

## 技术与方法

# 冷冻超薄切片技术中明胶包埋在 实体组织样品中的应用

吴轶成 陈新宇 易静 杨洁\*

(上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025)

**摘要** 该文运用明胶包埋三种不同实体组织, 经过冷冻超薄切片技术获得超薄切片, 进行透射电子显微镜的观察。结果表明, 经明胶包埋后的三种组织块, 其超薄切片质量都得到了更好的保证, 切片平整且无破损; 透射电子显微镜下观察到的超微结构更加完整, 有效地保留了组织本身的结构信息。

**关键词** 免疫电镜技术; 冷冻超薄切片; 明胶; 生物组织; 透射电子显微镜

## The Application of Gelatin-embedding in Ultrathin Cryo-sectioning of Solid Tissues

Wu Yicheng, Chen Xinyu, Yi Jing, Yang Jie\*

(Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** Three different biological solid tissues are embedded in gelatin, then ultrathin cryo-sectioned and observed by transmission electron microscope (TEM). The results show that the embedded tissues are better than unembedded ones in the quality of ultrathin cryo-sections and the integrity of ultrastructures under TEM.

**Key words** immunoelectron microscopy; ultrathin cryo-sectioning; gelatin; biological tissue; transmission electron microscope

免疫电镜技术是细胞化学技术和电子显微镜技术相结合的一项新技术, 是在超微结构水平上定位组织细胞内生物大分子的细胞生物学技术。在免疫电镜技术中, 冷冻超薄切片技术是较为关键的技术, 其技术特点是生物组织无需经过脱水和包埋的过程, 直接冷冻, 在冷冻的状态下进行超薄切片, 然后进行免疫标记。该技术大大减少了对生物组织的化学处理, 避免了组织和细胞内生物大分子变性, 更好地保存了大部分可溶性成分及一些生物大分子的

活性, 亦避免了其发生移位, 对提高后续免疫胶体金标记的敏感性有着重要的意义<sup>[1-2]</sup>。

冷冻超薄切片技术中冷冻超薄切片的获得是其中最基本且最关键的一步, 切片的质量直接影响后续免疫标记及电镜观察。但由于冷冻超薄切片特殊的切片环境, 要获得一张良好的超薄切片比较困难。

一般情况下, 细胞和结构疏松的小块组织如肺、睾丸等, 需要经过明胶包埋, 以防止切片融化过程中细胞和疏松结构的分离, 而大部分实体组织的组织块可直接浸泡蔗糖后进行冷冻超薄切片<sup>[1-3]</sup>。但本实验发现, 一些非疏松结构的实体组织块, 如间隙较大、具有突起或有空腔的组织, 在切片后会产生间隙增大、突起断裂、空腔内结构撕裂脱落等现象。因此, 本实验利用明胶将这些实体组织进行包埋, 发

收稿日期: 2013-07-16 接受日期: 2013-08-26

\*通讯作者: Tel: 021-63846590-776480, E-mail: pollyyj@gmail.com

Received: July 16, 2013 Accepted: August 26, 2013-08-28

\*Corresponding author: Tel: +86-21-63846590-776480, E-mail: pollyyj@gmail.com

网络出版时间: 2013-08-29 14:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130829.1445.006.html>

现能更好地改善样品的切片性能, 切片质量得到了明显提高。本文对三种不同的实体组织样品在明胶包埋后, 电镜下所呈现的超微结构信息的保存情况进行了比较分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

EM FC7冷冻超薄切片机(莱卡公司, 德国); H-7650透射电子显微镜(日立公司, 日本); 明胶(Sigma公司, 德国); 蔗糖(润捷化学试剂有限公司, 上海); 甲醛(Merck公司, 德国); 戊二醛(国药集团化学试剂有限公司, 上海)。

### 1.2 方法

**1.2.1 生物组织样品制备** 本实验分别取小鼠的心脏、肾脏和肝脏的组织块作为实验样本, 用锋利的刀片将组织块修成 $1\text{ mm}^3$ 大小的若干块, 置于2%甲醛+0.1%戊二醛的混合固定液中, 固定1 h。

将心脏、肾脏和肝脏的组织块分别分为两组, 第一组组织块直接放入离心管中, 用 $2.3\text{ mol/L}$ 蔗糖溶液浸泡,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜。第二组组织块则用明胶包埋, 为使明胶更好地渗透进入组织块, 该过程依照浓度梯度进行: 2%, 5%, 10%, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 各个浓度分别浸透20 min, 并且伴有轻柔的摇晃<sup>[4]</sup>。待10%明胶溶液渗透完成后, 用吸管吸出组织块置于蜡块板上, 放入密封盒, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下使明胶固化, 固化后用锋利的刀片修去组织块周围多余的明胶, 最后将组织块放入 $2.3\text{ mol/L}$ 蔗糖溶液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜。

