

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00008

小轴海绵小球细胞的 3,3'-二氨基联苯胺染色标记法研究

宋悦凡^{1,2}, 曲翊^{1,2}, 张锦友^{1,2}, 曹旭鹏¹, 张卫^{1,3}

1. 中国科学院 大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组, 辽宁 大连 116023;
2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;
3. 澳大利亚 Flinders 大学 海洋分子生物过程及生物产品实验室, 阿德莱德 SA5042

摘要: 中国南海小轴海绵(*Axinella* sp.)体内含有 2 种活性生物碱: debromohymenialdisine(DBH)和 hymenialdisine (HD), 这 2 种生物碱位于小轴海绵中的特定类型细胞——小球细胞中。针对该类细胞建立 1 种特异性的染色标记, 可以为细胞分化提供指示, 并应用于细胞体外培养的代谢调控研究中。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色是一种常用的过氧化物酶染色法, 本研究通过对小轴海绵实施细胞分离并对不同类别的细胞进行 DAB 染色, 证明了小球细胞具有颗粒状着染的特征; 对各类细胞和海绵组织的蛋白提取物进行了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE), 考察各组分中与 DAB 作用的过氧化物酶条带; 通过电镜观察揭示了小球细胞的 2 种内含体, 发现其中的大内含体与光镜下的染色颗粒在形态和数量上存在对应关系; 另外, 在细胞体外培养体系(细胞团培养)中应用了 DAB 染色, 在 20 d 的培养期间内, 颗粒状着染细胞与小球细胞的比例同步变化, 小球细胞的特征着染率保持在 93%以上。综合上述结果, 可认为小轴海绵组织和细胞体外培养过程中的小球细胞均具有 DAB 颗粒状着染的显著特征, 该染色法对于该类细胞而言是一种可靠的细胞化学染色标记方法。[中国水产科学, 2011, 18(1): 8-15]

关键词: 小轴海绵; 小球细胞; 细胞分离; 3,3'-二氨基联苯胺(DAB); 染色标记

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0008-08

海洋是天然产物的巨大宝库。20 世纪 50 年代, Bergmann 等^[1]在海绵(*Cryptotethya crypta*)中发现了阿拉伯糖核苷, 自此引发了海洋药源活性物质开发的风潮。作为最原始的多细胞动物, 海绵是海洋天然药源活性产物的重要来源, 每年都有大量的新化合物从海绵中被发现^[2]。除了从海绵中发现新化合物外, 对这些化合物的来源和定位研究也是海绵药物开发的一项重要任务。了解这些化合物是由哪种细胞生产和贮藏的(如微生物或某类型海绵细胞), 有助于制定适宜的药物生产策略, 如微生物发酵、海绵块和细胞培养或化学合成等。

对活性产物的定位研究表明, 在海绵各种类

型的细胞中, 小球细胞是活性产物的重要贮存场所^[3-4]。中国南海小轴海绵(*Axinella* sp.)中发现的 2 种具有治疗骨关节炎和老年痴呆症活性的生物碱: debromohymenialdisine (DBH)和hymenialdisine (HD)^[5-7], 也存在于该海绵的小球细胞中(待发表)。鉴于小球细胞具有储藏次生代谢产物的特性, 在目前的海绵细胞培养体系——细胞团(primmorphs)培养的过程中^[8], 定向调控其向小球细胞分化, 是具有应用前景的活性化合物生产方式。而为了实现对小球细胞的分化跟踪和定性定量研究, 需要找到一种对其独有而稳定的标记方法。

过氧化物酶(peroxidase, POX)是广泛存在于生物界的一类酶^[9], 生物体内的过氧化物酶体

收稿日期: 2010-03-24; 修订日期: 2010-06-01.

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA09Z435); 大连化物所科研创新基金项目(K2006A19).

作者简介: 宋悦凡(1981-), 女, 博士研究生, 研究方向为海绵细胞培养及活性产物代谢. E-mail: songyf@dicp.ac.cn

通讯作者: 张卫, 研究员, 主要从事海洋生物产品工程研究. Tel / Fax: 0411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn, wei.zhang@flinders.edu.au

