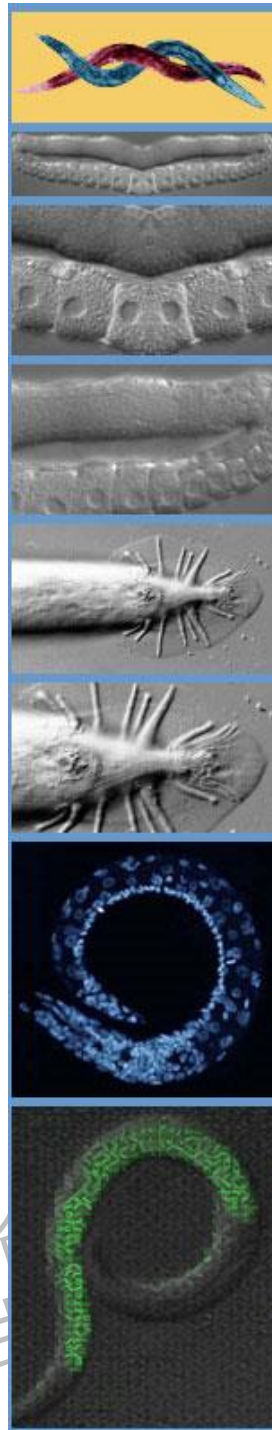


实验九 模式动物秀丽线虫 *C. elegans* 胚胎发育与形态、结构观察

王亚梅

黄朝阳楼C322, 2187932

wangyamei@xmu.edu.cn



厦门大学
2015普生

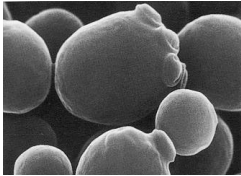
院

Model Organisms 模式生物

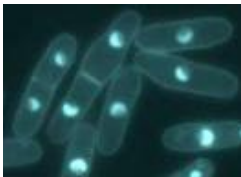
for Biomedical Research

体型小，生长发育迅速，
生活周期短，易于培养，
易于进行实验操作

Non-Mammalian Models:



S. cerevisiae
(酿酒酵母)



S. pombe
(裂殖酵母)



Neurospora crassa
(红色面包霉)



C. elegans
(线虫)



D. melanogaster
(果蝇)



D. rerio (斑马鱼)



Xenopus (蟾蜍)



Gallus (鸡)

Mammalian Models:



Mouse (小鼠)



Rat (大鼠)

Other Model Organisms:



Arabidopsis (拟南芥)

中国科学院
2015普生头课

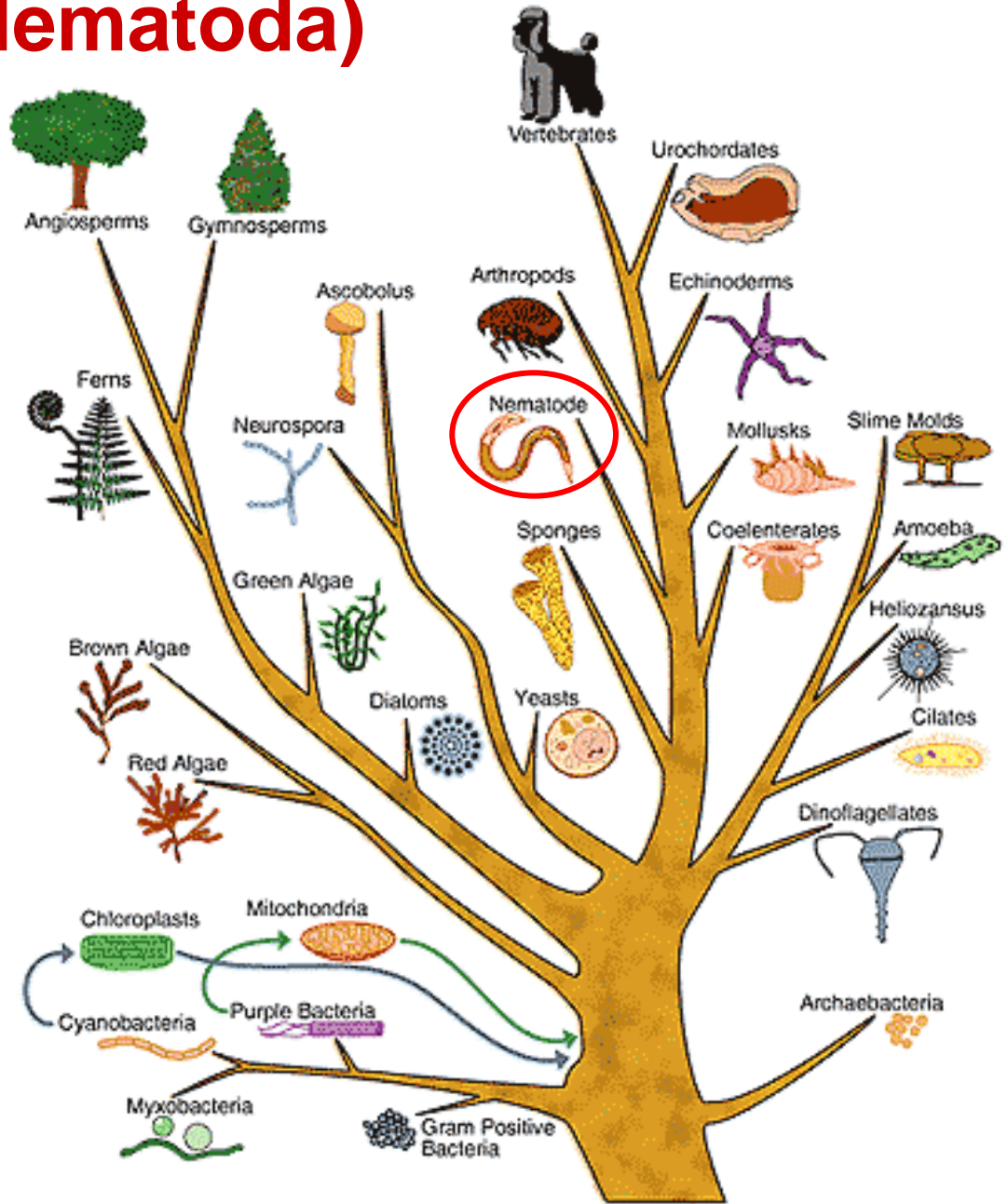
Caenorhabditis elegans

(Maupas E., 1900)

- 
- A grayscale micrograph of the nematode
- Caenorhabditis elegans*
- . The worm is shown in a curved, S-like shape, highlighting its slender, thread-like body. The head region is visible at the top right, showing the anterior end. The body is covered in a fine, segmented pattern, and the tail end is visible at the bottom left.
- 域： 真核域 Eukaryota
 - 界： 动物界 Animalia
 - 门： **线虫动物门 Nematoda**
 - 纲： 胞管肾纲 Secernentea
 - 目： 小杆目 Rhabditida
 - 科： 小杆科 Rhabditidae
 - 属： 隐杆线虫属 *Caenorhabditis*
 - 种： 秀丽隐杆线虫 *C. elegans*

线虫动物门 (Nematoda)

- *C. elegans* 是已知一万种线虫动物中的一个种。
- 线虫动物门实际可能有超过10万个种。
- 地球上的动物以个数来计算，每5个动物就有4个属于线虫动物门。



实验目的：

1. 掌握 *C. elegans* 的培养方法和实验操作技术。
2. 了解 *C. elegans* 的生活周期。
3. 利用光学显微镜观察 *C. elegans* 早期胚胎发育过程及雌雄同体成虫的形态结构。

