

文章编号: 1000-0615(2019)04-0852-06

DOI: 10.11964/jfc.20171111021

中华绒螯蟹卵细胞透明液的配方

刘志强, 冯建彬, 邱高峰*

(上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心,
上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为了快速准确判断中华绒螯蟹卵细胞是否发育成熟, 实验根据斑马鱼卵细胞透明液的配方进行一系列的探索, 最终发现用无水乙醇、冰乙酸和甲醛按60:1:30的体积比混合成的透明液处理中华绒螯蟹卵细胞, 在细胞内可以观察到一白色斑点。对卵巢组织进行切片观察, 证实该斑点即为中华绒螯蟹卵细胞的细胞核。在发育成熟的卵细胞中则不能观察到白色斑点。研究表明, 无水乙醇、冰乙酸和甲醛按60:1:30的体积混合成的透明液能够有效透明中华绒螯蟹卵细胞, 为准确判断其卵母细胞是否发育成熟, 及时对卵母细胞进行人工诱导具有重要的实用价值。

关键词: 中华绒螯蟹; 卵细胞; 细胞核; 透明液

中图分类号: Q 954.4; S 966.1

文献标志码: A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)隶属于甲壳动物, 是我国重要的水产养殖品种^[1], 其卵细胞的发生主要包括3个时期: 增殖期、生长期和成熟期^[2]。判断其卵细胞是否发育成熟, 能够帮助生产人员准确掌握人工诱导卵细胞成熟的时间^[3], 缩短中华绒螯蟹人工辅助育苗的周期, 同时也是研究中华绒螯蟹卵细胞最后成熟机制必不可少的步骤^[4]。与其他多黄卵细胞相似, 中华绒螯蟹卵细胞在生长期完成卵黄积累后, 进入最后减数分裂成熟阶段, 此阶段细胞核(生发泡)的位置首先从卵细胞中央向一端移动, 然后核膜瓦解消失, 生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD), 形成减数分裂相, 包括纺锤体(spindle)、染色体的形成等。最终卵细胞停滞在减数分裂中期(meiotic metaphase), 之后才能排卵、受精^[5], 因此, 可根据卵细胞内细胞核的位置或有无判断卵细胞是否发育成熟^[6-8]。

卵细胞在发育过程中会积累大量的卵黄, 导致其透光性很差, 无法直接在解剖镜下观察到生发泡, 实验中常将中华绒螯蟹卵巢组织用

固定液进行固定, 通过传统石蜡切片, 苏木精—伊红染色(H.E染色)后才能对其生发泡进行观察, 从而确定卵细胞是否发育成熟。但是该方法需要对卵巢样品进行固定、漂洗、脱水、浸蜡、包埋、切片、染色等一系列繁琐的处理步骤^[9-10], 周期较长。另外, 卵细胞卵黄较多, 卵细胞膜通透性差, 在制作切片的过程中常会出现浸蜡不彻底, 卵细胞碎裂的现象。加之, 由于卵细胞在经历生长期后体积增大, 核质比(karyoplasmic ratio)变小^[11], 切片时会有切面不经过细胞核的现象, 导致对卵细胞是否发育成熟判读错误。组织透明技术(tissue optical clearing technique)是利用化学或物理的原理与方法将大块组织或完整器官透明化处理的技术, 通过光学仪器直接对组织或器官内的细胞等结构进行观察^[12-13]。因此可以根据卵细胞中所含成分的溶解性质, 用不同试剂配置成的混合液对卵细胞进行透明处理, 以达到易于观察其细胞核的目的。因此, 本实验通过文献查阅^[14-17]及实验研究, 发现将无水乙醇、冰乙酸和甲醛按60:1:30的体积比进

收稿日期: 2017-11-01 修回日期: 2018-04-30

资助项目: 国家自然科学基金(31272655)

通信作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

行混合后处理积累卵黄的卵细胞, 能够清晰地观察到细胞核的位置与有无, 从而确定卵细胞是否发育成熟。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

中华绒螯蟹购自上海浦东新区果园农贸市场, 体质量为90~100 g。无水乙醇、冰乙酸、甲醛、二甲苯、甲醇等化学试剂, 购自国药集团化学试剂有限公司(上海)。4%多聚甲醛固定液, 苏木精、伊红染料购自于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 实验方法

