

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 CO<sub>2</sub> 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<sup>[1,2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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CO<sub>2</sub>干燥法(Quasi-saturated CO<sub>2</sub> 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<sup>[4]</sup>及HAC小鼠腹水型肝癌<sup>[5]</sup>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CO<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub>压力

在 50 大气压以上。当液面不再升高时,打开放气小阀,流量控制最小刻度,边放边进  $\text{CO}_2$ ,持续 3—5 分钟。 $\text{CO}_2$  的最后注入量约在 80—90% 之间。如  $\text{CO}_2$  充溢到视窗玻璃,可放掉一些。关闭进、放气阀后,样品室升温至  $18^\circ\text{C}$ ,停留 5 分钟后,即可缓慢放气。总放气时间控制在 1 小时以上。当  $\text{CO}_2$  液面下降接近放试样的不锈钢盒时,放气速率控制最小,直至样品室压力下降到正常大气压。在室温下取出试样后,立即进 IB-3 离子溅射仪镀金,最后用 Sigma-1 扫描电镜观察摄片。上述实验重复三次。

## 结果与讨论

一、SGC-7901 经 QSCD 后作 SEM 观察(图1):瘤细胞大多为多边形上皮样细胞,亦见有梭形、圆形细胞,以及正处于分裂的哑铃状细胞。细胞伪足舒展,微绒毛细长,且较为丰富。几个细胞的伪足常相互连接。细胞形态与 CPD 对照组(图2)相似,但前者表面细微结构似较丰富。

二、HAC 经 QSCD 后作 SEM 观察(图3):瘤细胞大多呈球形,直径  $10\ \mu\text{m}$  左右,比较均匀。细胞表面微绒毛纤细,姿态不一;微绒毛分布较均匀,局部较稀疏。有时可见细胞间的微绒毛粘连以及纤维蛋白索。瘤细胞的形貌与 CPD 对照组无明显差异(图4)。随机取样,并在相同观察、摄片条件下分别测算经 QSCD 及 CPD 处理的近 300 个 HAC 细胞,前者平均直径为  $9.8 \pm 1.3\ \mu\text{m}$ , ( $n=222$ ); 后者平均直径为  $8.9 \pm 1.1\ \mu\text{m}$ , ( $n=304$ ); 统计学处理有极显著差异( $p < 0.001$ )。在重复实验中,再次测试比较仍显示经 CPD 处理的 HAC 细胞收缩较严重,但两者的差异小于 Boyde 报道的数值<sup>[3]</sup>。经 CPD 处理的试样,有人认为是全体平均的收缩<sup>[1]</sup>,对于超微结构定性观察无太大的影响。但作定量测算时,就难免有较大的误差,显然不如经 QSCD 处理的试样更接近实际尺寸。

三、在 CPD 过程中,随着处于临界态的  $\text{CO}_2$  外逸,压力从 100 大气压左右逐渐降低。而在 QSCD 过程,当样品室放气时,压力一直维持在 65 大气压附近,样品室的气相处于动

态饱和状态。这种状态是以  $\text{CO}_2$  气体缓慢排放,液体  $\text{CO}_2$  不断气化而维持。因此相对液相而言,气相实际上是处于一种接近饱和而没有饱和的准饱和状态。只是在放气阶段的最后几分钟(此时试样已经干燥),压力才急速下降到正常大气压。不难判断,试样是在准饱和  $\text{CO}_2$  气压条件下干燥。此种状态下的  $\text{CO}_2$  气相分子密度接近其最大值。在气液界面上,有足够多的气相分子位于液相表面层分子的分子力有效力程内,以至气、液分子间的作用已不能忽略不计,其结果是液相表面层分子间距缩小(但仍比液体内部分子稀疏),与表层分子间距正相关的表面张力也随之减小。由于液体  $\text{CO}_2$  的表面张力在  $20^\circ\text{C}$  时为  $1.18\ \text{dyn/cm}$ , 仅是水的  $1/60$ , 处于准饱和  $\text{CO}_2$  气压条件下的表面张力又比  $1.18\ \text{dyn/cm}$  更小一些,因此对试样形貌的影响是比较微弱的。QSCD 过程避免了 CPD 过程导致试样严重收缩的 b、c 2 个阶段以及 a 阶段的部分过程,因而试样收缩较 CPD 小;至于 QSCD 过程存在的微弱表面张力对试样的影响并不显示大于 CPD 因收缩所受的影响,所以最后获得的图象质量与 CPD 不相上下,甚至更好一点。

