

技术与方法

用激光共聚焦显微术在小鼠卵母细胞中
检测蛋白激酶 C^{*}范衡宇¹⁾ 佟超¹⁾ 李满玉²⁾ 孙青原¹⁾**¹⁾中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080;²⁾中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 用免疫荧光化学与激光共聚焦显微术结合的方法研究了小鼠卵母细胞中蛋白激酶 C (PKC) α 和 β I 的表达和定位, 以及蛋白激酶 C (PKC) 和皮质颗粒的双标记, 探讨了以哺乳动物卵母细胞为实验对象进行免疫荧光共聚焦显微研究的简便方法. 结果发现, PKC α 和 β I 在小鼠生发期和 M II 期卵母细胞中都有表达, 但表达部位存在差异. 说明采用改进的激光共聚焦显微术, 可以方便、灵敏地检测特异蛋白质在卵母细胞中的表达部位, 从而为生殖、发育研究提供有效手段.

关键词 激光共聚焦显微术, 卵母细胞, 蛋白激酶 C

学科分类号 Q26

激光共聚焦显微术 (confocal laser microscopy) 是一项新兴的生物显微技术, 是利用荧光物质标记组织或细胞的某一部分, 然后用确定波长的入射光扫描样品不同层面, 并收集荧光物质被激发出的荧光, 用计算机系统进行分析, 把各个层面的荧光图像叠加起来, 形成立体图象. 免疫荧光化学术 (immunofluorochemistry) 是利用抗原-抗体特异性反应来研究特定蛋白质在组织、细胞中表达时间和部位的有用方法. 其基本原理是利用特定蛋白质的抗体, 即第一抗体 (first antibody, Ab1), 使之与组织切片或整装片 (卵母细胞或早期胚胎) 中的该种蛋白质结合, 然后加入荧光物质标记的抗第一抗体的抗体, 即第二抗体 (second antibody, Ab2), 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, 所以只有在具有该种蛋白质的部位才可见荧光, 由此研究蛋白质表达规律. 目前已有大量商品化抗体出售.

卵母细胞是细胞生物学的重要研究对象. 多种参与细胞周期调控、细胞信号转导的蛋白质以及细胞骨架成分都在卵母细胞中呈时空特异性分布, 但是卵母细胞的体积远大于体细胞, 且在排卵后游离于输卵管中, 或在体外培养系统中游离于培养液中, 不能采用常规的组织切片方法来进行免疫荧光化学处理, 而必须使用适合于卵母细胞的特殊方法.

皮质颗粒是分布在成熟卵子皮质区的直径为

0.8~2 μ m 的圆形颗粒, 内含多种酶类和糖蛋白. 卵受精之后皮质颗粒与卵质膜融合, 释放出内含物, 使透明带和卵质膜成分发生改变, 阻止多精子受精. 某些植物凝集素可以与皮质颗粒中的特异性多糖结构相结合^[1,2]. 利用荧光标记的植物凝集素抗体, 并结合激光共聚焦显微术, 可以有效地示踪皮质颗粒的分布及排放情况. 蛋白激酶 C (PKC) 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 在静息细胞中以无活性形式存在于细胞质中, 当细胞受到刺激后, PKC 转位到细胞膜上磷酸化多种靶蛋白. PKC 在卵母细胞受精后的卵活化^[3]、皮质颗粒排放^[4]和 MAPK 激活^[5]等过程中都发挥重要作用. PKC 有 12 种亚型, 在细胞中呈现分布和底物特异性^[6]. 本实验试图利用小鼠卵母细胞为实验材料, 以 PKC 和皮质颗粒为对象, 研究以卵母细胞为实验材料时, 采用简便而实用的激光共聚焦显微术.

1 材料与方法

1.1 实验动物及取材

实验动物为 4~6 周龄的雌性中国昆明小白鼠,

* 973 项目 (受精分子机理, G1999055902), 中国科学院创新工程项目, 九五预攀登项目 (970211019-2) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62562793, E-mail: sunqyl@yahoo.com

收稿日期: 2001-03-30, 接受日期: 2001-05-17

饲养在控光条件下 (14 h 光照, 10 h 黑暗), 腹腔注射孕马血清促性腺激素 (PMSG, 10 IU/只), 48 h 后杀死小鼠并取出卵巢, 在实体镜下用针刺破卵泡, 用胚胎吸管收集生发泡 (GV) 期卵母细胞; 或在注射 PMSG 48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG, 10 IU/只), 在注射 hCG 后 15 h 取出输卵管, 用尖镊子撕破输卵管壶腹, 收集 M II 期卵母细胞。

