

斑马鱼胚胎第一次卵裂过程中胞内钙信号的研究*

高文学** 周鹏** 卫威文路张博*** 王世强***

(北京大学生命科学院, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 细胞增殖与分化教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要 钙离子作为广泛存在的细胞内信使物质, 在动物胚胎早期发育过程中扮演重要角色. 为了研究钙离子在斑马鱼胚胎发育过程中的空间分布和浓度变化, 采用 Fluo-4 和 Indo-1 作为钙离子指示剂, 利用激光共聚焦和双波长荧光比例成像技术, 对斑马鱼胚胎第一次卵裂过程中的钙信号进行了详细的跟踪观察. 在第一次卵裂过程中, 斑马鱼胚胎的动物极顶端首先出现高钙斑, 然后在分裂沟部位出现高浓度的钙信号, 这一信号在卵裂过程中持续存在. 利用 Indo-1 双波长荧光比例成像对上述过程中钙离子的时空分布进行了定量测定, 表明, 胞内钙离子在卵裂开始之前是均匀分布的, 随着分裂沟的出现, 其附近区域的钙浓度显著升高, 而胞内其他区域的钙浓度则保持不变. 双波长荧光比例成像排除了荧光染料分布不均匀造成的干扰, 为钙信号与胚胎分裂的密切关系提供了确凿的定量依据.

关键词 斑马鱼, 早期胚胎, 钙信号

学科分类号 Q2, Q4

钙离子作为重要的细胞内信使, 行使着重要的生理功能, 如参与肌肉收缩、蛋白质分泌、基因表达等众多生命活动. 细胞内静息水平的 Ca^{2+} 通常维持在 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 左右, 在特定条件下, 当细胞受到刺激时, 胞内 Ca^{2+} 浓度能迅速升高到 $1 \mu\text{mol/L}$ 甚至 $10 \mu\text{mol/L}$. Ca^{2+} 的分布具有复杂的时间和空间特性, 具有局部高钙区、钙波、钙振荡等多种形式. 在动物胚胎的发育过程中可以看到多种钙信号模式, 不同的模式与相应的生理过程有关^[1].

在对早期胚胎钙信号的研究中, 斑马鱼作为一种模式动物具有很多优势. 它在体外受精, 胚胎体外发育, 卵的直径较大 (0.8 mm 左右), 从受精到孵化后一段时间内鱼体透明, 这些特点都便于对斑马鱼胚胎内的钙活动进行观察^[2]. 现有的研究大多通过将水母发光蛋白(Aequorin)、Calcium Green 等钙离子探针注射到卵或者胚胎中, 以此观测不同发育时期和不同细胞区域内的钙信号变化^[3,4].

斑马鱼在不同发育阶段存在不同的钙信号形式. 在斑马鱼胚胎卵裂周期中检测到局部的胞内钙信号, 这时钙波的速度在 $0.5 \mu\text{m/s}$, 被认为有助于分裂沟的定位和二细胞的形成^[5]. 囊胚期则出现细胞间钙信号, 这种信号与多细胞的协调有关^[4,6]. 在原肠期出现的节律性钙波与这一时期不同类型细

胞的大规模运动有关, 这种节律性钙波的波速为 $5 \mu\text{m/s}$, 沿着胚胎的前后轴传播^[7]. 在分节期, 躯干部连续的钙瞬变与体节的形成有关^[8], 可以观察到在即将出现的后脑部是低钙区, 在前脑和中脑是高钙区, 在眼原基观察到瞬变钙脉冲, 在心脏区域可观察到低频高幅钙波^[9], 这些钙信号形式与这些器官的发育密切相关. 可见在斑马鱼胚胎发育过程中, 钙信号具有相当重要的地位.

在斑马鱼发育过程的钙信号研究中, 大量工作集中于钙信号模式的观察, 而对钙信号时空变化的定量分析则在整个鱼类研究中均是空白. 本文以斑马鱼受精卵以及早期胚胎为实验材料, 使用 Fluo-4 和 Indo-1 作为钙指示剂, 对斑马鱼早期胚胎发育过程中的钙信号进行了定量研究, 对钙浓度的变化规律进行了更加深入的探索.

