

水溶性包埋剂甲基丙烯酸乙二酯对于 鲤鱼垂体促性腺细胞超微结构的保存

宋秀斌 叶容

(中国科学院上海生理研究所)

潘家秀 冯敏绮

(中国科学院上海生物化学研究所)

为开展蛋白质或多肽激素电子显微镜水平的免疫组织化学定位工作,如何保存细胞的超微结构和抗原性是共所关心的问题。除固定剂应作适当的选择外,包埋剂的影响也颇大。例如高等动物的垂体激素,用Epon812包埋,只有促生长激素和催乳激素可以保存抗原性,而卵泡刺激素(简称FSH)用甲基丙烯酸甲丁酯或Epon812包埋均不能保存^[1],尽管Epon812有利于保存形态。有的作者用水溶性包埋剂聚乙二醇^[1,2,3],脱包埋剂的条件温和,不用有机溶剂,然而据本文作者的经验,摊片有一定困难,操作时必须控制在一定的温度和湿度。甲基丙烯酸乙二酯^[4,5,6]是超微细胞化学和免疫细胞化学中曾用过的包埋剂,早期工作由于聚合损伤、电子束损伤、包埋块硬度难以控制等因素遇到一定困难。近来改进了包埋剂的配方^[7,8],并用预聚合的溶液渗透和聚合,其结果是包埋块稳定,膨胀假象少,形态结构保存也大有改进。由于处理条件相当温和,组织的抗原性也可得到较好的保存^[6,8]。

本文即用这种改良的甲基丙烯酸乙二酯包埋剂,首先作鲤鱼垂体促性腺细胞(简称GTH细胞)的超微结构观察,并与Epon812和甲基丙烯酸甲丁酯包埋剂进行比较。

材 料 和 方 法

(一) 取材和固定

性腺成熟度达IV期的鲤鱼,剪断鳃弓动脉,以0.6%NaCl作慢速心脏灌流,至鳃色变浅为止。将头切下,取垂体,预固定于用0.1M二甲砷酸钠缓冲液配制的1%戊二醛溶液,pH

7.2—7.4, 4℃, 2小时。以含有8.2%蔗糖的二甲砷酸钠缓冲液冲洗24小时,再用以同一缓冲液配制的2%OsO₄继续固定2小时。

(二) 脱水和包埋

1. 甲基丙烯酸乙二酯*—聚乙二醇(简称GMA—PEG) GMA—PEG包埋剂配方按Spaur和Moriarty^[8]

GMA100%	66.5毫升
甲基丙烯酸丁酯	28.5毫升
双甲基丙烯酸乙酯*	5.0毫升
过氧化二苯甲酰	1.5 克
聚乙二醇 400	1.0 毫克

预聚合GMA—PEG的制备:在125毫升三角烧瓶中加50毫升按上述比例混合的GMA—PEG。用斜面开有2毫米槽的木塞塞住,木塞上另打有一孔,斜插入一根温度计。磁力加热搅拌,当液体温度升到60℃左右时,过氧化二苯甲酰开始溶解。继续加热搅拌,并将温度上升速度控制在每分钟6—7℃。由于GMA—PEG的全聚合临界温度为98℃±1℃,过此温度,骤然大量放热完全聚合,因此温度上升至90℃时,必须小心观察,一俟达到96—97℃,立即将三角烧瓶浸于干冰—酒精混合液,不断摇动,使温度迅速下降至零度以下,放置一段时间后取出。此时GMA—PEG的粘度较高,放置于室温,粘度随温度升高而下降。塞紧,干燥保存备用。组织块经固定后,按下述方法脱水、包埋:

50% 乙醇 10分钟

* 日本三菱レイヨン株式会社出品

* 美国 Polysciences, Inc. 出品。

70% 乙醇	10分钟
85% 乙醇	10分钟
95% 乙醇	10分钟
100% 乙醇	3次, 每次 10分钟

1份预聚合GMA—PEG + 1份无水乙醇10分钟
 3份预聚合GMA—PEG + 1份无水乙醇10分钟
 预聚合 GMA—PEG 3次, 每次5分钟 组织块
 包埋于预聚合GMA—PEG, 37°C, 24—48小时
 或稍长, 使聚合完全。