中华绒螯蟹卵巢的组织切片观察 将中华绒螯蟹置于冰上, 冷冻麻醉20 min后解剖, 取其卵巢组织约1 mg置于4%的多聚甲醛中, 4℃固定24 h, 之后用1×PBS漂洗3次, 每次30 min。最后将卵巢组织置于甲醇中-20℃保存备用。保存组织用70%、80%、95%、100%乙醇分别处理60 min, 使其进行梯度脱水。随后用1:1的酒精:二甲苯及二甲苯对组织进行透明处理。透明处理的组织先后置于充分溶解的1:1的二甲苯:石蜡及石蜡中分别浸泡60 min。最后用镊子将样品迅速转放入装满石蜡的纸盒内, 并将纸盒放置在平整的冰上, 待纸盒内的石蜡凝固后转移至4℃冰箱内, 过夜。次日, 用旋转式切片机将石蜡包埋的卵巢组织切成6 μm厚的切片。

待切片贴片牢固后进行H.E染色, 具体步骤: 二甲苯 I 10 min; 二甲苯 II 10 min; 1:1的乙醇:二甲苯5 min; 无水乙醇2 min; 95%的乙醇2 min; 90%的乙醇2 min; 80%的乙醇2 min; 70%的乙醇2 min; 蒸馏水2 min; 苏木精20 min; 流水冲洗30 min; 1:99的盐酸、乙醇2 s; 流水冲洗20 min; 70%的乙醇2 min; 80%的乙醇2 min; 90%的乙醇2 min; 0.5%的伊红30 s; 95%的乙醇2 min; 无水乙醇2 min; 1:1的乙醇:二甲苯5 min; 二甲苯 I 5 min; 二甲苯 II 2 min。随后用中性树脂封片处理。待干燥后用显微镜进行观察并拍照。

中华绒螯蟹卵细胞透明液配方的探索 斑马鱼(*Danio rerio*)卵细胞透明液是体积比为6:1:3的无水乙醇:冰乙酸:甲醛。但该透明液不能透明中华绒螯蟹的卵细胞, 因此实验通过调整该透明液中无水乙醇、冰乙酸、甲醛3种

试剂的体积比, 摸索适用于处理中华绒螯蟹卵细胞的透明液。

利用透明液对中华绒螯蟹卵细胞进行透明处理 取4 mL适于处理中华绒螯蟹卵细胞的透明液及1 mg的卵巢组织置于5 mL的离心管中, 迅速剧烈振荡, 使卵细胞呈游离状态, 静置1~2 min后在解剖镜下观察、拍照。