*国家重点基础研究发展规划(973)(2004CB720007, 2005CB522504)、国家自然科学基金(30421004,30425035)和美国 NIH(R01 TW007269)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

张博. Tel: 010-62759072, E-mail: bzhang@pku.edu.cn

王世强. Tel: 010-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn

收稿日期: 2007-04-24, 接受日期: 2007-05-25

1 材料与方法

1.1 材料

斑马鱼(*Danio rerio*)(Tübingen 品系)由北京大学生命科学院遗传发育中心斑马鱼实验室提供。

Indo-1 钾盐、Fluo-4 钾盐、Texas Red 购自 Invitrogen Corporation, 其他药品均购自北京化学试剂公司。

胚胎培养液成分为: 13.7 mmol/L NaCl, 0.54 mmol/L KCl, 0.025 mmol/L Na₂HPO₄, 0.044 mmol/L KH₂PO₄, 1.3 mmol/L CaCl₂, 1.0 mmol/L MgSO₄ 和 4.2 mmol/L NaHCO₃, pH 7.2.

1.2 方法

1.2.1 卵的收集. 斑马鱼的光周期为 14 h / 10 h (光照 / 黑暗), 温度保持在 28.5°C. 在收集胚胎的前一天晚上将 1 条雌鱼和 1 条雄鱼用隔板隔开放入配鱼缸. 收集胚胎时移去隔板, 在 2 条鱼追逐过程中雌鱼将卵产在水中并进行体外受精. 将收集的受精卵用胚胎培养液清洗后, 置于解剖镜下注射。

1.2.2 染料注射方法. 使用拉针仪(NARISHIGE PN-30)将芯入式硝子管(NARISHIGE GD-1)拉成 2 根尖端封闭的玻璃针, 在显微镜(ZEISS TLB3.1)下用镊子将玻璃针尖端去掉, 使之形成开口. 将受精卵置于预先做好的琼脂板上固定. 使用注射仪(HARVARD APPARATUS PLI-90)将含有所需荧光染料(0.125 mmol/L Indo-1 钾盐、2.5 mmol/L Fluo-4 钾盐或 1 g/L Texas Red)的注射液注入斑马鱼胚胎中, 每个胚胎定量注射 2 nl, 约占卵总体积的 1%. 由于注射时间早在形成动物极之前, 此时整个受精卵的细胞质相互联通, 所注染料在整个卵内扩散, 并在动物极形成过程中随着胞质流进入动物极细胞。

1.2.3 激光共聚焦显微成像. 将注射 Fluo-4 和 Texas Red 的卵置于 Zeiss LSM-510 激光共聚焦显微镜(Zeiss)下观察. Fluo-4 的激发光为氩激光, 波长 488 nm, 发射光接收范围为 500~550 nm; Texas Red 的激发光为氩-氖激光, 波长 543 nm, 发射光接收范围 > 560 nm. 物镜放大倍数为 10×, 数值孔径为 0.3, 面扫描图像分辨率为 512×512.

1.2.4 Indo-1 双波长荧光成像. 在荧光显微镜(Nikon)下, 观察注入 Indo-1 钾盐的斑马鱼胚胎. 使用紫外光进行激发, 紫外物镜放大倍数为 20×, 数值孔径为 0.65. 通过 Optosplit II 分光系统(Cairn)分离 405 nm 与 485 nm 荧光成分, 并同时成像于

Luca 高灵敏 CCD 相机 (Andor Technology). 2 幅图像荧光强度的比值 $R_{405/485}$ 反映了钙浓度的变化, 其关系方程式为:

$$[Ca] = \beta \cdot K_d \cdot (R_{405/485} - R_{min}) / (R_{max} - R_{405/485}) \quad (1)$$

其中, [Ca] 为自由钙离子浓度, R_{min} 与 R_{max} 分别表示 Indo-1 与钙离子完全解离与完全结合条件下的 405/485 荧光比值, K_d 表示 Indo-1 与钙离子的解离常数, β 表示 Indo-1 结合钙离子前后的 485 nm 荧光强度比值^[10].

