



一种简易制备 GMA 塑料薄切片的 酶细胞化学方法

徐 是 雄

(香港大学植物系)

不久前我介绍了有关乙二醇甲基丙烯酸酯 (glycol methacrylate 以下简称 GMA) 塑料薄切片技术^[1]。这一技术最适用来做高分辨率光学显微镜观察。现在我把这一技术在酶细胞化学定位方面的最新发展, 以及我自己新近积累的一些经验再为大家介绍如下。

GMA 薄切片, 假如依照常规的方法来固定和包埋, 一般是不适宜用来做酶细胞化学的。因为, 当 GMA 聚合时得在 40—60°C 进行(事实上由于聚合时 GMA 会散发热量, 所以温度会超过 60°C), 这样细胞内的酶活性便会全部丧失掉。因此, 如果要用这一技术来做细胞酶定位, 就一定得把 GMA 放在低温聚合。1972 年 Ashford、Allaway 和 McCully^[2]介绍了一种低温聚合 GMA 的方法。但由于这一方法做起来很繁复, 而且还需配备许多装置设备, 所以这一方法并没有得到广泛的应用。但最近我在文献中看到, 假如应用美国 Polysciences, Inc* 出产的 JB-4 GMA, 则可以很简易地用低温包埋聚合, 而无损酶的活性^[3]。我们试用了 JB-4 GMA, 觉得它的性能的确很好。但它有一个弱点, 那就是固化了的包埋头, 在切片时比较软。所以后来我们就改用了美国 Hartung Associates 的 GMA, 效果则比较好, 下面介绍 JB-4 GMA 的具体操作技术及我们的改良方案, 供大家参考。

I. JB-4 GMA 技术

美国 Polysciences 生产的 JB-4, 一般为盒装产品 (JB-4 Embedding Kit)。盒内配有三种制剂:

(1) 溶液 A (JB-4 solution A)——为一种水溶性乙二醇甲基丙烯酸酯, 即 GMA;

(2) 溶液 B (JB-4 solution B)——为一种活化剂 (activator), 化学名称为 N,N-dimethylaniline^[4];

(3) 催化剂 (catalyst)——为过氧化苯甲酰 (benzoyl peroxide)。

(溶液 A 100 毫升 + 催化剂 0.9 克) 是用来脱水和渗透的, 而 (溶液 A 100 毫升 + 催化剂 0.9 克) + (溶液 B) 则用来聚合。

在文献中, 有关应用这一方法来包埋动植物细胞已有人简略地报道过^[3,4,5], 但他们用来固定细胞的固定剂都为凝固性固定剂, 而这里所报道的方法, 则是用非凝固性固定剂。下面详细介绍一下我们现时所用的固定、包埋步骤和方法。

固 定

把材料切成小块 (2—3 平方毫米), 放在 4% 戊二醛固定 2 小时 (室温), 也可以在 4—5°C 固定。戊二醛用 0.05M (pH 7.2) 二甲胍酸钠缓冲液稀释。在固定液内加入 5% 蔗糖。

清 洗

材料固定后, 用 0.05M 二甲胍酸钠缓冲液 (加 5% 蔗糖) 清洗 2—3 小时, 换 2—3 次。清洗可以在室温或 4—5°C 进行。如果做酸性磷酸酶活性定位, 则最好用 0.05M 苹果酸缓冲液 (0.05M, pH 5) 加 5% 蔗糖或 50mM Tris 一顺丁烯二酸缓冲液 (pH 5.2) 清洗。

脱水和渗透

材料清洗干净后, 便可以直接放入加了活化剂的溶液 A 内, 同时进行脱水和渗透, 而无需酒精或丙酮。首先我们把固定的材料放在

* Polysciences, Inc. Paul Valley Industrial Park, Warrington, PA, 18976, U. S. A.

室温渗透3小时(在这段时间内换两次溶液),然后再放在4—5℃渗透过夜。大多数材料经一夜的渗透,第二天便可以包埋。但一些比较难渗透的材料(如干种子等),则需要渗透4—5天。JB-4 GMA 为一种水溶性塑料,所以它可以直接用来脱水和渗透。但如果有些材料不宜直接用JB-4 GMA 来脱水,那么也可以先用酒精来脱水,然后再用JB-4 GMA 来渗透。

包埋

材料经足够的时间渗透后,便可以进行包埋。包埋剂为(溶液A + 催化剂 + 溶液B)混合液。我们一般把包埋剂混合液和材料放在胶囊内,然后在4—5℃聚合。胶囊一定得放在一个金属架子的孔眼内进行聚合,而绝对不能使用木架子。因为据我们的聚合温度测试结果显示,这种GMA在4—5℃聚合时,如果用金属架子,温度最高只升至36℃左右;这种温度不会影响细胞内酶的活性。但如果用木架子,聚合温度则可以升高至60—70℃;这种温度会破坏酶的活性。

我们也曾把胶囊置放在-18℃聚合。但在这种温度,GMA聚合得比较慢,需要5—6小时,而在4—5℃,聚合时间则只需要1小时半左右便够。不过为了方便,我们经常把胶囊放在4—5℃聚合过夜,然后马上把固化了的包埋头放在一个密封的玻璃瓶内(瓶内预先放一些干燥剂),在4—5℃长期贮藏。如果将包埋头放在室温贮藏,则酶活性很快便会失掉。

II. 改良 JB-4 的方法

JB-4的最大弱点是固化了的包埋头容易吸水变软,不能切片。后来我们改用了Hartung Associates**的GMA(即把Polysciences的GMA溶液A换掉),包埋头的硬度、切片性能都比原装的JB-4来得好。所以现今我们只用这一种改良的混合液来包埋材料即:(Hartung GMA 100毫升 + 催化剂0.9克) + [活化剂(Polysciences)]。

