参考文献

[1] Bain, B., et al. 1964. *Blood* **23**: 108—116.
[2] 张宗梁、王 珏、王球达、姚 鑫、1979, 实验生物学报 **12**: 13—29.
[3] 张宗梁、王 珏、王球达、刘国良、姚 鑫 1980 实验生物学报 **13**: 155—165.
[4] Fernbach, B. R., et al. 1977. *Transplantation* **21**: 381—386.
[5] Oppenheim, J. J., et al. 1976. *Prog. Allergy* **20**: 65—194. (Karger Basel).
[6] Watanable, T., et al. 1977. *Eur. J. Immunol.*, **7**: 603—609.
[7] Lucas, D., et al. 1977. In D. Lucas (eds) Regulatory mechanisms in lymphocyte activation. pp, 76—89. Academic Press. New York.
[8] Cerottini, J. C., et al. 1974. *Adv. Immunol.*, **18**: 67—132.
[9] Meo, T., 1979. In Immunological Methods. Edited by Lefkovits, I., and B. Pernis, pp, 227—239.
[10] Ting, C. C., et al. 1979. *J. Immunol.*, **123**: 801—807.
[11] Ting, C. C., et al. 1980. *Int. J. Cancer* **25**: 243—249.
[12] Ting, C. C., et al. 1980. *J. Immunol.*, **124**: 1039—1044.
[13] Bach, F., 1976. In D. H. Katz, and B. Benaceffaf (eds) The role of production of the histocompatibility complex in immune response. pp, 103—129. Academic press, New York.
[14] Festenstein, H., 1978. In The immune system a course on molecular and cellular basis of immunity. pp, 249—260. Blackwell Scietific Publications.
[15] Schwartz, M. R., 1968. *Science* **160**: 1014—1017.
[16] Piguet, P. F., et al. 1972. *J. Exp. Med.*, **136**: 962—967.
[17] Vischer, T. L., 1972. *Clin. Exp. Immunol.*, **11**: 523—534.
[18] Oehler, J. R., et al. 1977. *J. Immunol.*, **119**: 1785—1789.
[19] Klimple, G. R., et al. 1980. *J. Immunol.*, **124**: 350—357.
[20] Rosenwasser, L. J., 1979. *J. Immunol.*, **123**: 1141—1144.

染色质核小体的电镜制片方法*

高 寺 蓉

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从发现真核细胞染色质普遍存在着核小体结构以来，对于核小体结构的研究已取得了重大的进展[1]。许多研究者运用电子显微镜直接观察核小体。

有人用核酸酶消化核或染色质，再经蔗糖密度梯度离心或柱层析分离，分别观察分离得到的单个核小体颗粒以及它们的寡聚体的形态[2]。也有人用 NaCl 或胰蛋白酶适当处理染色质[3]；甚至简单地将胀破的核直接离心到铜网上[4]，观察串珠状的核小体纤维。还有人观察由组蛋白和 DNA 重组形成的核小体[3,5]。根据不同的制备方法，在电镜下，或可以看到单个的核小体颗粒，或看到串珠状的核小体链，核小体颗粒直径一般为 75-100 Å，颗粒间连接丝直径为 20-30 Å。

要在电镜下呈现出清晰的染色质核小体结构，掌握样品的电镜制片方法是很重要的。本文就我们的工作实践，着重对核小体样品的电镜制片方法作一扼要介绍。这一方法包括：(1)碳膜铜网的制备，(2)取样，(3)固定，(4)染色，(5)投影等步骤。