1.2.5 Indo-1 钙浓度标准曲线的测定. 通过细胞内标定方法测定钙浓度的标准曲线, 利用 EGTA-Ca²⁺ 缓冲体系配制标准溶液, 配方根据 WEBMAXCLITE v1.15 软件 (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) 计算, 结果如表 1 所示. 将各组标准缓冲液中加入 Indo-1 钾盐, 分别注射到斑马鱼胚胎中, 成像并计算相应的 $R_{405/485}$, 在此基础上绘制 Indo-1 的标准曲线。

Table 1 Components of free [Ca] standard solutions (pH 7.40 at 25°C)

$c(\text{EGTA})$ /(mmol·L ⁻¹)	$c(\text{CaCl}_2)$ /(mmol·L ⁻¹)	Solution [Ca] /(nmol·L ⁻¹)	Embryo [Ca] /(nmol·L ⁻¹) ¹⁾
200	0	0	< 0.01
200	26.90	10	11.17
200	121.70	100	126.07
200	151.31	200	225.00
200	177.18	500	560.50

¹⁾ Intracellular [Ca] of embryo was calculated on the assumption that standard solutions injected were diluted 100-fold in the cells, while intracellular ATP and Mg²⁺ concentrations were 5 and 6 mmol/L.

1.2.6 数据统计. 利用 IDL 5.5 图像处理软件编写程序计算 $R_{405/485}$ 及胞内钙离子浓度. 使用 SigmaPlot 8.02 软件进行曲线拟合. 所有数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 方式表示, 根据适用情况选择 t 检验或单因素方差分析判断差异显著性, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结 果

2.1 使用 Fluo-4 钾盐检测斑马鱼胚胎中的钙信号

采用钙荧光探针 Fluo-4, 通过激光共聚焦显微成像方法检测不同发育时期的钙信号变化. 随着发育的进行, 在受精后 25 min 就可以见到动物极胚盘, 在胚盘部位各处荧光强度均匀. 在 30 min 可以看到在动物极顶点出现荧光亮斑, 在 35 min 可以看到在分裂沟区域有较强的荧光亮度, 这种较强的

荧光伴随在分裂沟的边缘. 较强的荧光区域继续维持, 直到 40 min 细胞分裂成二细胞时依然存在 (图 1a~h).

Fluo-4 的荧光强度不仅取决于钙离子浓度, 还取决于染料自身的浓度. 如果 Fluo-4 浓度不均, 则其荧光强度不能直接代表钙离子浓度. 为了检验荧光探针注入后是否在细胞内均匀分布, 我们将

Texas Red 与 Fluo-4 同时注入卵内观察. Texas Red 是一种非钙离子结合的染料, 其荧光亮度仅代表染料浓度. 我们发现, Texas Red 在细胞内的分布并不总是均匀的, 并且其浓度分布与 Fluo-4 的荧光亮度分布具有相关性(图 1 i~k). 这一现象表明 Fluo-4 的分布也可能不均匀, 其荧光亮度并不总是能完全反映胞内钙浓度的变化.

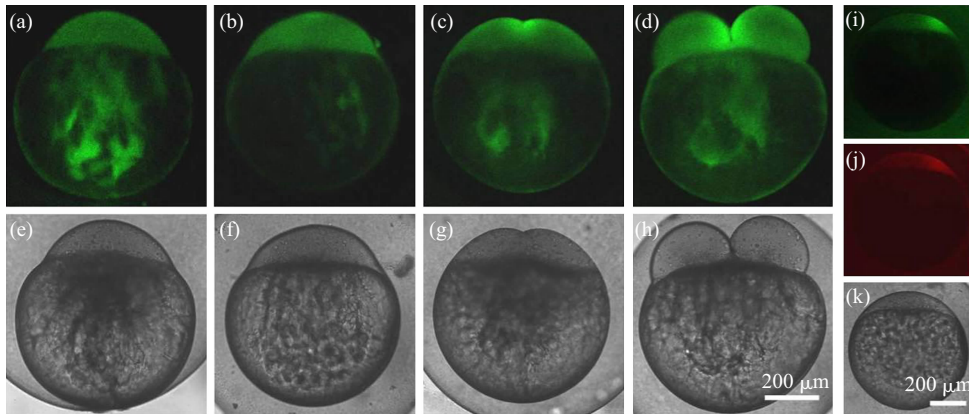


Fig. 1 Representative Fluo-4 fluorescence patterns (upper panels) and transmission images (lower panels) during the cleavage period using confocal microscopic imaging
 (a, e) 25 min after fertilization. (b, f) 30 min after fertilization. (c, g) 35 min after fertilization. (d, h) 40 min after fertilization. An example showing that high Fluo-4 fluorescence (i) may result from the inhomogeneity of dyes as revealed by Texas Red (j). Fluo-4 (green) and Texas Red (red) were injected together into an egg (k) in the zygote period.