实验设备、仪器及试剂：

1. 普通光学显微镜（1人1台）；实体解剖镜（2人共用1台）
2. 铂金虫针(2人用1个,因为贵重且易碎,需要小心保护),酒精灯（2人用1个）易燃，小心！
3. 载玻片（上有2个2%琼脂糖垫）（每人2片）及盖玻片若干，
4. 培养基及溶液：
 - 线虫生长固体培养基（NGM）：3gNaCl,2.5g蛋白胨peptone,17g琼脂,加水至975mL, 高压灭菌后冷却至55° C再加入1M CaCl₂ 1mL,1M MgSO₄ 1mL,1M KPO₄缓冲液（pH 6.0 ,108.3 g KH₂PO₄, 35.6 g K₂HPO₄,加水到1L)25mL,5mg/mL胆固醇乙醇溶液1mL, 将培养基分装到无菌3cm培养皿中。
 - LB液体培养基：10g NaCl, 10g胰蛋白胨, 5g酵母粉, 用10mM NaOH调pH值至7.0, 加水至1L, 高压灭菌后储存于4° C备用。 E. coli OP50菌液：
 - M9溶液：3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 5g NaCl, 加水至1L, 高压灭菌后加入1M MgSO₄ 1mL。
 - 2%琼脂糖溶液：0.8g琼脂糖加热溶解于40ml去离子水中。

两人共用：1. 铂金虫针1个, 酒精灯1个, 打火机1个, 3cm培养皿1个, 2. 带红色胶带载玻片2片, 普通载玻片6片, 盖玻片若干, 纱布一块, 吸管1支, 3. 20ul移液枪（带枪头）1把, M9溶液（含0.5%叠氮化钠)1管

实验材料： *C. elegans*野生型N2虫株

实验步骤：

1. 掌握实体解剖镜的正确使用方法。

最大放大倍数：**40倍**



1. 打开电源开关，
2. 将培养皿放在光源底座上，
3. 调节**粗调节旋钮**以便看清培养皿上的线虫，
4. 再利用**连续变倍调焦旋钮**进一步放大或缩小视野中的样品

实验步骤：

- 1.掌握实体解剖镜的正确使用方法。
- 2.观察培养皿上自由生长的*C. elegans*野生型N2虫种，辨识不同发育阶段线虫的形态特征。

实验室中如何培养 *C. elegans*?

NGM (nematode growth media) 固体培养基
食物为 *E.coli* OP50

在 15° C to 25° C 生长良好 .



厦门大学生命科学学院
2015普生实验课

C. elegans实验操作技术：挑取并转移线虫

实体解剖镜（两人一台）



铂金丝虫针（两人一个）

因为贵重且易碎，
需要小心保护！！

用时摘掉蓝色保护帽！



线虫培养皿（两人一个）



酒精灯（两人共用）

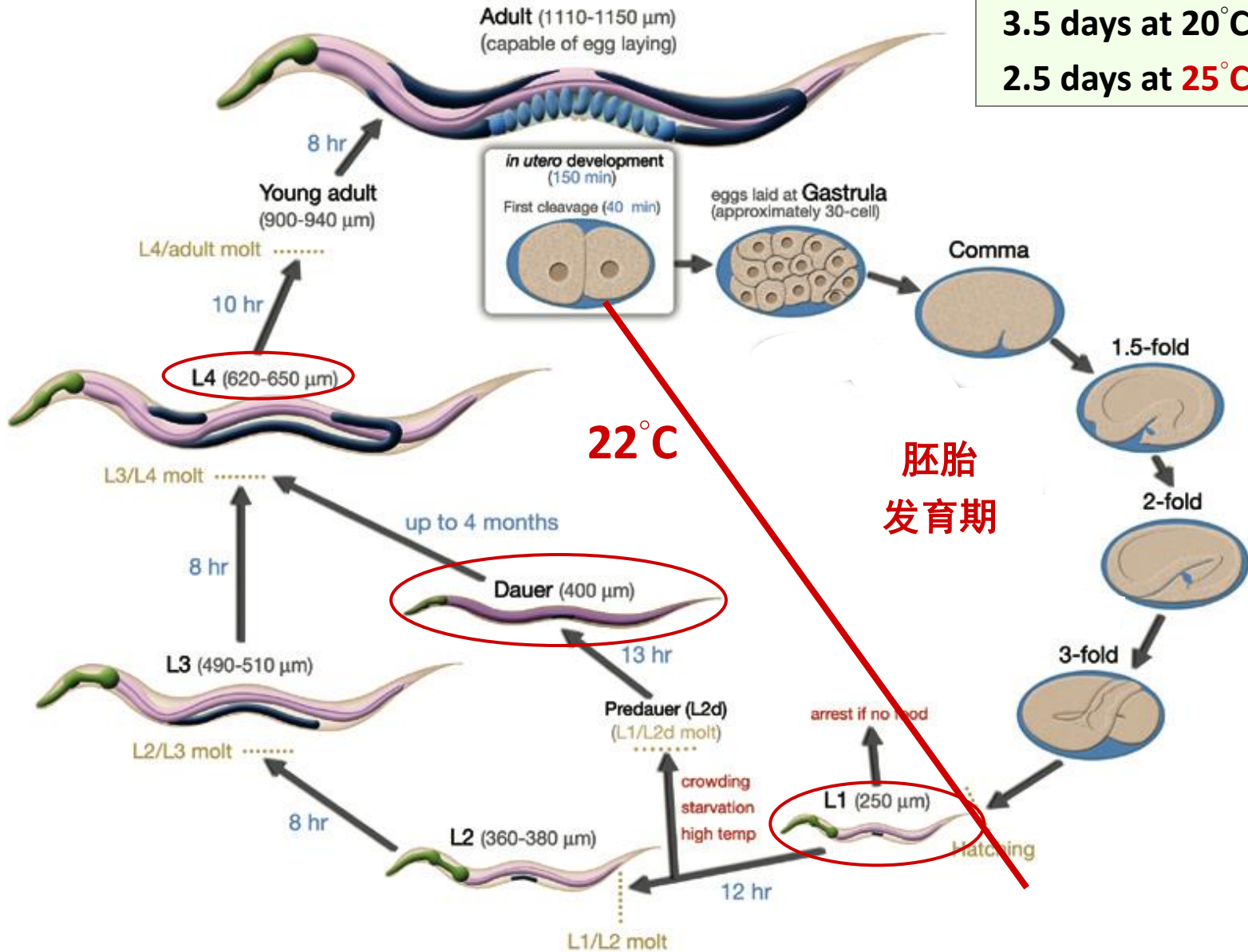
易燃易爆，
人走灯灭！

女同学请把长发扎起来

1. 先将铂金丝在酒精灯上**过火**烧去杂菌及其他虫体，
2. 然后用虫针沾取培养皿上的少量*E. coli* OP50，**粘取不同时期**的线虫，放在培养皿或载玻片上，
3. 再将铂金丝在酒精灯上**过火**