(peroxisome)是连结氧化代谢与生物合成的场所,能使代谢反应区间化,并行使次生代谢调控和细胞解毒的功能^[10]。研究表明,小轴海绵小球细胞中的DBH和HD含量分别高达细胞干重的 10.9%和 6.1%(待发表),细胞中高浓度的次生代谢产物的累积,需要较高的酶活来完成合成代谢、富集浓缩和产物间隔化以避免对细胞的毒害。鉴于以上分析,对小球细胞中POX的特征考察,可以作为建立细胞特异性标记的切入点。POX的细胞化学染色法是血细胞鉴别分类的常规方法,具有简便灵敏的特点,其原理是利用细胞中的POX将底物中H₂O₂分解,产生新生态氧,使无色联苯胺氧化为蓝色的联苯胺蓝,进而变为棕色产物^[11]。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色法为常用的POX检测法,本研究中应用该方法对小轴海绵进行细胞化学染色,以确定小球细胞的标志性染色特征,同时,在海绵细胞体外培养体系中检验了该染色法的可靠性,为细胞的分化调控、细胞特征蛋白的鉴定和功能研究提供了有价值的信息。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小轴海绵采自中国南海,采集的样本运至实验室在水族缸中暂养,水温 25℃。DAB染色试剂盒购自中杉金桥(ZLI-9032)。无钙镁海水(CMFASW)的组分为NaCl 35 g/L, Na₂SO₄ 0.99 g/L, KCl 0.75 g/L, Tris-Base 2.42 g/L, 调pH至 8.0。含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的无钙镁海水(CMFASW-E)中,EDTA的浓度为 25 mmol/L。细胞培养用海水为天然海水经 0.22 μm滤膜过滤后,110℃高压 10 min 灭菌。Native-PAGE 蛋白提取缓冲液为含 0.3% Triton X-100 的Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH7.9),高分子量蛋白Marker购自Amersham。

1.2 细胞分离及细胞团培养

为考察不同类别海绵细胞的 DAB 染色特征,使用细胞分离的方法(图 1),将组织离散得到的混合细胞划分为不同的组分:富集的小球细胞,除小球细胞外的大细胞,和除小球细胞外的小细胞。小轴海绵的小球细胞具有在 CMFASW-E 中自

然聚集的特性,实验中利用此特点对小球细胞进行了富集,方法如下:取健康的小轴海绵组织 25 g,在 CMFASW 中浸洗并轻轻剔去表面附着的藻类,弃去 CMFASW,手术刀片切成 2 mm 薄片状,置于培养皿中用 CMFASW-E 浸泡 5 min,CMFASW-E 体积 30 mL。用镊子轻轻挤压,使得细胞逸出成为悬液。将细胞液经 350 目筛绢过滤,剔除骨针和石粒等杂质。将通过筛绢的细胞悬液置于培养皿中,静置 30 min 使小球细胞自然聚集。待小球细胞形成聚集体后,将培养皿在水平桌面上往复振荡,使单细胞和聚集体均匀重悬,小球细胞聚集体经 20~30 s 沉至培养皿底面,单细胞仍悬浮在上清液中,用吸管吸取并收集上清细胞液 20 mL(皿中 2/3 体积 CMFASW-E),经筛绢过滤后收集。反复进行向培养皿中添加 CMFASW-E(20 mL)、培养皿振荡和收集上清细胞液的操作,重复 7 次该操作后,培养皿中剩余的细胞聚集体即为富集的小球细胞。收集的上清细胞液经 29 g 离心,得到细胞沉淀为除小球细胞后的低速离心细胞群体,主要为海绵中的大细胞;其上清再经 110 g 离心,得到细胞沉淀为除小球细胞后的高速离心细胞群体,主要由海绵中的小细胞构成。

为检验DAB染色在细胞培养中的应用,进行了以小球细胞为主的细胞团培养。制备细胞团时,组织离散方法与上述细胞分离方法相同,反复进行向培养皿中添加含EDTA的CMFASW、培养皿振荡和收集上清细胞液的操作,重复 4 次,收集培养皿中的细胞聚集体,少量取样用 4%甲醛解聚计数,估算细胞密度,按 2×10^5 个/mL 将团块接种于无菌天然海水中,每天更换 50% 的无菌天然海水(图 1)。

1.3 DAB 染色

富集的小球细胞聚集体转移至 4% 甲醛(CMFASW-E 稀释 40% 甲醛至终浓度 4%)中,轻振荡使细胞解聚,固定 1 h 后离心,涂片干燥。以小球细胞为主的细胞团先用 CMFASW-E 离散成细胞悬液,再加入 40% 甲醛至终浓度 4%,固定 1 h 后离心,涂片室温干燥。染色前玻片经去离子水浸润,DAB 试剂盒染色检测。