2.2 使用 Indo-1 钾盐检测斑马鱼胚胎中的钙信号

与 Fluo-4 不同, Indo-1 在结合钙离子前后具有不同的发射波长, 这 2 种波长荧光强度的比例是一个与荧光探针无关的量, 因此广泛用于胞内钙离子浓度的定量测定. 我们利用 Indo-1 钾盐作为钙指示剂注射到斑马鱼胚胎, 根据 405 nm 与 485 nm 发射光强度的比值, 观测钙离子浓度在发育过程中的变

化. 如图 2 所示, 当动物极胚盘刚刚形成时, 自由钙离子在整个动物极中均匀分布, 受精后约 30 min 动物极顶部出现高钙斑, 受精后 35 min 到 40 min, 随着分裂沟出现并加深的同时, 其附近的钙离子浓度显著高于胞内其他区域, 形成沿分裂沟分布的高钙区, 并在二细胞形成过程中持续存在.

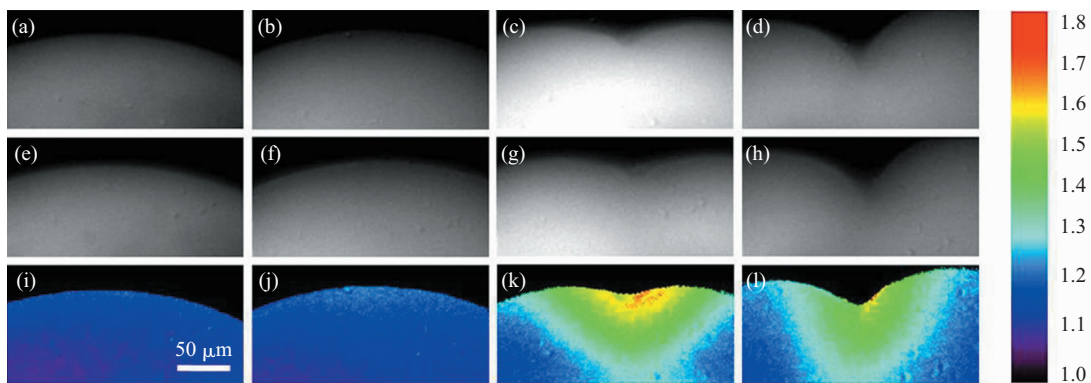


Fig. 2 Representative Indo-1 fluorescence images during cleavage in the zygote
 (a, e, i) 25 min after fertilization. (b, f, j) 30 min after fertilization. (c, g, k) 35 min after fertilization. (d, h, l) 40 min after fertilization. (a~d) 405nm, (e~h) 485nm, (i~l) $R_{405/485}$.

2.3 根据 Indo-1 标准曲线计算胞内钙浓度

根据公式(1), 要通过 $R_{405/485}$ 计算钙离子浓度, 需要先测定 Indo-1 荧光比值的标准曲线、确定 R_{min} 、 R_{max} 和 $\beta \cdot K_d$ 的数值. 由于荧光探针分子与胞内蛋白质的结合会显著改变这几个参数, 因此这一工作必须在胚胎内进行.

实验中使用不同 Ca^{2+} 浓度的缓冲液与 Indo-1 钾盐混合后注入斑马鱼胚胎, 分别记录不同钙浓度条件下的胞内荧光比值. 由于注射液中 $[Ca]$ 过高 ($>1 \text{ mmol/L}$) 会导致斑马鱼胚胎在短时间内死亡, 难以直接测定 R_{max} , 因此我们利用大鼠心肌细胞在同一套装置上的记录结果与斑马鱼胚胎实验得到的数据进行校对. 如图 3 所示, 二者结果基本吻合. 根据测定结果 $R_{max} = 3.8$, $R_{min} = 1.1$, 按照公式(1)对胚胎注射结果进行拟合, 从而得出钙浓度与荧光比值之间的标准关系曲线, 拟合结果 $\beta \cdot K_d = 2310 \text{ nmol/L}$. 将上述结果代入公式(1), 即可计算斑马鱼胚胎发育过程中的不同区域的钙浓度.