一、碳膜铜网的制备

常用的样品支持膜有塑料膜、碳膜和喷碳的塑料膜。喷碳的塑料膜既牢固又容易制备，但一般较厚，直径仅为 20-30 Å 的、核小体颗粒间

*有关的工作曾得到王幽兰先生的指导，文章中的线图由乔以炯同志绘制，谨致谢意。

连接细丝就不易观察到，因而很少选用。一般选用一些塑料膜或碳膜。用得最普遍的是碳膜。

碳膜较薄，透明度高，化学稳定性强，能用来制备高分辨率、高反差的样品。塑料膜往往在电子轰击下会发生收缩变形，而使样品漂移。而碳膜能在电子轰击下保持稳定。但是，碳膜有高度的脆性，最小的机械力或碰撞都可以使之破碎，所以碳膜极不容易制备。

我们选用的是碳膜。现将我们试用的两种制备碳膜的方法简述如下：

1．剥离法

将用干净绸布擦净的载玻片或新鲜劈开的云母片放在真空喷镀机的钟罩内，在高真空(10^{-4}-10^{-5}毫米汞柱)下，用一强电流(约35安培)通过位于载玻片(或云母片)上方10厘米处的二根碳棒(直径0.5厘米，一根碳棒的一端磨尖，另一根碳棒的一端磨平，将一根碳棒的尖端顶着另一碳棒平面的中部)进行喷投，时间约40秒。掌握一定的电流强度和喷投时间对于得到厚度合适的碳膜是重要的。也有人在载玻片(或云母片)旁放一小块光洁的白磁片，加上一滴真空油。喷投后，磁片将指示喷投出的碳的量，而油滴仍保持原来颜色，这可以用眼睛估计喷碳的厚度。除此以除，为了得到粒子极细的碳膜，真空度要高，电流要逐渐加大。

喷投完毕后，取出喷镀过碳的载玻片(或云母片)，再按图1所示的步骤操作：

(1) 用解剖刀在载玻片四周划痕，云母片

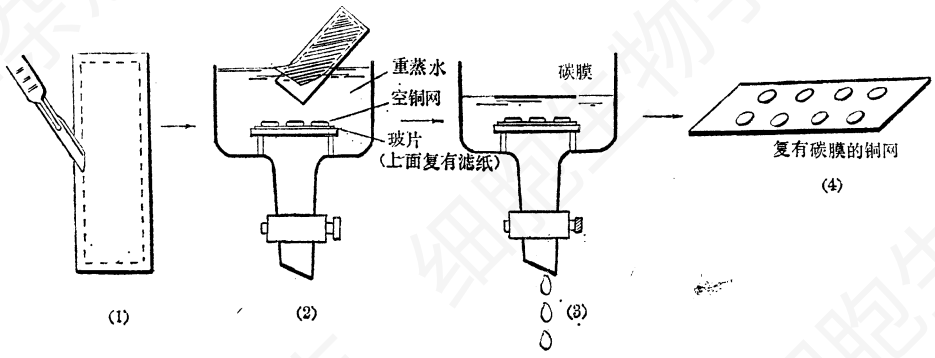


图 1 碳膜剥离示意

不必划痕，喷镀在云母片上的碳膜比载玻片上的容易剥离。

(2) 将载玻片(或云母片)斜插入水面，注意要尽量避免水面抖动，抖动会使碳膜破裂。同时，必需在纯净的重蒸水面进行，室温和水温一般为20℃左右，有人报道用温水更便于碳膜的剥离。

(3) 逐渐放水，让碳膜沉降到铜网上。注意放水时要慢，特别在碳膜将接触铜网时。

(4) 将覆有碳膜的铜网于40—50℃烘箱干燥二小时。

2．溶剂溶解法[6]

同喷碳方法一样，在塑料膜铜网上喷层碳，然后使用适当的溶剂将塑料膜溶解而保留碳膜。经过试验，对于我们使用的Formvar膜，以氯仿溶解为宜。

在培养皿里铺上一张滤纸，以氯仿充分湿润，放上喷过碳的和未喷过碳的Formvar膜铜网各若干只，浸润约半小时以后，取后一种铜网在解剖镜下检查。待此种铜网上的Formvar膜全部溶解时，将前一种铜网取出，干燥待用。