C. elegans的生活周期

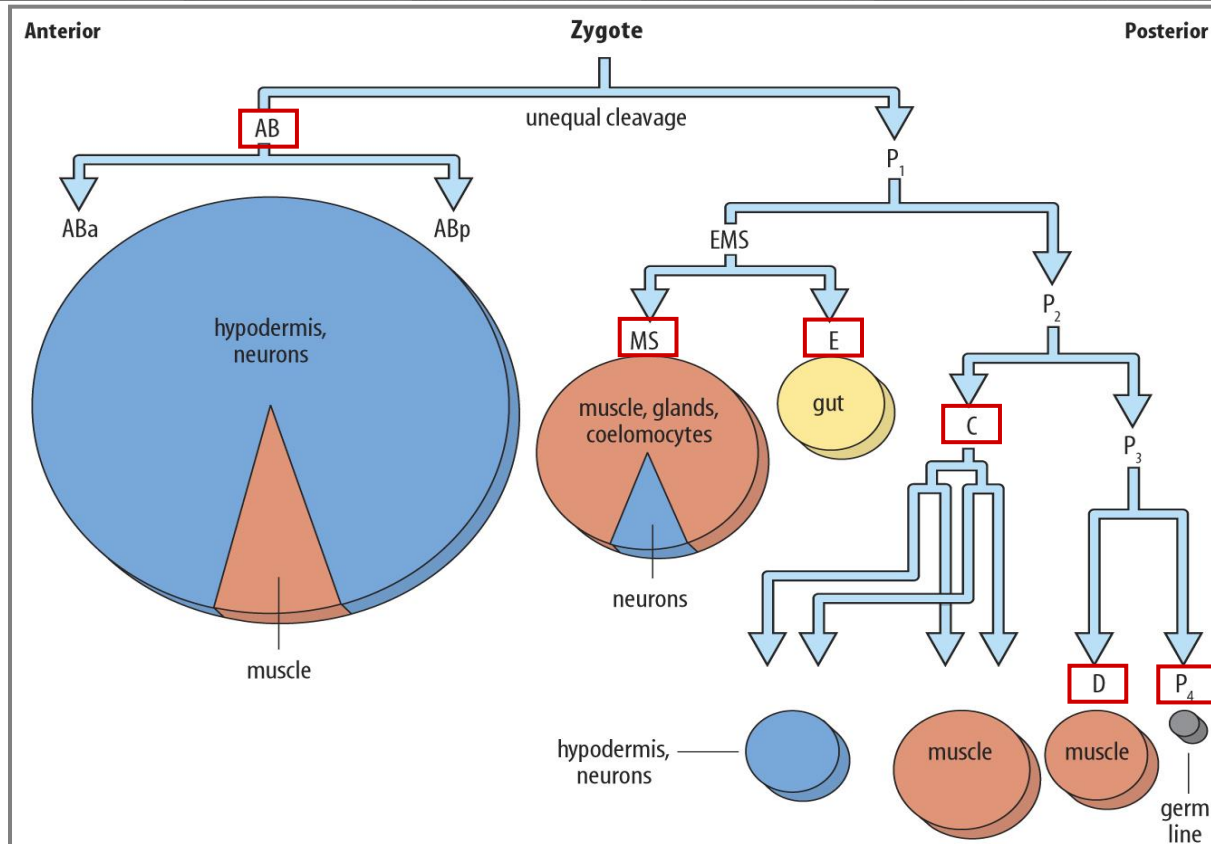
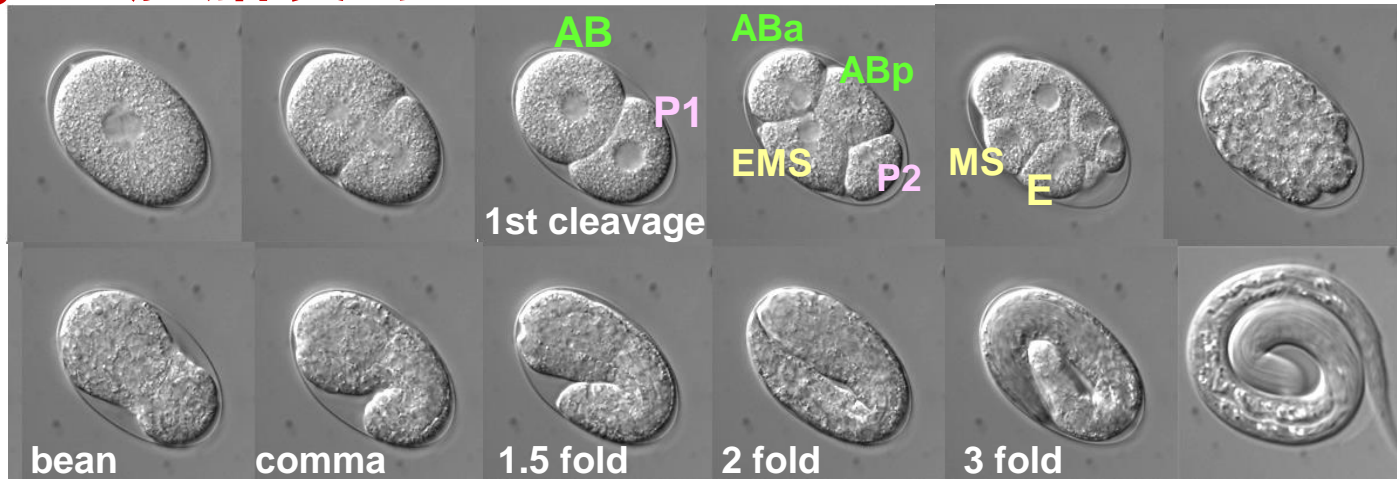
5.5 days at 15°C
3.5 days at 20°C
2.5 days at 25°C



