

实验技术

激光共聚焦同步双扫描技术在斑马鱼前脑神经发育研究中的应用

石莹，高景霞，彭刚，姜民*

复旦大学脑科学研究院，医学神经生物学国家重点实验室，上海 200032

摘要：随着标记蛋白光转换等实验技术在生物科研领域的开展，对激光共聚焦取图技术也提出了越来越高的要求。本文旨在以斑马鱼前脑神经发育为研究对象，建立应用激光共聚焦同步双扫描系统的实验模式。本实验将36~48 h的转基因Tg(*lhx5:kaede*)斑马鱼胚胎麻醉固定后，以光诱导变色荧光蛋白kaede标记的前脑神经元作为实验观察目标，使用激光共聚焦同步双扫描系统的405 nm紫外激光刺激扫描感兴趣区域的同时，进行488 nm和559 nm激光刺激取图，实时观察kaede蛋白光学信号的转换状态，并在光转换后记录紫外激光刺激区域神经元的投射形态图像。结果显示，激光刺激引起kaede蛋白从绿色转变为红色，其在感兴趣区域的分布变化指示出目标神经元的胞体位置及其轴突投射路径。由上述结果可见，激光共聚焦同步双扫描技术的应用满足了kaede蛋白光转换实验的刺激和扫描同步的要求，该技术在斑马鱼胚胎特定神经元形态发育研究中的应用，可作为神经发育研究的一种实验模式在很多实验设计中进行延伸，也为激光共聚焦双扫描技术的推广提供了一个很好的平台。

关键词：激光共聚焦同步双扫描技术；斑马鱼；光转换；kaede；神经发育

中图分类号：Q7

Application of confocal simultaneous scanner unit in the study of forebrain neurodevelopment in zebrafish

SHI Ying, GAO Jing-Xia, PENG Gang, JIANG Min*

Institutes of Brain Science and State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: With the application of the photoconversion technology of genetically expressed fluorescent proteins in biologic field, more powerful confocal imaging ability was demanded. The aim of the present study was to establish an experimental model employing confocal simultaneous scanner unit for simultaneous laser stimulation and imaging, taking study of forebrain neurodevelopment in zebrafish as an example. In the present study, 36–48-hour-old Tg(*lhx5:kaede*) zebrafish embryos were mounted with 1.2% low melting temperature agarose. The forebrain neurons marked with kaede were observed using the simultaneous scanner unit of confocal microscopy. The 405 nm laser was used to stimulate the region of interest (ROI), while 488 and 559 nm lasers were used to acquire images at the same time. The photoconversion state of kaede protein was then reviewed, and the projecting pattern of neurons stimulated by the ultraviolet laser was examined. The results showed that, the fluorescence of stimulated kaede turned from green to red, and the photoconversion of kaede demonstrated anterior dorsal telencephalon (ADt) neurons projected axons ventrally into the anterior commissure (AC) and supraoptic tract (SOT). These results suggest the confocal simultaneous scanner unit meets the demand of the photoconversion experiment. The application of confocal simultaneous scanning technology in examining Tg(*lhx5:kaede*) zebrafish embryos affords an ideal experimental model in neurodevelopment study.

Key words: confocal simultaneous scanner unit; zebrafish; photoconversion; kaede; neurodevelopment

Received 2012-06-12 Accepted 2012-08-27

This work was supported by the National 985 Program from the Ministry of Education of China.

*Corresponding author. Tel: +86-21-54237854; Fax: +86-21-54237643; E-mail: minjiang@fudan.edu.cn

众所周知, 激光共聚焦显微成像系统能够完成生物样品的高分辨率成像。近年来随着生命科学的飞速发展, 某些标记蛋白质因其在激光刺激下产生特异性变化的特性而逐渐被应用于生物学实验, 成为激光共聚焦显微成像系统的重要观察指标^[1]。不同蛋白质在激光刺激下所发生的变化各不相同, 某些蛋白质通过激光的诱导可发生颜色的转换, 主要是以 kaede 蛋白从绿色到红色为代表的光转换^[2]; 而另外一些蛋白质通过激光的诱导可发生亮度变化, 即我们通常讲的光漂白或光活化^[3]。这些标记蛋白的灵活运用, 使得一些复杂的生命现象或过程如: 基因表达调控、生物大分子相互作用、细胞器动力学、细胞间信息传递、胚胎发育、生物传感器等的研究工作得以顺利进行。这些实验的开展一方面极大地拓展了生物学研究的视野, 但另一方面也对共聚焦扫描技术提出了更高的要求^[4]。在进行此类激光诱导转换或活化实验时, 常规的激光共聚焦扫描系统因为只具备一套扫描系统, 只能利用扫描单元先对样品兴趣部位进行激光刺激, 再利用扫描单元取图, 很难获得刺激过程中的实时图像信号, 从而导致重要实验信息的丢失。