2. 甲基丙烯酸甲—丁酯 (简称甲丁酯)

预聚合甲—丁酯的制备: 按常规方法处理甲酯和丁酯中的抑制剂, 然而以甲酯: 丁酯 (2: 8) 混合, 加入1—1.5%过氧化二苯甲酰, 在水浴中加热, 不断搅拌, 注意温度不可过高, 以免完全聚合。当混合液呈粘稠糖浆状, 即停止加热, 冷却后使用。

包埋剂的配方和组织块脱水、包埋按常规。

3. Epon812

包埋剂的配方和组织块脱水、包埋按常规。

(三) 切片和观察

用LKB—4800A型切片机分别切成1—2微米厚片和500埃薄片, 日立H—500型电子显微镜观察。

垂体促性腺细胞超微结构的保存

垂体中含有多种激素分泌细胞 (图1、2) 用上述各种包埋剂制备的性腺IV期的鲤鱼垂体切片, 在电子显微镜下均可找到硬骨鱼中典型的GTH细胞, 见图1、4、5。这种细胞有以下一些形态学特点:

1. 细胞核偏位, 常呈不规则形, 有围核腔。
2. 分泌颗粒直径100—200毫微米 (m μ), 数量多。
3. 粗面内质网明显, 扁池扩大, 除依附于池膜上的核糖核蛋白体构成粗面外, 还有成簇核糖核蛋白体散在于胞质中。
4. 高尔基器发育良好, 常伴有胀大的泡。

上述种种特征说明GTH细胞内蛋白的合成

和运输旺盛, 导致分泌颗粒的增多, 而排空期 (即细胞释放促性腺激素 (GTH) 的时期) 尚未到来。此观察表明, 用免疫组织化学方法进行GTH的细胞内定位, 取此期的垂体材料是适当的。这里所观察到的分泌颗粒大多数是小的。目前有的作者认为^[9], 硬骨鱼垂体只有一种GTH细胞, 但分泌两种激素, 小分泌颗粒是黄体生成素(LH), 而大团块是卵泡刺激素(FSH), 在生殖周期中后者(FSH)出现较晚, 我们所观察的时期, 基本上只是前者。

虽然我们所用的三种包埋剂, 都能保存GTH细胞的一些基本结构特征, 但其中尚有一定优劣之分: Epon812 (图4) 和GMA—PEG (图1、2、3) 二者的细胞结构保存比较好细致, 这特别表现在细胞间隙紧密, 细胞膜较完整, 以及分泌颗粒结构细致; 反之, 甲—丁酯包埋的细胞 (图5) 间隙明显扩大 (膨胀假象), 细胞膜明显缺损, 分泌颗粒的结构保存亦不如前二者 (颗粒膜与内含物的区分不如前二者清晰)。此外, 在GMA—PEG的切片上很少出现皱纹, 说明其硬软度是适当的。

Epon812包埋虽然结构保存较好, 但不利于抗原性的保存, 故GMA—PEG包埋可能对于鲤鱼GTH的免疫组织化学研究是一个较好的选择, 有待继续进行试验。至于甲—丁酯, 虽然结构保存差, 但由于细胞内定位需要标记抗体能进入细胞膜及通过颗粒膜, 甲—丁酯在这些方面的某些保存缺陷是否反而成为一种便于标记抗体通过的有利条件? 无论如何, 在今后的免疫组织化学方法摸索中, 继续进行某些平行比较试验总是有益的 (如比较GMA—PEG及甲—丁酯)。

参 考 文 献

- [1] Nakane, P. K. 1975. In "The Anterior Pituitary" (ed. Tixier-Vidal, A.) 45.
- [2] Mazurkiewicz, J. E., and P. K. Nakane. 1972. J. Histochem. cytochem. 20: 969-971.
- [3] Backs, T. D. and P. G. Anderson, 1963 Histoche-

下转30页

抗原进入抗体凝胶前的缓冲区域。这种排列有助于使沉淀峰的起底线清晰，特别有利于分析交互重叠的沉淀峰。

小 结

本文介绍一种简便的聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳方法，使在聚丙烯酰胺凝胶上分离的抗原成份与并列的不同的抗体凝胶层发生沉淀反应而被分开。该法可用以分析抗血清的特异性和抗原的免疫学性质，其形成的抗原—抗体复合物沉淀可用以制备特异性抗血清。

