+10%山羊血清)对

样本封闭处理 2 小时。

[0052] 抚育一抗:先用抗体稀释液(抗体稀释液为含有浓度百分比为 10%的山羊血清和 5%的二甲亚砷(DMSO)的 Tris 盐酸缓冲液)将单克隆鼠抗 α -微管蛋白(α -Tubulin)进行稀释(比例为 1:1000)制成一抗悬浮液,然后将封闭后的样品在一抗悬浮液中 4℃抚育过夜。

[0053] 清洗:将样品用清洗液(PBST: PBS+0.1%Tween-20)清洗 3 次,每次 10 分钟。

[0054] 抚育二抗:用抗体稀释液将 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)进行稀释(稀释比例 1:500),制成二抗抚育液,同时加入 DNA 荧光染料 DAPI(稀释比例 1:100000),然后在避光条件下将样品室温抚育 0.5-1 小时。

[0055] 再用清洗液清洗 6 次,每次 10 分钟。

[0056] 5、制作胚胎整装片并观察拍照:将清洗后的胚盘用吸管吸取,滴加到洁净的载玻片上,将溶液吸干后加入适量的抗荧光淬灭剂,盖上盖玻片,用指甲油封片,晾干后用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜进行观察拍照。

[0057] 实施例 2、大菱鲂 2- 细胞中期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察过程

[0058] 操作步骤基本同实施例 1,与实施例 1 不同之处在于:

[0059] 大菱鲂受精卵在甲醛-戊二醛固定液中抚育时间为 6 小时;

[0060] 发育时期为 2- 细胞中期,Triton-100 打孔处理的温度为 30℃,浓度为 5%,处理时间为 12 小时;

[0061] 单克隆鼠抗 α -微管蛋白(α -Tubulin)稀释比例为 1:750;

[0062] Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 稀释比例为 1:500;

[0063] DAPI 稀释比例为 1:10000。

[0064] 实施例 3、大菱鲂 4- 细胞中期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察过程

[0065] 操作步骤基本同实施例 1,与实施例 1 不同之处在于:

[0066] 大菱鲂受精卵在甲醛-戊二醛固定液中抚育时间 5 小时;

[0067] 发育时期为 4- 细胞中期,Triton-100 打孔处理的温度为 28℃,浓度为 4%,处理时间为 10 小时;

[0068] 单克隆鼠抗 α -微管蛋白(α -Tubulin)稀释比例为 1:500;

[0069] Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 稀释比例为 1:250;

[0070] DAPI 稀释比例为 1:10000。

[0071] 实施例 4、牙鲆 1- 细胞前期受精卵微管蛋白和细胞核 DNA 的荧光双标记显微观察过程。

[0072] 操作步骤基本同实施例 1,与实施例 1 不同之处在于:

[0073] 牙鲆受精卵在甲醛-戊二醛固定液中抚育时间 4 小时;

[0074] 发育时期为 1- 细胞前期,Triton-100 打孔处理的温度为 28℃,浓度为 5%,处理时间为 12 小时;

[0075] 单克隆鼠抗 α -微管蛋白(α -Tubulin)稀释比例为 1:500;

[0076] Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 稀释比例为 1:500;

[0077] DAPI 稀释比例为 1:100000。

[0078] 从图 1- 图 4 中可以看出,本发明图 1a、图 2a、图 3a、图 4a 可以清楚的看到微管蛋白(α -Tubulin)的标记结果(如箭头所示);从图 1b、图 2b、图 3b、图 4b 可以清楚地看到细胞核(DNA)的标记结果(如箭头所示),从图 1c、图 2c、图 3c、图 4c (图中 a 与 b 叠加)可以看到微管蛋白(α -Tubulin)和细胞核(DNA)的双标记结果(如箭头所示)。