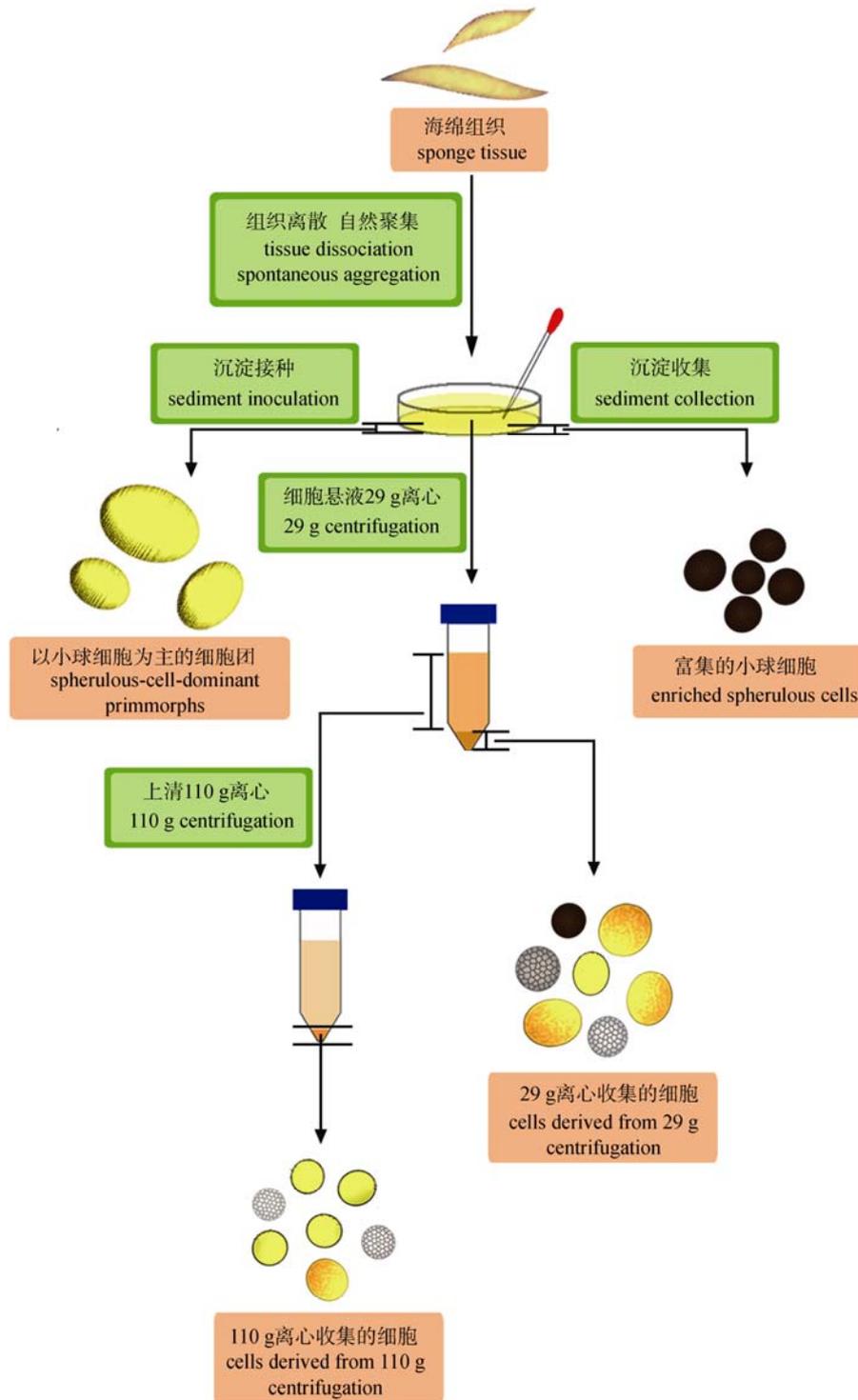


图 1 细胞分离和细胞团制备的流程图

Fig. 1 Operational diagram for cell separation and preparation of primmorphs

1.4 显微观察

采用Nikon TE2000 倒置荧光显微镜对细胞和细胞团进行光镜观察, 成像系统为DS-U2 digital camera。电镜样品的制备参考Maldonado^[12], 富集的

小球细胞在 2.5%的戊二醛溶液中固定 1 h, 润洗后 2% 锇酸固定, 经丙酮梯度脱水后用Spurr's resin树脂包埋。Reichert-Jung Ultracut E切片机制备超薄切片, 切片经 2% 乙酸铀酰染色 30 min,

柠檬酸铅染 15 min, 使用 JEM-2000EX 电子显微镜进行观察。

1.5 海绵组织和各细胞组分蛋白提取物的 Native-PAGE

将新鲜海绵组织和细胞分离后得到的 3 类细胞组分(富集的小球细胞、29 g 离心细胞和 110 g 离心细胞)进行冷冻干燥, 得到的干燥物在冰浴下提取蛋白, 提取液于 4°C 10 000 g 离心 15 min, 收集上清, 使用 Bradford 法测定总蛋白。不连续 Native-PAGE 使用浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 8%, 细胞和组织提取物上样量统一调至总蛋白 20 μ g, 使用考马斯亮蓝 R-250 和 DAB 染色液染色(DAB 染色液配制方法按试剂盒说明, 总体积 8 mL, 浸没凝胶表面, 染色时间 8 min)。