III. 酶定位方法

酶定位的方法很多,我们根据Pearse^[6]所提供的方法,用GMA低温包埋切片,测试了好几种材料及酶(图版I、II图1—7),效果都很好。现在为了方便叙述起见,以酸性磷酸酶定位法为例,具体地介绍一下我们的方法。

切片和粘片

我们经常用玻璃刀在AO Spencer切片机上切1—3微米薄切片^[1]。预先在玻璃载片上涂一层1%白明胶,干后,在上面放一滴水。将切片放在水滴上,然后用一小块滤纸,把多余的水吸掉,然后放在室温风干。

酶定位

将玻片放在一个盛有反应液的染色缸内,在37℃水浴内温育。每隔五分钟取出一块玻片,用水清洗干净。清洗时要小心,不要让切片从玻璃片上脱落。最有效的方法是用滴管轻轻的将水滴在平放的玻片上。用手轻轻摇动几下,然后把水倒掉。如此重复几次,直至反应液被清洗干净。假如在清洗的过程中,切片脱落漂起,那么只能用滤纸把水吸干。切片清洗干净后,用滤纸将多余的水吸掉,在通风槽内,放一滴硫化氨(NH₄)₂S在切片上,然后马上用清水洗干净,用微温的白明胶/甘油封片(明胶5克 + 甘油35毫升 + 酚0.5克 + 蒸馏水30毫升)。假如切片经反应液处理后脱离玻片,那么在清洗干净后,可以直接用硫化氨封片,再用白指甲油将盖片四周密封。

酸性磷酸酶反应液的配制,主要根据Gomori^[7]的方法:10mMβ-甘油磷酸钠 + 4mM硝酸铅 + 50mM醋酸钠(pH5)^[8]。

由于底物容易渗透入切片,所以一般只需要培育10—15分钟,效果便很好。假如温育时间太长,反应产物过多,是会影响分辨率的。但如果用naphthol AS-B1 phosphate^[9]为底物,fast Garnet GBC为染料,则需要

** 地址: Hartung Associates, 803 North 33rd Street, Camden, N. J. 08105, U. S. A.

在 37℃ 温育 1 至 2 小时。

对 照

我们基本上只做两种对照：1. 把载有切片的玻璃片放在 100℃ 的温台上 1 小时。2. 把切片放在不含有底物的反应液中温育。有时我们也用在反应液中加入 0.01 M 氟化钠抑制剂处理切片。对照都为负反应。

IV. 小 结

根据我们的经验，GMA 低温包埋法是现今用来观察结构以及做酶定位的最好和最简易的方法。不过现今由于世界上还只有极少数研究者在使用这方法，所以我们对它的“优越性”以及它可能引起的臆象知道得还不多。但有一点是可以肯定的，即这一方法的出现，必定会为动植物酶细胞化学带来广阔的发展前景。

此外，由于用低温来聚合 GMA 是完全没有影响 GMA 切片的常规染色的。所以现今我们就是不做酶定位，而只做常规结构观察，我们也经常用低温来聚合 GMA。再由于这一方法无需用酒精或丙酮来脱水，所以应用这一方

法来测试细胞内脂类的分布情形尤为理想（图版 II 图 8）。

参 考 文 献

- [1] 徐是雄 1980 细胞生物学杂志. 4: 31-36.
- [2] Ashford, A. E. Allaway, W. G., and McCully, M. E. 1972. *J. Histochem. and Cytochem.* 20: 986-990.
- [3] Knox, R. B., H. I. M. V. Vithanage and B. J. Howlett 1980. *Histochemical Journal* 12: 247-272.
- [4] Swartz, W. J. and Nusbickel, F. R. 1979. *Journal of Microscopy* 115: 181-185.
- [5] Nusbickel, F. R. and W. J. Swartz 1979. *Histochemical Journal* 11: 197-203.
- [6] Pearse, A. G. E. 1968. *Histochemistry Theoretical and Applied*. Vol 1. 3rd Edition. Williams and Wilkins Co.
- [7] Gomori, G. 1950. *Stain Technology* 25: 81-85.
- [8] Sommer, J. R. and Blum, J. J. 1965. *J. Cell Biology* 24: 235-251.
- [9] Ashford, A. E. and McCully, M. E. 1970. *Protoplasma* 70: 441-456.
- [10] Bentwood, B. J. and J. Cronshaw 1978. *Planta* 140: 111-120.

人胃低分化粘液腺癌细胞系(MGC 80—3)通过鉴定

山东师范大学生物系和有关单位协作，经过三年多的努力完成了人胃低分化粘液腺癌细胞系(MGC 80-3)的建立及其生物学特性的初步研究。鉴定会在山东省科委和省教育厅的领导下，于 1981 年 12 月份在山东省济南市召开，有全国八个省市 27 位专家代表参加，由北京师范大学付校长生物系主任汪埏仁教授主持。代表们听取了 MGC80-3 细胞系的有关工作报告，对该系细胞的形态、生长特征、染色体分析、异种动物接种、组织化学、透射、扫描电镜和冷冻蚀刻电镜观察，以及人胃癌细胞系抗原性的鉴别等方面的工作结果进行了讨论，认为符合人胃低分化粘液腺癌的基本特征。

胃癌是目前发病率较高的人恶性肿瘤之一。胃癌细胞系的建立为从细胞水平研究其防治问题提供了重要工具，此外胃癌的病理形态分类比较复杂，因此建立不同组织类型的胃癌细胞系来研究这种癌细胞的特性也是十分必要的。

朱 德 厚

更正：本刊 1981 年第 4 期封三倒数第 13 行中大鼠凝集素系误，应为大豆凝集素。