

综上所述,整个固定、脱水、包埋过程可在5—6天内完成。第1天:固定、漂洗;第2天:后固定及脱水;第3—5天:树脂的渗透;第6天便可得到聚合完毕的包埋块。

V. 切片 先在包埋块头修出一块下底边 $<0.5$  mm,高 $<0.3$  mm的光滑平面。一个较易掌握的修块方法是:先用玻璃刀在包埋头上切出一个光滑平面(切法同超薄切片法),尔后在此平面上修出一梯形面。梯形上下底边必需平行,否则得不到连续切片。

一般来说,每块玻璃刀在切出了三十片左右的片子后便不再锋利。这时应把切片从水槽中捞起,换刀再切。捞片前,先用牙签或滤纸蘸少量氯仿,在离切片 $0.5—1$  mm上方薰片刻。见到切片伸展开即可,一般不超过10秒钟。左手持镊子,夹住铜网并伸入水下;右手持睫毛针,将切片带拨到铜网正上方。在将铜网提出水面的同时用睫毛针稳住切片的位置,切片带就会粘在铜网上指定的位置。一枚铜网可粘两排切片带,每排4—5块切片。如果对切片的连续性要求不高;亦可采用更简便粘片法,即用睫毛针将水面上的切片拨到一起,用铜网的膜面接近切片,使切片粘附在铜网上。

VI. 染色 用毛细管滴一滴醋酸铅染液在铜网上,1—2分钟后用流水冲洗铜网约1分钟。用滤纸吸走铜网上的水,在白炽灯下烘烤铜网片刻后可入电子显微镜中观察。

醋酸铅染液配方<sup>[2]</sup>:以40%NaOH配制2%酒石酸钾钠。取1 ml上液,与5 ml 20%醋酸铅 $[Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3 H_2O]$ 混合,搅拌。稀释10倍后过滤备用。此染液pH值为酸性,不易沉淀,可在冰箱中长期保存。染色快速,方便,无污染。

VII. 花粉粒的电子显微镜制样方法 有些植物的花药很大。一枚烟草花药约含40,000个花粉粒;一

枚芍药花药中的花粉粒更多,花药长度均在3 mm以上,欲得到 $<1$  mm<sup>3</sup>的材料需将花药切成6块以上。花粉囊中松散排列的花粉往往散落到固定液中,随溶剂流失。在这种情况下,固定花粉粒比固定花药更有优越性,固定和包埋花粉的方法如下:

在固定液中撕开花药,抖出花粉。固定2小时后离心(100×g 5分钟),弃去上清液(固定液)。沉淀下来的花粉按上述处理花药的方法漂洗,后固定、脱水及包埋,只是每次更换溶液都要经过离心(100×g 5分钟)。使用花粉制样一定要掌握好离心速度,速度高于100×g则花粉容易破裂。

## 讨 论

欲得到满意的花粉超薄切片,应注意下述几点:(1)材料需新鲜,固定迅速。以磷酸钠缓冲液固定效果好。(2)脱水要彻底。在无水丙酮及无水乙醇中置放少量无水硫酸铜(包在定量滤纸中)以保持其无水。(3)以花粉等较坚硬组织或细胞为材料,Spurr包埋剂效果优于其它常用包埋剂(如Epon 812)。

按本文介绍方法细心操作,便能得到较理想的花粉超薄切片及电镜照片。本文所附图版,均为按上述方法操作所得到的亚显微结构照片。小孢子及花粉形状保持良好,细胞质细微结构清晰。

## 参 考 文 献

- [1] Spurr, A. R. 1969. *J. Ultrastruct.* 26:31-43.
- [2] Millonig, G. 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:736-739.

