

- [7] Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu and T. Sugiyama, 1975. *Chromosoma*, 53: 223—230.
- [8] Scheid, W. 1976. *Exp. Cell Res.*, 101:55—58.
- [9] Perry, P. and H. j. Evans, 1975. *Nature*

(Lond.), 258: 121—125.

- [10] 施立明, 贺维顺, 陈玉泽, 1980. 动物学研究, 1(3):297—302.
- [11] 贺维顺, 刘爱华, 陈松强, 保海仙, 朱慧香, 王桂清, 1981. 动物学研究, 2(2): 113—118.



介绍两种新颖的薄切片塑料

徐 是 雄

(香港大学植物系)

不久前曾先后^[1,2]介绍了两种乙二醇甲基丙烯酸酯(简称GMA)薄切片塑料。现在我再介绍两种供高分辨率光学显微镜观察的塑料产品。这两种产品经我们用植物材料试做切片,发现它们各有一定的优点。现将应用这两种塑料包埋剂的经验介绍如下:

I. GMA-Quetol 523 塑料

GMA-Quetol 523 塑料包埋剂, 是日本人Kushida^[3,4]等首先使用的。基本配方包括三种试剂: (1)GMA; (2)Quetol 523; (3)QCU-1。有关GMA塑料的性能,在《塑料薄切片和超薄切片技术》一书^[5]中已有详尽的报道,就不重复了。Quetol 523 则为一种能与GMA混合的塑料(名叫 methoxy polyethylene glycol 400 methacrylate), 其粘度为21厘泊,比GMA略稠(GMA的粘度约为9.15厘泊)。QCU-1(化学名为2,2'-azobis isobutyronitrile)是一种糊状液体。这三种试剂是由日本日新EM株式会社*供应的。

在使用时,按以下配方,配成混合液:

GMA	85 毫升
Quetol 523	15 毫升
QCU-1	0.05 克

混合液在60°C,约需12小时便可固化。如把QCU-1的份量加高至0.4克,在39°C只

需36小时,便可固化。固化的包埋头,是透明的。

Kushida和Kushida^[6]在以后将配方进行改良,在配方中增加了MMA(methylmethacrylate)(但据我们试用,发觉加不加MMA对塑料的性能无多大改变),改良的配方如下:

GMA	68 毫升
Quetol 523	2 毫升
MMA	30 毫升
QCU-1	0.05 克

使用GMA-Quetol 523塑料包埋的具体步骤与GMA包埋方法^[5]基本相同,一般可采用以下方法:

材料 3³毫米或略大的小块

固定 用2—6%戊二醛在室温固定4小时。固定液用磷酸或二甲胂酸钠缓冲液(0.2M)配制。

清洗 用上述缓冲液清洗2次,每次停留半小时。

脱水 50%,70%,80%,90%乙醇各30分

- * Nissin EM Co., Ltd., Yotsuya Songyo Bldg. 2 Samon-cho, Shinjuku, Tokyo, 160 JAPAN.
- ** Polaron Equipment Ltd., 21 Greenhill Crescent, Holywell Industrial Estate, Watford Hertfordshire WDI 8 x G, England.
- *** 购自Miles Lab. Ltd., P.O.Box 37, Stoke Court Stoke Poges, Slough SL 2 4LY, England.

钟; 100%乙醇两次, 每次 60 分钟。

渗透 100% 乙醇/GMA-Quetol 523 混合液(1:1)1—2 小时。

GMA-Quetol 523 混合液 2—3 小时。

GMA-Quetol 523 混合液 2—3 小时。

以上各步可在室温进行, 但当材料进入最后一步渗透时, 需要的话, 可在 4°C 延长渗透时间至几天或几星期。

包埋 把材料和混合液放入透明胶囊内, 然后加盖。胶囊可直放或横放, 使材料定向。

固化 60°C 约 12 小时。

切片 用干玻璃刀切 2—3 微米厚切片, 将切片放在有水滴的玻璃片上, 在室温或 60°C 干片, 干后用一般的 GMA 染色法染切片^[5]。但染后要清洗得干净, 因为 GMA-Quetol 523 塑料本身具酸性, 故此如用碱性染料来染色, 易产生背景染色。

如供电镜观察, 需把切片厚度保持在 0.5 微米左右, 用具有水槽的玻璃刀切片, 然后转移至电镜铜网上。染色采用 Kushida^[7,8] 的方法, 先将铜网夹在一条塑胶管上, 放在装有铍酸晶体的密封瓶内熏 6—12 小时。染色后便可在透射电镜下观察。

我们认为用 GMA-Quetol 523 与用常规的 GMA 方法^[5]同样方便, 唯一的问题是, GMA-Quetol 523 混合液酸度大, 所以切片经碱性染料染色后, 塑料本身易着色, 影响清晰度; 但对一些酸性染料则影响不大^[8] (图版 I, 图 1, 2)。如用 GMA-Quetol 523 来做电镜观察, 则由于切片厚, 影象并不清晰(图版 I, 图 3)。但另一方面, 我们使用 GMA-Quetol 523 来做光学显微放射自显术, 效果则颇好(图版 I, 图 4)。其操作方法与应用环氧树脂基本相同^[5], 唯一的改动是我们发现染色时可用 Azure B [配方如下: 先配制缓冲液, 将 24.6 毫升 0.1 醋酸加 15.4 毫升 0.2M 磷酸 pH4, 然后每一毫升缓冲液内加入 0.25 毫克 Azure B]^[6], 但需将染料原溶液稀释 10 或 20 倍, 染 2—5 分钟, 效果最好。

