

## 技术与方法

## 改良透射电镜方法观察小鼠 ICSI 胚胎核仁超微结构

郑 重 胡丽丽 文 刚 张宝东 雷 蕾\*

(哈尔滨医科大学基础医学院组胚教研室, 哈尔滨 150081)

**摘要** 小鼠植入前胚胎的发育过程中,核仁经历从简单到复杂、从致密结构到网状结构的变化。对核仁超微结构的观察有助于揭示早期胚胎发育过程中核仁结构的动态变化及其特定阶段的功能。但由于核仁结构微小,数目较少,并且在胚胎中只处于卵裂球细胞核的内部,难以定位,因而给核仁的超微结构观察带来很大的困难。本实验探索了透射电镜观察小鼠植入前胚胎核仁的方法:先用琼脂对小鼠胚胎进行预包埋,在经过常规的透射电镜样品制备流程后,将整个胚胎先切成半薄切片;经过甲苯胺蓝染色后,选取含核仁结构的切片进行重包埋;最后再对回收来的半薄切片进行超薄切片,醋酸铀染色后上电镜观察;最终成功获得小鼠胚胎植入前发育不同时期核仁清晰的透射电镜图像。

**关键词** 小鼠胚胎;核仁;透射电镜;超微结构;重包埋

核仁是真核细胞核内重要的结构,具有rDNA转录、核糖体亚基装配、细胞周期调控、细胞应激感受等多种重要生物学作用<sup>[1]</sup>。哺乳动物早期胚胎的卵裂球内最初只出现核仁样结构,表现为致密的纤维球状体,即核仁前体(Nucleolus precursor body, NPB)。随着合子基因组的激活, NPBs的周边或内部开始出现空腔,继而发育出整体呈现纤维网状的活性核仁结构,也称功能核仁<sup>[2]</sup>。哺乳动物不同来源(正常受精、孤雌激活、核移植等)的胚胎发育能力不同,而功能核仁出现的时间也不尽相同<sup>[3]</sup>,这种差异对不同胚胎的发育的影响有待进一步研究。

核仁超微结构的变化直接反应了其功能,而观察核仁超微结构最直接的手段是透射电镜(TEM)技术。常见实验用哺乳动物的胚胎体积都很小,以小鼠为例,其早期胚胎的直径大约在80~120 μm之间,常规的透射电镜样品制备流程很难适用。为解决这个问题,国外的研究者先将4%的琼脂滴在胚胎上,然后切成包含胚胎的琼脂小块,再进行后续的操作,大大降低了制样的难度<sup>[4]</sup>。观察核仁超微结构的另外一个难点是核仁很小,直径仅为3~6 μm,且只位于胚胎间期卵裂球的细胞核内部有限区域,大大增加了定位和切片的难度。有研究者先对胚胎进行半薄切片,染色后再筛选出目的切片进行后续操作,部分降低了实验

工作量,但与此同时提高了实验难度<sup>[5]</sup>。

由于上述的原因,到目前为止,国际上关于小鼠、猪、牛等实验动物卵母细胞和早期胚胎核仁超微结构的研究仅限于几个实验室<sup>[3,6]</sup>,国内仅有几篇关于小鼠卵母细胞和早期胚胎的透射电镜实验的报道<sup>[7,8]</sup>,而没有关于核仁超微结构的报道。

本实验选用了不同发育时期的 B6D2F1 小鼠的单精注射(ICSI)胚胎,探索了透射电镜观察小鼠植入前胚胎核仁的实验方法,旨在建立一套切实可行的、高效的观察小鼠胚胎核仁超微结构的方案,为今后进一步研究该时期核仁的变化和对不同类型胚胎发育的影响提供技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 ICSI 胚胎的获得

8~10周龄B6D2F1雌鼠腹腔内注射7.5 U PMSG,48小时后腹腔再注射5 U hCG。于hCG注射13~14小时后断颈法处死小鼠并取卵,取出的MII期卵母细胞置于CZBG培养液中备用。B6D2F1雄鼠断颈法处

收稿日期: 2010-09-26 接受日期: 2010-10-08

国家自然科学基金(No.30671025)和黑龙江省留学归国人员科学技术专项资金(No.LC07C17)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0451-86674518, E-mail: lei1086@yahoo.com.cn

死, 分离附睾尾, CZBG-HEPES 中剪碎, 收集活力较好的精子到 0.5 ml 小离心管中备用。在显微操作仪的辅助下, 用 PIEZO 装置先将精子断尾, 之后将单个精子头分别注入卵母细胞中。将操作完成的胚胎放入预平衡的KSOM培养液中, 于CO<sub>2</sub>恒温培养箱内培养, 培养条件为 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 饱和湿度。