## 制备小鼠染色体新法——利用腹腔引流细胞制备染色体\*

郑瑞珍 冯燕玲 高晓虹 陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所)

利用外周血淋巴细胞体外培养法制备染色体,已被广泛应用于各类动物<sup>[1,4,5,8]</sup>。在小鼠也有成功的报道<sup>[3,6]</sup>,但在实际应用中还

极不稳定,用同样的材料和条件,分裂相也会

\* 刘若枫同志参加部分技术工作,李建荣同志参加相片放大,谨致谢意。

出现时有时无的现象,其原因尚不清楚。根据已有资料<sup>[3,5,10]</sup>和我们的经验,证明小鼠外周血淋巴细胞的培养,比大鼠以及人等对于培养条件、PHA的质量和操作过程都有更严格的要求。由于小鼠是一种常用的实验动物,不少实验要求不杀死动物检查染色体,有的实验还要求定期对某一实验动物进行重复检查,因此制备活小鼠染色体的简易方法有待解决,现将我们所建立的腹腔引流细胞制备染色体的方法介绍如下。

### 材 料 和 方 法

1. 取成年健康昆明小白鼠,♀♂不拘。
  2. 按无菌操作法进行实验,每只小鼠腹腔内注射无热源的小牛血清0.5毫升。
  3. 两天后每只小鼠腹腔内注射经37℃预热的Hanks氏液5毫升,然后轻轻按摩腹部使腹腔内液体充分混合。
  4. 握住小鼠使其腹部向下,并用两指轻压腹部两侧,以加大腹腔内压,插入注射器轻轻抽吸,腹腔内液体便慢慢流入注射器内。
  5. 将注射器内的液体注入离心管,以800 rpm离心5分钟,弃上清液。
  6. 沉淀物加1640培养液4毫升(内含0.8 μg秋水仙素,20%小牛血清和常规量青、链霉素)重新悬浮,转移至培养瓶内在37℃孵育3—4小时。
  7. 收集细胞,按常规制作染色体片和Giemsa染色。G带染色用胰酶—Giemsa法。
- 分裂指数:在Giemsa染色体制片上随机选取三个部位,计数视野里的分裂相和单核细胞总数之比。

### 结 果 与 讨 论

注射小牛血清后二天的小鼠腹腔液中含有多种细胞:有淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞、嗜中性细胞、嗜碱性细胞和嗜酸性细胞。细胞比例不完全一样,总的说来单核细胞占绝大多数,约占80%左右,多形核细胞占少数约20%。

实验共分三组,一次引流组,动物用小牛血清做腹腔内注射,两天后抽取腹水。二次引流组,动物在第一次引流后一周,再次腹腔内

表 1 I 各实验组分裂指数的变化

组别	动物数	所统计的细胞数		分裂指数 %	平均分裂指数 %
		中期细胞	单核细胞总数		
I 一次 引流 组	6	115	27979	0.41	0.5
		40	13472	0.30	
		243	77993	0.30	
		43	11944	0.36	
		69	16045	0.43	
	15	1268	1.18		
II 二次 引流 组	6	332	61946	0.56	0.73
		99	18900	0.52	
		147	30549	0.48	
		57	12270	0.55	
		9	716	1.20	
	24	2278	1.05		
III 对照组	3	1	9357	0.016	0.014
		2	6893	0.027	
		0	4128	0	

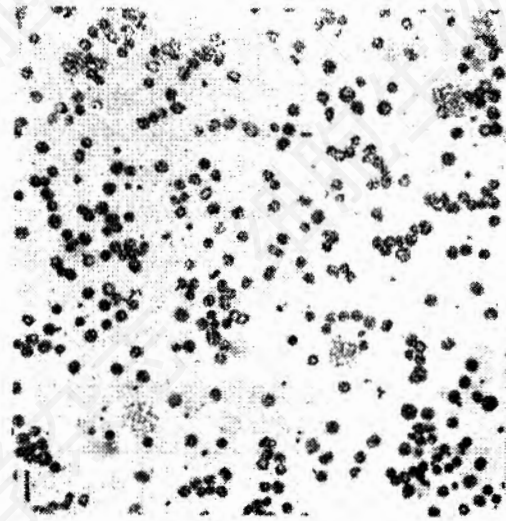


图 1 示分裂相 190×

注射小牛血清,两天后抽取腹水。对照组,动物不经处理,而在实验当天抽取腹腔液[见表1],三组分裂指数的均数分别为:对照组0.014%,一次引流组0.50%,二次引流组0.73%。很明显分裂指数随引流次数而增加。虽然一次引流组分裂指数仅千分之五,但腹腔引流液中细胞很多,每次每只小鼠能制片