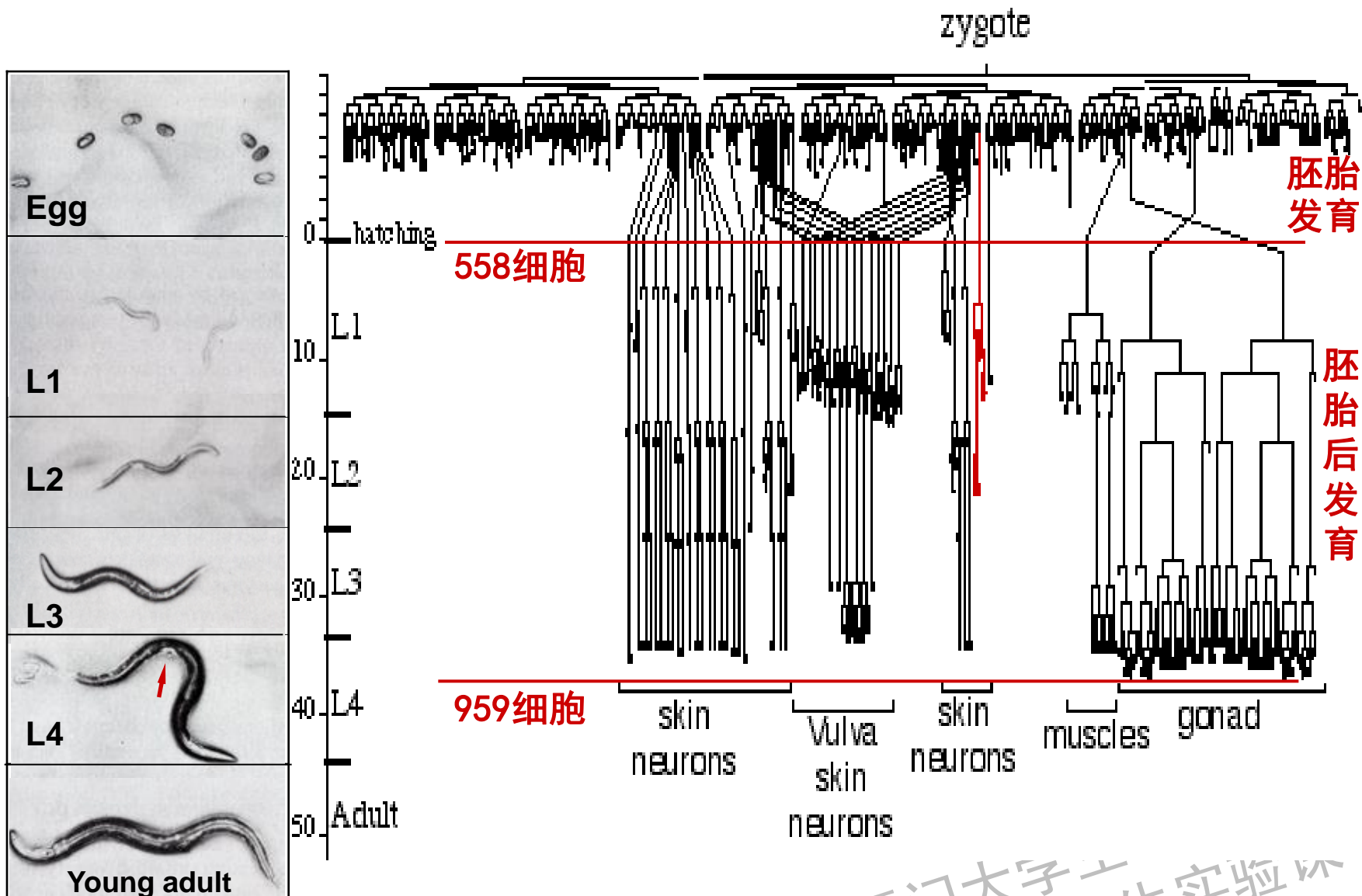
线虫不同发育时期形态特征

		时期	长度	形态特征	体细胞数	
胚胎发育期		Egg	30x 60 μ m		<558	
胚胎后发育期	性腺发育	L1	0.25mm		>卵的四倍长	558
		L2	0.35mm		肠子像拉链,头占1/4身长,身体中央有一空白处	
		L3	0.5mm		>卵的八倍长	
	精子卵子发生	L4	0.65mm		V字型的vulva	959
成熟期	精子卵子发生	Young adult	0.9mm			959
		Adult	1.2mm			959

C. elegans 胚胎发育



C. elegans 细胞谱系图：成虫959个体细胞的来源



Sulston, J. & Horvitz, R. (1977)

完

厦门大学
2015 普生实验环



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002

“for their discoveries concerning 'genetic regulation of organ development and programmed cell death' ”



Sydney Brenner

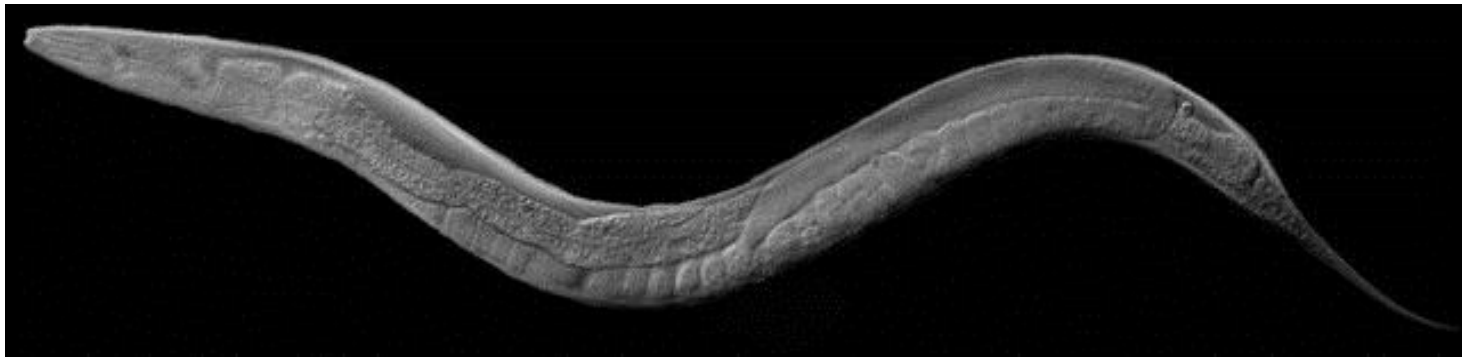
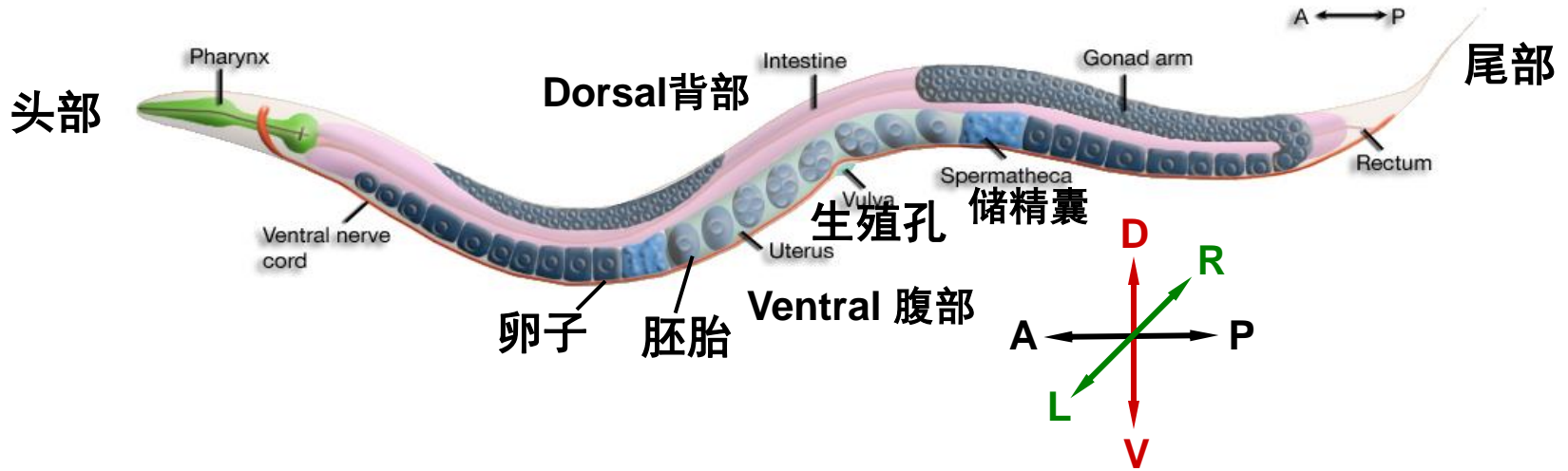


H. Robert Horvitz



John E. Sulston

*C. elegans*成虫有959个体细胞及多个组织器官分化



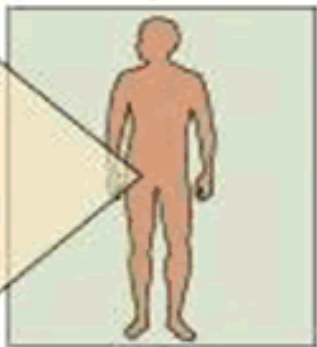
细胞

上皮组织
肌肉组织
神经组织
结缔组织

各种器官

运动系统
消化系统
循环系统
呼吸系统
泌尿系统
神经系统
内分泌系统
生殖系统

H. sapiens



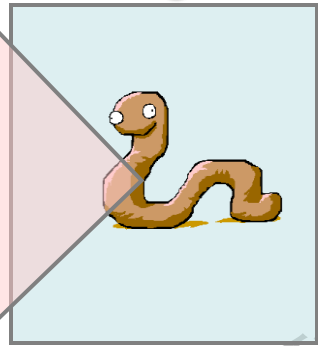
细胞

上皮组织
肌肉组织
神经组织
结缔组织

各种器官

运动系统
消化系统
排泄系统
神经系统
生殖系统
内分泌细胞?