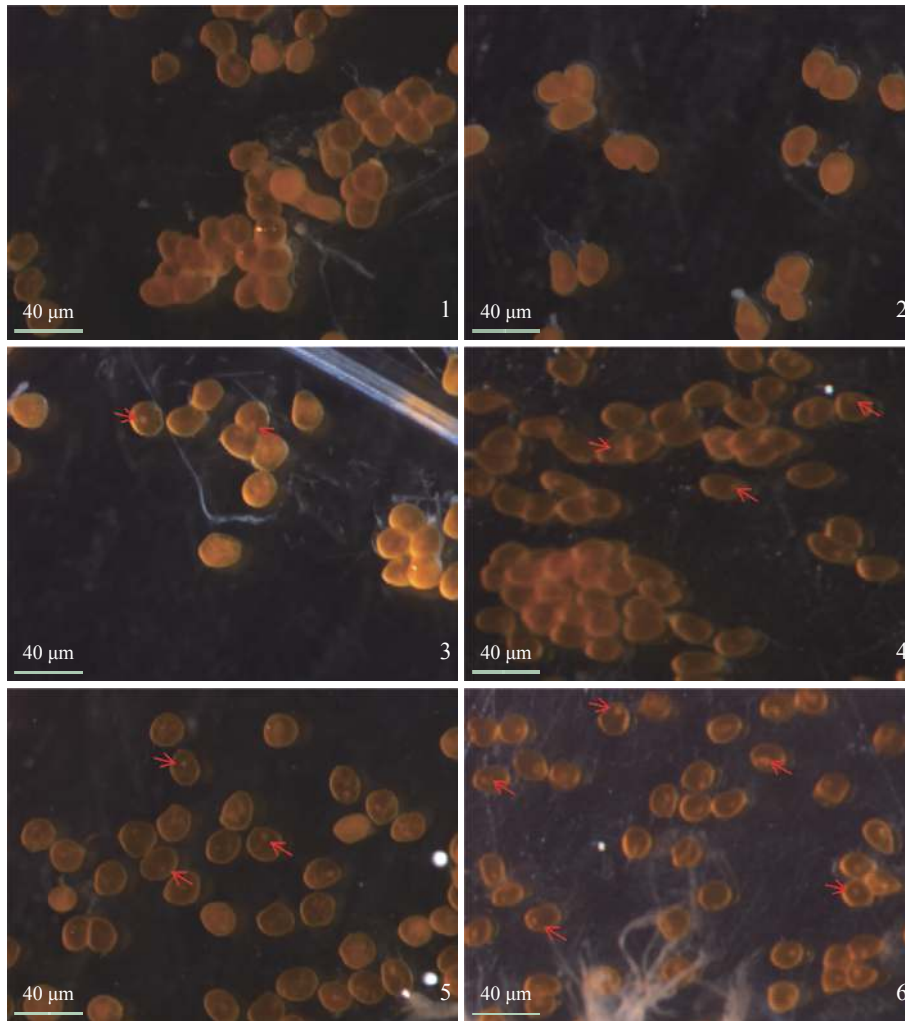
2 结果

2.1 中华绒螯蟹卵细胞透明液配方的探索

解剖发现, 卵细胞内积累一定量的卵黄以后, 中华绒螯蟹的卵巢呈现为深紫色或黑色, 几乎充满整个腹腔。解剖镜下观察未经透明液处理的卵细胞, 呈圆形、椭圆形等形状。用处理斑马鱼卵细胞的透明液(无水乙醇6:冰乙酸1:甲醛3)处理中华绒螯蟹的卵细胞, 结果显示该透明液不能使中华绒螯蟹卵细胞透明(图版 I-1)。随后分别用6:2:3、12:1:3、6:1:6、12:1:3、12:2:3、12:1:6等一系列体积比的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液对中华绒螯蟹卵母细胞进行处理, 虽然有些比例的混合液能够使中华绒螯蟹卵母细胞透明, 但是效果并不理想(图版 I-2, I-3, I-4)。当用30:1:30的无水乙醇:冰乙酸:甲醛体积比处理卵细胞时, 发现此混合试剂能够起到一定的效果, 且处理后的卵细胞内可以观察到一白色斑点, 但是透明仍不彻底(图版 I-5)。进一步调整无水乙醇:冰乙酸:甲醛的比例, 发现当体积比为60:1:30时透明卵细胞的效果非常理想, 卵细胞内的白色斑点清晰可见(图版 I-6)。

2.2 中华绒螯蟹卵细胞的透明液处理及组织学观察

为了验证实验透明液的效果及观察到的细胞内白色斑点是否为卵细胞的细胞核, 实验分别选取不同发育时期的卵巢进行透明处理。结果发现, 卵细胞经过透明液处理后由黑色或深紫色变为橙黄色, 将其置于解剖镜下观察, 细胞呈透明状态, 并且在未成熟的卵细胞中能清晰地看到一白色斑点(图版 II-1), 而在发育成熟的卵细胞中则不能观察到白色斑点(图版 II-2)。随后对中华绒螯蟹卵巢进行组织切片观察, 在H.E染色后的切片中可以看到, 在未成熟的卵细胞内可观察到生发泡, 为空泡状, 内有1~2个被



图版 I 用不同配方的透明液处理的中华绒螯蟹卵细胞

1.用体积比为6:1:3的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞; 2.用体积比为6:2:3的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞; 3.用体积比为12:1:3的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞; 4.用体积比为12:2:3的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞; 5.用体积比为30:1:30的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞; 6.用体积比为60:1:30的无水乙醇:冰乙酸:甲醛的混合液处理的中华绒螯蟹的卵细胞, 白色斑点用红色箭头指出

