

AgS法对兔肾和肝脏的四种磷酸酶进行了光镜定位,并对这三种钡法进行了比较。Ce-DAB法反应较强,Ce-Pb-AgS法次之,Ce-Pb法反应较弱。但用这三种方法在光镜下均可清晰地显示这4种磷酸酶的活性,从而使钡法可同时应用于电镜和光镜下的磷酸酶的活性定位。

图版说明

4种磷酸酶的3种钡法光镜定位的比较

1. 兔肾 AKP Ce-DAB法×132
2. 兔肾 5'-Nase Ce-DAB法×132
3. 兔肝 AKP Ce-DAB法×132
4. 兔肝 AcP Ce-pb-Ags法×264
5. 兔肝 AKP Ce-Pb法×132
6. 兔肾 TPPase Ce-Pb法×132

参考文献

- [1] 汤雪明, 1989, 细胞生物学杂志, 11(1):

39—41.

- [2] Robinson, JM. and Karnovsky MJ., 1983, *J. Histochem. Cytochem*, 31(10):1190.
- [3] Hoefsmit, ECM., et al., 1986, *Histochem*, 84:329,
- [4] Kobayashi, T., et al., 1987, *J. Histochem. Cytochem*, 35(5):601.
- [5] Reynolds, E. S., 1963, *J. Cell Biol*, 17: 208—212.
- [6] Goor, H. V., et al., 1989 *J. Histochem. Cytochem*, 37(3):399—403.
- [7] Zimmermann, N. and Halhuber, K. J., 1985, *Acta histochem*, 76:97—104.
- [8] Halhuber, K. J., et al., 1985, *Acta Histochem*, 77:67—73.
- [9] Halhuber, K. J., et al., 1985, *Acta Histochem*, 77:143—149.
- [10] Augermüller, S., and Fahimi, H. D., 1988, *J. Histochem. Cytochem*, 36(1): 28—28.

植物组织中光合产物的放射自显影定位 ——冷冻取代树脂包埋法

肖永琦 高金方

王丽霞 毕庶春 国际翔

(吉林省农业科学院原子能利用研究所、公主岭) (中国科学院沈阳应用生态研究所)

关于植物组织中可溶性物质的放射自显影,我们曾用冰冻切片乳胶干装法,取得了¹⁴C标记的光合产物在人参、大豆输导组织中定位的自显影片^[1],但是,该方法具有标本与乳胶不能紧密接触和防止标本脱落的困难。虽然可以克服,但操作的精细程度直接影响实验的成败与质量。应用冷冻取代、树脂包埋和液体乳胶法,可以避免这方面的问题。

材料和方法

一、仪器设备

Jeal-JuM-7型超薄切片机、生物显微镜、照相机、液体二氧化碳、广口冰瓶、GMA、Epon 812包埋剂,核4型乳胶,无水丙酮等试剂。

二、材料及标记处理方法

盆栽3年生人参植株,用含¹⁴C₂ 400 PPM(V/

V),比放射性为0.137 μci/ml的CO₂标记空气(用FGC-2型¹⁴C植物光合测定仪配制^[2]),于室外气温为19.5℃,光强为3万LX条件下,对人参植株一片掌状复叶,曝光两次(间隔一个半小时),每次15分钟。标记后3.5小时取样。分别按标记叶脉、叶柄、茎或侧根取样,迅速切割为小于2mm的小块样本,液氮速冻或直接放入干冰冷冻的无水丙酮中速冻,并继续进行冷冻取代。

三、冷冻取代

化学纯丙酮,经加入无水硫酸钠或分子筛等干燥剂,反复脱水并蒸馏后,密封保存,供做取代液用。

冷冻取代:采用简易的广口冰瓶和干冰法,以代替昂贵的超低温(-80℃)冰箱。取一大型广口冰瓶,将高压钢瓶中液态二氧化碳放入布袋中使成干冰。干冰直接加入冰瓶中至满,或冰瓶中先加一定量酒精,再加入干冰调至-72℃^[3],取带胶塞试管(7×1.8mm),每管迅速装入约20ml无水丙酮作取代液