1.2 免疫荧光化学

1.2.1 蛋白激酶 C 单标记: 所有操作都在置有 50 μ l 液滴的 35 mm 胚胎培养皿中进行。把卵母细胞放入含透明质酸酶 (300 U/ml) 的 T6 胚胎培养液中, 轻轻吹打, 直至卵丘细胞脱落, 经 T6 培养液洗 3 次后, 把卵母细胞移入新鲜配制的 4% 多聚甲醛液滴中, 在 37 $^{\circ}$ C 下固定 30 min, 在清洗液滴中 (含 0.1% BSA 的 PBS) 洗三次后, 用含 0.2% Triton X 100 的 PBS 在 37 $^{\circ}$ C 下处理 15 min 以增加细胞膜透性, 用清洗液充分清洗后把卵移入封闭液滴 (含 1% BSA 的 PBS) 中, 37 $^{\circ}$ C 下处理 1 h, 以封闭抗体的非特异性结合位点。把兔抗小鼠 PKC 抗体在封闭液中按 1:100 稀释并做成液滴, 移入卵母细胞, 根据时间安排的需要, 室温孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。用清洗液滴洗卵 3 遍以充分去除未结合的抗体, 然后移入用封闭液 1:300 稀释的二抗 (FITC 标记的山羊抗兔 IgG) 之中, 室温避光孵育 30 min, 用清洗液洗 3 次, 去除未结合的二抗。最后, 用 10 mg/L 溴代碘脒 (PI) 室温处理 5 min, 对核 DNA 进行荧光染色。为防止液滴干涸, 凡处理时间长于 10 min 的步骤, 都要把培养皿置于加有蒸馏水的湿盒中。

同时, 用不加一抗的卵母细胞作为对照, 其他处理过程与实验组相同。

1.2.2 蛋白激酶 C 和皮质颗粒双标记: 为了在一枚卵中同时显示 PKC 和卵皮质颗粒的分布, 在含 1:100 稀释的兔抗小鼠 PKC β I 抗体液滴中再按 10 mg/L 加入生物素标记的扁豆凝集素 (biotin-LCA, Sigma 公司产品), 共同 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用清洗液滴洗卵 3 遍后, 用 1:300 稀释的 FITC-山羊抗兔 IgG 和 2 mg/L 的得克萨斯红-链亲和素 (Texas red-streptavidin) 室温避光孵育 30 min 后用清洗液洗 3 次。其他处理过程与 PKC 单标记相同。

如果要把样品长时间保存, 则可以在固定之后把卵放入加有 PBS 的 24 孔细胞培养板中, 然后用

封口膜把口封紧, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中可保存一周左右。如要保存更长时间, 可用 70% 乙醇代替 PBS。在要进行免疫荧光化学研究之前取出卵母细胞, 进行固定以后的处理。

取清洁的载玻片, 在中心滴一滴防荧光淬灭封片剂 (DABCO, Sigma 公司产品), 用 9:1 的凡士林/石蜡油在其四角点四个柱, 盖上一张盖玻片, 在实体镜下小心按压盖玻片, 使卵稍微受压但不至破碎。做好的样品暂时在 4 $^{\circ}$ C 下避光保存, 并在 2 d 内用共聚焦显微镜观察、照相。

1.3 激光共聚焦显微术

样品制备好后, 在 Leica 激光共聚焦显微镜下观察并照相。每组实验重复三次, 每次至少观察 10 个样品。

2 结果和讨论

如图 1a 所示, 在 GV 期卵母细胞中, PKC α 在细胞质中均匀分布, 但是在生发泡中检测不到; 在 M II 期卵母细胞中, PKC α 在细胞质中呈现不均匀分布, 只存在于细胞的周边部位 (图 1b)。在 GV 期和 M II 期的卵母细胞中生发泡和纺锤体中的 DNA 都在 PI 染色后发出红色荧光。在 M II 期卵母细胞中, PKC β I 却在细胞质中呈现均匀分布 (图 1c), 与 PKC α 不同。在对照组的 M II 期卵中, 检测不到 FITC 的荧光信号 (图 1d)。在 M II 期卵母细胞中, FITC 的绿色荧光显示 PKC α 的定位,