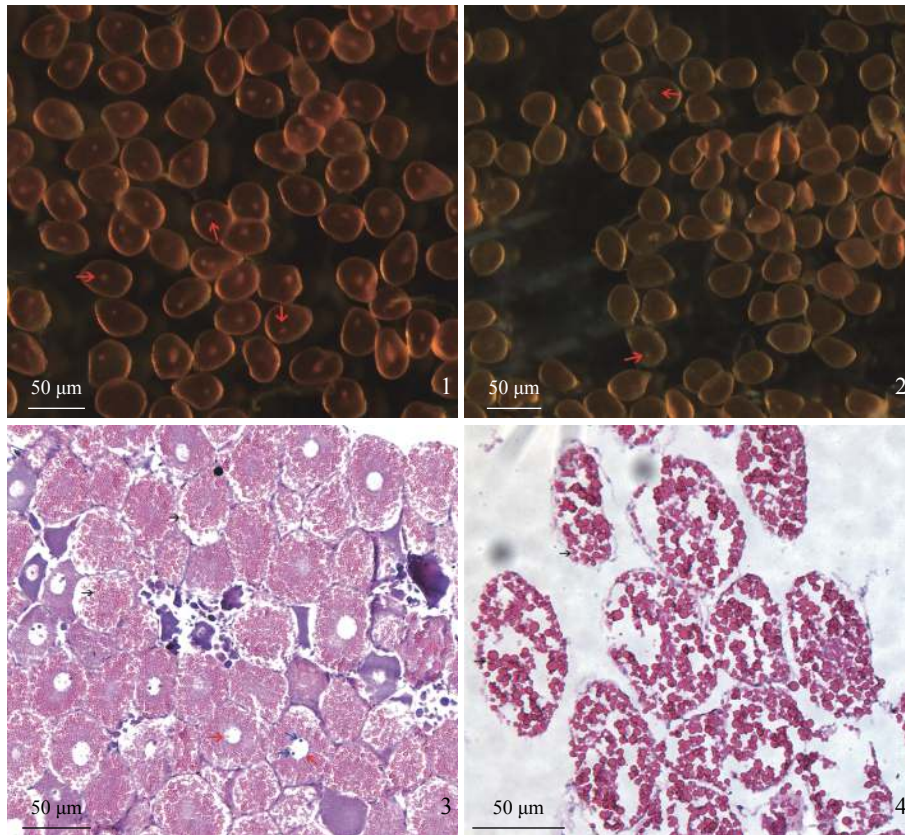
Plate I Observation of the crab oocytes after treated with various transparent liquid

1. the crab oocytes after treated with the mixture of 6 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 3 percent of formaldehyde; 2. the crab oocytes after treated with the mixture of 6 percent of ethanol, 2 percent of acetic acid and 3 percent of formaldehyde; 3. the crab oocytes after treated with the mixture of 12 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 3 percent of formaldehyde; 4. the crab oocytes after treated with the mixture of 12 percent of ethanol, 2 percent of acetic acid and 3 percent of formaldehyde; 5. the crab oocytes after treated with the mixture of 30 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 30 percent of formaldehyde; 6. the crab oocytes after treated with the mixture of 60 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 30 percent of formaldehyde. The white spots were showed with red arrows

染成蓝色的核仁。围绕在生发泡外的卵黄颗粒较小, 排列致密, 越靠近细胞膜的部分卵黄颗粒越大, 排列也愈疏松(图版 II -3)。成熟的卵细胞内不能观察到细胞核, 且细胞内的卵黄颗粒均较大, 排列更加疏松(图版 II -4)。说明透明液处理后在卵细胞内观察到的白色斑点即为其细胞核。

3 讨论

在生物卵细胞发育的过程中会逐渐积累大量的卵黄、水和脂类等多种不同物质, 这些物质都有一定的遮光性, 当光线通过这些不同组分时发生散射, 并且细胞越大, 散射越强, 透射越少^[18-19], 从而导致不能够通过直接的光学观



图版 II 中华绒螯蟹卵细胞经透明液处理和H.E染色后的观察

1. 利用透明液处理的未成熟的卵细胞; 2. 利用透明液处理的成熟的卵细胞; 3. 未成熟卵细胞的组织切片; 4. 成熟卵细胞的组织切片, 红色箭头指示的为卵细胞的生发泡, 黑色箭头指示的为卵黄颗粒, 蓝色箭头指示的为核仁

Plate II Observation of the crab oocytes after treated with transparent liquid and H.E staining

1. the immature oocytes that were treated with transparent liquid; 2. the mature oocytes that were treated with transparent liquid; 3. the immature oocytes that were treated with H.E staining; 4. the mature oocytes that were treated with H.E staining, the nucleus were showed with red arrows, the yolk was showed with black arrows, the nucleolus were showed with blue arrows

