

- [2] 王美琪, 1983, 细胞生物学杂志, 5 (4): 14—17.
- [3] Goding, J. W. 1976, Conjugation of antibodies with fluorochromes; modifications to the standard methods. *J. Immunol Methods*. 13: 215—226.
- [4] 王美琪等, 1993, 细胞生物学杂志, 15(1): 39—41.
- [5] J. 库姆斯, D. O. 霍尔等主编, 1986, 科学出版社, 生物生产力 and 光合作用测定技术, 15.8: 205—206.
- [6] 叶济宇, 李德耀, 1985, 植物生理学实验手册, 4—6: 100—102.
- [7] M. C. Wang and I. R. Kennedy, 1988, *Aust. J. Biol. Sci.*, (41): 475—487.
- [8] Tetsuaki Osafune, Shuji Sumida, et al., 1990, Proceeding of the XIIth International Congress for Electron Microscopy, (Copyright 1990 by San Francisco Press, Inc., Box 6800.) 662—663.
- [9] 王美琪等, 1996, 电子显微学报, 15(5): 406.

## IMMUNOGOLD LOCALIZATION OF RUBPCASE IN EUGLENA GRACILIS CULTURED UNDER LIGHT AND DARK

WANG Mei Qi WANG Wei Jun GAO Xiao Yan  
(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

### ABSTRACT

By using Immunogold labelling Technology it is shown that the RuBPCase of Euglena and other alga cultured under light is concentrated in the pyrenoid. The location of RuBPCase is different from its location in higher plants. The RuBPCase in Euglena was also distributed in the Stroma of chloroplast. Such distribution was similar to its distribution in higher plants.

Euglena cultured under dark could not form thylakoid, No RuBPCase was found, without capacity of Photosynthesis. It was considered as heterotrophy.

**Key words:** (PA-Au) complexes Keyenzyme Euglena pyrenoid  
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase

### 经验交流

## 常规组织切片凋亡细胞原位末端标记方法

谭晓华 张亚历 姜泊 陈学清 李明松 周殿元  
(第一军医大学南方医院消化内科研究所 广州 510515)

细胞凋亡(Apoptosis)或称为程序化细胞死亡(Programmed cell death, PCD)是由内在基因调控的一种细胞死亡方式<sup>[1]</sup>。自Kerr等于1972年首先描述后,随分子生物学研究的深入,PCD已成为生物学、医学领域研究的热点。胚胎形成,组织发生,肿瘤的发生发展等生理、病理过程无不涉及细胞凋亡机制。原位末端标记法(In situ end-Labeling, ISEL)是检测凋亡细胞一种较特异而又敏感的手段<sup>[3]</sup>,国内实验室虽已有使用但尚无报道,本文成功

地建立了这一方法,经反复应用,证明具有敏感、直观、重复性好等优点。现报道如下。

### 材料与方 法

#### 一、试剂准备

1. 试剂 0.5%胃蛋白酶(Sigma),用HCl调至pH 2.0; biotin-dUTP和dNTP购自德国BM公司, Klenow大片段(promega公司)。辣根过氧化物酶标记生物素(HRP-Avidin)购自美国ZYMED。

2. 组织预处理液 (1)2×SSC(300 mmol/L氯化钠, 30 mmol/L柠檬酸钠, pH 7.0);(2) 内源酶

阻断剂: 1%  $H_2O_2$ -甲醇溶液。

3. 缓冲液(buffer A, pH 7.5): 含 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L  $MgCl_2$ , 10 mM  $\beta$ -巯基乙醇, 0.005% BSA。

4. 标记液 含 0.005 mmol/L dNTP(dATP, dCTP, dGTP), 0.005 mmol/L biotin-16-dUTP 和 25 U/ml Klenow 大片段。

5. DAB- $H_2O_2$  显色液 DAB (sigma) 用 0.1 mol/L Tris-Cl 配成 0.005%, 用前加  $H_2O_2$ , 终浓度为 0.001%。

## 二、标本制备

1. 大鼠脾淋巴细胞凋亡的诱导 200 g 左右的雄性 SD 大鼠禁食 24 h, 乙醚麻醉, 放线菌酮(3 mg/kg 体重)腹腔内注射 3 小时处死, 取脾脏, 石蜡包埋, 常规 HE 染色。

2. 人肝癌(7402 系)裸鼠移植瘤细胞凋亡的诱导: 将肝癌细胞皮下接种成瘤后, 用肝细胞特异的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)静脉注射, 一周后处死动物, 取肝脏, 常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 作 HE 染色。

