

一种在荧光显微镜下同时观察贝螈间质细胞及神经细胞发育的方法*

黄 蓓

(安徽大学生物系 合肥 230039)

摘要 用 Brdu 及 FITC 同时标记贝螈 S 期的间质细胞及神经细胞的免疫细胞化学法,不但操作简单,大大缩短实验时间,而且还可避免用同位素 H^3 -Thymidin 标记放射自显影所带来的射线危害。在做成的同一张片子上可通过调节改变荧光显微镜光源的色彩来观察分化前的间质细胞与分化后的神经细胞。在观察两者相互关系上有独特的效果。

关键词 荧光显微镜,免疫细胞化学法,贝螈,间质细胞,神经细胞

贝螈 (*Hydractinia*) 是附生在花斑贝壳 (*Buccinum littorinā*) 上,行有性生殖的一种海生动物。每天可采集到较多的受精卵,经多次分裂后形成浮浪幼虫,此幼虫不需供食,不会自发变态,处于发育静止状态。某些化学试剂如 $CaCl_2$ 、细菌 *Aliceromonas* 的某种分泌物都可诱发其幼虫变为水螅体。这种水螅体基部可分枝地长出葡伏茎,这葡伏茎长到一定长度后又以出芽方式长出新的水螅体。如此生长,使它们相互连成网状形成克隆。

由于贝螅体壁薄、较透明、结构简单,不需做任何切片即可在显微镜下观察相应的实验结果;又由于它的葡伏茎分泌粘液,可首先把经诱变剂处理后的浮浪幼虫放在盖玻片上,使其在上固着生长,便于拿取。为以下实验多次换液培养提供了方便,不必为实验过程中丢失或损伤组织而担心。

对于分裂间质细胞的跟踪研究,常采用同位素 H^3 -Thymidin 标记的放射自显影法,此方法用起来比较麻烦,时间较长,而且还要求一定的射线防护措施。本文介绍用免疫细胞化学法同时显示分裂着的间质细胞及神经细胞,不但操作方便,而且具有其独特的效果。此方法

也适用于在淡水中生长的水螅,略有不同之处在方法中加以说明。

1 材料与方法

1.1 动物的来源及饲养 具刺贝螈 (*Hydractinia echinata*) 野生种来自德国北海或大西洋,附生在贝壳上。实验室内培养液制备方法如下: 495mmol/L NaCl, 28mmol/L Na_2SO_4 , 11mmol/L $CaCl_2$, 9.4mmol/L KCl, 2.4mmol/L $NaHCO_3$, pH8.2。(室内淡水水螅的培养液配方如下: 11g Tris; 147g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 或 219g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 58.5g NaCl; 7.6g KCl; 20g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 7.25g Na-EDTA 加水至 1000ml, pH7.8。此液为母液,用前在 1 升水中加 1ml 的母液即可。) 培养室温度保持 17℃ 左右。实验前从 4℃ 冰箱取出幼虫进行人工诱变,等长成水螅体后每天喂以咸水丰年虫,4 小时后换上新鲜的培养液。

1.2 处于 S 期的间质细胞与神经细胞的鉴定 本实验是 1989 年采用较新的 Brdu 标记法 (Berking, S., 1986)。Brdu 在 DNA 合成过

* 本项工作为作者 1988—1990 年在德国海登堡大学进修期间完成。

程中可取代 Thymidin, 结合上去的 Brdu 可用专一性的初级抗体识别, 再通过带有异硫氰酸荧光素 (FITC) 的次级抗体连接, 最后在荧光显微镜下观察结果。神经细胞可采用类似的免疫细胞化学法鉴定 (Leitz T., Müller W.A., 1987)。实验已证明许多腔肠动物的神经细胞都含有 FMRF-amid 结尾的神经肽, (这种神经肽的初级抗体已商品化), 之后再连接上异硫氰酸荧光素的次级抗体, 镜检观察结果。由于这两种方法具有共同性, 作者试着将它们加以结合, 一次性完成两种细胞的鉴定, 在同一张做成的片子上通过调节改变荧光显微镜光源的色彩来观察分化前的间质细胞与分化后的神经细胞。具体做法如下:

在装有贝螭幼虫的培养液中加入 116 m mol/L CsCl 诱变剂, 3 小时后用新鲜培养液冲洗干净, 在 17°C 室内培养 48 小时后 (已变成正常大小的水螅体) 进行以下实验:

1.2.1 在 200 μ mol/L Brdu (对于水螅可换成 5mmol/L Brdu) 中培养 1 小时, 换上新鲜培养液, 去头, 室内培养 36 小时。