II. Lowicryl 塑料

Lowicryl 塑料为一种 2-甲基丙烯酸和丙烯酸盐混合剂 (acrylate-methacrylate mixtures), 由瑞士人 Carlemalm 等^[10]研制出来的。他们共研制了两种不同类型的包埋剂: 一类具亲水性, 叫 Lowicryl K4M; 另一类具疏水性, 叫 Lowicryl HM20。我们试用的 Lowicryl 是英国 Polarlon** 供应的。买回时, 两类 Lowicryl 都包括有三种溶液: (1) 聚合剂; (2) 塑料单体; (3) 起动剂。把三种溶液依照以下的配方配成混合液, 便可供渗透包埋。

Lowicryl K4M

聚合剂(K4M-A)	4 克
单体(K4M-B)	26 克
起动剂(C)	0.15 克

Lowicryl HM20

聚合剂(HM20-A)	4.5 克
单体(HM20-B)	25.5 克
起动剂(C)	0.15 克

经试用后发现, HM20 渗透不易, 切片也难, 只有 K4M 合用。因此在这里只介绍 K4M 混合液的使用。这一种塑料用来做免疫荧光, 效果尤佳, 具体操作步骤依据我们对燕麦球蛋白的定位工作叙述如下:

一、抗血清的制备

抗原 用提纯的燕麦球蛋白 (从燕麦种子内抽提出来, 制成干粉, 放在 0°C 备用)。

抗体 将 1 毫克燕麦球蛋白溶在 0.5 毫升 PBS [配方: NaCl(8 克) + KCl(0.2 克) + KH₂PO₄(0.2 克) + Na₂HPO₄(1.14 克) 溶在 1 升水中], 再加入 0.5 毫升福氏完全佐剂 (complete adjuvant), 混匀, 分 4 点注入兔背表皮下; 再隔二星期注射一次, 但抗原浓度加倍 (即 2 毫克/毫升)。从第二次注射开始, 改用不完全福氏佐剂 (incomplete adjuvant)。以后每隔一星期再注射一次 (共 2 次, 每次注射抗原 1 毫克/毫升), 在第二次注射后, 隔三天从兔耳部取少许血, 分离

出抗血清,然后用免疫扩散法鉴定是否有反应。如测试为正反应,则在抽血测试后四天作最后一次注射(抗原浓度为2毫克/毫升)。注射后4天处死兔子,取出所有血液,然后再分离出抗血清,分装入小瓶,放在0℃保存备用。另外用少许抗血清,用免疫扩散法和免疫电泳法等鉴定抗血清内的抗体与抗原的专一性和抗体的浓度(titre)。

二、K4M塑料切片的制备

材料 把燕麦种子的不同部位切成2—3毫米厚小块。

固定 用2%戊二醛或2%甲醛,在室温固定2小时。固定液用二甲酸钠缓冲液(0.2M)配制。[注意:我们发现经戊二醛固定的材料有时会产生自发荧光(图版I,图5),但经甲醛固定的材料则自发荧光较弱(图版II,图6,7),比较适宜来做免疫荧光。经戊二醛固定的材料何以会产生大量的自发荧光,尚有待进一步研究。

清洗 用二甲酸钠缓冲液清洗2次,每次停留半小时。

脱水 80%乙醇停留2小时(0℃)。

渗透 K4M混合液:乙醇(1:1) 1小时(0℃)

K4M混合液:乙醇(2:1) 1小时(0℃)

100%K4M混合液 1小时(0℃)

100%K4M混合液 3天(0℃)

聚合 把材料和K4M混合液放入透明胶囊内,加盖,置放在4℃,用紫外光(360nm)照射(样品与紫外光管保持距离30—40厘米)过夜。经紫外光照射后,K4M混合液一般还没完全聚合,故需要再放在室温2—3天,使其固化。塑料一经固化便得立刻切片,不然固化的样品,经长时间贮存会干缩。

切片 用干玻璃刀,切2—3微米厚切片。把切片放在玻片水滴上展开,然后用滤纸把多余的水吸干,放在室温干透(约需4—6小时),备用。

三、免疫荧光(我们采用间接法)

先将抗燕麦球蛋白的兔抗血清用PBS稀释1:50倍,然后放一大滴在切片上,在密封的箱内培育30分钟,然后用PBS清洗两次,每次停留15分钟。再将具有荧光标记异硫氰酸荧光素(FITC)或罗丹明异硫氰酸盐的抗兔山羊抗血清***滴一大滴在切片上(但需将购来的原溶液用PBS稀释100倍)10分钟后,用PBS清洗15分钟,最后用90%甘油+10%PBS混合液封片。用蓝光(FITC)或绿光(罗丹明)照射,在光镜下观察,用柯达Tri-X(ASA 400)黑白底片照相(图版I,图5;图版II,图6,图7)。

