

保存胚胎材料中荧光染料的方法

蒋婉素

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从 1978 年 Stewart 应用了荧光染料 Lucifer Yellow CH, VS 等以来^[1],它在生物学和医学的各个领域中正在日益广泛地被应用。其优点是:灵敏度高、无毒性、在活细胞中能迅速地从一细胞转运到另一细胞;并可以检测细胞连接功能状态^[2-6]。但是,在荧光显微镜下观察两栖类整胚,荧光染料的传递,一般只能从表面观察,里面就无法看清。为了同时检查内外细胞层间的荧光染料传递情况,最近,在荷兰国际胚胎研究所 Hubrecht 实验室进修期间采用了该实验室常用的一套较实用,又能长期保存荧光的方法,使用于两栖类胚胎细胞取得了较理想的结果。本文仅就此作一简单的介绍。

材料和方法

Xenopus laevis 作为实验动物。用 2%L-半胱氨酸盐酸盐(pH 7.8)去除胶膜,用游丝镊子去除卵黄膜。按照 Nieuwkoop 发育分期表^[7],取 10 期胚胎,用离子电泳法注射荧光染料 Lucifer yellow CH (分子量为 457.2)^[8]。注射部位是动物半球中央的细胞。每个胚胎只注射一个细胞,注射后 30 分钟至 1 小时进行固定、脱水,包埋等。现按顺序简述如下:

一、固定 用对胚胎细胞和荧光保存都较好的多聚甲醛液(配制方法见下)固定。固定 24 小时,换至正常两栖类溶液。然后用玻璃针把动物半球割下,用两栖类盐溶液洗涤外植块数次,换入脱水剂。

固定液的配法如下:将 2.5 克多聚甲醛粉末加入 50 毫升两栖类生理盐溶液,加热至 60—65℃(在通风橱中操作),用玻璃棒搅拌,此时溶液成浑浊,然后加入几滴 1 mol/L NaOH 继续搅拌,直至溶液澄清,冷却后加重蒸水至 100 毫升,按照两栖类溶液的 pH 调节,贮存在 4℃冰箱中备用^[9]。

二、脱水 为了保证包埋介质完全渗入细胞内部,必须事先使胚胎细胞脱水完全,用一种快速酸化

脱水剂 2,2-二甲基丙烷 [(2,2-Dimethylpropan (DMP 进行脱水)^[10]。脱水 1 小时,更换一次即可。它的优点是免除更换各级酒精或丙酮的操作,缩短脱水时间,使用方便。

酸化 DMP 配法:100 毫升 DMP 加一滴浓 HCl。

三、浸透、包埋与聚合 用一种 Spurr 的低粘度环氧树脂(有成套药盒进行包埋,操作步骤详见 Spurr 电镜包埋法^[11]整修包埋头后,作 1μm 的连续厚切片。每切二、三片后就用小白金丝圈捞片,依次序排于滴有水滴的载片上。为了使切片贴在玻片上,载玻片预先涂以白明胶。烘干水滴后,用 Elvanol 封固剂封片。用 Opton 标准荧光相差显微镜观察、拍摄记录。

白明胶处理载玻片的方法:0.5 克白明胶溶于 100 毫升双重蒸馏水,沸腾后保持热把载片浸入,立即取出凉干备用。

结果与讨论

我们共注射了 39 个第 10 期的爪蟾胚胎,偶合的有 16 例,14 例未偶合,2 例不清楚,7 例荧光来自下层。我们分别选了未偶合单个细胞的 4 例,偶合的二个细胞的 3 例和来自下层的 7 例进行切片观察。图 1 示一个注射后未偶合的细胞,荧光染料限于注射细胞,细胞核荧光强于细胞质。图 2 是两个有荧光的细胞,左边荧光强的是注射细胞,由于荧光太强,核与细胞质分不清。当荧光染料从注射细胞传递到相邻细胞以后,右边细胞也能看到荧光,虽然荧光强度比注射细胞的弱,但细胞核与细胞质一目了然。图 3 示活体观察时只见荧光来自下面,切片后清楚地看到内层细胞有荧光。总之,经过上述方法,既能看清表面细胞的荧光,又能看清里面细胞的荧光。如果用荧光显微镜拍照时,同时使用相差,那么,就会得到

