

酸钠漂白剂内进行腐蚀5—10分钟后,用肉眼可以观察到复型膜已漂浮下来,再继续腐蚀几分钟,使残余组织全部腐蚀干净。然后用重蒸馏水清洗复型膜3—5次,用发环将复型膜捞在400目铜网作镜检。有些复型膜较大,容易卷曲或折叠,可滴入数滴30%丙酮,使膜伸展开来,再捞至铜网上镜检。

复型膜制成后,可以存放一星期左右再进行腐蚀、剥离,效果相同^[5]。

参 考 文 献

- [1] 李文镇等,1982。电子显微学报,16—19。
- [2] 张铁峰等,1980。细胞生物学杂志,2(1):43—45。
- [3] 洪涛等,1980。生物医学超微结构与电子显微技术。p.248—254。
- [4] Stolinski, C. and A. S. Breathnach, 1975, Theory and Principles of the Technique. In: Freeze-Fracture Replication of Biological Tissues: 15—31, Academic Press.
- [5] 龚忠萍,1983。用发环捞取冰冻蚀刻复型膜。细胞生物学杂志,5(3):38。

细胞生物学实验课“酸性磷酸酶显示”的方法改进*

余 其 兴

(武汉大学生物系)

酸性磷酸酶的测定是细胞生物学实验课中一个比较重要的项目,它对于学生掌握酶的细胞化学实验要领,以及了解溶酶体功能方面都具有积极的作用。目前国内资料所介绍的实验方法^[1-3],均是采用动物组织石蜡切片的硫化铅法(Gomori氏,1950)。此种实验技术的原理是可靠的,但其要求石蜡切片的制备条件较高,实验过程时间也较长,这都给此实验项目的开设带来一定的困难。为此,我们对本实验做了如下的改进:(1)实验材料改为采用小鼠腹腔巨噬细胞,省去了烦琐的实验材料准备工作。(2)以中性福尔马林固定,缩短了固定时间。(3)以姬姆萨染液对染,对比清晰,效果良好。根据我们的实践体会,此改进方法具有反应稳定、实验时间短(全过程在2—2.5小时内完成)以及与理论课讲授内容联系紧密等优点,特别是对于目前实验条件较差的教学单位,是一种简便易行的实验方法。

材 料 和 方 法

溶液配制

- (1) 10%中性福尔马林(pH 6.8—7.1) 甲醛 10

毫升,蒸馏水 90 毫升,醋酸钠 2 克。

- (2) 酸性磷酸酶作用液 蒸馏水 74 毫升, 0.2 M 醋酸缓冲液(pH 4.6) 12 毫升, 5%硝酸铅 2 毫升, 3.2% β-甘油磷酸钠 4 毫升。

先将蒸馏水和醋酸缓冲液混合,然后分成大致相等的两份,分别加入硝酸铅和甘油磷酸钠溶液,随后再将两液缓缓混合,边混边搅,搅匀后保存于冰箱中备用。用前加少量醋酸钠调整 pH 为 5.0。

- (3) 2%硫化铵溶液 硫化铵 2 毫升,蒸馏水 98 毫升。

- (4) 姬姆萨染液(1:30) 姬姆萨原液 3 滴,磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 5 毫升。

- (5) 6%淀粉肉汤 牛肉膏 0.3 克,蛋白胨 1 克,氯化钠 0.5 克,蒸馏水 100 毫升,可溶性淀粉 6 克。

高压灭菌 15 磅, 20 分钟,再加入可溶性淀粉,水温浴促使其溶解(无条件时,用煮沸灭菌也行),置冰箱保存待用。

实验步骤

- (1) 取小白鼠一只,每日腹腔注射 6% 淀粉肉汤 1 毫升,连续注射三天;

- (2) 在第三天注射后 3—4 小时,再向腹腔注射生理盐水 1 毫升。过 3 分钟后,抽取腹腔液 0.1—0.3

* 本工作是在周瞰副教授指导下进行的。

毫升;

(3) 将腹腔液滴在预冷的载玻片上, 每片1—2滴, 立即涂片, 并迅速放入冰箱(4℃), 细胞自行铺展;

(4) 30分钟后, 将玻片转入10%中性福尔马林(冰箱4℃), 固定30分钟;

(5) 自来水漂洗5分钟, 晾干(或甩干);

(6) 转入酸性磷酸酶作用液中, 37℃处理30分钟;

(7) 自来水漂洗片刻;

(8) 2%硫化铵处理3—5分钟;

(9) 自来水冲洗, 甩干;

(10) 用1:30的姬姆萨液染色15分钟;

(11) 自来水冲去染液, 甩干, 滴上磷酸盐缓冲液(pH 6.8)临时水封片, 镜检观察。

(12) 对照片的制作: 将腹腔液涂片放入50℃温箱处理30分钟, 中性福尔马林固定30分钟, 其余步骤同(5)—(11)。

结果观察

镜检可见, 巨噬细胞的细胞核染成紫红色, 而细胞质中则有许多大小不等的棕黑色或黑色的颗粒和斑块。在部分细胞之中, 由于酸性磷酸酶极丰富, 故整个细胞质甚至整个细胞皆被黑色反应沉淀物所掩盖。淋巴细胞的细胞质中也有少许黑色沉淀物。而中性粒细胞则呈现阴性反应^[4]。

注意事项

(1) 酸性磷酸酶作用液的配制是本实验成

败的基础。硝酸铅和甘油磷酸钠混合时易产生絮状悬浮物, 使作用液有效浓度下降, 减弱酶的反应。配制时应注意: 一要严格控制pH值4.6, 二要分别稀释后缓慢混合, 混匀后方可调pH值至5.0;

(2) 小鼠腹腔注射, 不必要求严格消毒, 但注射生理盐水和抽液的进针部位应一致, 否则腹腔液难以抽出;

(3) 涂片置冰箱内, 应垂直插入玻片架上, 以利细胞铺展;

(4) 当室温低于20℃时, 可不用冰箱, 步骤(3)、(4)均在室温下进行也能取得较满意的效果;

(5) 福尔马林固定后, 水漂洗务必彻底, 同时玻片上水应该尽量甩干, 否则反应将不明显;

(6) 硫化铵处理后, 水冲洗干净, 也必须将玻片上水甩干, 否则将造成姬姆萨染色偏蓝, 影响观察效果。

参考文献

- [1] 孟瑞朝, 1955. 组织病理标本制作法, 146—147页。
- [2] 郑国辑, 1978. 生物显微技术, 156—157页。
- [3] 汪德耀, 1981. 细胞生物学实验指导, 336—338页。
- [4] 沈阳医学院, 1967. 临床血液学及细胞学图谱, 人民卫生出版社, 21—22页。

实验室细胞微载体培养装置的设计与初步应用*

毕 圻

(中国科学院新疆化学研究所)

毕 刚

(苏州医疗用品厂)

van Wezel^[1]1967年首先提出了细胞微载体培养技术, 它兼有单层细胞培养和悬浮细胞培养双重特点, 这种方法使细胞贴附生长于借轻度搅拌悬浮在培养液中的微载体珠粒表面,

既不改变细胞附着表面生长成单层的特性, 又可以全面控制各项培养条件, 特别是培养表面

* 感谢卫生部药品生物制品检定所吴绍沅同志指导。