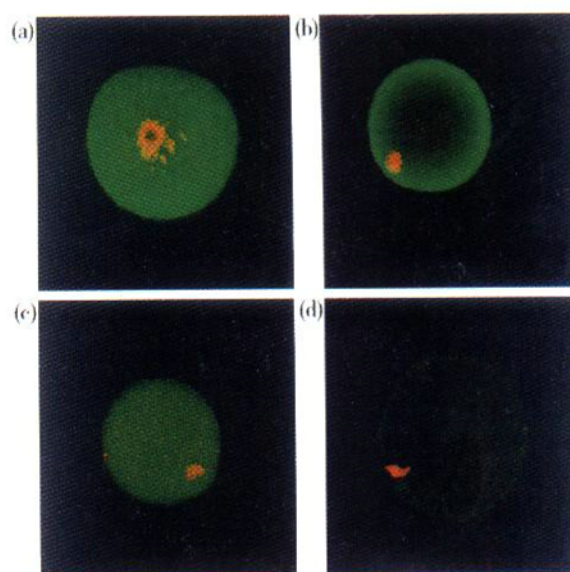


Fig 1 Expression of protein kinase C α and β I in mouse oocyte
(a) PKC α in GV oocyte; (b) PKC α in M II egg; (c) PKC β I in M II egg; (d) negative control.

Texas red 的红色荧光显示皮质颗粒的定位 (图 2). 皮质颗粒在卵质膜下呈单层分布, 在卵母细胞内部检测不到.

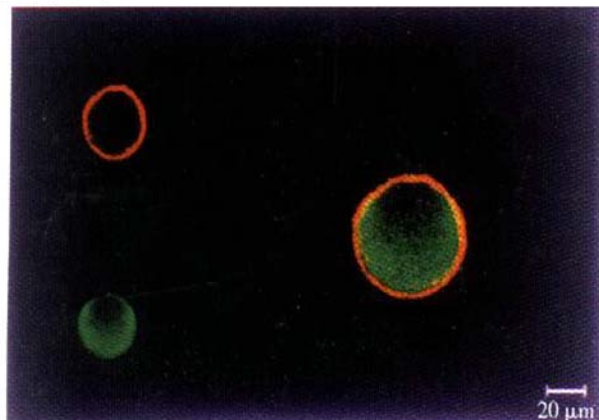


Fig. 2 Double staining of PKC α (green) and cortical granules (red) in MII egg

根据实验结果, PKC α 和 PKC β I 在卵母细胞中呈时空特异性分布. 在 GV 期卵母细胞中 PKC α 在细胞质中均匀分布, 但在 MII 期转位到质膜下, 说明随着卵母细胞的发育, PKC α 在细胞质中发生位置转变, 可能对细胞下一步的生理机能产生影响. 而且, PKC 的两种亚型, PKC α 和 PKC β I 在卵母细胞中的分布部位存在差异, 在 MII 期卵母细胞中, PKC α 位于质膜下, 而 PKC β I 则均匀分布于胞质中. 说明 PKC α 和 PKC β I 在卵母细胞中受到不同的调节, 以不同蛋白质分子作为底物, 参与不同信号转导过程. 通过对卵母细胞中 PKC α 和 PKC β I 的定位研究, 证明我们的免疫检测方法是灵敏和特异的.

通过对卵母细胞中 PKC α 和 PKC β I 的免疫荧光共聚焦显微技术研究, 我们修改、简化和发展了针对卵母细胞的免疫细胞化学技术. 共聚焦显微镜是昂贵的大型设备, 一般由专人操作, 研究者的使用受到限制; 而样品在荧光标记之后又要求立即到镜下观察. 为解决上述矛盾, 我们在从取样到抗体孵育的几个环节设计了可以自由掌握时间的方案. 首先, 在样品固定之后, 可以在 PBS 或 70% 乙醇之中较长时间保存. 在上述条件下保存一段时间, 不会对实验造成不良影响, 这样就可以随时取样并保存, 在实验条件允许的时候具备大量可用于免疫荧光化学研究的卵母细胞. 其次, 二抗结合后要当天观察照相, 否则易发生荧光淬灭, 为保证二抗结合后的当天有足够时间上镜观察, 我们设计了一抗过夜的方案, 可以在观察前一天完成大部分前期处

理, 在观察当天迅速完成荧光标记, 有足够时间进行共聚焦显微研究. 最后, 防荧光淬灭剂的使用也增加了样品处理后的保存时间.

由于哺乳动物卵母细胞取材困难, 因此在操作中应尽量避免样品的丢失. 但卵母细胞体积微小, 操作困难, 为尽量减少样品损失, 我们采取以下措施:

首先, 在不影响实验结果的前提下简化操作步骤. 许多文献要求在固定之前用链蛋白酶或酸性台氏液去掉透明带, 但我们在实验中发现, 经多聚甲醛固定后小鼠卵母细胞透明带已经变性, 在以后操作过程的反复吹吸中可自行脱去, 无须特殊处理, 因此我们省略了固定前的去透明带步骤. 由于未固定的卵母细胞失去透明带保护会变得易破和易黏附, 省略该步骤避免了卵母细胞的大量丢失和破碎.