四、Boyde 曾用 QSCD 法制备体积较大的小鼠胚胎前肢扫描电镜试样效果良好<sup>[3]</sup>。理论上此方法适用于一般生物材料。对于体积小于  $1\ \text{mm}^3$  的生物试样。由于体积小,回定、脱水、置换充分, QSCD 法优点更突出。QSCD 法操作顺序简单;一次可以干燥较多试样;由于升温不超过  $20^\circ\text{C}$ , 样品室最终压力不到 70 大气压,较 CPD 更为安全。由于 QSCD 法是针对 CPD 法的不足由 CPD 法演变而成,而且是在临界点干燥器上进行干燥,所以 Boyde 称此法为“非完全临界点干燥”(Not quite critical point drying)。事实上并不能将此法视为 CPD 的任何一种类型, Boyde 亦认为“非完全”的说法并不确切。因此,我们对其工作原理进行了初步分析,认为称之“准饱和  $\text{CO}_2$  干燥法”可能比较正确。这是一种具有推广价值的扫描电镜试样

制作新方法。

### 摘要

采用准饱和 CO<sub>2</sub> 干燥法 (QSCD) 制备 SGC-7901 人体胃癌细胞株贴壁细胞和 HAC 小鼠腹水型肝癌游离细胞的扫描电镜试样, 结果显示, 细胞形貌与临界点干燥 (CPD) 对照组无明显差异, 但收缩率较后者减小。QSCD 法突破了传统的无表面张力干燥条件, 操作顺序简单, 一次可干燥较多试样; 样品室压力不超过 70 大气压, 较 CPD 法安全。

### 参考文献

- [1] 田中敬一等, 1984, 图解扫描电子显微生物样品制备, pp 94. 科学出版社, 北京。
- [2] Boyde, A. and C. Wood., 1969, J. Microsc., 90: 221-249.
- [3] Boyde, A. and E. Maconnachie., 1983, In The Science of Biological Specimen Preparation for Microscopy and Microanalysis, ed. by Revel, J. P. et al., pp 71-75 SEM Inc, Chicago.
- [4] 林超鸿等, 1981, 肿瘤, 1: 1-3。
- [5] 膏彬等, 1975, 科学通报, 20: 242。

## 我国细胞生物学教学中值得探讨的问题

近十年来, 我国综合性大学, 师范、农林与医学院校普遍开设了细胞生物学课程。经过广大任课教师的努力, 已取得了一定的成绩, 也积累了一些经验。但是, 在教学中也存在一些值得探讨和应该解决的问题。我们利用在西安举办的全国细胞生物学新进展讲授班的机会, 邀请了部分任课教师进行了认真的讨论和分析, 现提出一些看法, 也热切希望全国关心细胞生物学教学的同志一起来讨论这些问题, 以使我国的细胞生物学教学跟上这一学科迅速发展的步伐。

### 1. 关于细胞生物学教学在生物学教学中的地位问题

细胞生物学是 70 年代独立出来的一门新兴学科。它是一门在细胞水平、亚细胞水平和分子水平上研究细胞生命活动规律的科学, 由于细胞是生命活动的基本结构和功能单位, 因此它在生命科学中的地位显得十分重要。它既是生物学的基础, 又是现代生物科学发展中的重要组成部分。细胞生物学在我国已成为综合性大学生物学系的骨干课程, 在美国很多大学设立细胞生物学系也充分说明了这一点。由于它是在超显微形态学与分子生物学相结合的基础上发展起来的, 因此它与生物化学、分子生物学、遗传学、生理学等学科关系十分密切, 许多研究方法也来源于这些学科, 有些内容似乎与它们有相似之处, 因此有的高校对它的教学重视不够, 往往成了课时压缩、必修课改为选修课的对象。细胞生物学作为一门新兴的学科是有它自己的学科体系的。以细胞为对象来讲授生命活动的

规律, 使细胞生物学在个体生物学 (如动物学、植物学、微生物学等) 与分子生物学 (也包括生物化学、分子遗传学等) 之间起着承上启下的作用。因此, 将生命科学在试管中研究的内容, 从细胞整体的角度来介绍给学生, 无论从生命活动规律的掌握上, 还是科学思维方法的培养上, 都是其它学科教学难以代替的。因此, 我们认为细胞生物学在生物学教学中有着它的特别重要性, 必须加强, 而不能削弱。

### 2. 关于细胞生物学教学内容与其它学科教学内容重复的问题

由于细胞生物学与其它生物学科的相互交叉和渗透, 它的教学又是在许多学科教学的基础上进行的, 因此在某些章节中往往不可避免地会遇到某些教学内容重复的问题。我们认为, 部分教学内容的某些重复是客观存在的, 问题是如何处理, 如何讲授。要处理好这个问题, 首先是这些内容不能象其它学科一样地讲, 如果细胞生物学象其它学科一样地讲, 就会造成不必要的重复, 而且还不如其它学科讲得好, 二是细胞生物学有自己的学科体系 and 特点及知识侧面, 要充分发挥自己学科的优势和特点。用动态的而不是静止的, 整体的而不是孤立的, 统一的而不是割裂的观点去认识并阐述细胞内错综复杂的生命活动规律, 那末即使与其它学科有某些重复性的内容也不是简单的重复和再现, 而是知识的深化和上升。我们相信, 随着细胞生物学本身的发展, 教学体系的完善, 教材内容的更新和教学方法的改进, 教学内容的重复问题是会