

触角嗅觉神经束路示踪的赖氨酸钴填充方法^{*}

项 辉, 彭 波

(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘 要:应用赖氨酸钴填充技术, 观察雄蛾触角嗅觉神经的传入途径及向中枢投射踪迹的方法 and 操作程序。结果显示赖氨酸钴填充的神经元成黑色, 与周围环境反差较大, 清晰易辨, 能准确反映触角神经元的生理特性及其向中枢投射位置。

关键词:示踪技术; 嗅觉神经; 赖氨酸钴填充

中图分类号: Q95 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 03-0056-04

钴作为一些染料的成分会对神经细胞有毒。

L 赖氨酸加入到钴溶液中, 可以和钴形成一种络合物从而降低钴对神经细胞的毒性。在填充过程中, 钴离子移动进入神经细胞内, 在组织中以钴硫化物存在, 这是一种不溶的黑褐色沉淀物质; 很粗大的神经纤维不需经过银染强化程序就可显示, 对纤细神经纤维则在银染强化程序后, 整个神经元的形态就以黑色的轮廓显示出来^[1,2]。如果此神经元向中枢投射, 则可在中枢部位观察到神经纤维的终止位置, 因此可了解神经元的中枢定位。

1 仪器设备与药品试剂

1.1 仪器设备

电生理实验装置及组织切片装置。

1.2 药品试剂

(1) 赖氨酸钴溶液 (0.5 mol/L) 称 2.38 g 六水氯化钴放入 25 mL 试剂瓶中 (带盖), 加入 5 g L 赖氨酸和 20 mL 蒸馏水, 磁力低速搅拌过夜。第 2 天用 1 mol/L 的 HCl 调整 pH 值到 7.2~7.4, 如果 pH 太低, 用 K_2HPO_4 把它调回来, 置室温至少 2 个星期后备用。溶液可被使用达 60 d 之久。L-赖氨酸变成浅黄色, 说明质量有问题, 不能使用。

(2) Ringer 的配方: NaCl 8.76 g, KCl 0.224 g, TES 2.29 g, $CaCl_2$ 0.333 g, 蒸馏水加至 1 L, 1 mol/L NaOH 调 pH 到 6.9。

(3) AAF 固定剂配方: 40 mL $\varphi=98\%$ 乙醇 (在最后的溶液中 $\varphi=80\%$, 5 mL 浓缩的含 φ 为 10%~15% 福尔马林的甲醇, 5 mL 冰乙酸 (在最后的溶液中 $\varphi=10\%$), 通风橱中操作, 贮存于通

风橱中备用。

(4) 氢醌显色剂及硝酸银显色剂 氢醌显色剂配方: 50 mL 双蒸水, 3 g 阿拉伯胶, 10 g 蔗糖, 0.17 g 氢醌, 2.5 g 二水柠檬酸或 2.3 g 一水柠檬酸, 加双蒸水到 100 mL。注意不要用金属接触显色剂中的任何化学物。氢醌是最有效的显色剂, 它氧化粘在硫化物上的银, 含 AgS 复合物的区域将变黑。阿拉伯胶有助于氢醌、银和溶液中其他化学物的渗透。先 60℃ 磁力搅拌溶解阿拉伯胶, 后添加其它成分, 加双蒸水到 100 mL, 搅拌直到所有的东西都溶解。

硝酸银溶液配方: 0.05 g 硝酸银, 5 mL 双蒸水。

硝酸银显色剂配方: 18 mL 氢醌显色剂, 2 mL 硝酸银溶液。

硝酸银显色剂在 15~20 min 就会变坏, 只能在使用前 5 min 时配制。取洁净的玻璃瓶加 18 mL 氢醌显色剂并水浴达 60℃, 加入 2 mL 硝酸银溶液混匀, 注意是否立刻变成乳状, 如果是, 则需重配。