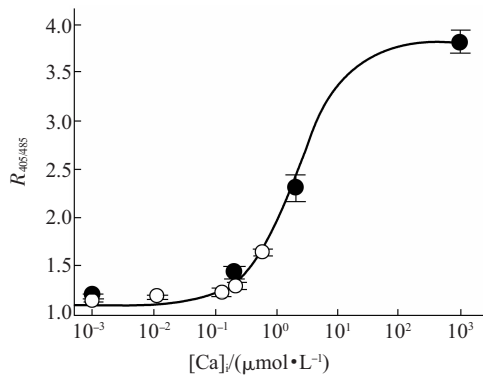


Fig. 3 *In vivo* calibration of Indo-1 fluorescence

The relationship between fluorescence ratio and $[Ca]_i$ was obtained from experiments on zebrafish eggs ($\circ-\circ$, $n = 3$) and rat cardiomyocytes ($\bullet-\bullet$, $n \geq 3$), respectively. The solid line is a curve fit to $R_{405/485} = (R_{max} - R_{min}) / (1 + \beta \cdot K_d / [Ca]_i) + R_{min}$. ($\beta \cdot K_d = 2310 \text{ nmol/L}$).

2.4 钙信号的定量分析

选取卵裂沟附近区域(图 4 红色框)及距离卵裂沟 $100 \mu\text{m}$ 的区域(图 4 黄色框), 计算所选区域内的钙浓度在不同发育阶段的变化. 如图 4 所示, 在胚盘形成后的最初阶段, 胚盘顶端(未来形成卵裂沟的位置)与其他部位的自由钙离子浓度没有显著差异, 胞内钙离子呈均匀分布, 平均钙浓度为 $(92 \pm 4) \text{ nmol/L}$. 从受精后 30 min 起, 胚盘顶部钙浓度开始升高, 在受精后 35 min 形成分裂沟时达到顶峰 $(295 \pm 14) \text{ nmol/L}$, 之后有所下降 $(205 \pm 35) \text{ nmol/L}$, 但仍然高于其他区域, 而在同一时期

内, 细胞其他部位的钙离子浓度并不随时间而变化(单因素方差分析, $P > 0.10$).

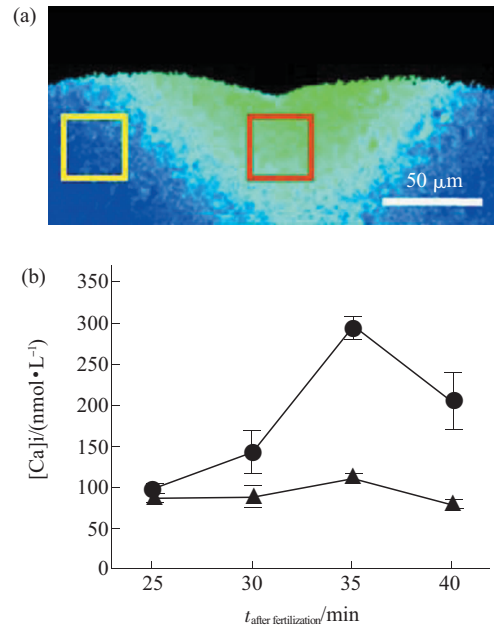


Fig. 4 Time-dependent change of intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca]_i$) in zebrafish embryos

(a) The image of an embryo as an example showing two areas of interest, marked in yellow and red, respectively, for the calculation of $[Ca]_i$. (b) $[Ca]_i$ changes in the red ($\bullet-\bullet$) or yellow ($\blacktriangle-\blacktriangle$) areas ($n = 4$).