2 结果与分析

2.1 小球细胞 DAB 特征性染色的确定

2.1.1 小球细胞 DAB 特征性染色的光镜观察与统计 经细胞分离流程(图 1)得到 3 类细胞组分, 各组分的 DAB 染色结果反映了细胞内的整体过氧化物酶水平和着染特征。富集的小球细胞在光镜下观察, 细胞呈深棕色, 直径 9~15 μ m, 内有颗粒(图 2-a); 细胞涂片干燥后经去离子水浸润, 细胞丧失颜色特性而变透明, DAB 染色后, 小球细胞呈胞内颗粒状强着染的特征, 显色颗粒为深棕色(图 2-b)。29 g 离心得到的细胞组分光镜下多为橙黄色, 直径 10~18 μ m, 含少量小球细胞(图 2-c); DAB 染色后部分细胞呈弥散性弱着染, 另有少数细胞呈颗粒状强着染(图 2-d), 其比例与本组分中

小球细胞的比例相当(表 1)。110 g 离心主要收集直径小于 10 μ m 的橙黄色的小细胞, 镜下视野中未发现小球细胞, 染色后也未发现颗粒状着染细

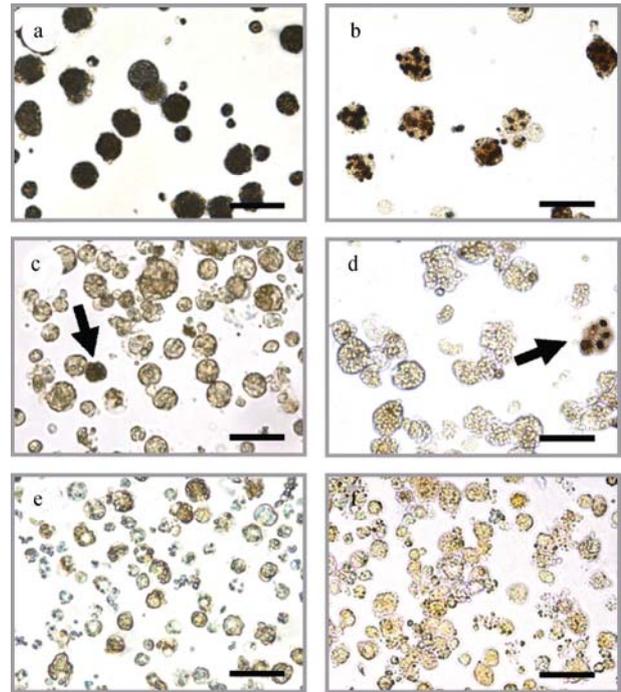


图 2 通过细胞分离得到各细胞组分

a. 富集的小球细胞; b. 富集小球细胞的 DAB 染色; c. 29 g 离心细胞(箭头所指为小球细胞); d. 29 g 离心细胞的 DAB 染色(箭头所指为小球细胞); e. 110 g 离心得到的细胞; f. 110 g 离心得到细胞的 DAB 染色. 比例尺 25 μ m.

Fig. 2 Light microscope images of cell fractions obtained with separation protocol

a. Enriched spherulous cells; b. DAB staining of enriched spherulous cells; c. Cells separated from 29 g centrifugation (spherulous cell was pointed by an arrow); d. DAB staining of cells separated from 29 g centrifugation (spherulous cell was pointed by an arrow); e. Cells separated from 110 g centrifugation; f. DAB staining of cells separated from 110 g centrifugation. Scale bar=25 μ m.

表 1 细胞分离各组分的 DAB 染色情况统计

Tab. 1 Statistics of DAB staining of different cell fractions

| 细胞组分 cell fraction | 小球细胞比例/% proportion of spherulous cells | 颗粒状着染细胞比例/% proportion of cells with DAB positive granules | 颗粒状着染细胞/小球细胞 cells with DAB positive granules/spherulous cells |
|--|---|--|--|
| 富集的小球细胞 enriched spherulous cells | 88.2±1.9 | 83.6±3.8 | 94.8 |
| 29 g 离心收集的细胞 cells derived from 29 g centrifugation | 3.8±1.2 | 3.1±0.8 | 81.6 |
| 110 g 离心收集的细胞 cells derived from 110 g centrifugation | 0 | 0 | — |

注: 细胞总数 500 以上, 镜下视野数 5.

Note: The cell proportions were calculated by counting more than 500 cells in five or more visual fields under light microscope.