(5) 环氧树脂包埋剂配方: A 54.0 g 环氧树脂, B 44 g 硬化剂, C 2.5 g 催化剂, D 10.0 g 塑化剂。

在 150 mL 的塑料烧杯中把成分 A 和 B 混合。加一大搅拌棒在通风橱中缓慢搅拌约 0.5 h, 混合物呈黄色均一凝胶状后, 加入成分 C 和 D, 再磁力搅拌 0.5 h 以上, 混合物应呈红棕色并且有些粘性。用 20 mL 塑料注射器吸入这种树脂混合液, 竖放贮存在冰柜中备用。树脂可以在大约 2 个月内保持良好。用丙酮清洗每样接触过树脂的东西。

^{*} 收稿日期: 2001-09-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (984192)

作者简介: 项辉 (1966—), 男, 副教授, E-mail: ls44@zsnu.edu.cn

(6) 亚甲蓝染色液: 配置 1 L $w=1\%$ 硼砂溶液, 然后用 $w=1\%$ 硼砂溶液配制 500 mL $w=1\%$ 天青 II 的原料液和 500 mL $w=1\%$ 亚甲蓝原料液。贮存在 4 °C 冰箱中备用。50 mL $w=1\%$ 天青 II 和 50 mL $w=1\%$ 亚甲蓝溶液混合, 过滤, 即为亚甲蓝染色液, 放入玻璃瓶内备用, 染色液可存于室温条件。

2 步 骤

2.1 动物准备

本方法介绍利用 *Agrotis segetum* 雄蛾作为实验动物, 观察性信息素感受神经元的神经纤维踪迹及向中枢神经系统的定位投射。也可用其他动物代替, 应根据不同动物采取相应的固定方式。实验要求填充的时间要长, 允许更多的钴进入神经; 填充后的时间也要长, 给钴更多的时间进入到神经及沿轴突到高级的中枢部位。钴对神经是有一定毒性的, 加上操作上的原因, 成功不是 100%, 因此尽可能用无损伤健康动物, 动物的数量要足够。

2.2 记录与填充电极准备

实验所用玻璃电极毛坯管内不含细纤丝。电极的长短要合适。用真空泵(可用其他方法)将赖氨酸钴溶液填充到拉制好的玻璃电极中。如果填充电极时产生气泡应排除或重做电极。检查电极的尖端是否完整且能包容切下尖部的触角。如果开口处太小了, 可以通过一个自制的电动砂轮打磨来把电极的尖端扩大。

2.3 准备电生理装置

空气流经 500 mL 蒸馏水瓶保持湿润, 并以 0.5 m/s 经玻璃管吹向触角, 将装有含性信息素滤纸片的 Pasteur 玻璃管插入空气流管中给触角以不同的性信息素刺激来确定感受神经元类型, Pasteur 玻璃管由嗅刺激器控制。仔细检查以确定前置放大器、示波器、刺激传送系统、电脑采样分析软硬件和扬声器处于正常工作状态。(见图 1)

左下角示电极接触触角纤毛的方式。图中的空气流管连接嗅刺激器, 给触角不同的性信息素刺激来确定感受神经元类型。

2.4 感受神经元的赖氨酸钴填充

2.4.1 最大填充 最大填充指示赖氨酸钴染料是否能被神经细胞吸收。

把蛾子用兰色蜂蜡固定在一个大培养皿中, 触角的尖端切掉。将触角切开端插入充满赖氨酸钴溶液的电极内, 电极另一端与一个吸有赖氨酸钴溶液的玻璃移液器相连。电极的尖端应可使得触角可以插入, 但不要太大至钴溶液泄漏出去。用兰色蜂蜡

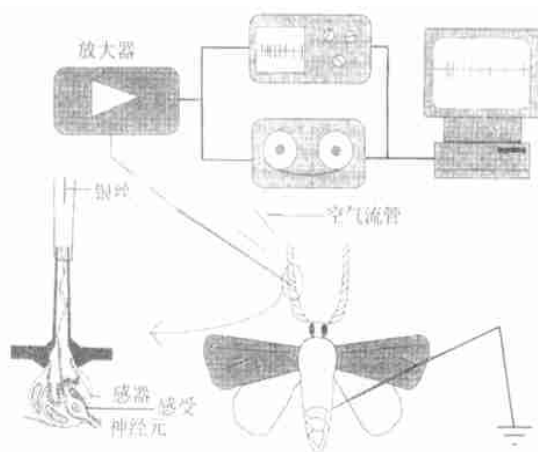


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Sketch map of this experiment equipments for neurons filling