3 讨论

在已有的斑马鱼研究中, 大多利用了水母发光蛋白(Aequorin)^[11]或 Calcium Green^[12]观测从受精到胚胎第一次卵裂过程中的钙信号, 认为卵裂过程伴随着细胞内的钙浓度变化. 在我们的实验中使用 Fluo-4 观察到了同样的现象, 但也同时发现这一方法与文献中已有的报道存在着共同的缺陷, 即难以确保注入的染料在细胞内部均匀分布. 由于 Aequorin、Calcium Green 和 Fluo-4 都是通过发射光的强度反映钙离子浓度的, 在染料分布不均匀的情况下, 就会造成钙浓度发生变化的假象(图 1 i~k). 因此, 单独使用上述几种染料都难以准确判断钙信号的实际变化情况, 更无法据此对胞内钙浓度进行定量分析.

为了解决上述问题, 本文首次引入了 Indo-1 染色的方法对鱼类胚胎钙信号进行观测. Indo-1 是典型的双发射荧光探针, 与钙离子结合前后其发射光谱有明显变化, 未结合钙时的发射峰位于 485 nm , 与钙结合后位于 405 nm ^[10]. 这 2 种发射光强度的比值 $R_{405/485}$ 仅随细胞内 Ca^{2+} 浓度的提高而增

加, 而并不依赖于 Indo-1 本身的浓度. 因此, 即使在染料不均匀分布的情况下, Indo-1 仍然能够准确反映钙离子浓度的变化. 通过注射 Indo-1 染料的方法, 我们观察了斑马鱼胚胎受精后第一次细胞分裂过程中的胞内钙浓度变化, 发现钙信号在第一次卵裂过程中是真实存在的(图 2). 在此基础上, 我们对这种钙信号的特征进行了进一步分析.

由于过去的研究方法所限, 对于鱼类胚胎内的钙浓度尚无定量研究. 应用 Indo-1 作为钙指示剂, 我们针对这一问题首次进行了深入的探索. 由于 Indo-1 具有双发射峰的性质, 我们可以根据 $R_{405/485}$ 对胞内钙离子浓度进行定量分析, 而无需确定染料浓度[公式(1)]. 实验结果表明: 在胚盘形成后, 钙离子首先均匀分布在动物极胚盘, 在此之后, 钙浓度的空间分布出现改变, 在胚盘顶端形成局部的高钙斑, 即定位信号. 随着分裂沟的出现, 高钙斑的浓度增大、空间范围延伸, 形成沿分裂沟分布的钙信号, 这一信号可以维持相当长的时间, 直到第一次卵裂完成时仍然存在. 而在胞内其他区域中, 钙离子浓度始终保持不变. 这一现象提示我们: 高钙区的出现与分裂沟的出现是密切相关的, 这种钙信号很可能控制着分裂过程本身, 从而在斑马鱼胚胎的早期发育中发挥重要作用. 另一方面, 在斑马鱼卵裂的整个过程中, 非分裂沟区域始终维持着恒定的静息钙浓度(图 4), 这表明从胚盘形成起, 斑马鱼胚胎已经具备了完善的钙调控机制, 能够通过主动转运方式对胞内钙浓度进行精细控制.

文献报道认为, 斑马鱼胚胎发育过程中的钙信号并非来自细胞外钙离子, 而是由内质网上的三磷酸肌醇受体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R) 钙释放通道所介导的^[3,5,13]. 根据文献报道, 向卵内注射 IP3 后, 整个动物极胚盘都出现了钙释放活动, 这表明非分裂沟区域内同样分布着具有完整功能的 IP3R^[13]. 在第一次卵裂过程中, 尽管整个细胞都具备完整的钙释放功能, 但仅在分裂沟部位出现持续的高浓度钙信号, 而细胞其他部位并不进行钙释放活动. 相反, 由于分裂沟部位释放的钙离子在细胞内的扩散过程, 其他部位必须不断地将这些钙运回内质网中.