其次, 调整操作液的理化特性以便于卵母细胞操作. 在一般免疫细胞化学研究中用普通 PBS 作为清洗液^[7], 但卵母细胞在 PBS 中有贴附培养皿的特性, 不利于吸取和转移. 向 PBS 中添加微量 BSA, 可以避免卵母细胞发生黏附, 利于操作. 这可能是因为 BSA 是带负电荷的大分子蛋白质, 可以附着在卵母细胞膜上, 使之带较多负电荷而相互排斥, 不易黏附. 有的研究者在 PBS 中添加微量 Triton X 100 和甘氨酸^[8], 但 Triton X 100 是一种表面活性分子, 会降低溶液的表面张力, 使做液滴困难, 并容易生成泡沫, 不利操作. 因此我们用 BSA 取代 Triton X 100, 也收到满意效果. 同时发现, 甘氨酸也不是必需的, 从而更简化了清洗液的配制. 但是用 Triton X 100 处理细胞以增加质膜透性的步骤是不可忽略的, 完整的卵母细胞直径达 80 μ m, 如没有增透措施, 抗体不能充分扩散入细胞. 为了解决 Triton X 100 溶液不宜做滴的问题, 在此步骤我们使用四分碟进行操作, 从而把液体限制在一定范围内, 使卵不至于四处漂移.

在某些情况下为了更好地研究某种物质在卵细胞中所行使的功能, 需同时在一个细胞中检测两种物质的分布, 以研究其相关性. 我们采用荧光物质双标记的方法, 即用不同荧光染料 (FITC 和 Texas red) 标记的二抗共同孵育, 同时标记了卵母细胞中的 PKC 和皮质颗粒, 结果发现两种信号互不干扰, 因此证明该方法适用于双重标记荧光显微术.

参 考 文 献

- 1 Wang W H, Sun Q Y, Hosoe M, *et al.* Quantified analysis of

- cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod*, 1997, **56** (5): 1376~ 1382
- 2 Yoshida M, Cran D G, Pursel V G. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocyte. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36** (4): 462~ 468
 - 3 Sun Q Y, Liu H, Chen D Y. Calcium-independent, egg age-dependent parthenogenic activation of mouse egg by staurosporine. *J Reprod Dev*, 1997, **43** (2): 189~ 197
 - 4 Sun Q Y, Wang W H, Hosoe M, *et al.* Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca^{2+} -independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Develop Growth Differ*, 1997, **39** (3): 523~ 529
 - 5 Sun Q Y, Lax Y, Robinstein S, *et al.* Mitogen-activated protein kinase and cell cycle progression during mouse egg activation induced by various stimuli. *Z Naturforsch*, 1999, **54c** (1): 285~ 294
 - 6 Luria A, Tennenbaum T, Sun Q Y, *et al.* Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development. *Biol Reprod*, 2000, **62** (3): 1564~ 1570
 - 7 Ducibella T, Anderson E, Albwertini D F, *et al.* Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Develop Biol*, 1988, **130** (1): 181~ 197
 - 8 Pahlavan G, polanski Z, Kalab P, *et al.* Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, 2000, **220** (2): 392~ 400

Detection of Protein Kinase C by Confocal Laser Microscopy in Mouse Oocyte*

FAN Heng-Yu¹⁾, TONG Chao¹⁾, LI Mar-Yu²⁾, SUN Qing-Yuan^{1)**}

(¹⁾ State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

(²⁾ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The expression and subcellular localization of protein kinase C alpha and beta I in mouse oocytes were studied by immunofluorochemistry and confocal laser microscopy. Double staining was performed to detect the PKC and cortical granules of the M II stage eggs. The results show that both PKC α and β I were expressed in mouse oocyte at G V and M II stages, but their subcellular localization were different. Simple methods of immunofluorochemistry and confocal laser microscopy in mammalian oocyte were developed. By these methods, the expression and subcellular localization can be studied conveniently and precisely, so as to provide an effective tool to the research of reproductive and developmental biology.

Key words confocal microscopy, oocyte, protein kinase C

* This work was supported by 973 project (fertilization mechanism, G1999055902) and the Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences.

** Corresponding author. Tel: 86-10-62562793, E-mail: sunqy1@yahoo.com

Received: March 30, 2001 Accepted: May 17, 2001