将移液器固定。将大培养皿转移到 4 °C 冰箱里放 2 d, 期间检查触角是否仍浸在钴溶液中, 钴溶液是否产生结晶。2 d 以后, 从冰箱中移出, 然后与银强化、解剖等一样处理。

2.4.2 填充生理学定义的感受神经元 固定动物并放好触角。显微镜下观察剪断触角上某个纤毛(感器)的尖端, 把内含赖氨酸钴溶液的记录电极移到切开的尖端, 并将纤毛断端插入电极内。先记录纤毛内神经的放电活动, 并通过给性信息素刺激, 确定此纤毛(感器)神经细胞的生理反应特性。如要针对专一对某种性信息素成分反应的感受神经元进行实验, 则须反复试验触角上的纤毛, 直到其神经放电反应与性信息素刺激相符为止。使用脉冲器将感受神经元用赖氨酸钴溶液填充 1 h。最适的填充频率为 0.5 Hz (每隔 1 s 一个脉冲), 脉冲的最适持续时间为 0.2 ms。在 1 h 的填充时间内应保持稳定的直流电压, 用交流电也很好。选择试验用纤毛位置应靠近触角的基部或至少是在中部, 填充的成功性将会提高。染料到达中枢神经系统所要经历的路程将短一些。填充时, 应经常监测活性和调整任何有需要的参数。做银强化之前, 填充 8—10 个动物将大大地节约成本和时间。

2.4.3 填充后程序 填充完成后, 卸下记录电极及参考电极, 取出蛾子。放入 4 °C 冰箱中 48 h。当然也可放在温度 11 °C 或室温下, 因钴染料在暖的温度下会移动得更快。如果蛾子经过 48 h 仍旧活着为最好。如果动物在填充后已经死了 1 d 或更长时间, 那么固定和解剖可能受到不良影响。

2.5 固定及脑的解剖

用微解剖剪尽可能靠近头部剪断触角并分离触角神经, 然后从颈部把蛾子头部切下。把整个头移

到一个充满 Ringer 液的凹盘中, 确定头完全浸在溶液中。用小镊子去除角质层并刺穿眼后的气囊, 使固定液易进入脑。把头移入一个充满 1 mL Ringer 的 4 mL 样品瓶中, 作好标记, 通风橱内每个样品瓶加 3 滴硫化铵。加入硫化铵的目的是为了与钴离子结合使得在强化程序中的银离子可以结合在硫化钴复合物上。如果硫化铵变成深黄色, 可能要增加滴数至 4~5 滴, 最好是采用新鲜的硫化铵。振荡器上 10 min, 用移液管把每个样品瓶中的硫化铵溶液吸出, 用 Ringer 液洗 3 次, 每次 5 min, 至闻不到硫化铵臭鸡蛋气味。然后把头放入 AAF 固定剂中 (1~2 mL) 12~24 h。把固定液换成乙醇。 $\varphi=96\%$ 乙醇洗 3 次, 每次 5 min。将头转入一个充满 $\varphi=70\%$ 乙醇的玻璃凹盘中, 在 15~20 倍镜下解剖脑, 注意不要碰到和损伤脑。尽量不要刺穿眼睛以免释放出色素阻挡视线, 保留眼睛有助于脑切片的定位。尽量去掉大脑周围的气管、神经纤维和肌肉。如果不能马上进行下一步实验, 脑可放入 $\varphi=70\%$ 乙醇贮存冰箱 (最多 2 周) 中备用。