同时做以下几个对照(对照应为负反应):

1. 切片上只加PBS(以观察自发荧光的强度)。

2. 切片上加未注射抗原的兔血清,清洗后再加荧光标记的抗兔山羊抗血清,再清洗,然后观察。

3. 切片上加荧光标记的抗兔山羊抗血清,清洗,观察(对照每一步停留时间与处理相同)。

用K4M来做免疫荧光的优点是切片质量好,塑料的自发荧光低。从文献中我们知道K4M也可以用来做电镜免疫技术^[1],但由于我们无法用K4M来做超薄切片(主要是塑料太软),所以没有试做电镜免疫技术,所以还不能决定K4M是否适宜做植物材料电镜或电镜免疫观察。但如用K4M来做光学显微镜的免疫荧光则非常理想,值得大家试用。

结 论

根据我们实验室多年来对不同的塑料包埋剂的试用,得出这样一些结论:做一般的结构形态的观察,可用GMA^[6]或GMA-Quetol 523;做组织化学定位(包括脂肪、蛋白质的定性定位)最好用JB4^[2];做光学显微放射自显影定位,最好用GMA-Quetol 523;做光学显微免疫荧光,最好用Lowicryl K4M。以上几种塑料虽然也可用于电镜观察,但效果则远没有Spurr

氏环氧树脂好;所以电镜工作我们还是用Spurr氏环氧树脂为主。最近我们还试用了一种新近出产的塑料叫LRwhite,但经我们试用,发现效果并不好,所以就不介绍了。

参 考 文 献

- [1] 徐是雄 1980 细胞生物学杂志 4: 31—36.
 [2] 徐是雄 1981 细胞生物学杂志 4: 43—46.
 [3] Kushida, T., Nagato, Y., Kushida, H. 1975. 10th Int. Cong. Anat., Tokyo. page 503.
 [4] Kushida, H. 1977. *J. Electron Microsc.* 26: 351—353.
 [5] 徐是雄 1980 《塑料薄切片和超薄切片技术》北京大学出版社。
 [6] Kushida, H., and Kushida, T. 1981. *J. Electron Microsc.* 30: 77—80.
 [7] Kushida, H. 1978. *J. Electron Microsc.* 27: 59—60.
 [8] Kushida, T., Nagato, Y. and Kushida, H. 1979. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 56: 1—22.
 [9] Berlyn, G. P. and Miksche, J. P. 1976 《Botanical Microtechnique and cytochemistry》Iowa State Uni. Press.
 [10] Carlemalm, E., Garavito, R. M. and Villiger, W. 1982. *J. Microscopy.* 126: 123—149.
 [11] Roth, J., Bendayan, M., Carlemalm, E., Villiger, W., and Gara Vito, R. M. 1981. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 663—669

经验交流

异种细胞融合诱导熟前染色体凝聚(PCC)

蒋 清 茅一萍 王世浚
 (南京铁道医学院 生物学教研室)

在某种细胞促融剂介导下,同种或异种细胞能相互融合形成单个的新细胞。观察分析这种融合细胞的结构和机能的变化,在细胞生物学、细胞遗传学和细胞免疫学等研究中,已逐渐得到重视和应用。我们在开展同种和异种细胞融合选择杂种的同时,参考有关文献^[1],进行了细胞融合诱导熟前染色体凝聚(premature chromosome condensation, PCC)的实验。结果表明,经化学促融剂——聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的介导,有丝分裂期(M期)细胞,在种内和种间均能诱导间期核产生不同时期相的PCC。所得图象清晰,其中以赤鹿细胞的PCC最为典型。

材 料 与 方 法

一、细胞和细胞培养

1. 雄性赤鹿成纤维细胞, (KIZ-7901), 由昆明动物研究所引进。
2. 中国仓鼠成纤维细胞系 (Wg3-h) 由复旦大学

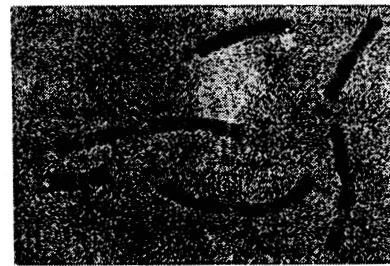


图 1 赤鹿细胞的核型 $2n = 7, XY_1 Y_2$

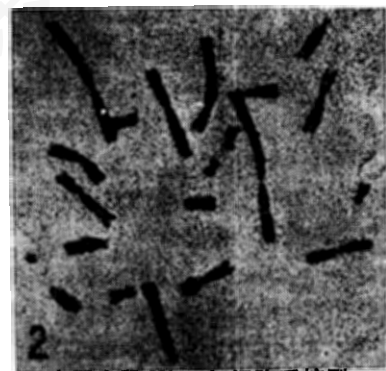


图 2 中国仓鼠 Wg3-h 细胞系核型, 染色体数 21—23