## 三、方法

1. 切片常规脱蜡、梯度乙醇复水化。

2. 将切片组织浸入  $2 \times SSC$  液中,  $80^\circ C$ , 20 min, 然后蒸馏水冲尽。

3. 0.5% 胃蛋白酶(pH 2.0)  $37^\circ C$  消化 10 min, 蒸馏水洗尽。

4. 用滤纸试干 组织块周边液体放入湿盒组织切片上滴加 Buffer A 液, 5 min。

5. 弃去 Buffer A 液, 滴加标记液约 50  $\mu$ l,  $25^\circ C$  温育 1 小时。

6. PBS 漂洗两次, 各 3 min。

7. 内源酶阻断剂阻断 15 min。

8. PBS 洗两次, 各 3 min。

9. 滴加 HRP-avidin 复盖组织, 室温下 30 min。

10. PBS 洗两次, 各 3 min。

11. DAB- $H_2O_2$  显色约 5 min。

12. 流水冲洗后, 苏木素复染 1 分钟。常规脱水、透明、封片。

13. 阴性对照片在第 5 步改加不含 Klenow 的标记液, 余同。

## 结 果

用放线菌酮腹腔内注射和特异的细胞毒性 T 淋巴细胞静脉注射可分别在脾脏生发中心

(图版图 1)和肝癌裸鼠移植瘤(图版图 2)诱导局灶性的细胞凋亡, 常规组织切片 HE 染色可见, 凋亡细胞呈片状或散在分布, 以细胞核固缩、碎裂为特征, 与红染无结构的组织坏死不同。采用 Biotin-16-dUTP 对石蜡组织切片凋亡细胞内 DNA 断裂片段的末端进行标记, 凋亡细胞的核呈棕色或棕褐色着色(图版图 3 箭头所示), 细胞核形态呈碎点状, 不规整, 大小不一致。而正常非凋亡细胞和阴性对照片核被苏木素复染成蓝色, 核相对较大, 形态大小较为一致。

## 讨 论

原位末端标记是一种运用生化原理结合形态学特征对凋亡细胞进行检测的一种方法<sup>[2,3]</sup>。细胞凋亡时, 其核染色体被钙镁离子依赖的内源性核酸酶从核小体间断裂成 180—200 bp 的核苷酸链, 断链产生一粘性末端, 一条含有游离的 3'羟基末端, 另一条有伸出的 5'末端。利用 Klenow 大片段的 5'-3' 聚合酶活性, 可将外源掺入的带有生物素标记的游离核苷酸从 3'羟基末端起始经 5'-3' 方向连接在断端上, 通过带有辣根过氧化物酶的卵白素与之结合, 经 DAB 显色, 便可观察到细胞是否存在有核苷酸掺入的 DNA 断端。

研究凋亡的方法很多<sup>[4]</sup>, 形态学观察是判断细胞凋亡的基本方法。然而, 对发生在体内的凋亡细胞的识别, 有时并非易事。机体细胞发生凋亡, 其过程很短, 多在几小时内就完成, 由于周围无炎症反应很容易与核染色体浓缩的细胞等相混淆。通过原位末端标记, 很容易根据核苷酸的掺入发现形态上不典型的凋亡细胞, 由于该法能用于常规的石蜡包埋组织切片, 故很适于临床标本的回顾性调查研究。但在应用中应注意以下方面:

组织切片的预处理: 载玻片清洁好后, 涂薄层防脱片胶以防脱片。组织切片用  $2 \times SSC$  加热  $80^\circ C$  保温 20 分钟是必要的, 这有助于增强胃蛋白酶消化的均一性。使用内源酶阻断剂可消除由内源性过氧化物酶引起的非特异性染

色, 我们使用 1% $H_2O_2$ -甲醇液阻断 15 分钟即可达到目的。

胃蛋白酶的消化: 胃蛋白酶消化的好坏, 直接关系到染色的效果。消化时间太长, 非特异性染色增多, 也使一些非凋亡细胞着色, 同时将破坏细胞形态, 细胞复染时着色浅, 背景也不清晰。而消化时间太短, 细胞膜达不到应有的通透性, 影响标记效果。对于一般切片, 以用 0.5% 胃蛋白酶 (pH 2.0) 在 37℃ 消化 10—30 分钟为宜。

各种核苷酸以及 Klenow 片段的浓度: 建议使用浓度为 0.005 mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP 及 biotin-16-dUTP。Klenow 片段的浓度以 20—30 U/ml 为宜。

### 摘 要

凋亡是有别于组织坏死的一种细胞死亡方

式, 多与基因调控的编程性死亡有关。准确地判断细胞凋亡对探讨程序化细胞死亡诱发机制具有重要意义。本文采用 Biotin-16-dUTP 对凋亡细胞内 DNA 断裂片段的末端进行标记, 可原位检测常规组织切片上的凋亡细胞, 方法具有敏感、直观、重复性好等优点。

关键词: 原位末端标记法 细胞凋亡

### 参 考 文 献

- [1] Kerr, J. F. et al., 1972, *Br J Cancer.*, 26: 293—257.
- [2] Wijsman, J. H. et al., 1993, *J Histochem Cytochem.*, 41: 7—12.
- [3] Ansari, B. et al., 1993, *J Pathol.*, 170: 1—8.
- [4] 张亚历, 姜泊., 1995, *细胞生物学杂志*, 17: 127.

(下转封二)

细胞生物学杂志 1997 年第 19 卷第 1 期  
国内统一刊号: CN 31—1478/Q

编 辑 细胞生物学杂志编辑委员会  
上海岳阳路 320 号 (200031)  
主 编 左嘉客  
出 版 上海科学技术出版社  
发 行 上海市报刊发行局  
订 阅 全国各地邮局  
印 刷 中国科学院上海分院印刷所

ISSN 0253-9977



刊号 4-296 1997 年 3 月 定价: 4.50 元