2.6 银强化步骤

从冰箱中取出存于 $\varphi=70\%$ 乙醇中的脑或解剖后直接开始。① $\varphi=50\%$ 乙醇 5 min, $\varphi=25\%$ 乙醇 5 min; ②双蒸水 (室温条件下) 代替 $\varphi=25\%$ 乙醇; ③60℃水浴 5~10 min; ④氢醌显色剂 60℃水浴 1 h; ⑤硝酸银显色剂代替氢醌显色剂; 如溶液变黄则换新鲜硝酸银显色剂 (15~20 min); ⑥脑变成淡黄色; ⑦60℃双蒸水代替显色剂 5 min (或更久); ⑧4℃双蒸水代替 60℃双蒸水 5 min; ⑨按 $\varphi=25\%-50\%-70\%-96\%$ 乙醇顺序脱水每次 5 min; ⑩ $\varphi=100\%$ 乙醇 2 次每次 5 min; ⑪用水杨酸甲酯清除直到脑沉下去; ⑫10 倍镜下观察整个制备的填充 (不是切片); ⑬脑可以在通风橱中室温条件下保存在水杨酸甲酯中 1~2 d; ⑭ $\varphi=100\%$ 乙醇 2 次, $\varphi=96\%$ 乙醇 1 次每次 5 min; ⑮4℃条件下贮存于 $\varphi=70\%$ 乙醇中 2 星期也可银强化后直接包埋; ⑯ $\varphi=100\%$ 乙醇 2 次, 然后在氧化丙烯中清洗每次 5 min; ⑰开始包埋程序。

2.7 包埋

昆虫脑用丙烯氧化物洗 2 次每次 5 min。丙烯氧化物会加速树脂进入和渗透到脑中。在 5 mL 空塑料杯子中倒入 1/4 的树脂 (可根据脑大小选择包埋杯子的大小), 再加等量的丙烯氧化物, 木牙签混匀树脂和丙烯氧化物。将昆虫脑移入其中。通风橱中过夜 (12~16 h)。丙烯氧化物会挥发, 树脂将浓缩并开始渗透入脑。树脂完全渗透入脑是一个漫长的过程。昆虫脑在树脂/丙烯氧化物杯中过夜

后, 转移到只有树脂的杯内, 再在通风橱中过 5~8 h。然后将脑包埋在胶囊内, 干燥箱内 60℃过夜凝固。

2.8 切片、展片、染色、封片

2.8.1 切片制作 切片厚度 10 μm 。载玻片浸入 $\varphi=10\%$ 乙醇, 用时则擦干。载玻片须电镀明胶。方法如下: 60℃水浴使明胶溶解在 750 mL 蒸馏水中, 大约需要 5~10 min。硫酸铝钾加到 250 mL 蒸馏水中形成一种浅紫色溶液。然后把硫酸铝钾溶液加到明胶溶液中, 混合的溶液变清后可用。可先配后贮存在冰箱备用, 但使用前应恢复至室温。将硫酸铝钾电镀明胶溶液加到染色缸内, 载玻片放入玻片盒内, 将整个玻片盒从硫酸铝钾电镀明胶溶液中浸入和取出 3~4 次, 用纸擦盒子底部以吸取多余的溶液, 玻片盒放入 50℃干燥箱内过夜干燥。

用电镀明胶后的载玻片来接切片, 按常规方法热板展片。一只雄性蛾的大脑可以做出 60~70 张 10 μm 厚度的切片。玻片放在热板上直到干燥。

2.8.2 亚甲蓝染色 滴几滴亚甲蓝染色液到玻片中央并用移液管的尖端均匀地把它扩散到玻片上。不要让染料停在上面太长时间否则切片会染色太深。先试 10 s, 如果切片没有吸收染料可以重复 (如果染色太深, 把玻片浸在 $\varphi=100\%$ 乙醇或含有一滴乙酸的 $\varphi=100\%$ 乙醇中分色)。用蒸馏水洗掉染料, 擦干玻片底部, 热板干燥, 然后进行封片。



图 2 昆虫脑连续切片触角叶部分
Fig. 2 Cobalt staining of a single neuron
physiologically identified
被研究的神经染成黑色

图中最右部分为被研究的触角神经的重构图, 表明此性信息素敏感神经元投射到巨嗅球复合体 (MGC) 中的某个嗅球
图顶标尺为 100 μm

2.9 神经元的重构

从玻片的第 1 张切片开始看过所有的切片。有两种方式可以实现重构。一个是以几个聚焦度对每张包括填充轴突和它的分枝部分的切片拍照。用于拍照的胶卷通常是富士 400RH 135 36 彩色幻灯片胶卷。显微照相应用相同放大倍数拍所有的照片

