

斑马鱼胚胎眼睛石蜡切片的制作和苏木素-伊红染色

杨 晨

(浙江大学医学院附属口腔医院, 浙江 杭州 310000)

摘要 目的: 介绍斑马鱼胚胎眼睛石蜡切片的制作流程和苏木素-伊红(HE)染色方法并推广应用。方法: 制作斑马鱼胚胎眼睛石蜡切片, 进行HE染色, 并使用光学显微镜拍摄图片。结果: 利用上述方法得到结构清晰的斑马鱼胚胎眼睛的石蜡HE染色切片。结论: 斑马鱼胚胎由于体积小, 制作眼睛石蜡切片, 其包埋、切片等过程和成年斑马鱼有所不同。建立了一套完善的胚胎鱼眼石蜡切片和染色方法, 为从事组织学研究者提供技术借鉴。

关键词 斑马鱼胚胎 眼睛 石蜡切片 苏木素-伊红染色

中图分类号: R446.8

文献标识码: A

文章编号: 1007-0745(2022)07-0149-03

斑马鱼由于体积小, 身体几乎是透明的, 性成熟快, 易繁殖等优势, 越来越多地应用于基因组学、发育生物学、功能组学、神经生物学、毒理学研究等, 成为科研工作者的主要模式生物选择^[1-3]。目前有关斑马鱼的研究主要集中在成年斑马鱼的鱼鳃、端脑、中脑、肠道、心脏、动脉球组织和肝等组织结构^[4-8], 而关于斑马鱼胚胎眼睛组织结构的研究还鲜见报道。斑马鱼的眼睛在形态发育、解剖学结构及功能学等方面与人类存在着很大的相似性, 并具有易于繁殖、生长发育较快、眼睛较大、易于观察等优势, 因此, 斑马鱼成了研究人类眼睛发育和眼睛疾病的一种理想模式生物^[9]。斑马鱼胚胎眼睛作为理想的眼病动物模型, 对了解眼睛疾病的发病机制和研发治疗药物具有重要的参考价值。本实验制作了斑马鱼胚胎眼睛石蜡组织切片, 并且采集光谱图进行组织结构比较分析, 旨在为斑马鱼胚胎的形态学及相关研究提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象

本文分享的案例实验中所用为野生型斑马鱼(Danio rerio) AB品系, 保持14h/10h光暗周期循环条件, 雌雄鱼交配产生的受精卵在鱼水(0.33g/L海盐)(30% Danieau buffer), 28.5℃恒温箱培养, 继续饲养至受孕后120h(hour post-fertilization, 120hpf)。

1.1.2 试剂与器材

甲醛(分析纯, 国药), 无水乙醇(分析纯, 国药), 二甲苯(AR, 国药), 石蜡(60-62℃(沪试),

国药), 苏木素染色液(苏木素2.5g, 纯乙醇25mL, 钾明矾50g, 蒸馏水500mL, 氧化汞1.25g, 冰醋酸20mL), 伊红染色液(伊红Y0.25g, 蒸馏水100mL, 冰醋酸50μL), 盐酸乙醇分化液(70%乙醇100mL内加入1mL浓盐酸混匀即可); 真空脱水机(ASP 200S型, 徕卡), 石蜡包埋机(Leica EG 1150, 徕卡), 石蜡切片机(RM 2235型, 徕卡), Leica自动封片机(CV 5030型, 徕卡), 体式显微镜(Nikon SMZ18), 自制玻璃弯勾(此工具为玻璃电极吹制而成, 具有很细的弯勾), 正置荧光显微镜(Leica DM 4000)。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片的制作流程

固定和脱水: 将收集到的斑马鱼胚胎在4%甲醛溶液中室温固定24h。固定完成后, 将斑马鱼胚胎小心取出, 用擦镜纸包裹好放入包埋盒内, 自来水冲洗, 放在脱水机内进行脱水、透明、浸蜡, 程序依次为: 70%乙醇, 1h→85%乙醇, 2h→95%乙醇, 2h→95%乙醇, 2h→无水乙醇I, 4h→无水乙醇II, 4h→二甲苯I, 30min→二甲苯II, 30min→二甲苯III, 1h→石蜡I、62℃, 1h→石蜡II、62℃, 3h→石蜡III、62℃, 4h。