C. elegans



*C. elegans*的组织、器官和系统



C. elegans 消化系统

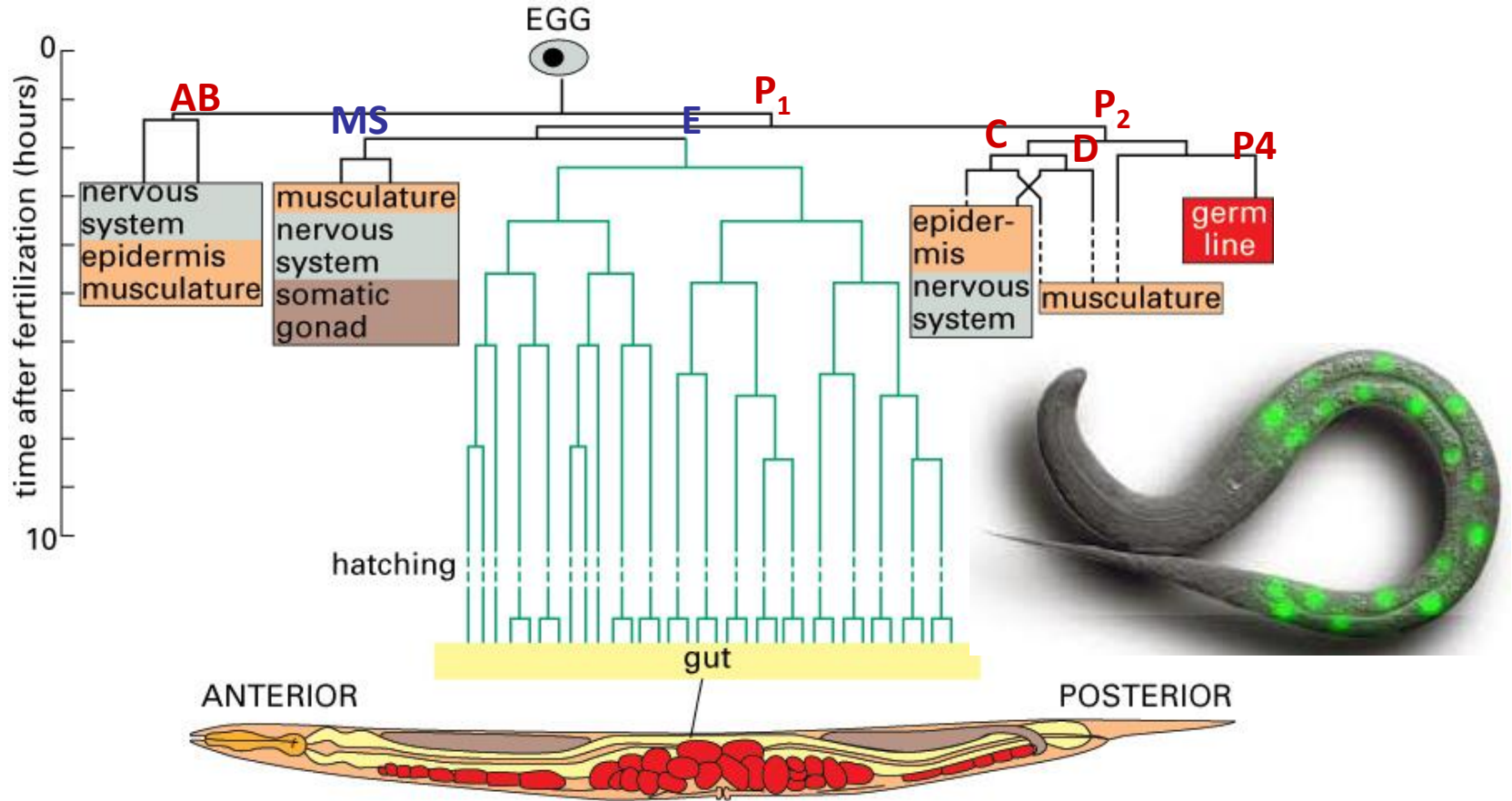
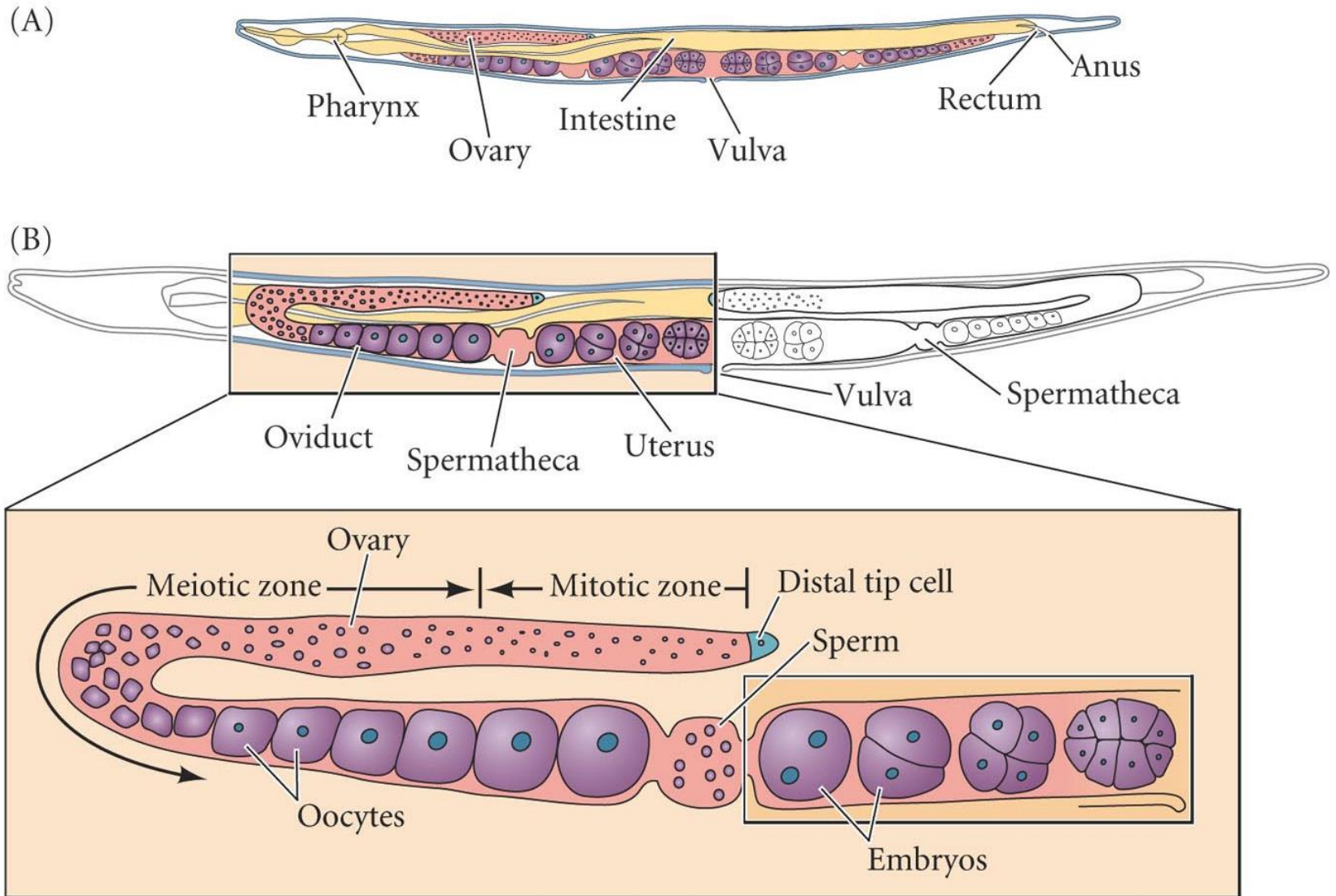