(如 10 倍), 以便以后易于按比例缩小。

另外就是把玻片投射到一张桌子的扁平白色表面上并用黑色墨水绘图笔在描图纸上重构, 可以先用铅笔画, 熟悉后, 然后用墨水。有时因为神经纤维细并且有时候染色很弱, 应用 100 倍油镜观察以免遗漏。重构过程也注意勾画其他的结构。如画出触角轮廓, 但太多不必要的细节会干扰和有益于要做的重点。

3 结果和讨论

昆虫触角神经根据对性信息素的反应特征有不同的类型存在, 在 *Agrotis segetum*, 其性信息素包含 4 种成分 (Z) -5 decenyl acetate (Z5-10: OAc), (Z) -7 dodecenyl acetate (Z7-12: OAc), (Z) -9-tetradecenyl acetate (Z9-14: OAc) 和 (Z) -5-dodecenyl acetate (Z5-12: OAc)。对性信息素反应的雄蛾触角神经元按生理学反应特征可分为: 第 1 种对性信息素成分 Z5-10: OAc, Z5-10: OH 和 Z5-12: OAc 有反应; 第 2 种对成分 Z7-12: OAc 有反应; 第 3 种对 Z9-14: OAc 起作用^[3,4]。某种神经元向脑中的初级处理中枢定位投射可应用本方法进行研究。图 2 显示第 1 种神经元向脑初级处理中枢—触角叶的投射情况。连续切片的图像, 染成黑色的神经与周围对比度较好, 反差很大, 神经清晰易辨; 脑的轮廓清楚, 特别是触角叶中的巨嗅球复合体及单个嗅球都能清楚分辨, 便于神经元和脑中结构的重构, 结果能准确反映触角神经元的生理特性及其向中枢的投射定位。

神经束路的示踪方法, 经典和常用辣根过氧化物酶法, 此法也得到不断改进^[5], 但对于神经的功能定位不能发挥作用。结合神经电生理特性的神经束路示踪和功能定位, 现较多用 Lucifer yellow 等神经荧光试剂, 这些方法, 要么试剂昂贵, 要么对仪器要求较高, 须荧光显微镜或激光共聚焦显微镜。本文介绍的方法, 多用常规试剂和仪器, 操作步骤也不是很繁, 结果可行, 不失为研究神经功能定位的好方法。

参考文献:

- [1] ALTMAN J S, TYRER N M. Filling selected neurones with cobalt through cut axons // STRAUSFELD N J, et al, eds. Neuroanatomical techniques. Insect nervous system [M]. New York: Springer Verlag, 1980: 373—402.
- [2] TYRER N M, ALTMAN J S. Identification of cobalt-filled neurones in sections (light and electron microscopy) // STRAUSFELD N J, et al, eds. Neuroanatomical techniques Insect nervous system [M]. New York: Springer Verlag, 1980: 429—446.
- [3] HANSSON B S, LJUNGBERG H, HALLBERG E, et al. Functional specialization of olfactory glomeruli in a moth [J]. Science, 1992, 256: 1313—1315.
- [4] HANSSON B S, ANTON S, CHRISTENSEN T A. Structure and function of antennal lobe neurons in the male turnip moth, *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. J Comp Physiol, 1994, 175: 547—562.
- [5] 张晓. 一种高效敏感的神神经束路追踪方法 [J]. 解放军医学专科学校学报, 1999, 27(2): 81—83.

Cobalt Lysine Filling Technique for Tracing Olfactory Sensory Neurons within Antenna into the Central Nervous System

XIANG Hui, PENG Bo

(School of Life Sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Here described the methods and procedures that included the cobalt lysine filling technique for tracing sensory neurons into the central nervous system with a moth as the test animal. Cobalt ions migrate into neurons during filling, the cobalt in the tissue is later precipitated as cobalt sulfide, which is brownish-black and insoluble. After a silver intensification procedure, the nerve fibers could be visible on a clear background. The results showed that cobalt staining for receptor neuron tracing is a good method.

Key words: tracing technique; olfactory sensory neurons; cobalt lysine filling