1.2.2 放入 4% 甲醛-0.1-mol/L 磷酸氢二钠中固定 12 小时 (4°C)。

1.2.3 依次用 0.1mol/L 磷酸氢二钠 1 小时、0.4mol/L 甘油 2 小时清洗。

1.2.4 在 2 mol/L 盐酸中培养 1 小时。

1.2.5 经 0.25% Triton-PBS 液清洗 1 小时。

1.2.6 把 Anti-Brdu 初级抗体 (Becton Dickinson 公司, 西德) 的稀释液 (1:25 溶于 0.25% HSA-Triton-PBS 液) 与 Anti-FMRF-amid 初级抗体的稀释液 (1:25 溶于 0.25% HSA-Triton-PBS 液) 以 1:1 比例加以混合, 把动物放入其中培养 12 小时 (0°C)。

1.2.7 换上 Triton-PBS 液清洗 1 小时。

1.2.8 在两种以 1:1 混合的次级抗体稀释液中培养 2 小时, 其中 Brdu-Anti-Mause IgG, FITC 以 1:40 稀释于 0.25% HSA-Triton-PBS 液; FMRF-Anti-goat, FITC 以 1:80 溶于 Triton-PBS 液。

1.2.9 放入 Triton-PBS 液中反复清洗 1 小

时。

1.2.10 在干净的载玻片上加一滴 PBS-Glycerin/DABCO 混合液 (1 + 9 PBS/Glycerin; 加入 25mg/ml 1,4 Diazabicyclo1 2,2,2), 然后用镊子小心地把带有动物的盖玻片取出, 稍稍用滤纸吸走部分水分后反盖在载玻片上, 拿到荧光显微镜下观察 (Zciss IM35 > BP 450-490, FT510 > LP520)。

2 结果

图 1、图 2 分别为去头后再生的头部, 36 小时左右间质细胞、神经细胞分布图。图 3 则



图 1 去头后再生的头部 36 小时间质细胞分布图



图 2 去头后再生的头部 36 小时神经细胞分布图

为便于理解所绘的上述两张照片的综合说明图。从图中可见三条已成型的神经索, 还可见正在向神经细胞分化的间质细胞 (即图 3 中所指的标有 Brdu 已分化的神经细胞前体)。因正常水螅体中具有潜在分生能力、位于内外两胚层间的间质细胞很少出现在头部、触手及茎尖处, 而 Brdu 是在去头前连在复制过程中 DNA 上的, 所以标有 Brdu 的神经细胞无疑是由胃区的间质细胞迁移分化而来的。

(下转第 56 页)

(上接第 40 页)

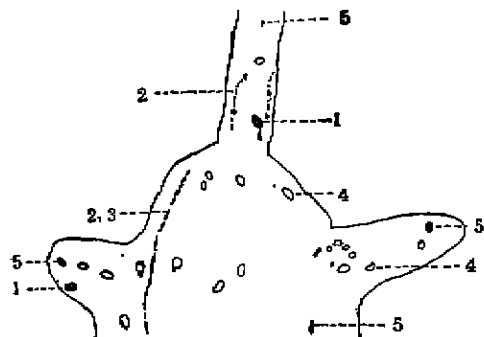


图 3 再生头部 36 小时后间质细胞与神经细胞分布综合图

1. 标有 BrdU 已分化的神经细胞前体。2. 已成熟的神经细胞。3. 已成熟并标上 BrdU 的神经细胞。4. 间质细胞。5. 神经细胞前体

3 讨论

用此方法做出的片子清晰、美观,可在同一张片子上直观地看出再生后的神经细胞确实是由后面的间质细胞迁移而来,而不是通过自生

分生增长形成的。如果连续定时地使用此方法,还能测出从间质细胞到神经细胞出现所需的时间及神经细胞空间分布出现的顺序。对神经细胞的跟踪研究,当然也可采用古典的方法如生体用美蓝 (Methylene blue) 及压片切片银染法,但就研究间质细胞与神经细胞两者关系上来讲,本文所介绍的方法就显示了其优越性。当然,在国内目前抗原抗体的来源还未商品化的情况下,此方法的使用受到了一定的局限。

参 考 文 献

- 1 Berking S. Transmethylation and control of pattern formation in hydrozoa: *Differentiation*. 1986, 32: 10-16.
- 2 Leitz, T., W.A. Muller, Evidence for the involvement of PI-Signaling and diacylglycerol Second messengers in the initiation of metamorphosis in the hydroid *Hydractinia echinata* Fleming. *Dev. Biol.* 1987, 121:82-89.