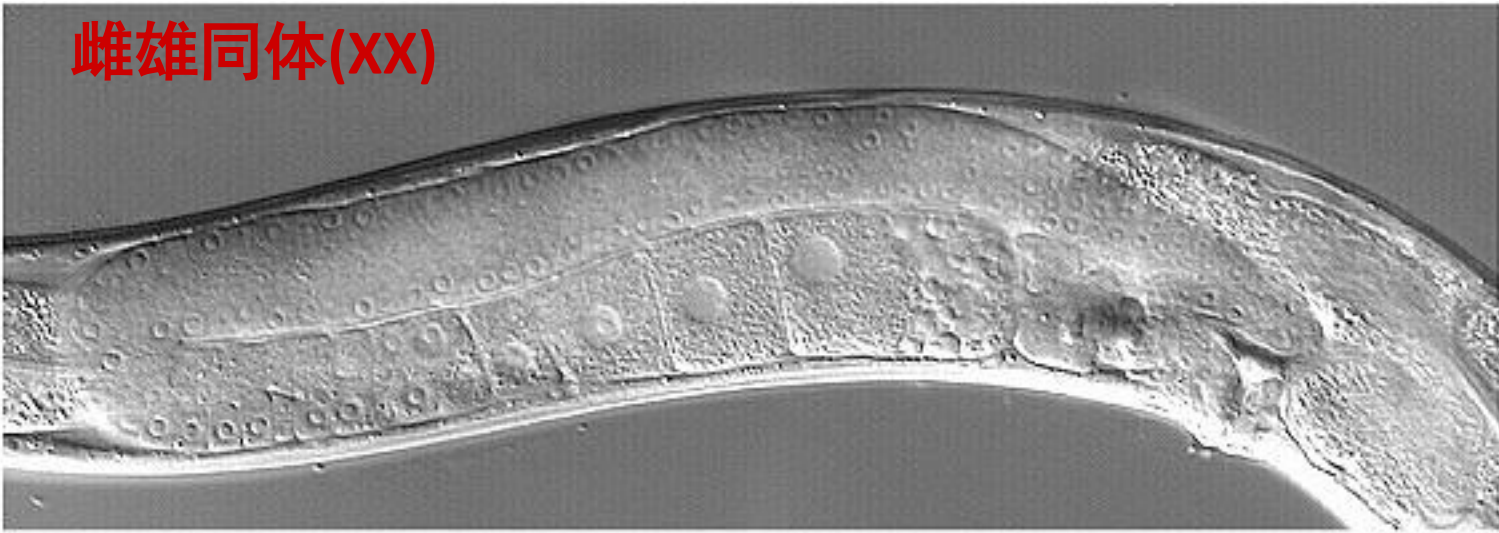
Figure 21-17. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