胞(图 2-e,f), 有部分细胞呈弥散性弱着色。29 g 和 110 g 离心的两组分中, 弱着色细胞显橙色或浅棕色, 胞内无可辨识的染色颗粒, 与小球细胞的深棕色颗粒状着色具有显著差别。通过上述细胞分离方法和分组染色, 证实了 DAB 颗粒状着色是小球细胞的特有现象, 在该类细胞的富集组分中, 小球细胞比例为 88.2%, 颗粒状着色细胞比例为 83.6%, 小球细胞的特征着色率达 94.8%(表 1)。

2.1.2 DAB 染色相关蛋白的 Native-PAGE 考察
DAB 除了应用于上述细胞染色以外, 还可以应用于非变性凝胶电泳后的活性染色, 以显示相应的过氧化物酶条带, 并且该显色方法具有较高的灵敏性^[13]。图 3-a 为小球细胞(Sp)、29 g 和 110 g 离心分离细胞组分的 Native-PAGE 电泳照片, 图中左半部为考马斯亮蓝(CBB)染色, 显示了 3 类组分中的总体的蛋白分布; 图中右半部为 DAB 活性染色, 显示各组分中的过氧化物酶条带。如图中所示, DAB 染色的小球细胞(Sp)泳道出现了明显的过氧化物酶活性条带(CB); 该条带在考马斯亮蓝(CBB)染色的 Sp 泳道中也很醒目。图中 29 g 和 110 g 组分, 在 CB 的水平位置上, 有微弱的 DAB 着色, 但难以观察到明显条带, 考马斯亮蓝也未有显色;

鉴于考马斯亮蓝单条泳道的最小检出量为 $0.1 \mu\text{g}$ ^[14], 而各泳道的上样量均为总蛋白 $20 \mu\text{g}$, 可推断 CB 在 29 g 和 110 g 组分中含量很低。综合上述结果, 具有过氧化物酶活性的 CB 条带为小球细胞的特征蛋白; 结合此类细胞的颗粒状强着色特性, 推断 CB 应为该特异性染色对应的过氧化物酶。另外, 29 g 和 110 g 泳道在 CB 的水平位置以上(分子量 $>232 \text{ kD}$) 有微弱的 DAB 阳染条带, 其对应的过氧化物酶可能与 2.1.1 所述的弥散性弱着色相关。图 3-b 为海绵组织(Ti)与小球细胞(Sp)提取物的电泳照片, 因海绵组织中含有小球细胞, 其泳道(Ti)中也含有 CB 条带。通过与 Maker 的分子量对照计算, 小球细胞的特征蛋白(CB)分子量约为 220 kD 。

2.2 小球细胞的电镜观察

小球细胞的电镜照片(图 4)显示, 其内部充斥着内含颗粒, 细胞核内核质浓缩, 细胞质很少, 没有可见的细胞器。小球细胞内部存在 2 种颗粒, 一种较大(li), 呈规则卵圆形, 长径 $2\sim 3 \mu\text{m}$, 单层膜包裹, 质地均匀。细胞内所含此类内含体的数量相对较少(每细胞平面上 $1\sim 4$ 个)。在细胞内另有一种小的内含体(si), 数量众多难以计数, 长径 1

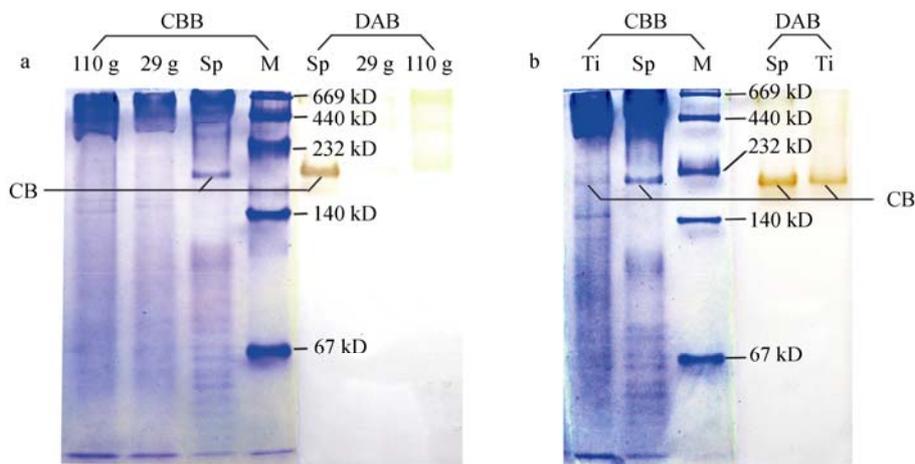


图 3 不同细胞组分及海绵组织蛋白提取物的 Native-PAGE

- a. 富集的小球细胞(Sp), 29 g 和 110 g 离心细胞蛋白提取物的考马斯亮蓝(CBB)和 DAB 染色, 显示了小球细胞的特有条带(CB);
b. 富集的小球细胞(Sp)和海绵组织(Ti)蛋白提取物的考马斯亮蓝和 DAB 染色. M: 蛋白分子量标准.