察检测卵细胞生发泡的位置或有无。生物组织光学透明技术是将完整的不透明的生物组织经生化试剂混合溶液进行灌注、浸泡、电泳等处理降低组织内部由于折射率(refractive index, RI)的不均一性所引起的光散射, 从而使组织透明的技术。另外, 在用透明试剂处理样品的同时也起到了降低组织内部的内源性色素等对光产生的强吸收的影响, 进一步增加了光的穿透深度^[12-13]。基于此, 可以考虑选取合适的试剂进行混合, 通过将卵细胞进行透明处理, 进而对其生发泡进行观察。

卵细胞积累的物质主要有脂溶性和水溶性2种。其中, 脂溶性成分溶于水, 难溶于甲醇, 易溶于高浓度乙醇、乙醚、氯仿、苯等有机溶剂; 水溶性成分易溶于水和乙醇, 不溶于乙醚、氯仿等有机溶剂。因此, 在对鱼类卵细胞透明液进

行透明处理时选取了乙醇作为脂溶性物质和水溶性物质的溶剂^[14]。另外, 卵细胞在用乙醇处理的过程中其细胞形态通常会受到破损, 为了避免此现象的发生还需要在透明液中加入能够使样品固定的试剂。甲醛是一种常用的样品固定液, 能够有效地保持细胞的形态^[20], 并且相比于其他固定试剂, 甲醛更加廉价, 因此, 在组织样品固定处理时通常选用甲醛做固定剂, 比如在鱼类卵细胞透明处理时也选取了甲醛作为固定试剂, 并取得了理想的效果。与其他类型的细胞相比, 卵细胞的细胞膜较厚, 透明液进入细胞较为困难, 而冰乙酸有助于透明液渗入细胞, 缩短细胞透明时间^[21]。但是, 不同物种卵细胞中水、脂类和蛋白质的比例会有所差别, 因此所需透明液中各试剂作用浓度也会有所差别。中华绒螯蟹属于无脊椎动物, 在进化上与鱼类

等脊椎动物相差较远, 实验用鱼类卵细胞透明液处理中华绒螯蟹卵细胞时都不能达到理想效果, 随后经过多次的探索, 才发现用无水乙醇、冰乙酸和甲醛按照60:1:30的体积比配制成的混合试剂能够快速、有效地透明中华绒螯蟹的卵细胞。除此之外, 实验用该透明液处理罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的卵细胞, 发现其亦能够有效地透明罗氏沼虾的卵细胞, 说明中华绒螯蟹卵细胞与罗氏沼虾卵细胞内的物质组成成分比较相似。但是, 该透明液在甲壳类动物中是否均有效尚需对更多物种卵细胞处理后才能确定。

参考文献:

- [1] Gai Y C, Wang L L, Zhao J M, *et al.* The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(6): 684-694.
- [2] 顾志敏, 何林岗. 中华绒螯蟹卵巢发育周期的组织学细胞学观察[J]. *海洋与湖沼*, 1997, 28(2): 138-145.
Gu Z M, He L G. Histological and cytological observation on the development cycle of crab (*Eriocheir sinensis*) ovary[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1997, 28(2): 138-145(in Chinese).
- [3] 王承志. 中华绒螯蟹脑组织促性腺释放激素类似物分离、免疫定位及功能鉴定[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Wang C Z. GnRH-like peptide from the brain of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: isolation, immunological localization and functional characterization[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese).
- [4] 李青. 中华绒螯蟹DDX家族及相关基因对配子发生和卵黄蛋白原表达调控机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
Li Q. Research on regulation mechanism of DDX family and the related genes in gametogenesis and vitellogenin expression in the Chinese mitten crab[D]. Shanghai: East China Normal University, 2016(in Chinese).
- [5] Fang J J, Qiu G F. Molecular cloning of cyclin B transcript with an unusually long 3' untranslated region and its expression analysis during oogenesis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(6): 1521-1529.
- [6] Si K Y, Zhao X, Liang G X. Study on germinal vesicle migration in the oocyte of *Bufo melanostictus* during maturation *in vitro*[J]. *Developmental & Reproductive Biology*, 1998, 7(2): 29-34.
- [7] 夏梦. PCBP1蛋白在小鼠卵母细胞成熟过程中调控大规模转录的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2011.
Xia M. Role of PCBP1 in large-scale transcriptional silencing during mice oocytes maturation[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2011(in Chinese).
- [8] 王寒阳, 李捷鑫, 李文瑞, 等. 不同直径的绵羊卵泡中卵母细胞核相及皮质颗粒分布特征分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(5): 1255-1262.
Wang H Y, Li J X, Li W R, *et al.* The nuclear morphology and cortical granule distribution of oocytes from different diameter follicles of sheep[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(5): 1255-1262(in Chinese).
- [9] 杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良[J]. *生物学杂志*, 2006, 23(1): 45-46.
Yang J P. Improvement of traditional paraffin section preparation methods[J]. *Journal of Biology*, 2006, 23(1): 45-46(in Chinese).
- [10] 任成林, 田勇, 梁淑珍. 动物组织HE染色石蜡切片技术的改进[J]. *河北北方学院学报(自然科学版)*, 2007, 23(1): 41-45.
Ren C L, Tian Y, Liang S Z. Technical innovation of paraffin slice for H. E. staining in animal tissues[J]. *Journal of Hebei North University (Natural Science Edition)*, 2007, 23(1): 41-45(in Chinese).
- [11] 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)雌性生殖系统的组织学研究[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 1987(3): 88-97.
Xue L Z, Du N S, Lai W. Histology of female reproductive system in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science Edition)*, 1987(3): 88-97(in Chinese).
- [12] 王培新, 张丹, 尚爱加, 等. 组织透明技术[J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(1): 124-128.
Wang P X, Zhang D, Shang A J, *et al.* Tissue optical clearing technique[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2016, 32(1): 124-128(in Chinese).
- [13] 李亚敏, 薛成志, 李贵叶, 等. 生物组织光学透明技术研究进展[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(6): 83-88.