* 本文承曾弥白教授审阅,深表感谢。

更理想的照片。图2就是在这样条件下拍摄的。既能看到荧光所在位置，又可观察到清晰的细胞结构。

通常，荧光染料注射胚胎后，荧光不能长时间保存。用上述方法做成的切片，荧光强度不会减弱与熄灭。与染苏术精、伊红片子一样可以长期保存。更重要的是，应用这一方法，能明确地判断荧光染料在细胞之间与细胞层之间的传递情况。因此，我们认为该技术对于用荧光染料追踪细胞间与细胞层间的传递是十分有用的。

摘要

本文介绍了保存胚胎材料中荧光染料的技术，给两栖类胚胎注射荧光染料后，应用所介绍的方法制备切片，既能保存荧光又能正确判断染料在各层细胞之间的传递情况。

参考文献

[1] Stewart. W. W. 1978, *Cell* 14, 741-759.

- [2] Stewart. W. W., 1981, *Nature.*, 292, 17-21.
- [3] Lo. C. W. & Gilula. N. B., 1979, *Cell.*, 18, 399-409.
- [4] Slack. C. & Palmer. J. P., 1969. *Exp. Cell Res.* 55, 416-419.
- [5] Sarah. C. Guthrie. 1984, *Nature.*, 311, 149-151.
- [6] Laat. S. W. de. et al., 1980, *Nature.*, 287 546-548.
- [7] Nieuwkoop P. D. and Faber J., 1975, "Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin)" 2nd ed., 1st reprint North-Holland, Amsterdam.
- [8] K. Sugimoto, et al., 1982, *Wilhelm Roux's Archives* 191: 143-148.
- [9] Audrey M. Glauert, 1975, Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens part I. "Practical Methods in Electron Microscopy."
- [10] Muller L. L. & Jacks T. J., 1975, *J. Histo. and Cytochem.* 23: 107-110.
- [11] Arthur R. Spurr. 1969, *J. Ultrastruct Res.* 26, 31-43.

用准饱和 CO₂ 干燥法制备两种肿瘤细胞的扫描电镜试样

戴志强 俞月桂 袁辛菊

(中国科学院上海药物研究所)

临界点干燥(Critical point drying, CPD)是目前公认的制备医学、生物学等含水材料扫描电镜试样较为理想的干燥方法。然而，即使是最严谨的操作，经 CPD 干燥的样品仍有明显的皱缩现象。收缩率从 13% - 49% 不等^[1,2]。深入研究表明，其收缩过程可分为四个阶段：a) 置换阶段(20℃ 左右)；b) 升温阶段(最终超过 30℃)；c) 降压阶段；d) 回复到大气压阶段。收缩程度依次为 a > c > b > d^[3]。为了避免升温、升压产生的收缩效应，我们参照 Boyde 的工作，建立了准饱和 CO₂ 干燥法(Quasi-saturated CO₂ drying, QSCD)，以此法制备两种肿瘤细胞的扫描电镜试样，镜下观察

瘤细胞的表面结构图象丝毫不亚于 CPD 法，且收缩率亦较 CPD 法减小。现介绍如下：

材料和 方法

实验所用 SGC-7901 人体胃癌细胞株^[4]及 HAC 小鼠腹水型肝癌^[5]均系我所肿瘤细胞药理组提供。前者已经培养贴壁生长在盖玻片上，后者抽取荷瘤鼠腹水后离心去掉血性成份。两种瘤细胞试样均用二甲酸钠缓冲的 2.5% 戊二醛前固定；1% 锇酸后固定；无水乙醇从 30% 递增浓度脱水，至 100% 无水乙醇时，试样一分为二，分别经醋酸异戊酯置换后作 CPD 及 QSCD。CPD 操作如常规。QSCD 亦在 HCP-II 型临界点干燥器上进行。操作顺序如下：样品室充分预冷至 -10℃ 左右，随即放进试样，缓慢注入液体 CO₂，CO₂ 压力