Fig. 3 Native-PAGE of protein extracts from different cell fractions and sponge tissue

- a. Coomassie brilliant blue (CBB) and DAB staining of protein extracts from enriched spherulous cells (Sp), cells derived from 29 g and 110 g centrifugation, with a characteristic band (CB) being detected; b. Coomassie brilliant blue and DAB staining of protein extracts from enriched spherulous cells (Sp) and sponge tissue (Ti). M: standard molecular weight.

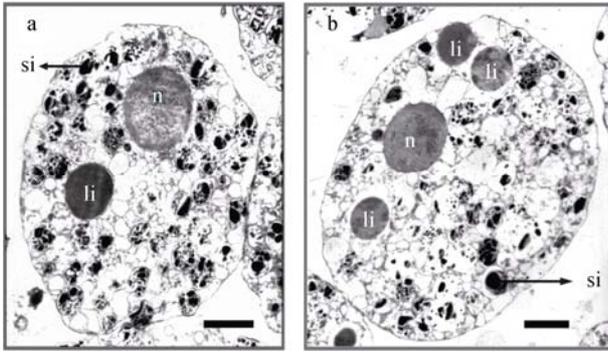


图 4 小球细胞的电镜照片

a. 切面含单个大内含体(li), 小内含体(si)数量较多形态相对完整; b. 切面含多个大内含体(li), 小内含体(si)缺损较多, 细胞核(n)核质浓缩的小球细胞. 比例尺=2 μ m.

Fig. 4 TEM images of spherulous cells

a. spherulous cell with a single large inclusion (li) in the section plane, the small inclusions (si) were abundant and relatively well-kept; b. spherulous cell with several large inclusions (li) in the section plane, the small inclusions (si) were mostly lost and the nucleus (n) was condensed. Scale bar= 2 μ m.

μ m 左右, 其密度比第 1 类颗粒更大, 虽然外表有单层膜包被, 但内部有裂隙, 并且易脱落而形成空泡, 可能是由于其密度较大在固定过程中溶胀导致的。小球细胞的内部超微结构解释了其光镜下的颜色特性, 即由于其内部含有大量颗粒, 阻碍了光的通过, 因此在视野中呈现为深棕色。由于小球细胞中仅能观察到 2 种内含体, 而 DAB 染色结果显示其含有的颗粒状的过氧化物酶体, 在数量和大小上与电镜中所显示的大内含体相符合,

因此较大的内含体应为细胞中的过氧化物酶体。考虑到小球细胞中高浓度的活性物质含量和第 2 种内含颗粒的密度特点, 此类小内含体很有可能是活性物质 DBH 和 HD。

2.3 细胞团培养验证 DAB 染色对小球细胞的标记作用

2.3.1 细胞团的培养特征 以小球细胞为主的细胞团培养, 将培养皿中的聚集体接种至 NSW 后首先形成不规则细胞团, 体积较小, 且边缘不平整(图 5-a,b), 随着培养时间的延长, 细胞团逐渐融合体积变大, 第 8 天左右外表趋于平滑(图 5-e, f), 培养至第 20 天, 细胞团保持外缘较平整(图 5-g,h), 在 20 d 的培养期间内无贴壁现象出现。

2.3.2 细胞团培养过程中的 DAB 染色考察 小球细胞团离散后出现了部分体积较大的深棕色细胞(图 6 a), 为团内的原细胞(海绵中具有增殖和多向分化能力的干细胞)吞噬了小球细胞的结果。DAB 染色结果表明, 大体积的深棕细胞虽呈阳性着染, 但表现为弥散性染色, 没有明显的胞内着染颗粒; 而细胞团内的小球细胞保持了颗粒状着染的特征, 在 20 d 的培养期内, 颗粒状着染细胞的比例与小球细胞的比例呈同步变化, 两者的比值稳定保持在 93%以上(图 7)。上述结果表明, DAB 对小球细胞的特异性染色标记法, 可以在细胞团培养体系中加以应用。