为了解决刺激和扫描不同步的问题, 激光共聚焦同步双扫描系统应运而生, 从而为激光刺激诱导和扫描成像同步进行提供了一个理想的技术平台。在本文中, 我们将以光诱导变色荧光蛋白 kaede 标记的神经元作为实验观察目标, 应用激光共聚焦同步双扫描技术研究斑马鱼神经发育。

1 材料和方法

1.1 实验动物和蛋白 本文所用转基因斑马鱼由复旦大学脑科学研究院斑马鱼技术平台提供。在脊椎动物胚胎发育研究中, 神经系统的发育尤其是脑部的形成是最为研究者所关注的领域之一。从 20 世纪 90 年代起, 斑马鱼因其具有繁殖能力强、体外受精和发育、胚胎透明、性成熟周期短、个体小易养殖等诸多特点, 逐渐为越来越多的研究者所采用, 已成为脊椎动物发育生物学研究的理想模型动物之一^[5]。

光诱导变色荧光蛋白 kaede 包含 HYG 发色基团, 在紫外光的照射后引起 62 位组氨酸残基与 α -碳原子间连接断裂, 形成一个相连的双咪唑环系统, 完成由绿色荧光到红色荧光的转换。光转换后, 使得红 / 绿比显著增加约 2 000 倍。因这一颜色转换

特性的存在, kaede 蛋白可用于细胞的光学标记^[6]。利用 kaede 蛋白在光转换前后的颜色变化, 可以持续追踪红色荧光的动态变化, 并用以将特异细胞与周围细胞进行区分。

本实验使用的斑马鱼为 kaede 转基因 Tg (*lhx5:kaede*) 斑马鱼^[7,8]。*lhx5* 是特异表达于前脑背侧 (anterior dorsal telencephalon, ADt) 神经元的转录因子^[7], 为了能够在荧光显微镜下追踪 ADt 神经元的轴突投射路径, 我们选择 *lhx5* 基因表达调控序列调控下的荧光蛋白 kaede 来特异性地标记这些神经元。神经细胞胞体内的 kaede 经照射转化后, 可以扩散到神经细胞的轴突当中, 进而对轴突及轴突末端分布区进行红色荧光标记, 以便显示该区域神经元的轴突投射特征。

1.2 实验仪器 具有同步双扫描配置的激光共聚焦正置显微镜 (OLYMPUS FV1000, 日本)。激光共聚焦同步双扫描技术, 是在原有的常规 XY 图像扫描振镜基础上, 额外增加扫描振镜, 用以控制激光的刺激诱导扫描状态 (图 1A)。正是基于这样的结构特点, 使得该设备能较好地进行双扫描工作, 即一组激光器在刺激诱导标本的同时, 另一组激光器完成扫描捕获图像。在我们的实验中, 405 nm 紫外激光在标本的特定部位进行刺激诱导扫描以完成光转换实验, 同时 488 nm 和 559 nm 激光器在该标本的光转换部位进行扫描取图, 实现“边刺激边取图” (图 1B)。

1.3 激光共聚焦同步双扫描技术在斑马鱼前脑神经发育研究中的应用 将 36~48 h 的转基因 Tg (*lhx5:kaede*) 斑马鱼胚胎用 0.02% 三卡因 (tricaine, ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, 购于 Sigma-Aldrich 公司) 麻醉后, 用 1.2% 低熔点琼脂糖腹卧位固定于透明载玻片的凹槽内^[9], 以便于实验观察。

将固定斑马鱼的载玻片置于激光共聚焦显微镜的载物台上, 在明场下找到视野, 转换激光通道, 用 488 nm 激光器扫描观察斑马鱼前脑 ADt 区神经元 (图 2)。转基因 Tg (*lhx5:kaede*) 斑马鱼的 ADt 神经元特异表达 kaede 蛋白, 在激光刺激下显示阳性荧光信号。