蜡块包埋: 将样本取出放入热蜡中, 取不锈钢小底模具置于热台上, 借助体式显微镜进行观察, 将斑马鱼头部冲下进行包埋, 使用自制玻璃弯勾不断调整斑马鱼方向, 直至其头部与模具底部垂直, 轻轻将模具转移至冷台, 等待石蜡冷却, 包埋完成。

切片: 将包埋好的蜡块固定在切片机上, 切片厚度设置为3μm, 修掉多余的石蜡, 借助体式显微镜观察,

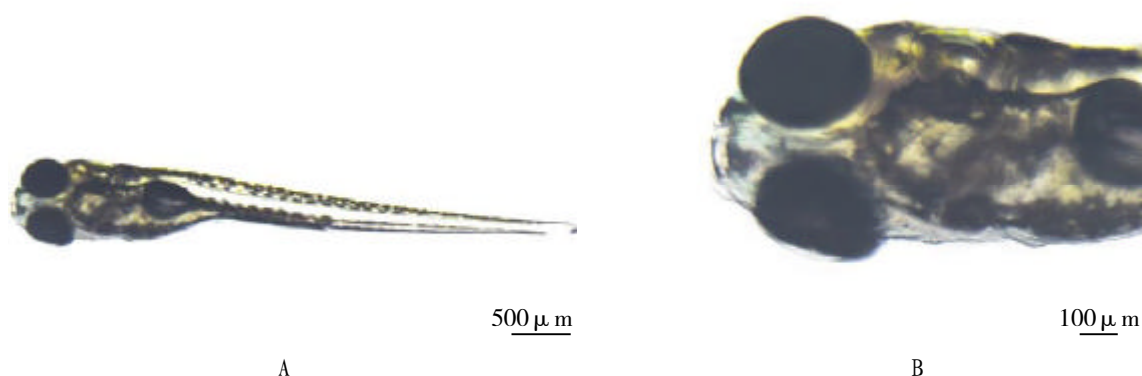


图1 正常 120 hpf 斑马鱼胚胎图 (A: 比例尺示 500 μm ; B: 比例尺示 100 μm)

表1 石蜡切片的脱蜡、染色、脱水和透明过程

脱蜡		染色		脱水和透明	
试剂	时间	试剂	时间	试剂	时间
二甲苯 I	10 min	蒸馏水	3 min	75% 乙醇	1 min
二甲苯 II	10 min	苏木素	5 min	85% 乙醇	1 min
无水乙醇	1 min	自来水蓝化	5 min	95% 乙醇	1 min
无水乙醇	1 min	盐酸酒精	5 s	无水乙醇	1 min
95% 乙醇	1 min	流水	10 min	无水乙醇	1 min
95% 乙醇	1 min	蒸馏水	3 min	二甲苯 I	1 min
85% 乙醇	1 min	伊红	2 min	二甲苯 II	1 min
75% 乙醇	1 min	流水	1 min		

调整样本固定角度。切片结束后, 将切片放到 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内过夜烤片。

1.2.2 斑马鱼胚胎眼睛石蜡切片的 HE 染色步骤

石蜡切片依次经过脱蜡、水化、HE 染色、脱水、透明等步骤完成染色, 具体如下:

脱蜡: 切片 60 $^{\circ}\text{C}$ 干烤过夜后, 进入二甲苯进行脱蜡, 二甲苯 I 和二甲苯 II 各 10min; 然后进行水化: 无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇各 1min, 蒸馏水 3min; 苏木素 - 伊红染色过程如下: 苏木素染液染色 5min, 自来水蓝化 5min, 盐酸酒精分化液分化 5s, 流水冲洗 10min, 蒸馏水 3min, 伊红染液染色 2min \rightarrow 水洗。

脱水和透明: 75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 梯度脱水 1min; 随后二甲苯 I、二甲苯 II 各 1min。最后用全自动封片机常规封片, 并使用正置显微镜观察和采集切片图像。

2 结果

2.1 石蜡切片的质量

图 2 显示: 石蜡切片完整, 薄厚均匀一致, 没有褶皱和刀痕, 没有裂痕和破损; 清晰显示了组织的正常形态结构。

2.2 切片的染色情况和染色结果分析

通过不断调整, 我们制作出结构清晰的眼睛 HE 切片 (图 3)。图中标注的结构依次为: 晶状体 (Lens), 视神经 (optic nerve, ON), 视网膜色素层 (retinal pigment epithelia, RPE), 外核细胞层 (outer nuclear layer, ONL), 内核细胞层 (inner nuclear layer, INL), 内网层 (inner plexiform layer, IPL), 背部边缘区 (dorsal marginal zone, dMZ), 腹部边缘区 (ventral marginal zone, vMZ) 以及视神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL)。