- Li Y M, Xue C Z, Li G Y, *et al.* The research progress of tissue optical clearing techniques[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(6): 83-88(in Chinese).
- [14] 吕众, 张毅, 魏华. 两种分离斑马鱼卵母细胞方法的比较[J]. *生物技术通报*, 2008(S1): 342-346, 355..
Lv Z, Zhang Y, Wei H. Comparison of two separating methods of zebrafish oocytes culture *in vitro*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(S1): 342-346, 355.(in Chinese).
- [15] 白遗胜. 淡水养殖500问[M]. 北京: 金盾出版社, 2006: 6.
Bai Y S. 500 Questions of Freshwater Aquaculture[M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2006: 6(in Chinese).
- [16] 胡保同. 养鱼致富技术手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 6.
Hu B T. Handbook of Fish Farming Technology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1995: 6(in Chinese).
- [17] 程士祥. 繁育淡水白鲢苗种四步走[J]. *江西饲料*, 2013(5): 42-43.
Cheng S X. Four steps of *Colossoma brachypomum* breeding[J]. *Jiangxi Feed*, 2013(5): 42-43(in Chinese).
- [18] Ertürk A, Bradke F. High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO)[J]. *Experimental Neurology*, 2013, 242: 57-64.
- [19] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2007, 4: 331-336.
- [20] 吴平, 张声. 无醛固定液与甲醛固定液对组织形态学保存效果比较[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(3): 343-345.
Wu P, Zhang S. Comparison of the effect on formaldehyde free fixative and formaldehyde fixative on histomorphology preservation[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 31(3): 343-345(in Chinese).
- [21] 方建平, 方园平. 一种线虫、棘头虫快速透明方法[J]. *动物学杂志*, 1997, 32(2): 43-44.
Fang J P, Fang Y P. A rapid translucent method for nematode and acanthosis[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1997, 32(2): 43-44(in Chinese).

Clearing solution's ingredients for oocyte in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

LIU Zhiqiang, FENG Jianbin, QIU Gaofeng*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to establish a quick and accurate determination method of whether the oocyte of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is mature or not, a series of experiments were carried out referred to the clearing solution's ingredients of oocyte in zebrafish. Finally, we found that the mixture of 60 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 30 percent of formaldehyde was useful for the oocyte of Chinese mitten crab. White spots could be observed in immature oocytes after treated with the mixture, while in mature oocytes, no white spot could be seen. And it is consistent with the result of optical microscopy and H.E staining. Obviously, the mixture of 60 percent of ethanol, 1 percent of acetic acid and 30 percent of formaldehyde could be used to determine whether the oocyte of *E. sinensis* is mature.

Key words: *Eriocheir sinensis*; oocyte; nucleus; clearing solution

Corresponding author: QIU Gaofeng. E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272655)