

全胚细胞 (REF), BGC-ras^H 单独转染 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞分别获得两个恶性转化细胞系 REF₄₋₃ 和 BGC 3T3。其中 REF₄₋₃ 由一早代成纤维样细胞转化成为上皮样的、染色体高度异倍体化并可稳定传代的细胞。两种转化细胞均可接种裸鼠致瘤, 成为二个用癌基因转化建立的细胞系。

图版说明

图1 BGC-ras^H 和 pSV-myc 共转染 REF 的转化灶。图为转化灶和未转化背景细胞的交界处。负相差 100×。

图2 转染前的 REF 细胞。负相差 200×。

图3 转化后 REF₄₋₃ 细胞。负相差 200×。

图4 REF₄₋₃ 转化细胞接种裸小鼠。八周时生长的皮下肿瘤直径约达 4 cm。

图5 转化细胞 REF₄₋₃ 透射电镜图像, 10000×。图中可见细胞核大, 形状不规则, 核仁大而清晰, 胞质少。箭头所示为细胞界限。

参 考 文 献

- [1] 吕有勇等。1986年, 中华肿瘤杂志, 8: 241。
- [2] 邓国仁等。1987年, 中国科学B辑, (1): 69。
- [3] Graham FL, Van der EB., 1973, *virology*, 52: 546。
- [4] Shih C, Weinberg RA., 1982, *Cell*, 29: 161。
- [5] Maniatis T, et al. 1983, *Molecular Cloning*, 6th ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, CSH, pp. 109。
- [6] 鄂征等。1988年, 《组织培养技术》, 人民卫生出版社, pp. 236。

铈在磷酸酶电镜细胞化学中的应用

汤雪明

(上海第二医科大学)

酶的电镜细胞化学常用的方法是, 在一定条件下使细胞内的酶作用于酶的底物, 再将酶反应的产物作为反应物质, 在酶的作用部位进行捕捉, 使其在电镜下具有可见性。因此, 酶的电镜细胞化学包括两个反应: 第一个是酶作用于底物的反应, 称酶反应, 形成的产物为初级反应产物; 第二个是捕捉剂与初级反应产物的作用, 称捕捉反应, 形成最终反应产物。在磷酸酶细胞化学反应中, 酶作用于底物所产生的初级反应产物为磷酸, 常用铅作为捕捉剂, 与磷酸反应形成高电子密度的磷酸铅沉淀, 在电镜下具有可见性。

由于铅捕捉剂对酶有一定抑制作用, 而且容易产生非特异性反应, 常常给细胞化学实验带来一定困难。近年来, 人们开始寻找新的捕捉剂, 其中铈(cerium)是较理想的一种^[1]。我

们采用这种新捕捉剂铈开展了胞嘧啶核苷酸酶(CMP酶)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P酶)的细胞化学反应, 实验结果表明, 与铅捕捉剂相比, 铈具有很多优点, 细胞化学反应效果较好。

材 料 和 方 法

实验动物为雄性大鼠, 用血管灌注方法固定肝、肾和睾丸等组织, 然后进行细胞化学反应, 具体步骤如下:

1. 用 1.5% 戊二醛固定液 (pH 7.4) 灌注固定大鼠的各种组织, 然后取下组织, 切成长条状组织块, 再在同样固定液中浸泡固定 15 分钟;
2. 用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 充分漂洗组织, 并置于冰箱 (4℃) 过夜;
3. 将长条形组织块埋在 7% 琼脂中, 用 Sorvall TC-2 组织切片机把组织切成 40 微米厚的组织片, 继

续浸在 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液中;

4. 将组织片换入配制孵育液用的缓冲液中, 使组织内部建立细胞化学反应所需的 pH 条件, 缓冲液需保持在 4°C 左右;

5. 将组织片放入新鲜配制的孵育液中, 在振荡式恒温水浴箱中孵育 90 分钟。

CMP 酶细胞化学孵育液内含有 2 mmol/L C-5'-MP、40 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)、2 mmol/L 氯化铈 (CeCl₃)、5 mmol/L 氯化锰和 4% 蔗糖。