溶剂溶解法虽然比剥离法操作简单，但如溶解得不完全的话，残留有部分塑料膜，使铜网局部仍为双层膜。采用剥离法使这一缺陷得到了弥补，所制得的碳膜是纯的、均匀的。

二、取　　样

1．滴样法

无论是分离的单个的核小体样品，还是串连的核小体样品都可以用滴样法来取样。将样

品直接用滴管滴在碳膜铜网上，1—2分钟后，用滤纸吸去液滴；或将样品滴一滴在干净的蜡条上，然后覆上碳膜铜网(碳膜面朝下)，1—2分钟即可。注意覆铜网时间不宜过长，否则念珠会拉长变形，而观察不到颗粒状的核小体。

2．离心法[7]

这需要用一特制的离心套管(如图2所示)，先将细胞核用重蒸水胀破，然后将样品通过一层0.1*M* 蔗糖—10% 福尔马林(pH8.5)直接离心(2000-2500g，5分钟)到碳膜铜网上。铜网取出后，浸入0.4%Kodak Photo Flo(拉开粉 pH7-8)蘸洗5—15秒，最后用滤纸吸去液滴。运用这方法制片，由于离心作用，染色质纤维充分展开，使核小体颗粒之间相连的细丝很容易被观察到。

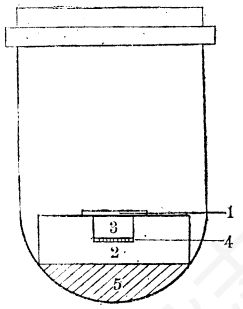


图 2 离心套管示意

1．盖玻片 2．有机玻璃套管 3．上层为铺展的样品，下层为蔗糖——福尔马林 4．碳膜铜网 5．橡皮垫

3．一步法

用针尖或细玻璃棒挑取一些细胞核，然后触及到重蒸水表面，细胞核由于低渗作用而破，染色质释放出来，用碳膜铜网沾取样品。在这方法制得的电镜铜网上也可观察到串珠状的核小体纤维。

三、固 定

用滴样法或一步法取样后的铜网必须再经固定，可在2.5%戊二醛中固定10秒钟或更长时间，然后用磷酸缓冲液(pH7.4)洗涤。对于核小体固定是必需的，它可以防止样品在制片过程中的变形。若用离心法取样，因为已经经过含有福尔马林的蔗糖液，所以不必再固定。

四、染 色

用于核小体样品的染色，有正染和负染。通常我们都采用1%磷钨酸和1%磷酸铀(分别配制在70%酒精中)正染，各染色1分钟。染色后，铜网经重蒸水蘸洗，用滤纸吸干液滴，自然干燥。。

五、投 影

投影是增加反差、提高样品能见度的一个极好的方法。

采用直径0.1毫米、长5厘米铂丝，投影角为6°，铜网放在一可转动的盘上。然后抽真空，使真空度达10^{-5}毫米汞柱以上。开启旋转开关，以30转/分钟转速旋转，接着逐渐加大电流，金属丝开始灼热，继续加大电流，至20—25安培时，铂丝熔融，待铂丝全喷投掉时，关掉电流。

为了提高投影效果，我们比较了不同的投影条件：投影角度，铂丝用量等。投影度较大(10°)或铂丝用量过少或过多，都不会取得满意的投影效果。

最后以我们的两张电镜照片(图3)作为本文的结束。

参 考 文 献

[1] 张志新等，1980 细胞生物学杂志 第二卷第三期，第1页.

[2] Finch, G. T. et al. 1975 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72: 3320.

[3] Oudet, P. et al. 1975 *Cell*, 4: 281.

[4] Olins, A. L. & Olins, D. E. 1974 *Scince*, 183: 330.

[5] Olins, A. L. et al. 1975 *J. Cell Biol.*, 64: 528.

[6] Glauert, A. M., 1972 *Practical Methods in Electron Microscopy*, 1: 144.