(称取代管), 立即密封, 埋入干冰中进行预冷。把已预先速冻的植物组织块在低温干燥条件下迅速转入取代管的丙酮中, 或将小块材料直接快速倒入已预冷的丙酮取代液中, 立即密闭。取代管埋入干冰中进行冷冻取代, 将冰瓶置普通冰箱(2℃)低温保存。每天向冰瓶中补充2-3次干冰, 以保证稳定的低温。20 ml 取代液中, 浸入约0.2—0.3cm³的材料块。可不更换取代液, 持续一周以上, 一次性完成取代脱水。

取代结束: 把取代管胶塞提至干冰面上, 使其在空气中升温, 待胶塞能插入针头时, 用一冷冻空针管吸出取代管中含水丙酮, 用另一冷冻针管再注入已预冷的无水丙酮。取代管仍放回干冰瓶中, 冰瓶不再继续加干冰, 让其自然升温至室温, 为取代结束。此材料块可直接用脱水树脂浸透、包埋。

四、浸透与包埋聚合^[4,5]

取GMA塑料及环氧树脂812包埋剂包埋: 1. GMA包埋剂配方: GMA(甲基丙烯酸乙二醇酯)单体7份, 甲基丙烯酸丁酯3份(经脱氢醌处理), 过氧化苯甲酰1.2%。2. 预聚合: 为防止包埋剂聚合时收缩对材料损伤、先制成半聚合态。按配方配成的混合液, 装三角瓶中, 在沸水浴中不断地搅拌, 至刚沸腾, 放入冰水浴中搅拌冷却。反复数次, 使成糖浆状带粘稠的半聚合液, 密闭, 置冰箱4℃贮存备用。3. 浸透: 在冰箱密闭条件下, 材料块依次在: GMA(半聚合液, 下同): 无水丙酮为1:1, 2:1和纯GMA包埋剂中, 置4℃冰箱, 分别浸透12, 12-24, 24-32小时。4. 聚合与包埋: 将干燥药用胶囊顶部压平, 灌入GMA半聚合液, 移入浸透过的材料块, 定向包埋, 灌满胶囊, 盖上上盖, 排除空气置4℃冰箱中继续浸透12小时以上, 放置于自制低温紫外照射聚合装置的样品框中如图。样品框距紫外灯18-20厘米处, 照射聚合15-24小时以上, 直至固化。

Epon 812 环氧树脂对照包埋、材料块由丙酮中移入Epon 812包埋剂, 干燥条件下, 常规包埋。

五、切片

经修块后, 用日本Jeol-JuM7型超薄切片机玻璃刀进行半薄切片, 厚度1—2μ, 切片用不锈钢环捞取, 铺展于预先涂有明胶的载片水滴上, 用滤纸吸去多余的水分, 用45℃蒸发板展平晾干。

六、自显影

1. 涂敷乳胶: 暗室红灯下, -40℃恒温水浴溶化核4型乳胶, 稀释1倍, 用滴管于载片一端滴一滴乳胶, 细玻璃棒均匀向外一次展平, 于80%湿度下晾干。

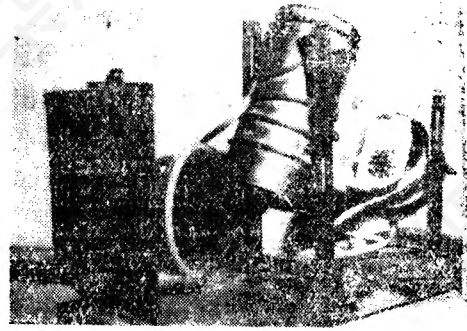


图 自制低温紫外照射聚合装置

图左为稳压器, 中为紫外灯、外套上冷循环管, 右为样品框。

装干燥暗盒, 于4℃冰箱中曝光。

2. 显影加工: 用实验曝光法, 对平行的实验材料, 按等比级数, 定时间间隔, 显影观察以确定适宜的曝光时间。经多次显影、定影观察后, 本实验光合¹⁴CO₂标记人参材料, 曝光40日开始显影、曝光至56天, 达到充分显影时曝光结束。于暗室红灯下, 用D19显影液显影7分钟, 蒸馏水停影半分钟, Ansco 201定影液定影20分钟, 流水冲洗20分钟, 蒸馏水冲洗后晾干。