在 kaede 蛋白绿色荧光标记的斑马鱼 ADt 神经元中, 选中 ADt 区的神经元胞体区域作为观察对象, 用 405 nm 紫外激光刺激感兴趣区域 (region of interest, ROI), 采用 60% 的激光输出功率, 刺激 6 次, 每次刺激时长为 500 ms。并同时用 488 nm 激光和

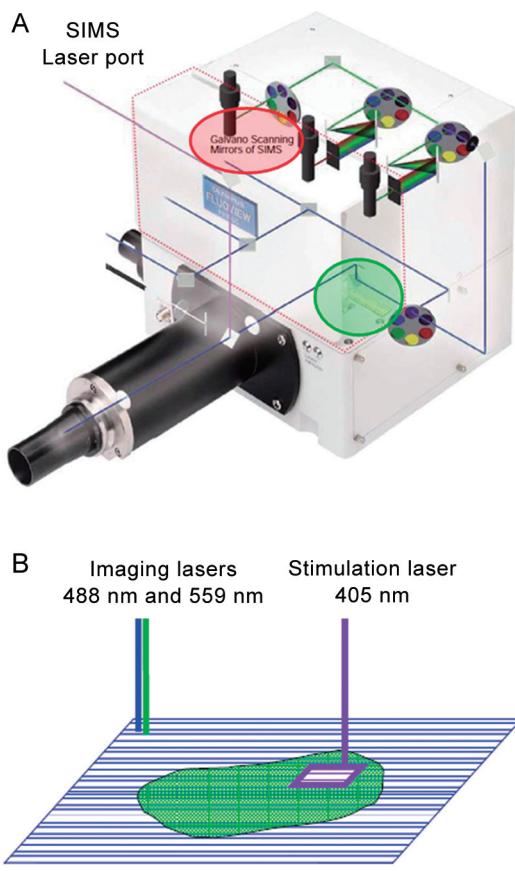


图 1. 激光共聚焦同步双扫描原理图

Fig. 1. Schematic diagram of confocal simultaneous scanner unit for simultaneous laser stimulation and imaging. *A*: Structure of confocal simultaneous scanner unit. The green section works for imaging, and the red section works for stimulation. *B*: Schematic diagram of the simultaneous scanner unit. The 405 nm laser is used to stimulate the region of interest (ROI), the 488 nm and 559 nm lasers were used to image at the same time.

559 nm 激光刺激 ROI 进行取图, 采取时间序列拍摄模式, 实时观察记录 kaede 蛋白从绿色到红色的光转换过程。

2 结果

2.1 激光刺激引起kaede蛋白从绿色转变为红色

图 3A 显示的是激光刺激 2、4、6 次时光转换的状态。对图中 ROI 的红色信号荧光强度进行定量统计, 结果显示随着激光刺激次数的增多, ROI 的绿色荧光逐渐减弱, 而红色荧光显著增强(图 3B)。

2.2 Kaede的分布显示神经元的胞体位置及其轴突投射路径

紫外激光刺激转换 30 min 后, 随着细胞体与轴突之间的轴浆运输, 显微图像显示有红色荧光的 kaede 蛋白被运送到轴突, 再使用 488 nm 和 559 nm 激光扫描斑马鱼的前脑部位, 图像显示红色荧光蛋白分布在被刺激神经元的胞体及轴突, 使其与周围绿色荧光标记的神经元区别开来(图 4)。利用这一实验手段, 就可以清晰明确地记录我们感兴趣的这组神经元的胞体位置及其正常轴突投射路径。如图 4 所示, 斑马鱼 ADt 神经元的轴突向腹侧投射到前联合 (anterior commissure, AC) 和视上束 (supraoptic tract, SOT)。