[7] Hamkalo, B. A. & Miller, O. L. 1973 *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 379.

(下转第14页)

直径通常只有60毫微米左右[13]。这可能是由于酶在胞间连丝上起溶解作用使胞壁断开，从而呈现较大的通道。如照片2、6可看出，细胞壁有时呈“⌒—”或“⌒//⌒”形状。因此，核穿壁的通道既与胞间连丝有联系，又不同于胞间连丝。这样的通道完全可能作为细胞间原生质(包括较大的细胞器)连络的重要途径。

从穿壁的内容来看，说明了在一定生理条件下细胞间的原生质流通具有很丰富的内容。我们观察到，不仅细胞核在穿壁，而且还有细胞质中细胞器也在穿壁(图版 图6)。郑国锠等[11]报道了染色质、线粒体、液泡等穿壁的现象，张伟成等[12]也报道了核糖体等在穿壁的现象。

核穿壁呈现“A→B、B→C”胞间转移的现象，说明细胞核可能就是通过这样的传递方式而达到转移的。我们观察的材料是小麦胚珠，此时胚囊正处于生长而珠心组织处于逐步解体时期。解体的珠心组织完全有可能通过胞间转移而把原生质输送到正需大量营养物质的胚囊中。所以，这种传递式转移可能是细胞间有机物运输的重要途径之一。

参考文献

[1] 吴素萱，1955 植物学报 4(2)：91—100.

[2] 吴素萱，1955 植物学报 4(3)：233—243.

[3] 娄成后，1955 植物学报 4(3)：183—222.

[4] 郑国锠，1955 植物学报 4(3)：223—232.

[5] 郑国锠，王耀芝，1956 植物学报 5(4)：363—375.

[6] 娄成后、吴素萱、张伟成，1956 植物生理学通讯 5：12—17。

[7] 吴素萱，1958 植物学报 7(1)：1—14.

[8] 娄成后、吴素萱、张伟成，1962 科学通报 12：52—54.

[9] 张伟成，荆玉祥，1964 植物学报 12(2)：121—132.

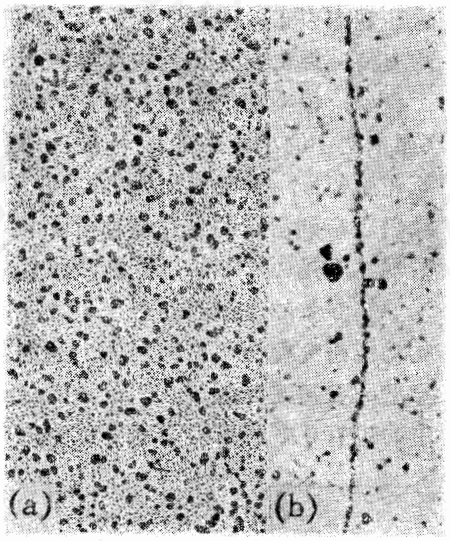
[10] 娄成后、邵莉楣、段静霞，1973 植物学报 15(2)：204—220.

[11] 郑国锠、聂秀苑、杨庆兰、王以秀，1975 植物学报 17(1)：62—68.

[12] 张伟成、严文梅、吴素萱，1980 植物学报 22(1)：32—36.

[13] B. E. S. Gunning, A. W. Robards, 1976: Intercellular communication in plants: Studies on plasmodesmata. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p.28.

(上接第 32 页)



(a) 用小球菌核酸酶消化小牛胸腺细胞核，再经 Wtrogel 柱层析分离，所得到的核小体单倍体样品，滴样法取样，磷钨酸和醋酸铀酒精溶液染色，铂旋转投影。照片显示出大小均匀的单个的核小体颗粒。×72000

(b) 将尖尾藻细胞核直接展开在重蒸水表面，一步法取样，磷钨酸和醋酸铀酒精溶液染色。照片显示一串珠状的核小体纤维。×14400

图 3 染色质核小体的电镜照片