**1.2.2 冷冻超薄切片及观察** 将样品从 $2.3\text{ mol/L}$ 蔗糖溶液中取出, 放在冷冻超薄切片机的样品钉上, 立即置入 $-120\text{ }^\circ\text{C}$ 切片冷冻箱体内进行冷冻。完成冷冻后, 将已黏附好样品的样品钉固定到切片机的样品臂上, 进行半薄切片, 切片厚度为200 nm, 用捞片环沾取蔗糖溶液, 取出切片, 置于玻片上, 在光镜下检查并进行结构的定位。随后对样品进行修块, 再进行超薄切片, 获得65 nm左右厚度的超薄切片。同样用蔗糖溶液捞片, 将其压在铺Formavar膜的载网上。按上述冷冻超薄切片过程, 将两组样品的三种组织块分别进行冷冻超薄切片。经过清洗和醋酸双氧铀染色, 待切片自然干燥后置于透射电镜下进行观察。

### 1.3 统计学方法

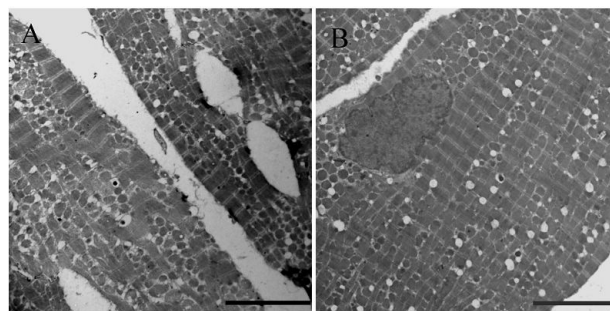
实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用Student's *t* 检验。

$P<0.0001$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠心肌的超微结构对比

电镜下见, 未进行明胶包埋的切片, 可以明显观察到组织变形, 心肌细胞间和心肌细胞内有较大的裂隙, 同时切片的边缘皱褶、卷曲。细胞内的肌



A: 未用明胶包埋; B: 明胶包埋; 标尺=10  $\mu\text{m}$ 。

A: without gelatin embedding; B: gelatin embedding; Bar=10  $\mu\text{m}$ 。

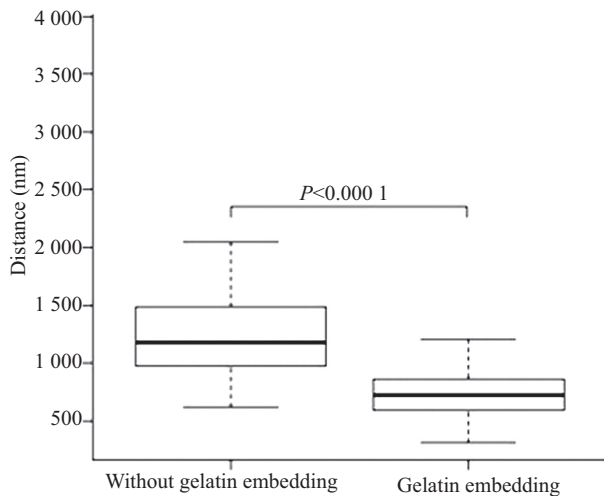
图1 透射电镜下小鼠心肌的超微结构

Fig.1 TEM image of mouse myocardium

原纤维排列松散, 肌丝断裂明显, 且线粒体排列紊乱, 线粒体之间的空隙明显增大(图1A)。而经过明胶包埋的心肌组织切片完整, 无褶皱和孔洞。心肌细胞排列规则, 胞质内的肌原纤维排列整齐, 横纹清晰, 线粒体间无明显间隙(图1B)。

为了半定量比较两组肌原纤维间的距离, 在远离心肌细胞细胞核的位置, 在相同倍数下, 随机各采集十张电镜照片。每张照片分五个区域, 每个区域随机选取并测量两个距离, 即两束肌原纤维之间只间隔单排线粒体的肌原纤维间的距离。从而得到两组, 每组各100个距离值。

将上述两组数据读入统计软件R中进行分析( $n=100$ ), 计量数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对两组之间差异显著性判别用Student's *t* 检验进行比较(图2)。在经过明胶包埋后的切片中, 其肌原纤维间的距离( $742.419\text{ }^\pm 222.642\text{ nm}$ ), 明显小于未用明胶包埋而直接切片的那组( $1\text{ }284.466\text{ }^\pm 460.086\text{ }^\pm 5\text{ nm}$ )。两组数据经过Student's *t* 检验后得到 $P<0.0001$ , 为差异有统计学意义。说明了明胶包埋后切片的心肌组织, 其肌原纤维基本保存了原来的状态, 并没有因为切片时的机械损伤作用而导致肌原纤维间产生距离的增大和结构的松散。