## 1.2 透射电镜样品的制备

1.2.1 前固定 分别在单精注射操作后 6 h、早 2- 细胞(hCG 注射后 34~37 h)、晚 2- 细胞(hCG 注射后 49~52 h)、4- 细胞(hCG 注射后 57~60 h)阶段取胚胎在 1 mol/L 磷酸缓冲液(PB, pH=7.1~7.4)中清洗 2 遍, 之后胚胎在 3% 戊二醛中 4°C 固定 1 小时, 取出后在 PB 中清洗数遍。

1.2.2 预包埋 将浓度为 4%~5%、温度为 40~50°C 的琼脂滴到干净的载玻片上, 实体镜下快速用口吸管在琼脂滴中吹入单个胚胎, 重复操作。待琼脂滴冷却凝固后用刀片切成 2×2×2 mm 见方包含胚胎的小块, PB 中清洗数遍。

1.2.3 后固定 将琼脂块放入 EP 管中, 加入 1% 锇酸(OsO<sub>4</sub>) 在 4°C 下固定 2 h, PB 清洗 2 遍后再用蒸馏水清洗 2 遍。

1.2.4 脱水 依次用 50%、70%、96% 酒精梯度脱水, 每次 10 min, 最后在 99% 酒精中脱水 2 次, 每次 20min。

1.2.5 置换 将脱水后的样品放于环氧丙烷中浸泡 2 次, 每次 10min, 置换出其中的酒精。

1.2.6 浸透 环氧丙烷和包埋剂(Epon812)分别以 2:1、1:1、1:2 比例混合的混合液, 依次浸透样品, 每次 20 min, 最后将样品转移至纯 Epon812 中敞口摇床过夜。

1.2.7 包埋 在橡胶包埋模具里注入 Epon812, 每个槽中放入样品, 细针调整样品琼脂块于凹槽尖部。

1.2.8 聚合 样品在 60°C 恒温培养箱中聚合 1~2 天。

## 1.3 半薄切片和筛选

1.3.1 半薄切片 将聚合后的样品柱从模具中取出后进行修块, 使胚胎贴近表面。用超薄切片机将整个胚胎切成半薄切片, 厚度为 4~5 μm。切片捞出后平

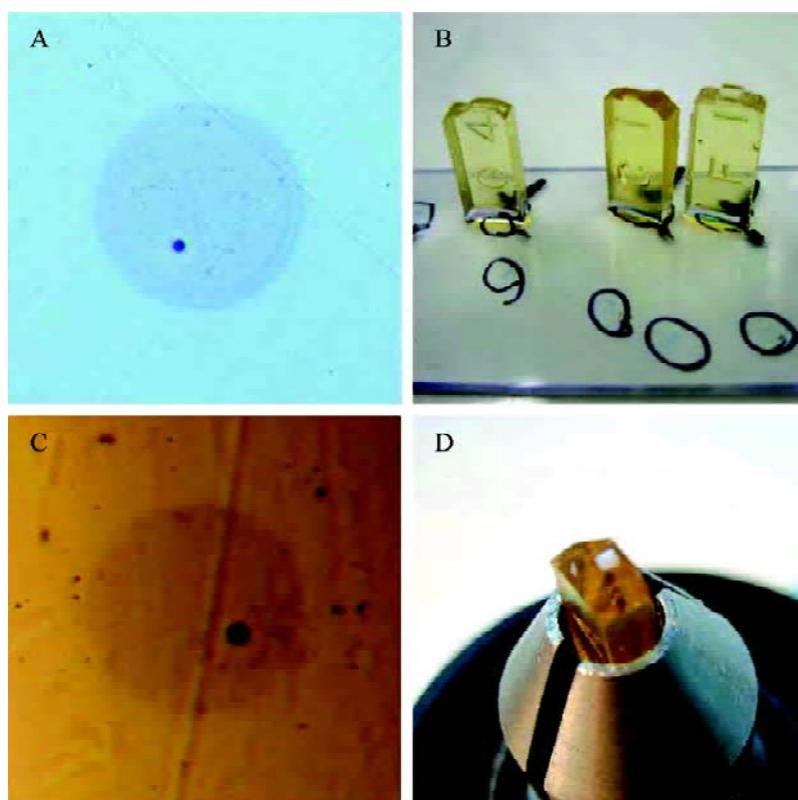


图 1 目标半薄切片的重包埋和回收

A: 光学显微镜下的半薄切片; B: 对目标半薄切片进行重包埋; C: 倒置显微镜观察回收的半薄切片; D: 用于超薄切片的样品柱。

Fig.1 Re-embed and recycle of target semi-thin sections

A: semi-thin section under light microscope; B: re-embed of target semi-thin sections; C: recycled semi-thin section under reverse microscope; D: sample before conduct ultra-thin section.