*C. elegans*成虫生殖系统

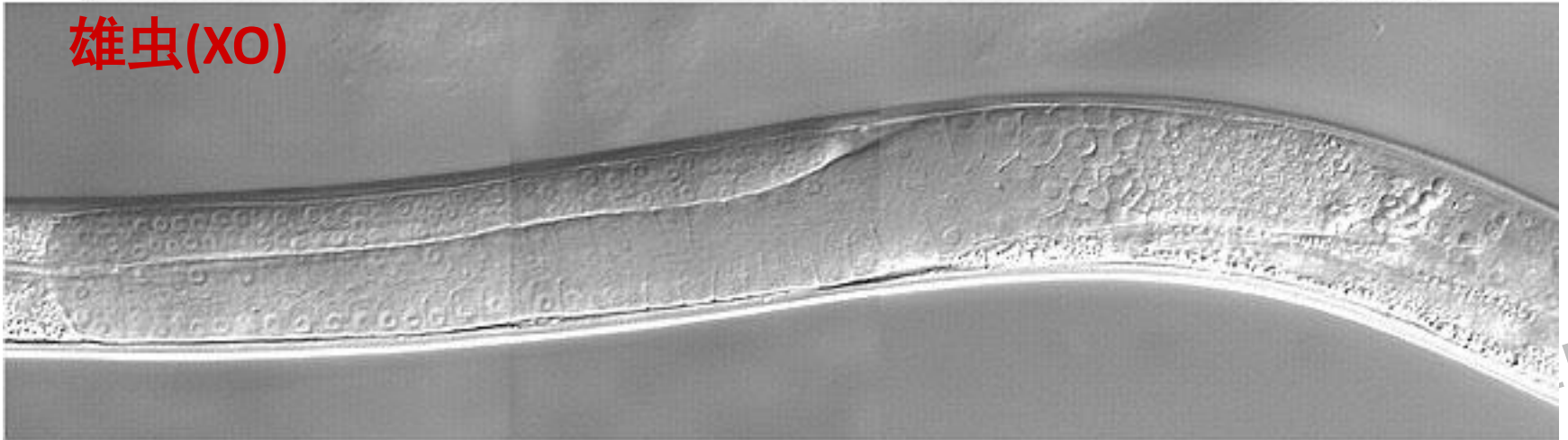


微分干涉镜(DIC)下观察到的*C. elegans*生殖系统

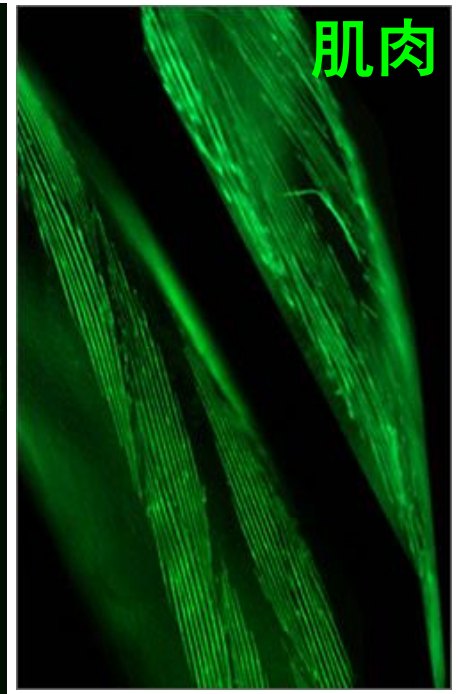
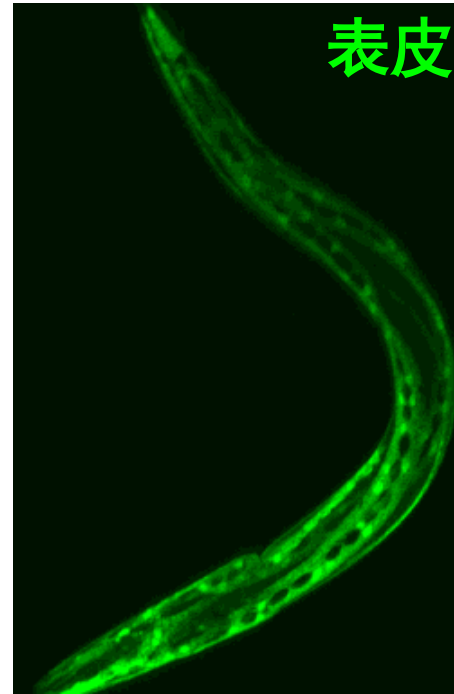
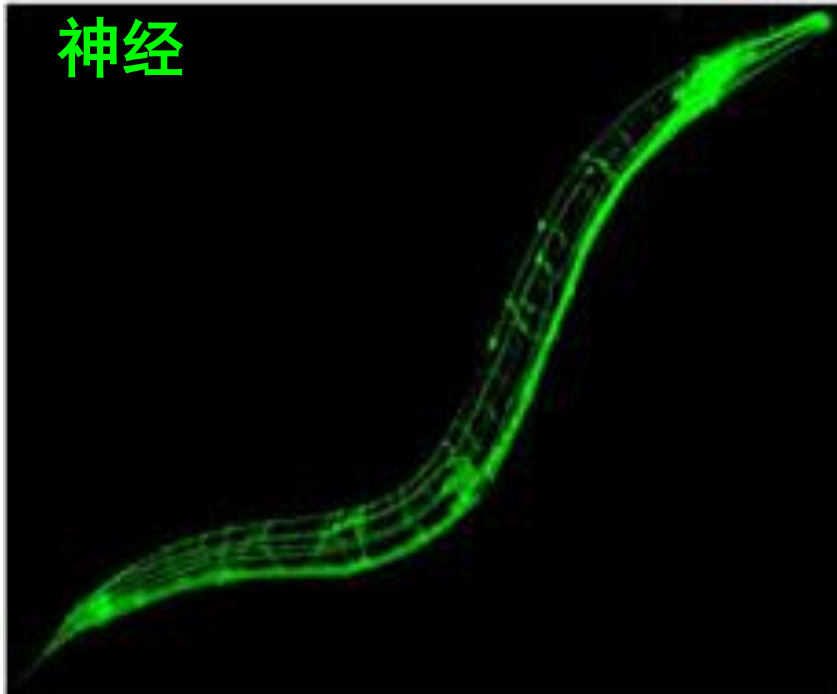
雌雄同体(XX)



雄虫(XO)

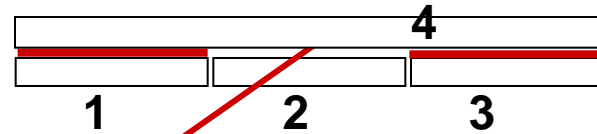
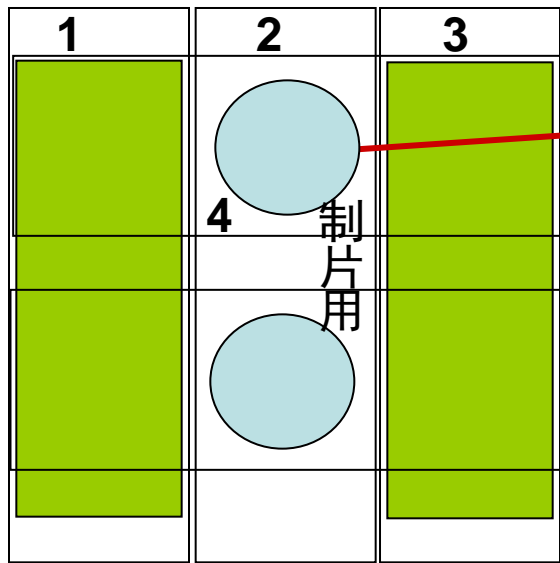


利用GFP追踪*C. elegans*神经, 表皮及肌肉



实验步骤：

1. 掌握实体解剖镜的正确使用方法。
2. 观察培养皿上自由生长的*C. elegans*野生型N2虫种，辨识不同发育阶段线虫的形态特征。
3. 制作带有**2%琼脂糖垫**的载玻片，用于高倍显微镜下观察*C. elegans*的细微结构。



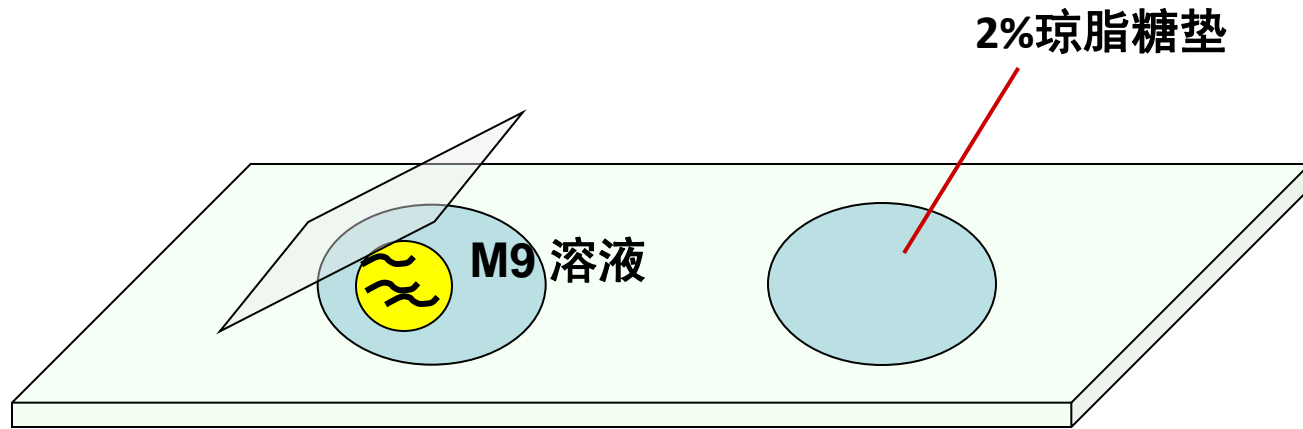
2%琼脂糖溶液

- 在实验台上依次摆好三张载玻片(1, 2, 3)
- 用滴管在玻片2上滴一小滴2%琼脂糖溶液
- 将载玻片4盖在2%琼脂糖溶液上
- 待2%琼脂糖凝固后**移去上面的载玻片4**

实验步骤:

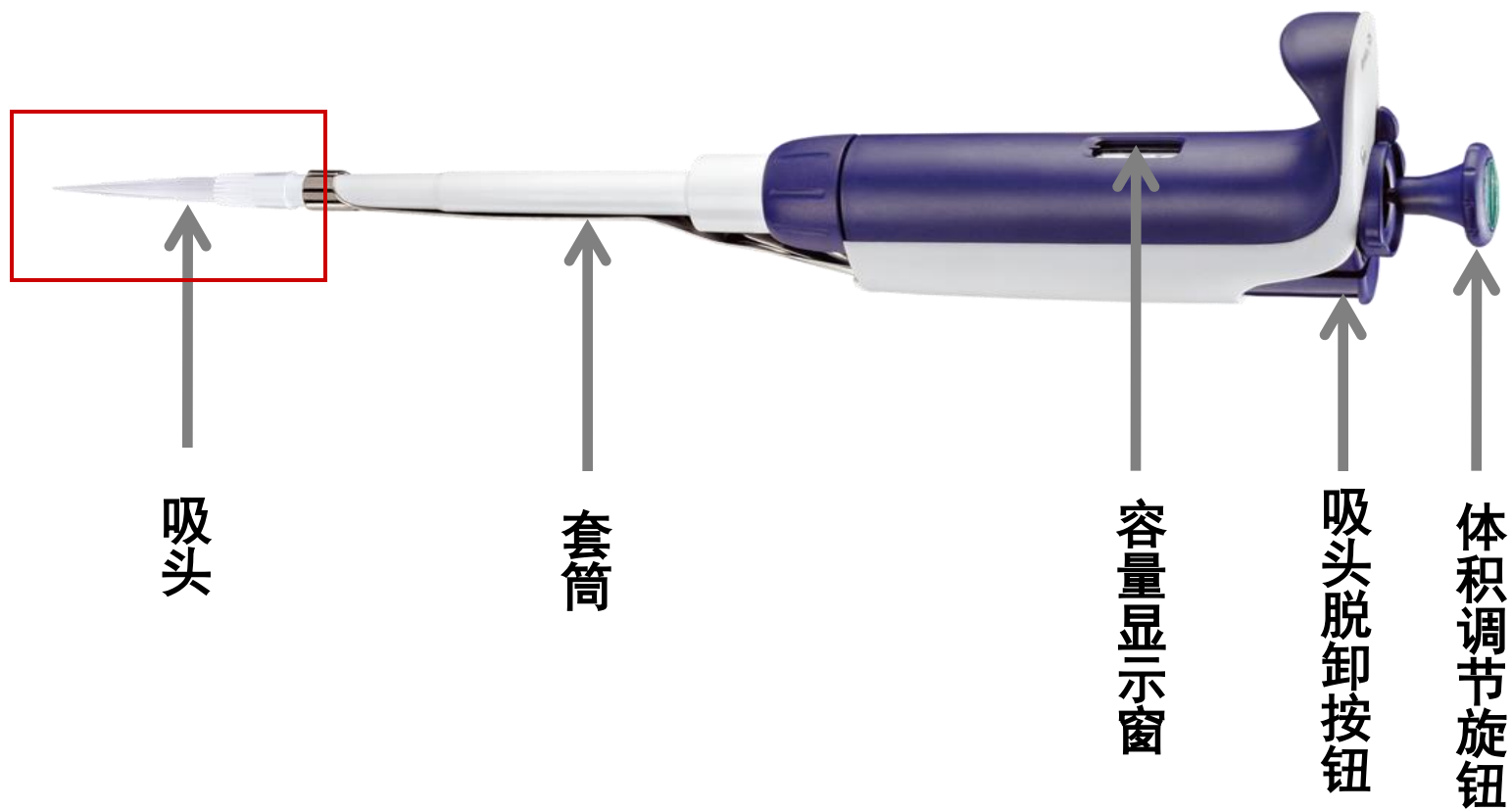
4. 光学显微镜下观察 *C. elegans* 胚胎发育过程以及雌雄同体幼虫、成虫的形态结构。

(1) 用**移液器**取 $5\mu\text{l}$ 的M9溶液(含有0.5%叠氮化钠)，加在2%琼脂糖垫上

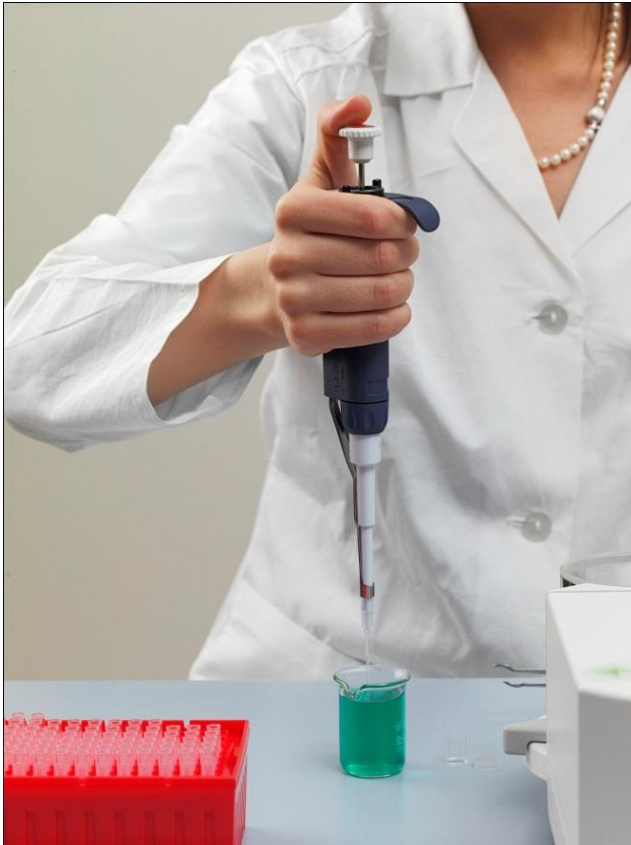


1. 在2%琼脂糖垫上加5ul M9溶液
2. 用虫针把虫挑在5ul M9溶液里
3. 盖上盖玻片,显微镜下观察

微量移液器



移液器使用注意事项



垂直吸液

吸液

↓

移液器按钮按到
第一档吸液

↓

释放按钮

排液

↓

先按到**第一档**打出大部分液体

↓

再按下**第二档**

↓

将余液排出

移液器使用注意事项

- 先调到所要的量程（本试验中5ul），
- 装好黄色枪头，慢慢按下拇指，垂直将枪头**尖端浸入液面2-4mm**以下准备吸液，把按钮按到**一档**，
- **吸液体**时一定要**缓慢地松开拇指**，不应松快过快，以防将溶液吸入过快而冲入移液器内腐蚀柱塞而造成漏气，
- **排出液体**时一定要**平稳**地把按钮压到**一档**，停约一秒钟后压到**二档**，排出剩余液体。
- 用毕将移液器**调到最大量程**。

实验步骤：

4. 光学显微镜下观察 *C. elegans* 胚胎发育过程以及雌雄同体幼虫、成虫的形态结构。

(1) 用移液器取5 μ l的M9溶液(含有0.5%叠氮化钠)，加在2%琼脂糖垫上

(2) 用铂金丝虫针沾取培养皿上的少量 *E. coli* OP50,

(3) **每人**挑取a. 卵, b. 幼虫, c. 成虫, 每一时期**至少各5个样品**放在载玻片上的M9溶液中, 轻轻盖上盖玻片 (需要经过一段时间的练习), **实验结束时, 每人都要让老师或助教看过, 并交上自己的载玻片方可离开。**

(4)先用低倍镜找到样品, 再转换到40倍物镜下认真观察其细微结构。

作业：

请将作业在下次上课时交上来。

1. 认真观察*C. elegans*胚胎发育过程(40倍物镜下),描述处于不同发育时期胚胎的形态结构特征。
2. 绘制雌雄同体成虫形态结构图(40倍物镜下)。
3. 实验结束前每人都要让老师或助教看过所做的载玻片,上交后方可离开。

思考题：

*C. elegans*作为模式生物的优点。

两人共用: 1. 铂金虫针1个, 酒精灯1个, 打火机1个, 3cm培养皿1个, 2. 带红色胶带载玻片2片, 普通载玻片6片, 盖玻片若干, 纱布一块, 吸管1支, 3. 20ul移液枪(带枪头) 1把, M9溶液(含0.5%叠氮化钠)1管

2%琼脂糖溶液(玻璃瓶中), 微波炉中加热后放在水浴中保温。先由老师帮助滴加到载玻片上。以后想要自己制作也可, **注意不要烫到!**