施渭康等图版

图 版 说 明

- 图1 凝胶条切割槽：由有机玻璃制成的槽和不锈钢刀二部分组成。
- 图2 聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳：a. 抗原为胎血清90微克；第一块抗体凝胶：兔抗正常人全血清20微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白抗血清2微升/平方厘米。b. 抗原为胎血清180微克；第一块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白抗血清20微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗正常人全血清10微升/平方厘米。图中AFP示甲胎蛋白；Alb示白蛋白(下同)。
- 图3 聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳：抗原为90微克人胎血清和38微克马脾铁蛋白混合物。a. 第一块抗体凝胶：兔抗马脾铁蛋白8微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白4微升/平方厘米。b. 第一块抗体凝胶：兔抗人甲胎蛋白8微升/平方厘米；第二块抗体凝胶：兔抗马脾铁蛋白4微升/平方厘米。图中 Fer 示铁蛋白。

参 考 文 献

- [1] Johansson, B. G. and Stenflo, J., 1971. *Anal. Biochem.* 40 : 232—236
- [2] 施渭康, 施渭康, 1979. *上海医学*, 2(5): 52—53
- [3] F. dest. J. Van Der Riet and M. Viljoen, 1973. *J. Immunol. Methods* 3 : 105—106
- [4] 施渭康, 卢延龄, 许河生, 和葛锡锐, 1976, *生物化学与生物物理进展*, 第4期8—10
- [5] Maizel, J. V., 1971, *Methods in Virology* 5 : 179—245
- [6] Ekwall, K., Soderholm, J. and Wadstrom, T., 1976. *J. Immunol. Methods.* 12 : 103—115

图4 三种不同抗血清的并列抗体凝胶交叉免疫电泳：抗原为人胎血清90微克。抗体凝胶层自下而上分别为兔抗正常人全血清40微升/平方厘米，兔抗人胎血清8微升/平方厘米和兔抗人甲胎蛋白2微升/平方厘米。

图5 单相特异性兔抗白蛋白和抗甲胎蛋白抗血清的免疫电泳分析：抗原孔：均为胎血清；抗血清槽：1. 聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶交叉免疫电泳甲胎蛋白免疫复合物制备的抗血清；2. 抗人胎血全血清抗血清；3. 聚丙烯酰胺凝胶—并列抗体凝胶电泳白蛋白免疫复合物制备的抗血清。

图6 聚丙烯酰胺凝胶条的洗涤对电泳结果的影响：抗原：正常人全血清180微克；抗体：兔抗正常人全血清7微升/平方厘米。a. 聚丙烯酰胺凝胶条在蒸馏水中洗涤45分钟的电泳图谱；b. 聚丙烯酰胺凝胶条在蒸馏水中洗涤60分钟的电泳图谱。箭头和数字表示明显低于图6a中相对应的峰，峰3近乎消失。(经固定染色后的另一半聚丙烯酰胺凝胶条在照相时置于凝胶板上，以示相对应的免疫电泳沉淀峰)。

上接32页

mistry, Theory, Practice and Bibliography. 19-22. Harper and Row Publishers, Inc.

- [4] Hoshino, M., and H. Kobayashi, 1971 *J. Histochem. cytochem.* 19: 575-577.
- [5] Glauert, A. M. 1974 *Embedding. In "Practical Method in Electron Microscopy"* 3: 159-160. North-Holland Publishing Co., Amsterdam and Oxford.
- [6] Hoshino, M., and H. Kobayashi, 1972 *J. Histochem.*

- cytochem.* 20: 743-745.
- [7] Kushida, H., and K. Fujita 1975 *J. Electron microsc.* 24: 175-176.
- [8] Spaur, R.C. and G. C. Moriarty, 1977 *J. Histochem cytochem.* 25: 163-174.
- [9] 北京动物研究所内分泌研究室细胞组、湖北省长江水产研究所养殖研究室生殖组. *中国科学* 1977. 6: 594—602.