展于滴有蒸馏水的载玻片上,于45℃烤片台上烤干。

**1.3.2 染色和筛选** 将半薄切片在1%甲苯胺蓝溶液中染色5 min<sup>[9]</sup>,之后用蒸馏水洗去多余染料。烘干后在普通光学显微镜下挑出包含核仁结构的半薄切片(图1A),并做好标记,丢弃不含目标结构的切片。

#### 1.4 重包埋和回收

**1.4.1 重包埋** 将空白的包埋柱顶部蘸少许Epon812,倒扣在含核仁结构的半薄切片上,载玻片保持水平状态,在60℃恒温箱中聚合过夜(图1B)。

**1.4.2 目标半薄切片的回收** 将重包埋的载玻片投入液氮中,反复冻融和敲打,使包埋柱与载玻片分离,在体视显微镜下观察,如表面有玻璃碎片必须除去(图1C)。

#### 1.5 超薄切片和电镜观察

将回收来的样品柱顶面修成边长约1.5 mm的矩形(图1D),之后进行超薄切片,醋酸铀染色并干燥后,透射电镜下观察并获取图像。

## 2 结果

### 2.1 半薄切片的染色和筛选

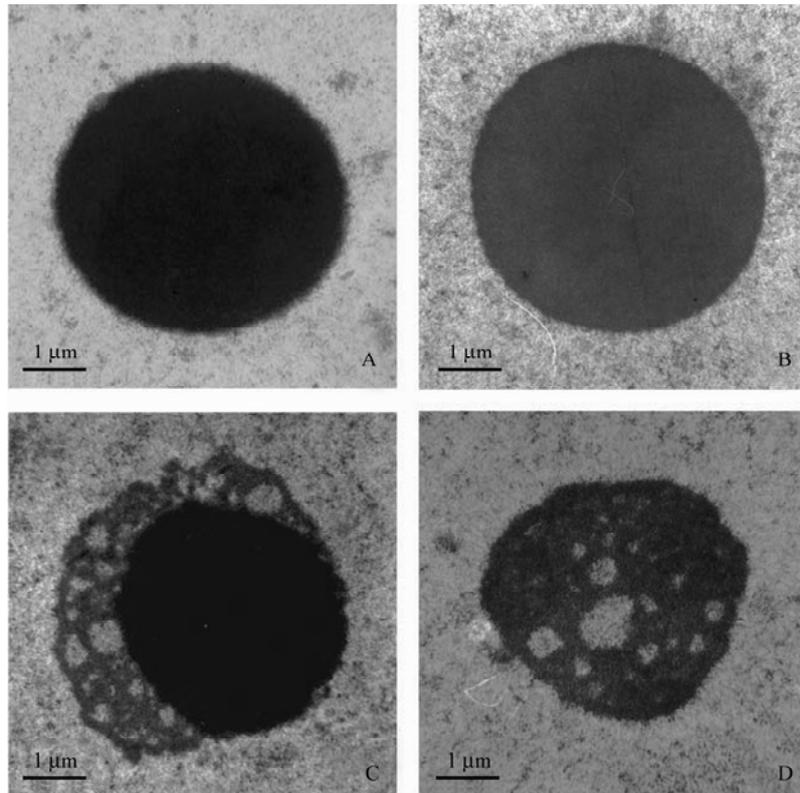
半薄切片用甲苯胺蓝染色后置于光学显微镜下观察,切片中胚胎所在位置呈现浅蓝色圆形轮廓,随着切片的顺序,可见到胚胎切面由小变大,再由大变小的过程。以4 μm的厚度为例,每个胚胎切成20~25张半薄切片,其中可以看到核仁结构的大约有3~6张,核仁在胚胎切片中呈现深蓝色圆形斑点(图1A)。