结果与讨论

冷冻取代后, 按上述操作手续, 用GMA和Epon812环氧树脂包埋制片, 自显影结果, 获得了由¹⁴CO₂标记人参叶片输出的光合产物, 在人参叶柄、茎(图版图1, 2)中分布的自显影片, 它们都是定位在韧皮组织中, 和早已被证明的韧皮部运输光合产物^[6]相符。说明本方法是可行的。

这里, 采用液体乳胶法, 避免了干装乳胶法带来的标本与乳胶接触不紧密, 无法曝光和标本脱落的问题。树脂包埋还可以作超薄切片、供电镜用。

有人顾虑切片时, 材料切片在玻璃刀水槽中迁水, 和施用液体乳胶, 会造成放射性损失。建议采用干切并覆盖干乳胶膜的方法^[7]。但Fisher已研究证明, 丙酮取代、树脂包埋可保持光合作用标记大豆叶片(及柄)中80%(v/v)乙醇浸出¹⁴C放射性的99%, 切片展在50—

60℃水滴上,也能保持最大部分的¹⁴C蔗糖,认为无须干法即可制备高分辨的自显影象^[8]。我们用以取代脱水的丙酮液中,没有查出可测知的放射性。从自显影片银粒集中分布在输导组织看,证明这个方法,至少在显微水平上是有效可行的。

包埋剂GMA在40—60℃高温聚合时,速度快、收缩强烈,易产生气泡和造成材料收缩损伤(图版图4,5)导致实验失败。采用浸透前包埋剂预聚合,聚合前于冰箱4℃继续浸透12小时以上,低温(12℃)紫外光照射聚合,可以消除气泡和收缩损伤。

为解决溶性物质放射自显影技术的困难,与其他方法相比较,本文所用方法的优点:
1. 方法简便,不需超低温冰箱,用广口冰瓶内加干冰即可替代。2. 克服了标本与干乳胶不能紧密接触曝光的困难。3. 克服标本切片易脱落的问题。

摘 要

本文采用以简易的广口冰瓶内加干冰作冷冻剂,以替代超低温(-80℃)冰箱。用以冷冻无水丙酮作取代液,对植物材料进行冷冻取代脱水,固定。经无水GMA预聚合后浸透、包埋、低温紫外线照射聚合,半薄切片、制片和涂敷核型乳胶,曝光后显、定影等操作。为

经验交流

用过氧化氢酶电镜细胞化学技术显示 人肝细胞的过氧化物酶小体

陆珍凤 郑晓刚 周晓军
(南京军区总医院超微病理科)

人肝细胞的过氧化物酶小体(Peroxisome)的电镜细胞化学技术研究,国内尚未见报道。本实验参照有关文献^[1,2],采用人肝组织进行细胞化学反应。结果表明,过氧化氢酶细胞化

植物体中溶性物质(包括引进外源溶性物质)放射自显影定位、定向研究、提供技术方法。

图 版 说 明

用0.137 μCi/ml ¹⁴C₂ 光合标记人参叶柄组织,冷冻取代,GMA、环氧树脂Epon 812包埋,切片厚1—2 μ,曝光56天人参叶柄维管束光合产物自显影片,放大380倍。

1. GMA包埋,人参叶柄维管束细胞内箭头所示自显影银粒。
2. Epon 812包埋,人参叶柄维管束细胞内箭头所示自显影银粒。
3. 未经标记的对照人参叶柄维管束细胞内无自显影银粒。
4. GMA包埋60℃热聚合出现气泡。
5. GMA包埋热聚合出现根组织损伤。

参 考 文 献

- [1] 肖永璐、高金方,1987,植物生理通讯,4:66—68。
- [2] 冯春生等,1987,核农学报,2:105—111。
- [3] 顾庆超等,1979,《化学用表》,8:54。
- [4] 朱丽霞等,1983,《生物学中电子显微技术》,26—33。
- [5] 徐是雄,1981,《植物材料的薄切片超薄切片技术》,p. 39。
- [6] Peel A. J., 1974, Transport of Nutrients in plants pp. 27—34. Butterworth Ltd. London.
- [7] 水平敏知,1978,オートラシノ“オク”ラフン医薬出版社,187—189。
- [8] Fisher and Housley, 1972, Plant Physiol., 49:166—171。

学反应的效果与戊二醛、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、过氧化氢(H₂O₂)、温度及时间5个因素有关。