

片的对比。显然原照片上左上方的两条浅带不经处理的话,经制版后就看不到了^[2]。图3为两张本底为灰色,信息条带为白色的电泳照片处理前后的对比,经处理后不但最上面一行的几处信息斑条都能在制版照片上显示出来,而且整幅照片的信息比原照片更清晰,层次更生动^[3]。

目前计算机图像处理系统种类繁多,有商业性的,有专用机也有适合特殊需要而设计制造的,应用于生物图像处理领域的报道也有一些^[4-6]。由于计算机图像处理问题目前还不能形成一个统一的模式,处理的软件要因题而异,所以计算机图像处理的发展速度并不快。我们研制的这套微型计算机图像处理系统其分

辨率已达到处理图像的要求,然而图像处理的速度较慢,但是对大多数的图像处理问题来说,它的处理速度是完全能够接受的。

参 考 文 献

- [1] Gonzalez, R. C. P. Wintz, *Digital Image Processing*, 1977.
- [2] 张金忠, 朱 激, 1986, 细胞生物学杂志 8, 123—126.
- [3] 朱 群等, 1988, 实验生物学报 21 (2): 141—147.
- [4] Arndt-Jovin, D. J. et al., 1985, *Science*, 230: 247—256.
- [5] Ash, E. A. *Scanned Image Microscopy* (Academic Press, New York, 1980).
- [6] Castleman, K. R. *Digital Image Processing* (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1979).

间期细胞银染活性核仁形成区的电镜观察方法

谢荣林 王芸庆

(中国医科大学细胞生物学教研室)

特异显示染色体上 rRNA 基因活性的银染核仁形成区(silver-staining nucleolar organizer region, Ag-NOR)的光镜方法,在遗传、肿瘤、药物毒理及预防医学等方面研究中均有广泛的应用^[1-3]。间期细胞核银染活性核仁形成区(silver-staining active nucleolar organizer region, Ag-aNOR)的透射电镜观察,由于分辨力高,能在亚细胞和分子水平上对 rDNA 活性进行定位观察,近年国外已在多方面研究中应用,但在国内,目前尚未见报道。我们在改进他人^[4,5]的对动、植物组织或贴壁培养细胞,进行 Ag-aNOR 超微结构观察的方法基础上,建立了用透射电镜观察悬浮培养细胞 Ag-aNOR 的方法。

材 料 与 方 法

1. 细胞培养 人白血病细胞(HL-60)培养在含

20%小牛血清和适量双抗的 RPMI-1640 培养液中,于 5%CO₂、100%相对湿度、37℃条件的二氧化碳培养箱中悬浮开放式培养。细胞培养 3~4 天(细胞数约 1×10⁶/ml)即可取材制备标本。

2. 银染溶液配制 A. 50%AgNO₃水溶液,用时现配。B. 2%蛋白胶,2 ml 蛋白胶溶于 1%甲酸中,可于 4℃冰箱中短期保存。用时 A、B 两液按 2:1 混合。C. 5%硫代硫酸钠溶液,5 克硫代硫酸钠加水溶成 100 ml。

3. 标本制备程序 收集悬浮培养的 HL-60 细胞,先用 2.5%戊二醛 1 ml 预固定,然后 Carnoy 固定液固定 5 分钟,2500 转/分离心 10 分钟,去上清液,取出细胞团块进行乙醇→水的梯度复水,然后,经 50%AgNO₃-2%蛋白胶(2:1)混合液,56℃处理细胞团块 20 分钟,水洗后再用 5%硫代硫酸钠室温处理 10 分钟,乙醇→丙酮梯度脱水, Epon 812 包埋,超薄切片,直接或再经醋酸铀和柠檬酸铅复染后用日立 H-600 型透射电镜,在 75 kV 条件下进行观察。

结果与讨论

人类核仁形成区(NOR)是28s、18s和5.8s rRNA基因所在的位置^[6],银染物质不是rDNA和rRNA,而是与活性rDNA特异结合的蛋白质^[7],生化和免疫化学研究表明银染蛋白质很可能就是RNA聚合酶I^[8]。RNA聚合酶I的功能是特异与有活性的rDNA结合催化转录rRNA,所以,银染是一种简便、快速显示有转录活性的rRNA基因的方法^[9]。

如图1所示,HL-60细胞银染后,再经铀、铅复染显示电子密度大的是核仁纤维中心(fibrillar centres, FC)和致密纤维成分(dense fibrillar component, DFC),它们是银染蛋白和有转录活性的rRNA基因存在的部位,周围电子密度均匀、着色浅的为rRNA前体和核糖体大小亚单位前体存在的颗粒成分(granular component, GC)^[4,5]。图2则是银染后,超薄切片不经铀、铅复染,直接在透射电镜下观察的核仁中FC和DFC图像,显示银染蛋白颗粒只存在于FC和DFC中,在周围GC中很少存在,说明银染蛋白与rRNA基因转录活性密切相关,而与转录后产物无关。

目前研究rRNA基因活动的形态学方法,一般采用银染中期染色体NOR和显示间期rDNA产物的Brachet反应等方法,两法只能在不同的细胞标本中分别进行,其结果要靠综合起来进行分析,不能在一个细胞内直观rDNA、rRNA和银染蛋白质三者之间的关系;用常规超薄切片技术虽分辨力较光镜明显提高,但只能显示核仁大小、多少,对核仁内组成成分、结构关系不能进行定位研究,如图3所示;而用酶化学和抗体标记方法来研究rRNA基因活性虽然效果较好,但方法较复杂。国外Ag-aNOR超微结构研究所用材料多为动、植物组织或贴壁培养细胞,本法应用悬浮培养细胞,改进后的方法简便易行,所用银染药物均为国产,效果明显,银染蛋白颗粒集中

存在于aNOR,显示了较强的特异性。在同一个细胞中清楚地显示出银染蛋白、活性rDNA和rRNA三者间的关系。

因此,本法可在亚细胞水平上研究遗传、肿瘤、药物毒理及预防医学等方面的问题。例如,作者应用它研究药物诱导HL-60细胞分化过程中rRNA基因表达的变化,在电镜下观察到,未分化的HL-60细胞处在旺盛的恶性生长和增殖状态,rDNA转录活跃,核仁中FC、DFC数量多,核仁大;经药物诱导分化后的细胞,趋于成熟状态,rDNA转录水平下降,核仁中的FC和DFC少,核仁也明显变小变少的现象,如图4、5所示,其结果较好地佐证了所用药物诱导肿瘤细胞分化的作用。

摘 要

本文报告改进建立的透射电镜观察间期细胞银染活性核仁形成区的方法简便易行,能在同一个细胞中从亚细胞和分子水平上清楚地显示银染蛋白、活性rDNA和rRNA三者间的关系。

参 考 文 献

- [1] Goodpasture, C. et al., 1975, *Chromosoma*, 53: 37.
- [2] 黄天华等, 1983, *生殖与避孕*, 3(1): 48—52.
- [3] 王戈华等, 1987, *遗传与疾病*, 4(3): 146—148.
- [4] Angelier, N. et al., 1982, *Chromosoma*, 86: 661—672.
- [5] Ploton, D. et al., 1985, *J. Cell. Sci.*, 74: 239—256.
- [6] Alberts, B. et al., 1983, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York & London, 424—425.
- [7] Busch, H. et al., 1979, *Cancer Res.*, 39: 857—863.
- [8] Scheer, U. et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 1431—1435.
- [9] Miller, DA. et al., 1976, *Expl Cell Res.*, 101: 235—243.