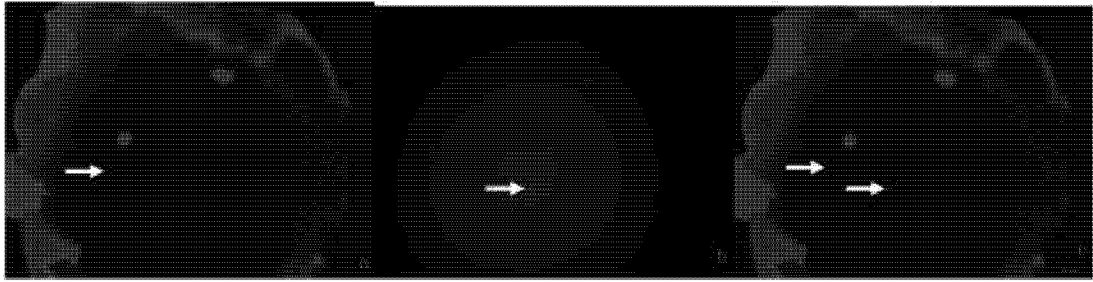


图 1

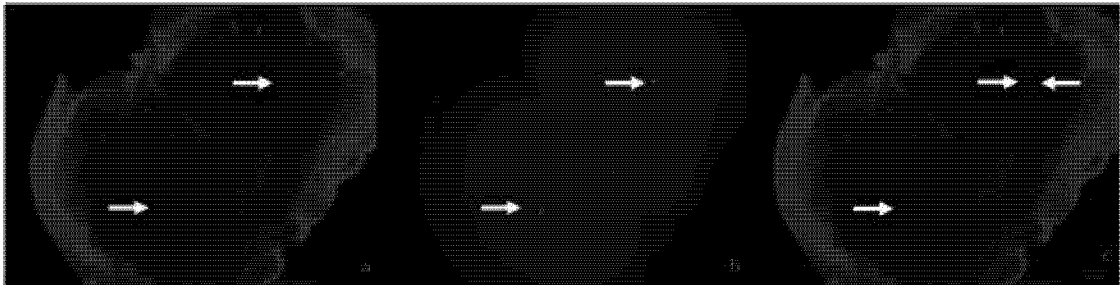


图 2

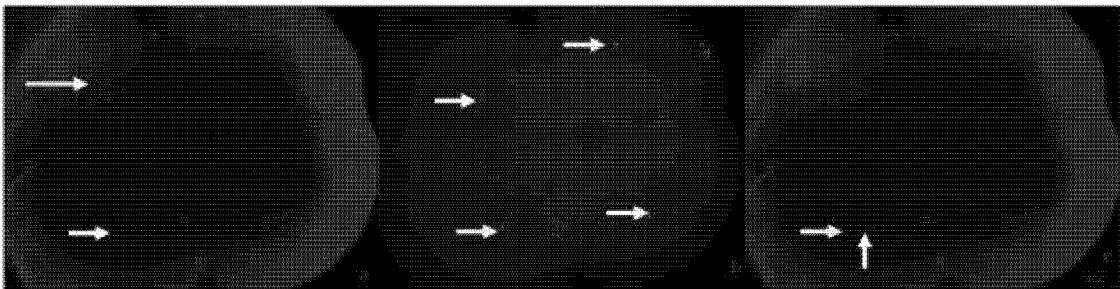


图 3

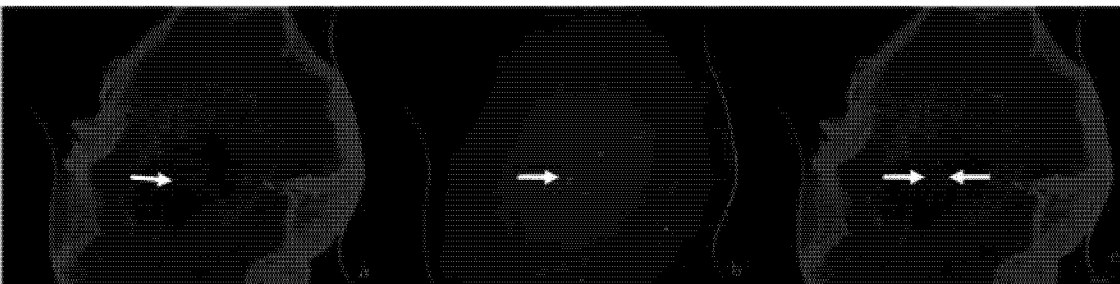


图 4

专利名称(译)	一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法		
公开(公告)号	CN103364570B	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201310332662.4	申请日	2013-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
[标]发明人	朱香萍 林正美 尤锋 吴志昊		
发明人	朱香萍 林正美 尤锋 吴志昊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533		
代理人(译)	王晓晓		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN103364570A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种海水鲆鲽鱼类受精卵微管骨架和细胞核的荧光双标记的显微观察方法，首先将未去膜的受精卵进行固定，然后用解剖针将固定后受精卵的胚盘从整个胚胎中剥离出来，对剥离出来的胚盘进行打孔处理，并用硼氢化钠降低或消除未结合的醛基对实验结果的影响，再对样品进行封闭及荧光双标记染色，最后用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜对样品进行观察。该发明的优点是对样品要求粗放，操作过程简单，便于观察，结果清晰度高，立体感强，可用于鲆鲽鱼类受精卵从胚盘形成到2-细胞、4-细胞、8-细胞等发育时期的微管骨架和细胞核的动态变化研究，同时也适用于类似海水鲆鲽鱼类受精卵的其他较大的端黄卵，适用范围广泛。