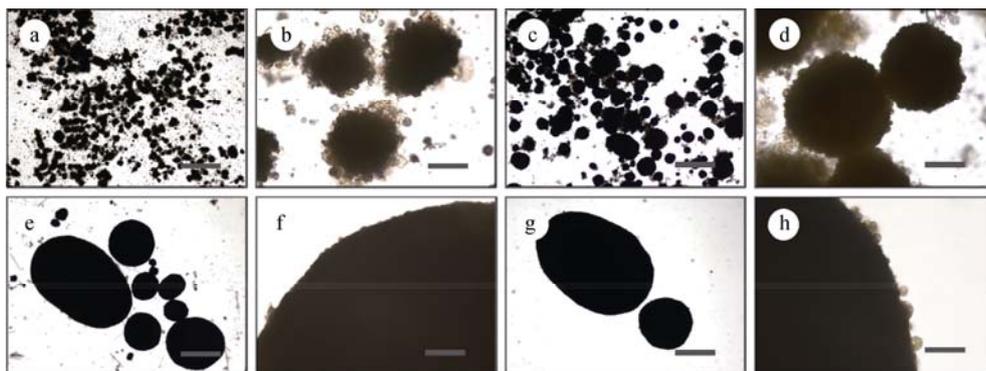


图 5 细胞团不同培养时期的特征

a,b: 1 d; c,d: 4 d; e,f: 8 d; g,h: 20 d. a,c,e,g 比例尺=500 μ m ; b,d,f,h 比例尺=50 μ m.

Fig. 5 Characteristics of primmorphs during culture period

a,b: 1 d; c,d: 4 d; e,f: 8 d; g,h: 20 d. Scale bar of a,c,e,g is 500 μ m ; Scale bar of b,d,f,h is 50 μ m.

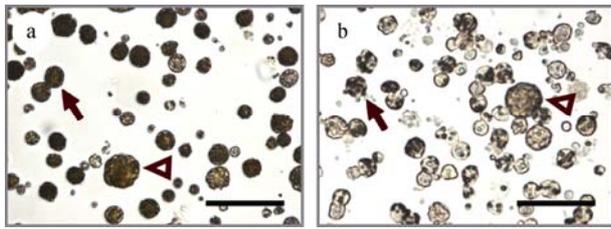


图 6 细胞团培养 5 d 离散后的 DAB 染色照片

a. 离散的细胞; b. 离散细胞的 DAB 染色(箭头所指为小球细胞, 三角所指为吞噬小球细胞后的原细胞)。比例尺=50 μm 。

Fig. 6 Light microscope images of DAB staining of dissociated cells from primmorphs cultured for five days
a. Dissociated cells; b. DAB staining of dissociated cells. Arrow shows spherulous cell. Triangle shows archaeocyte with spherulous cells engulfed in. Scale bar= 50 μm .

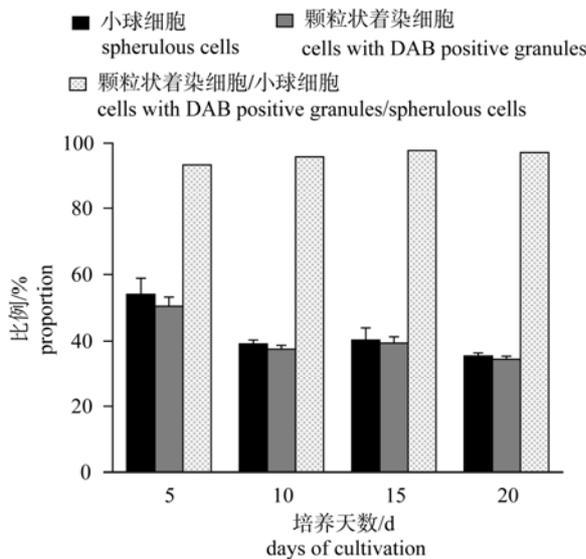


图 7 细胞团在培养不同阶段小球细胞和 DAB 颗粒状着染细胞的比例

Fig 7 Proportions of spherulous cells and cells with DAB positive granules in primmorphs during culture period

3 讨论

海绵是最原始的后生动物,其体内没有器官分化,但含有多种类型的细胞。目前对海绵细胞种类的鉴定,主要以形态观察为主。电镜观察比较清晰准确,但制样过程较繁琐;光镜观察虽简便但有一定局限性。对于小轴海绵而言,虽然小球细胞在光镜下有显著的深棕色特征,但细胞于玻片上干燥后再浸润,便会丧失其颜色特性而变透明(可能是由于溶胀导致内部小颗粒泄露所致),

不利于后续的观察鉴定。另外在小轴海绵中,除深棕色的小球细胞外,还有部分内含颗粒的灰色细胞,在光镜观察时容易与小球细胞混淆。细胞化学染色方法能够原位显示细胞的内含物质^[11],具有操作简便和显色稳定的特点,可弥补电镜和光镜鉴定方法的不足,是上述 2 种方法的有益补充。

以往的海绵细胞化学染色研究多集中于对常规细胞内含物(如 DNA、RNA、糖原、脂肪等)的检测^[15-16],此外也有关于海绵细胞酸性磷酸酶和酯酶的活性报道^[16]。然而相关资料表明,迄今为止尚未能对海绵中的某类细胞建立特异性的细胞化学染色标志。本研究首次运用 DAB 染色对小轴海绵中的活性产物储存细胞——小球细胞进行了标记,并确定了其相关的蛋白条带。对于该特征蛋白的深入研究,可建立小球细胞特异性的蛋白分子标记;并且,由于该类细胞是次生代谢产物的贮存场所,对此蛋白功能的进一步考察,也将为细胞次生代谢通路研究提供重要线索。