3 讨论

Kaede 蛋白经紫外光照射时发生荧光光谱转换, 其荧光颜色从绿色变为红色。由于这一光转换特性, kaede 蛋白被广泛用于特异细胞的荧光标记实验^[6]。

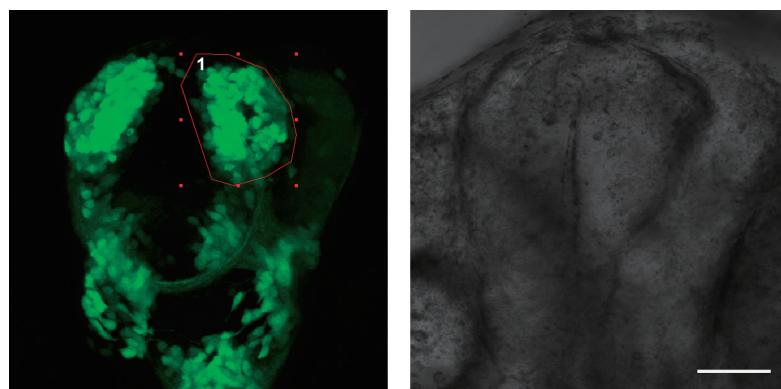


图 2. 斑马鱼前脑ADt区神经元

Fig. 2. The ADt region neurons in forebrain of zebrafish. Left: The frontal dorsal neurons of *Tg(lhx5:kaede)* zebrafish images recorded by 488 nm laser. The section in the red polygon line is the region of interest (ROI) for photoconversion. Right: Forebrain anatomic localization of zebrafish in light field. Scale bar, 50 μm.

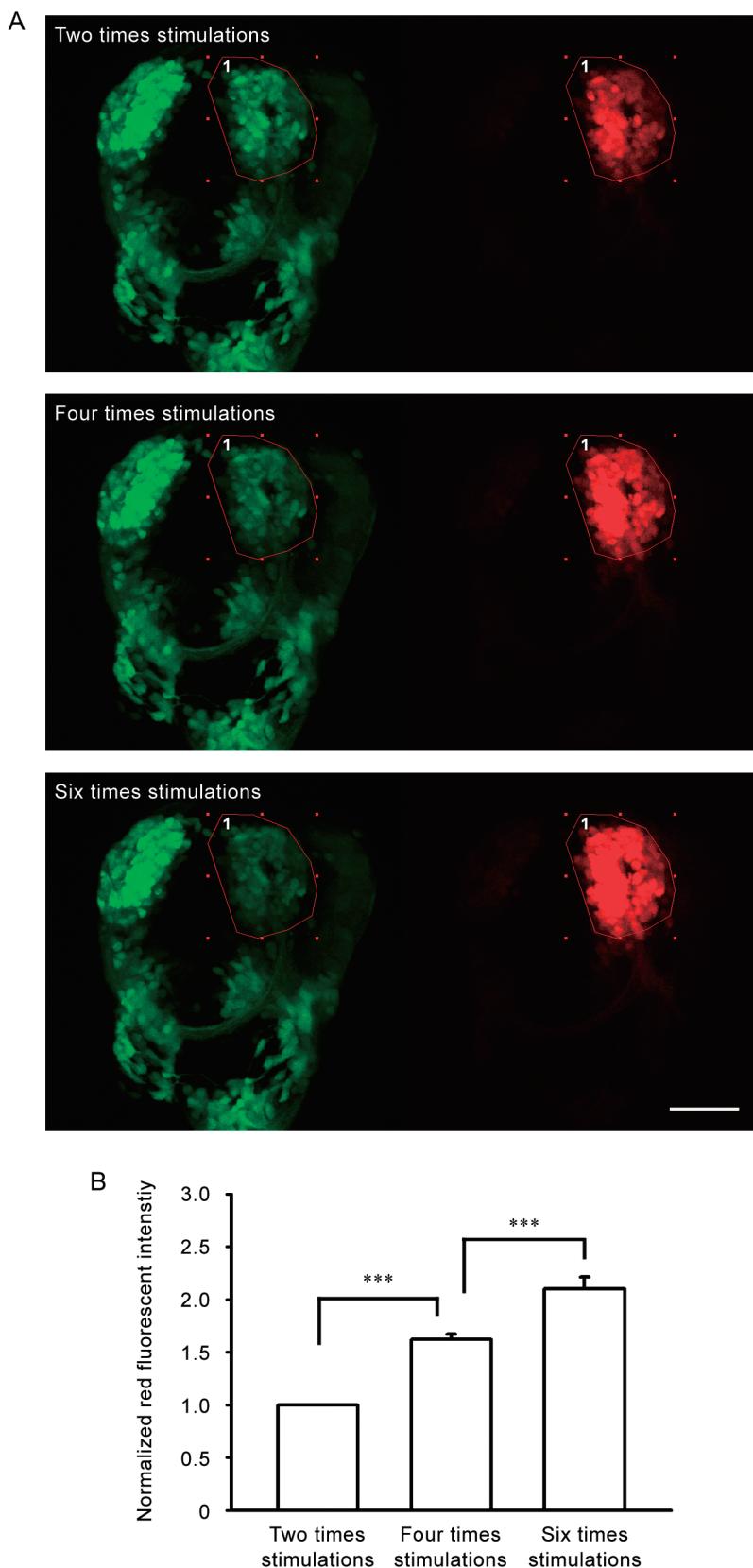


图 3. 斑马鱼前脑背侧神经元中kaede蛋白光转换过程

Fig. 3. Photoconversion recording of kaede protein in the frontal dorsal neurons of zebrafish (*A*). Quantitative analysis (*B*) shows that, as the times of laser stimulation increase, the red fluorescent intensity significantly increases. Mean \pm SEM, $n = 9$. *** $P < 0.0001$ (*t*-test). Scale bar, 50 μm .