### 2.2 半薄切片的回收

回收的半薄切片平整地贴附在空白柱的表面,与背景树脂融为一体。胚胎切片和核仁轮廓依旧清晰(图1C),去尽玻璃碎渣,直接修块后即可用于超薄切片,且切片效果依旧良好。

### 2.3 核仁的超微结构

电镜下可以观察到ICSI胚胎不同时期核仁清晰的超微结构(图2)。单精注射后6 h的核仁为高电子密度、质地均一的球体(图2A),早2-细胞阶段的核



**图2** 透射电镜下核仁的超微结构

A: 小鼠单精注射胚胎注射精子6小时后的核仁超微结构,呈致密球状; B: 早2-细胞阶段,与6小时类似; C: 晚2-细胞阶段,在NPBs的周边开始出现网状结构; D: 4-细胞阶段,整个核仁都变为纤维颗粒结构,显示核仁功能完全激活。

**Fig.2 Nucleolus ultrastructure under TEM**

A: nucleolus ultrastructure of mouse ICSI embryo at 6 h post sperm injection, shows a dense sphere; B: early 2-cell stage, like previous stage; C: late 2-cell stage, vacuoles appears at the surface of NPBs; D: 4-cell stage, the whole nucleolus shows fibrillar-granular structure, means fully activated.

仁与之类似(图 2B)。晚 2- 细胞的核仁在外周发育出网状结构, 出现若干较大的低电子密度的空腔(图 2C)。而在 4- 细胞期, 核仁整体呈现较为发达的网状结构, 内部出现大量低电子密度的空腔(图 2D)。

### 3 讨论

电镜样品制备的好坏直接影响到最终的超薄切片和透射电镜观察效果。由于小鼠胚胎体积很小, 不易操作, 我们借鉴了国外研究者的经验, 利用琼脂先对胚胎进行预包装。因此, 后续的步骤的操作对象均为琼脂块, 使得样品操作和转移难度大大降低。但是国外的研究者采用先在载玻片上滴少量缓冲液, 在其中放入胚胎, 然后用 40~50℃ 琼脂溶液滴在上面的方法。在实际操作过程中我们发现, 滴下琼脂后, 胚胎很容易被冲到琼脂滴的边缘, 给后续琼脂切块和操作带来很大麻烦。我们改良了预包装的方法, 即先在载玻片上滴琼脂滴, 之后用口吸管(前端为控制的细玻璃管)直接将胚胎加入琼脂滴的中心部位。冷却后, 胚胎即位于琼脂滴中部。

由于核仁在卵裂球中体积小、数目有限并且分布随机, 给目标结构的定位带来很大难度。常规的解决方案有两种, 一是收集大量胚胎离心聚合再制样, 之后对细胞团块进行超薄切片; 二是先切半薄切片, 切完后染色检查, 切到核仁结构后再做超薄切片。前者将会造成大量胚胎的浪费, 且超薄切片目的性不强, 不一定能切到核仁结构; 后者导致步骤繁多, 且就算半薄切片后已经确认切到核仁结构, 做超薄切片对刀完毕试切时也很有可能直接将该核仁剩余部分直接切掉。为了避免盲目进行超薄切片造成的时间和精力浪费, 我们采取了先将整个胚胎切成半薄切片, 然后用甲苯胺蓝染色以选出核仁结构的切片, 重包埋回收后再进行超薄切片的方法。实践表明, 最终有 80% 以上回收来的半薄切片经过超薄切片后能看到核仁结构, 证明这种方法是切实可行的, 而且大大节约了实验时间, 提高了实验效率。此外, 国外研究者的半薄切片一般厚度为 1~2  $\mu\text{m}$ , 在实际操作中, 我们发现回收这个厚度的半薄切片用于超薄切片, 难度会很大, 很容易将核仁结构错过, 而且切出的半薄切片数量过多。所以我们选择了将半薄切片的厚度控制在 4~5  $\mu\text{m}$ , 以此达到工作量和可操作性的平衡。

此外, Hyttel 等<sup>[4]</sup>获得半薄切片并染色后, 先用镜头油封片, 然后筛选。目标切片再用二甲苯溶解以

去除盖玻片, 之后用指甲油裱出框, 再进行倒扣包埋。在实际操作过程中, 我们对这一步进行了简化, 半薄切片染色后并在光镜下选片后, 略去封片过程, 直接在空包埋柱顶端蘸少量包埋剂, 倒扣在目标切片上进行重包埋, 最后效果也非常不错。

此外, 在实验过程中应该注意的细节还有如下几点: 琼脂块在环氧丙烷置换后, 应迅速投入浸透液中, 在空气中暴露容易导致环氧丙烷迅速挥发, 琼脂块皱缩。暂不重包埋的半薄切片应保存在干燥环境中, 防止吸潮软化。