G-6-p 酶细胞化学孵育液内含 1 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸钠盐、2 mmol/L 氯化铈、0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 和 8% 蔗糖;

6. 孵育后先用配制孵育液的缓冲液漂洗组织, 再用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 进一步漂洗, 所用缓冲液都保持在 4°C 左右;

7. 用亚铁氰钾还原的钼酸固定液 (2% 钼酸水溶液与等量 3% 亚铁氰化钾水溶液的混合液) 对组织作后固定, 由于组织较薄, 在 4°C 下固定时间不超过 1 小时;

8. 按常规方法进行组织的脱水和环氧树脂包埋, 超薄切片可不经染色在电镜下观察, 将观察结果与以铅为捕捉剂的 CMP 酶和 G-6-p 酶细胞化学结果进行比较。

结果与讨论

CMP 酶是酸性磷酸酶的一种, 其细胞化学反应原理是以 5'-CMP 为底物, 在 pH 5 的酸性条件下被 CMP 酶水解并释放出磷酸, 后者与捕捉剂铈盐反应形成高电子密度沉淀, 在电镜下容易检出。CMP 酶位于溶酶体以及高尔基体成熟面的部分膜囊, 是溶酶体的主要标志酶^[2]。本实验中, 肝、肾、睾丸等组织中各种细胞的溶酶体和高尔基体成熟面部分膜囊 (以前称为 GERL) 均呈 CMP 酶阳性反应, 细胞化学反应产物呈均匀的细颗粒状, 不掩盖超微结构细节。例如 Leydig 细胞中多泡体的 CMP 酶反应产物位于多泡体基质中, 小泡呈阴性反应 (图 1); 自体吞噬泡经 CMP 酶细胞化学反应后, 其内部结构仍清晰可见 (图 2)。

G-6-P 酶能把葡萄糖-6-磷酸水解成葡萄糖和磷酸, 因此也可以用捕捉剂铈盐显示这种酶。G-6-P 酶位于内质网和核膜, 是内质网的

主要标志酶。本实验中, 各种细胞的内质网和核膜均呈 G-6-P 酶阳性反应。如 Leydig 细胞中有丰富的内质网, G-6-P 酶细胞化学反应把整个细胞的内质网系统清楚地显示出来 (图 3)。

本实验中, 各种组织的 CMP 酶和 G-6-P 酶细胞化学反应都没有出现明显的非特异性反应, 在没有底物的对照实验中各种组织均呈阴性反应。

我们将本实验结果与以前以铅为捕捉剂 (铅法) 的细胞化学实验结果^[3]相比较, 可以清楚地看到, 与铅法相比, 以铈为捕捉剂的电镜细胞化学方法 (铈法) 有下列优点:

1. 铅法很易在细胞内产生非特异性反应, 而铈法很少有非特异性反应。铅法的非特异性反应主要表现为细胞核内的小块状高电子密度沉淀和细胞质内的结晶状沉淀, 有时会严重影响细胞化学反应, 是电镜细胞化学技术中的一个难题。铈法的应用基本上解决了这一问题。

2. 铅法的反应产物为粗颗粒状沉淀, 有时会掩盖超微结构细节, 而铈法反应产物细而均匀, 一般不掩盖细节。如多泡中的小泡、自体吞噬泡中的结构用铅法往往不能清楚地显示^[4], 而铈法则使这些结构清晰可见。

3. 铈法的细胞化学反应比铅法稳定, 重复性较高。具体原因尚不清楚, 但可能与下面两个因素有关: ①铅对不少酶有一定抑制作用, 使酶活性降低; ②铅有时会引起底物的分解, 从而影响细胞化学反应。