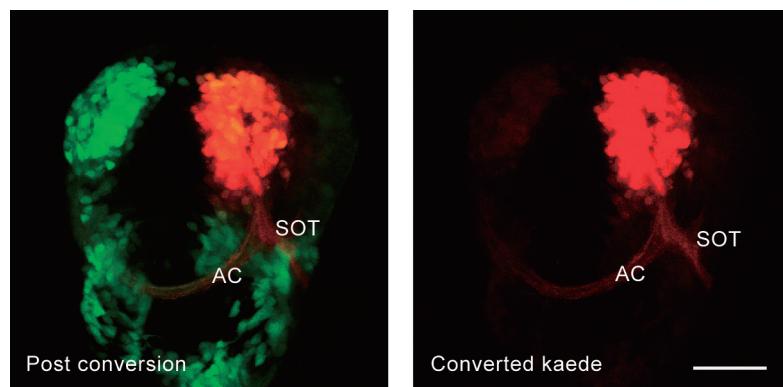


图 4. 光转换实验后记录到斑马鱼前脑背侧神经元的轴突向腹侧投射到前联合和视上束

Fig. 4. Photo-conversion of kaede in *Tg(lhx5:kaede)* zebrafish demonstrates ADt neurons project axons ventrally into the anterior commissure (AC) and supraoptic tract (SOT). Scale bar, 50 μ m.

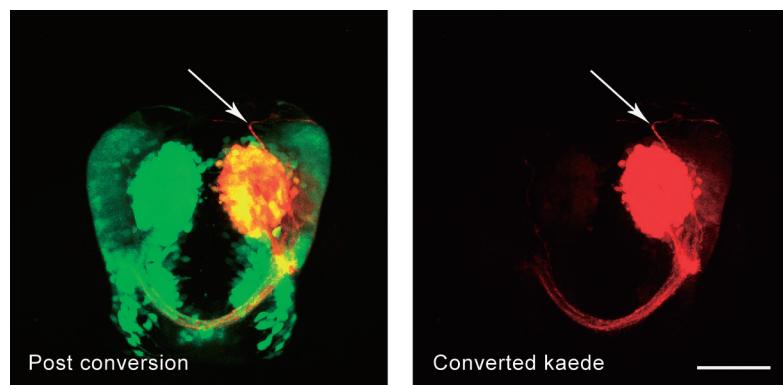


图 5. 反义吗啉代寡核苷酸注射降低 *Dcc* 基因表达后 ADt 区神经元的背侧投射

Fig. 5. ADt neurons project axons dorsally (white arrow) when *Dcc* function is inhibited by morpholino oligonucleotides injection. Scale bar, 50 μ m.

本实验设计中, 将 kaede 蛋白定向表达于斑马鱼的 ADt 神经元, 作为该区域神经元的荧光标记物^[8]。因为在实验中希望实时观察 kaede 蛋白在 405 nm 激光刺激下的光学信号的转换状态, 所以需要刺激与扫描同时进行。

常规激光共聚焦扫描在光转换实验中存在一定的弊端, 由于其刺激与取图存在一定的时间差, 因此不能实时观察细胞的反应及激光的诱导状态, 从而给实验设计和实验效果带来很多限制。而激光共聚焦同步双扫描技术的应用, 使得刺激和取图装置各司其职, 能够同时进行, 满足了 kaede 蛋白光转换实验所需的条件, 使得此类快速反应实验能够顺利开展。因此激光共聚焦双扫技术可以应用于 kaede 蛋白光转换实验研究, 进而用以开展斑马鱼的神经发育研究实验。