染色后细胞核质分明, 染色对比度好, 透明洁净



图2 正常120hpf斑马鱼胚胎眼睛切片HE染色图(比例尺:50 μm)

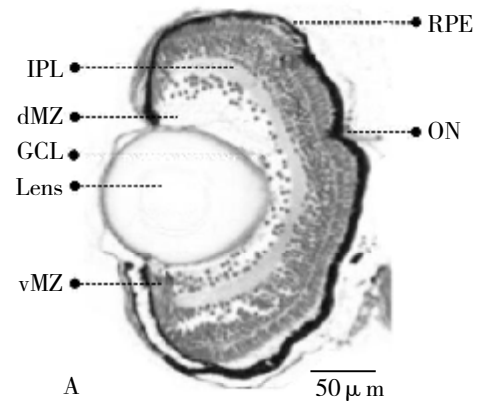


图3 受孕后120h斑马鱼胚胎眼睛切片HE染色图(比例尺:50 μm)

等要求,能够保持细胞间的正常相互关系,清晰显示组织细胞的形态结构,真实地展示组织形态学结构。

3 讨论

斑马鱼胚胎体型小,身体透明度高,脱水处理后体积更小,包埋难度大,需要借助体式显微镜进行放大后才能有效地确立满意的包埋方向,完成胚胎包埋。由于组织体积的特殊性和眼睛切片要求的高难度,样本数量需要准备多一点,包埋和切片工作还要求技术和经验,更需要耐心。另外,包埋过程中,对温度的要求很高,在调整好包埋方向之前,需要将样本一直放置在热台上,保持62℃,防止石蜡遇冷凝固。称手的弯头玻璃勺有个很细的尖头,很适合用来调整胚胎的包埋方向,当然大家也可以尝试其他有尖头的工具。至于修片,当修出组织后,及时调整切片厚度,避免组织过多地被修掉。

斑马鱼胚胎眼睛切片的制作好坏与质量,直接关系到后续的HE染色以及免疫荧光等实验效果。染色需要通过在镜下观察染色效果进行调整,以保证染色质量。对于脱水后体长只有几毫米的斑马鱼胚胎,正常斑马鱼胚胎眼睛最大直径只有180微米,切片难度可想而知^[10]。

我们通过不断测试,摸索出一套实用的切片和染色方法,希望能够为从事斑马鱼胚胎眼睛石蜡切片的研究者提供参考。

参考文献:

[1] YANG L,HO N Y,ALAHUT R,et al.Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of

chemicals[J].Reproductive Toxicology,2009,28(02):245-253.

[2] P.D.Noyes,D.E.Haggard,G.D.Gonnerman,R.L.Tanguay.Advanced morphological-behavioral test platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed to comprehensive suite of halogenated and organophosphate flame retardants[J].Toxicol Sci,2015(145):177-195.

[3] D.S.Wiley,S.E.Redfield,L.I.Zon.Chemical screening in zebrafish for novel biological and therapeutic discovery[J].Methods Cell Biol,2017(138):651-679.

[4] 赵巧雅,王新栋,孙雪婧,等.斑马鱼鳃的光镜和透射电镜观察[J].动物学杂志,2018,53(01):92-98.

[5] 陈微,章琳俐,杨平,等.斑马鱼端脑的微细形态与结构[J].水产学报,2015,39(03):371-380.

[6] 陈微,章琳俐,刘仪,等.斑马鱼中脑微细结构及相关免疫组化反应[J].畜牧与兽医,2015,47(12):89-93.

[7] 林金杏,章琳俐,姚一琳,等.斑马鱼肠道显微和超微结构的研究[J].畜牧与兽医,2013,45(03):60-66.

[8] 王宁军,赵燕,刘娟.斑马鱼器官石蜡组织切片制作与观察[J].解剖学研究,2019,04(03):240-241.

[9] 邱亚男,朱丽英,钱雯,等.斑马鱼作为模式动物在人类眼睛疾病研究中的应用[J].实验动物与比较医学,2020,40(05):440-448.

[10] Jinling Fu,Jingxue Jiao,Kechao Weng,Ruijun Li et al.Zebrafish methanol exposure causes patterning defects and suppressive cell proliferation in retina[J].Am J Transl Res,2017,09(06):2975-2983.