4. 铈法还能增加生物膜的反差, 因此在细胞化学反应有后即使不染色, 细胞结构也有相当好的反差, 而铅法则没有明显的增加生物膜反差作用。

铈在电镜细胞化学中最早用于氧化酶的细胞化学, 如 NADH 氧化酶^[5]、D-氨基酸氧化酶^[6]、单胺氧化酶^[7]等, 近几年才开始应用于水解酶的细胞化学^[1,8,9]。尽管铈法的应用还很不普遍, 但它的优点预示着铈有可能会逐渐取代铅而成为电镜细胞化学中一种重要的捕捉剂。我们认为, 在磷酸酶细胞化学中, 铈法是

值得推广的。

切片未经染色。

×10800

摘 要

本文介绍了一种新捕捉剂铈在磷酸酶电镜细胞化学中的应用。与铅法相比,以铈为捕捉剂的电镜细胞化学方法有细胞化学反应稳定、非特异性反应少、反应产物细而均匀、能增加生物膜反差等优点,是一种值得推广的方法。

图 版 说 明

- 图 1 睾丸间质细胞的 CMP 酶细胞化学反应,多泡体(箭头)和次级溶酶体(Ly)呈阳性反应。 ×42500
- 图 2 睾丸间质细胞的 CMP 酶细胞化学反应,自体吞噬泡(箭头)和次级溶酶体(Ly)呈阳性反应。 ×42500
- 图 3 睾丸间质细胞的 G-6-P 酶细胞化学反应,内质网和核膜呈阳性反应,超薄

参 考 文 献

- [1] Robinson, JM and Karnovsky, MJ 1983, *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1190-1196.
- [2] 汤雪明, 1983, 电子显微学报, 2: 28-31.
- [3] 汤雪明, 1985, 细胞生物学杂志, 7(增): 3-14.
- [4] 汤雪明, 1988, 实验生物学报, 21: 119-129.
- [5] Briggs, RT et al., 1975, *J. Cell Biol.* 67: 566-586.
- [6] Robinson, JM et al., 1978, *J. Cell Biol.* 77: 59-71.
- [7] Fujimoto, T et al., 1982, *Histochem. J.* 14: 87-98.
- [8] Hulstaert, CD et al., 1983, *Histochemistry* 78: 71-79.
- [9] Angermuller, S and Fahimi, H 1984, *Histochemistry* 80: 107-111.

包埋后电镜细胞化学技术在细胞研究中的应用

唐 欣

(上海第二医科大学)

电镜细胞化学(包括免疫电镜细胞化学)是一种在超微结构水平上对细胞内各种大分子物质(如抗原、受体、大分子糖和核酸等)进行定位研究的方法,借助电子致密物质标记某些与待测大分子具有特殊亲和力的物质(如抗体、激素、凝集素和酶等),在电子显微镜下使大分子物质的存在位置得以显示。结合生物化学等研究资料,可对细胞内某些成分的结构和功能之间的关系作更深入的探索^[1]。

电镜细胞化学研究的标本制作方法与普通电镜标本基本上一样,都需要经过固定剂固定,逐级酒精脱水,环氧树脂包埋和超薄切片等过程,所不同的是细胞化学研究还需要增加一个孵育步骤,即具有特殊亲和力的物质(如抗原与抗体、受体与激素、大分子糖与凝集

素、酶与底物等)之间产生结合反应的步骤。如果孵育步骤的实施是在组织被固定之后,环氧树脂包埋之前进行,则称为包埋前技术(**pre-embedding technique**);如果孵育步骤是在环氧树脂包埋后的超薄切片上进行,则称为包埋后技术(**post-embedding technique**)。包埋前技术已在电镜细胞化学中广泛应用,但在实践中还存在一些问题,其中最主要的是反应物(抗体、标记物等)难以透过细胞膜进入细胞内。采用冷冻融解(Marger等,1961年)、溶媒或除垢剂(Bohn,1978年)等手段预先处理细胞,或用振动式切片机将固定后的组织切成薄片(Pickel,1975年)虽可部分解决细胞膜通透性

本文经汤雪明教授审校,特此致谢。