正如本实验中所显示的, 利用 kaede 蛋白的光

转换特性及其聚焦同步双扫描的特点, 就可以比较客观有效地观察转基因 *Tg(lhx5:kaede)* 斑马鱼特定神经元的轴突投射情况。另外, 在我院神经系统发育与动物行为学实验室开展的实验研究中, 对转基因 *Tg(lhx5:kaede)* 斑马鱼的受精卵单细胞期进行显微注射, 通过注射反义吗啉代寡核苷酸 (morpholino oligonucleotides) 特异地降低 *Dcc* 基因的表达, 胚胎期 36~48 h 进行激光共聚焦同步双扫, 结果显示 ADt 区神经元的轴突投射除了向腹侧投射外, 还出现异常的背侧投射 (图 5)^[8]。由上述研究实践可见, 在 kaede 转基因斑马鱼的受精卵单细胞期降低或过表达某些基因, 利用 kaede 蛋白的光转换特性, 紫外激光刺激斑马鱼前脑 ROI 的神经元, 观察、记录 kaede 蛋白红色荧光所标记神经元的轴突投射特点, 就可用于研究目的基因与特定神经元发育之间的关系。激光共聚焦双扫描技术在斑马鱼神经发育研究

中的此类应用，可作为神经发育研究的一种实验模式在很多实验设计中进行延伸，也为激光共聚焦双扫描技术的推广提供了一个很好的平台。

激光共聚焦同步双扫描系统作为一个实时刺激和扫描标本的技术设备，除了在斑马鱼研究中应用于kaede蛋白光转换实验，还可以在神经生物学领域完成其它一些有意义的激光诱导实验。例如，该系统可以实现标本不同部位荧光淬灭与快速恢复的实验成像，即荧光漂白后损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)和荧光漂白后恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)实验^[10,11]，是细胞生物学研究中常用的光操作技术手段。FLIP技术需记录荧光的损失过程，要求提供尽量同步的刺激和图像获取，而激光共聚焦同步双扫技术恰好符合了这个技术要求，该技术为研究内质网、细胞核和细胞质等区室的边界提供了强有力的新工具。而FRAP技术需记录的是荧光的恢复过程，可用于研究细胞的粘度、胞内膜扩散、蛋白质定向合成和运输。更为重要的是，双扫描系统也广泛被运用于解笼锁^[12,13](Uncaging)：利用UV激光刺激笼锁化合物(如神经递质、细胞内第二信使cAMP、核苷酸、Ca²⁺及某些荧光素等)，定点激活特定信号分子，是研究神经细胞信号通路的有效技术手段。

综上所述，激光共聚焦同步双扫描系统在生物学领域已有广泛的应用，突破了单一扫描系统在技术应用方面的限制。随着影像技术的不断发展，双扫描原理结合多光子成像及超分辨率成像技术必将进一步拓宽其实验应用范围，为开展前沿研究提供有力的技术支撑。

参考文献

- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 906–918.
- Lukyanov KA, Chudakov DM, Lukyanov S, Verkhusha VV. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 885–891.
- Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N, Patterson GH. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol* 2003; 5: S7–S13.
- Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 2007; 120: 4247–4260.
- Fekany K, Yamanaka Y, Leung T, Sirotnik HI, Topczewski J, Gates MA, Hibi M, Renucci A, Stemple D, Radbill A, Schier AF, Driever W, Hirano T, Talbot WS, Solnica-Krezel L. The zebrafish bozozok locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. *Development* 1999; 126: 1427–1438.
- Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12651–12656.
- Peng G, Westerfield M. Lhx5 promotes forebrain development and activates transcription of secreted Wnt antagonists. *Development* 2006; 133: 3191–3200.
- Gao JX, Zhang CW, Yang B, Sun L, Westerfield M, Peng G. Dcc regulates asymmetric outgrowth of forebrain neurons in zebrafish. *PLoS One* 2012; 7(5): e36516.
- Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000, chapter 4-microscopic observations.
- Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 2012; 17(4): 4047–4132.
- Iliev AI, Wouters FS. Application of simple photobleaching microscopy techniques for the determination of the balance between anterograde and retrograde axonal transport. *J Neurosci Methods* 2007; 161(1): 39–46.
- Burgalossi A, Jung S, Man KN, Nair R, Jockusch WJ, Wojcik SM, Brose N, Rhee JS. Analysis of neurotransmitter release mechanisms by photolysis of caged Ca²⁺ in an autaptic neuron culture system. *Nat Protoc* 2012; 7(7): 1351–1365.
- Branco T, Häusser M. Synaptic integration gradients in single cortical pyramidal cell dendrites. *Neuron* 2011; 69(5): 885–892.