据此我们推测, 伴随着第一次卵裂, 存在钙离子在胞质和内质网间的循环过程, 细胞通过一系列耗能反应, 在分裂沟附近区域维持高钙浓度, 同时确保其他部位的钙浓度不受影响. 这一现象对于胚胎早期发育具有重大意义, 但其分子机制仍有待研

究. 有报道称, 分裂沟附近也是内质网和 IP3R 的富集区域, 并认为这种富集现象为钙信号的产生提供了结构基础^[13]. 然而如前所述, 斑马鱼胚胎在这一时期内已经形成了有效而精确的钙调控机制, 如果此时的细胞仍然需要依靠钙释放通道的空间分布 (而非调节信号分子如 IP3 的分布) 来调节胞内的钙浓度变化, 在能量消耗方面就显得很不合理. 同时, 细胞的其他部位同样具有功能完整的 IP3R^[13], 其与分裂沟部位的差异可能仅仅是蛋白质密度的不同. 因此, 内质网和 IP3R 的空间分布并不足以充分解释卵裂过程中钙信号的成因, 这种钙信号的形成机制尚有待于进一步的研究来加以阐明.

致谢 本文完成过程中, 李伟业、白在玲、郭运波、白雪、唐爱辉、黄鹏、刘音等同学给予很大帮助, 在此致以衷心的感谢.

参 考 文 献

- Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev*, 2006, **86** (1): 25~88
- Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995, **203** (3): 253~310
- Webb S E, Miller A L. Calcium signalling during zebrafish embryonic development. *Bioessays*, 2000, **22** (2): 113~123
- Chang D C, Meng C. A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo. *J Cell Biol*, 1995, **131** (6 Pt 1): 1539~1545
- Webb S E, Lee K W, Karplus E, *et al.* Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev Biol*, 1997, **192** (1): 78~92
- Kane D A, Kimmel C B. The zebrafish midblastula transition. *Development*, 1993, **119** (2): 447~456
- Gilland E, Miller A L, Karplus E, *et al.* Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (1): 157~161
- Chernoff E A G, Hilfer S R. Calcium dependence and contraction in somite formation. *Tissue and Cell*, 1982, **14** (3): 435~449
- Stainier D Y R, Lee R K, Fishman M C. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*, 1993, **119** (1): 31~40
- Grynkievicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, **260** (6): 3440~3450
- Creton R, Speksnijder J E, Jaffe L F. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *J Cell Sci*, 1998, **111** (12): 1613~1622
- Chang D C, Lu P. Multiple types of calcium signals are associated with cell division in zebrafish embryo. *Microscopy Research and Technique*, 2000, **49**: 111~122
- Lee K W, Webb S E, Miller A L. Ca²⁺ released via IP3 receptors is required for furrow deepening during cytokinesis in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol*, 2003, **47** (6): 411~421

Intracellular Calcium Signaling During The First Cleavage of Zebrafish Embryo*

GAO Wen-Xue**, ZHOU Peng**, WEI Wei, WEN Lu, ZHANG Bo***, WANG Shi-Qiang***

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology and Key Laboratory of Cell Proliferation and Differentiation,
College of Life Science, Peking University, Ministry of Education, Beijing 100871, China)

Abstract Ca^{2+} is a ubiquitous second messenger which plays a key role in early development of embryos. Ca^{2+} probes (Fluo-4 or Indo-1) were injected into zebrafish eggs to detect the distribution of free Ca^{2+} during their first cleavage using confocal microscopic or dual-wavelength ratiometric imaging. A high Ca^{2+} zone was first observed in the animal pole right before the first cleavage, then it extended along the cleavage furrow and the Ca^{2+} signal remained high in this region throughout the first cleavage. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}]_i$) was measured *via* Indo-1 dual-wavelength system, and it was shown to be homogeneous within the whole embryo before the first cleavage. During the first cleavage, $[\text{Ca}]_i$ increased significantly near the cleavage furrow, while it remained unchanged in other areas. As the dual-wavelength ratiometric imaging eliminates the artifacts due to indicator inhomogeneity, the results provided an unequivocal quantification for the Ca^{2+} dynamics associated with the first cleavage of embryonic development.

Key words zebrafish, early embryo, calcium signaling

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB720007, 2005CB522504), The National Natural Science Foundation of China (30421004, 30425035), National Institutes of Health, USA (R01 TW007269).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author .

ZHANG Bo. Tel: 86-10-62759072, E-mail: bzhang@pku.edu.cn

WANG Shi-Qiang. Tel: 86-10-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn

Received: April 24, 2007 Accepted: May 25, 2007