参考文献:

- [1] Bergmann W, Freney R J. Contributions to the study of marine product of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges[J]. I J Org Chem, 1951, 16: 981-987.
- [2] Blunt J W, Copp B R, Hu W P, et al. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2009, 26: 170-244.
- [3] Thompson J E, Barrow K D, Faulkner D J. Localization of two brominated metabolites, aethionin and homoethionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia thiona*)[J]. Acta Zool, 1983, 64: 199-210.
- [4] Richelle-Maurer E, De Kluijver M J, Feio S, et al. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*[J]. Biochem Syst Ecol, 2003, 31: 1073-1091.
- [5] 张浩, 靳艳, 张卫. 南海海绵 *Axinella* sp. 中两个含吡咯七元环内酰胺生物碱的分离鉴定[J]. 中药材, 2006, 29: 1299-1301.
- [6] Chipman S, Faulkner D J. Use of debromohymenialdisine and related compounds for treating osteoarthritis[P]. PCT/US1996/008822.
- [7] Meijer L, Thunnissen A-M W H, White A W, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hy-

- menialdisine, a marine sponge constituent[J]. Chem Biol, 2000, 7: 51–63.
- [8] Müller W E G, Böhm M, Batel R, et al. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*[J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1077–1081.
- [9] 刘稳. 植物过氧化物酶超家族的分子结构[J]. 生命科学, 2002, 14: 212–214.
- [10] Igamberdiev A U, Lea P J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms[J]. Phytochemistry, 2002, 60: 651–674.
- [11] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1990: 32.
- [12] Maldonado M. Intergenerational transmission of symbiotic bacteria in oviparous and viviparous demosponges, with emphasis on intracytoplasmically-compartmented bacterial types[J]. J Mar Bio Ass UK, 2007, 87: 1701–1713.
- [13] Strauven T A, Armstrong D, James G T, et al. Separation of leukocyte peroxidase isoenzymes by agarose-acrylamide disc electrophoresis[J]. Age, 1978, 1: 111–117.
- [14] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2000: 90.
- [15] Simpson T L. The biology of the marine sponge *Microciona prolifera* (Ellis and Solander) I. A study of cellular function and differentiation[J]. J Exp Zool, 1963, 154: 135–147.
- [16] Bergquist P R. Sponges[M]. London: Hutchinson, 1978: 56–61.

Marking spherulous cell in marine sponge *Axinella* sp. using a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining method

SONG Yuefan^{1,2}, QU Yi^{1,2}, ZHANG Jinyou^{1,2}, CAO Xupeng¹, ZHANG Wei^{1,3}

1. Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Flinders Centre for Marine Bioprocessing and Bioproducts, Flinders University, Adelaide SA5042, Australia

Abstract: Debromohymenialdisine (DBH) and hymenialdisine (HD) are two bioactive alkaloids which has been isolated from marine sponge *Axinella* sp. living in the South China Sea, and these two alkaloids are located particularly in spherulous cells in *Axinella* sp.. Establishment of a specific marker for this type of cells by cytochemical staining can provide an indication method for cell differentiation, and can be applied in the metabolism regulation in *in vitro* cell culture. The 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining is commonly used to detect peroxidase activity. In this study, sponge cells were fractionated and stained by DAB. A distinguishing feature of dark brown granules in cytoplasm was observed in spherulous cells. Native-PAGE was carried out with protein extracts from fresh tissue and different cell fractions of marine sponge to examine the peroxidase responsible for DAB staining. By transmission electron microscope (TEM), two kinds of inclusions were found inside the spherulous cells, the larger ones of which showed consistency in dimension and amount with the positive stained granules under light microscopy. In addition, this staining method for spherulous cell identification was also applied in *in vitro* cell culture (primmorph culture). The proportion of both granularly positive-stained cells and the spherulous cells synchronously varied during a 20-day culture period, and the ratio of positive-stained spherulous cells was kept above 93%. The above results suggested that the cytochemical method of DAB staining was reliable and could be applied in both fresh-tissue dissociation and *in vitro* cell culture, with the distinctive characteristic of positive stained granules in cytoplasm marking spherulous cells in sponge *Axinella* sp.. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 8–15]

Key words: marine sponge; spherulous cell; cell fractionation; 3,3'-diaminobenzidine (DAB); cytochemical staining

Corresponding author: ZHANG Wei. Tel/Fax: +86-411-84379069;

E-mail: weizhang@dicp.ac.cn, wei.zhang@flinders.edu.au