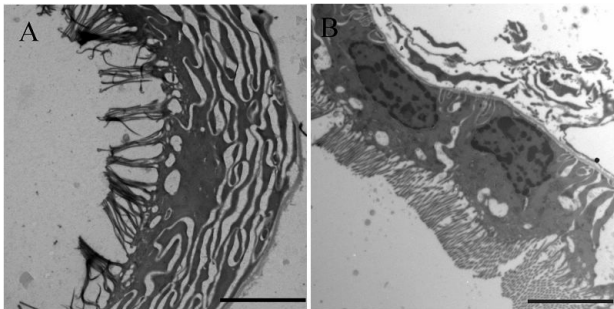


未用明胶包埋组:  $1\ 284.466\ 1 \pm 460.086\ 5\ \text{nm}$ ; 明胶包埋组:  $742.419\ 6 \pm 222.642\ 1\ \text{nm}$ 。  $P < 0.000\ 1$ ,  $n = 100$ 。

Without gelatin embedding group:  $1\ 284.466\ 1 \pm 460.086\ 5\ \text{nm}$ ; Gelatin embedding group:  $742.419\ 6 \pm 222.642\ 1\ \text{nm}$ 。  $P < 0.000\ 1$ ,  $n = 100$ 。

图2 未用明胶包埋组与明胶包埋组肌原纤维间的距离比较

Fig.2 Comparison of the distance between myofibrils in two groups

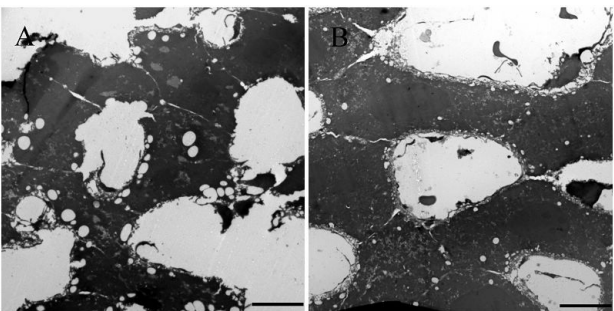


A: 未用明胶包埋; B: 明胶包埋; 标尺=5  $\mu\text{m}$ 。

A: without gelatin embedding; B: gelatin embedding; Bar=5  $\mu\text{m}$ 。

图3 透射电镜下小鼠肾脏(肾小管)的超微结构

Fig.3 TEM image of mouse kidney (kidney tubule)



A: 未用明胶包埋; B: 明胶包埋; 标尺=10  $\mu\text{m}$ 。

A: without gelatin embedding; B: gelatin embedding; Bar=10  $\mu\text{m}$ 。

图4 透射电镜下小鼠肝脏的超微结构

Fig.4 TEM image of mouse liver

## 2.2 小鼠肾脏的超微结构对比

电镜下观察, 未进行明胶包埋的切片中可以明显观察到一些较严重的皱褶, 组织拉伸变形明显, 尤其是微绒毛, 相互交错叠加, 甚至断裂缺失(图3A), 这些直接影响到该部位超微结构的观察。而经过明胶包埋的肾脏切片完整, 无褶皱和孔洞。超微结构保存完好, 肾小管上皮细胞排列规则, 肾小管管腔面的微绒毛整齐紧密排列, 无叠加、断裂(图3B)。

## 2.3 小鼠肝脏的超微结构对比

在未进行明胶包埋的切片中, 电镜下可明显观察到肝组织结构不完整, 肝细胞及肝血窦内皮细胞被撕脱, 结构破损严重, 部分内皮细胞位置改变, 毛细胆管内微绒毛结构不明显, 造成了部分超微结构细节的丢失(图4A)。在经过明胶包埋后的肝脏切片中, 切片完整, 无褶皱和孔洞。肝细胞及肝血窦内皮细胞结构完整, 腔内还保留了少量的红细胞。毛细胆管结构完整清晰, 能观察到毛细胆管的微绒毛突入管腔(图4B)。

## 3 结论

上述三种不同的非疏松结构的生物组织块在经过明胶包埋后, 其冷冻超薄切片的性能得到了明显的改善, 电镜下能更好地呈现出原有的超微结构。由此可见, 类似心肌细胞中的肌丝, 间隙较多的结构; 类似肾脏肾小管上皮, 具有突起的结构; 类似肝脏血窦, 有空隙的结构, 这些组织经明胶包埋后能很大程度上避免超微结构的分散, 甚至丢失, 从而保存了原有的结构, 特别是细胞的突起和易撕裂脱落的内皮细胞以及管腔中游离的结构, 对后续免疫胶体金标记和观察具有很重要的意义。本文的结果对更好地获得生物组织的冷冻超薄切片提供了一定的参考。

## 参考文献 (References)

- 1 Griffith JM, Posthuma G. A reliable and convenient method to store ultrathin thawed cryosections prior to immunolabeling. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(1): 57-62.
- 2 Webster P, Webster A. Cryosectioning fixed and cryoprotected biological material for immunocytochemistry. *Methods Mol Biol* 2007; 369: 257-89.
- 3 Stierhof YD, Donselaar EV, Schwarz H, Humbel MB. Cryofixation, freeze-substitution, rehydration and rokyasu cryosectioning. *Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy*. Florida: CRC Press, 2010, 339-59.
- 4 Peters PJ, Pierson J. Immunogold labeling of thawed cryosections. *Methods Cell Biol* 2008; 88: 131-49.