本实验在探索和建立透射电镜观察核仁超微结构方法的同时, 也对 B6D2F1 小鼠 ICSI 胚胎不同发育时期卵裂球的核仁进行了超微结构的观察。单精注射操作后 6 h 的小鼠胚胎处于原核期, 此时核仁还没有 rDNA 转录的活性, 只是一个个致密的纤维球状体, 即 NPBs。早 2- 细胞阶段的核仁还没有激活, 仍呈现致密球状。小鼠的合子基因组激活发生在 2- 细胞晚期, 此时 rDNA 的转录也开始激活并逐渐活跃, 核仁从致密球状体逐渐发育为纤维颗粒网状结构, 我们也观察到 2- 细胞晚期在核仁周边开始部分出现网状结构。而 4- 细胞阶段, 整个核仁都呈现网状结构, 表明此时的核仁已经发育完全, 即成为功能核仁。本实验观察的结果与 Svarcova 等<sup>[3]</sup>的结果类似, 也表明我们的样品制备方法和实验策略是切实可行的。

本实验借鉴了国外从事哺乳动物核仁研究的研究人员的经验, 尝试并改良了相关的方法, 成功观察到不同时期小鼠胚胎核仁的超微结构, 这种方法也可应用于哺乳动物胚胎内其他超微结构的观察。

### 参考文献(References)

- 1 Stark LA, Taliensky M. Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the nucleolus and disease. *Embo Rep* 2009; 10 (1): 35-40.
- 2 Maddox-Hyttel P, Bjerregaard B, Laurincik J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17(1-2): 3-14.
- 3 Svarcova O, Dinnyes A, Polgar Z, Bodo S, Adorjan M, Meng Q, *et al.* Nucleolar re-activation is delayed in mouse embryos cloned from two different cell lines. *Mol Reprod Dev* 2009; 76 (2): 132-41.
- 4 Hyttel P, Madsen I. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anat (Basel)* 1987; 129(1): 12-4.
- 5 Laurincik J, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Brem G, Wolf E, Müller M, *et al.* Nucleolar protein allocation and ultrastructure

- in bovine embryos produced by nuclear transfer from granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 2002; 61(4): 477-87.
- 6 Baran V, Vignon X, LeBourhis D, Renard JP, Fléchon JE. Nuclear changes in bovine nucleotransferred embryos. *Biol Reprod* 2002; 66(2): 534-43.
- 7 吕广艳, 曲淑贤, 申 健, 高船舟. 小鼠早期胚胎细胞超薄切片制备法. *大连医科大学学报* 2003; 25(1): 62-4.
- 8 武彩红, 朱达文, 胡新岗, 芮 荣, 戴建军, 郑筱峰, 等. 卵母细胞扫描电镜和透射电镜样本的制作. *安徽农业科学* 2010; 38(1): 182-4.
- 9 刘冬娟, 祝素文, 李艳杰. 硼砂甲苯胺蓝染液在半薄切片染色上的应用. *中国医科大学学报* 2004; 33(1): 33.

## Observation of the Nucleolar Ultrastructure of Mouse ICSI Embryos by Modified Transmission Electron Microscope Technique

Zhong Zheng, Li-Li Hu, Gang Wen, Bao-Dong Zhang, Lei Lei\*

(Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract** Nucleolar structure of mouse embryo varies during pre-implantation development. Ultrastructural observation of nucleolus is necessary to reveal the dynamic changes of nucleolar structure and their important roles in pre-implantation development. However, it is relative hard to conduct the experiment for nucleoli in common TEM method as they are few in number, small in diameter and difficult to locate. In this study, we explored a way to observe the nucleolar ultra-structure of mouse pre-implantation ICSI embryos. Firstly, we embedded the embryos in agar to make it easier to operate. Then, we made semi-thin sections after routine TEM sample preparation. After stained with toluidine blue, the semi-thin sections with nucleoli structure were selected, and then they were re-embedded and recycled. Finally, the ultra-thin sections were produced and observed under TEM. By using this modified embryonic TEM sample preparation, we obtained clear images of the nucleolar ultra-structure of mouse embryos in different pre-implantation stages.

**Key words** mouse embryo; nucleoli; transmission electron microscope; ultrastructure; re-embed

Received: September 26, 2010 Accepted: October 8, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671025) and the Project of Abroad Researcher Foundation of Heilongjiang Province (No.LC07C17).

\*Corresponding author. Tel: 86-451-86674518, E-mail: leil086@yahoo.com.cn