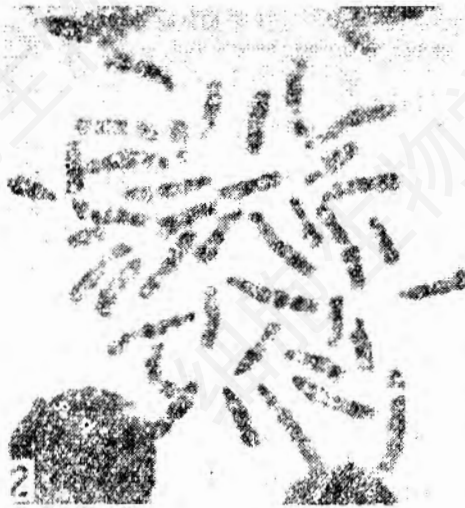


图2 小鼠染色体G带 2520×

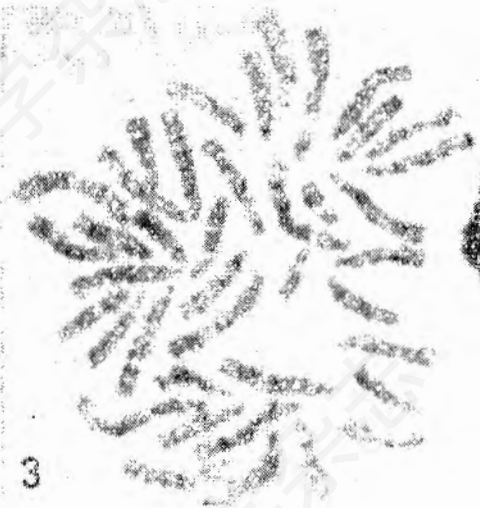


图3 示小鼠延伸的染色体G带带型 2520×

6—7张,每张片子细胞可多达几万到几十万,故每张片子的分裂相最少30多个,多至几百个,第二次引流组的分裂相更多,每张片子可多达上千个(见图1)。图面上有四个分裂相,有时一视野里可多达18个分裂相。我们还利用它进行小鼠染色体G带分析,获得足够数量分带良好的染色体,图2和图3显示小鼠染色体的G带图像,前者染色体稍微延伸,显示了所有的主带;后者染色体延伸较长,可以清晰地区分出Nesbitt和Franche(1973)所描绘的所有主带(major bands)和小带(minor bands)。

用腹腔引流法制备细胞染色体,方法简便,稳定,重复性高。现将此法与Michael(1974)<sup>[5]</sup>,

Willard等(1965)<sup>[10]</sup>以及我们在小鼠外周血培养方面的工作(未发表资料)做比较于下(见表2)。由于腹腔引流细胞取自腹水液,故没有心脏取血的危险性,也没有尾巴取血那样易于污染。另外腹腔引流液中单核细胞比外周血中的多得多。更重要的是腹腔引流法不需PHA,在体外只需培养3—4小时,因此避免一切源于PHA的不稳定因素。值得注意的是,第二次引流组比第一次引流组效果更好一些,这意味着小牛血清引起淋巴细胞发生母细胞转化和巨噬细胞大量增殖(Rowley等1964)<sup>[9]</sup>,因此若能增加腹腔内注射血清的次数,有可能增加腹腔引流细胞的分裂指数。

表2 制备小鼠染色体腹腔引流法与外周血培养法之比较

	外周血培养法	腹腔引流法
细胞来源	心脏取血或尾巴放血	腹腔引流
PHA	需	不必需
体外培养时间	48—72小时	3—4小时
培养条件	一定培养液,PHA,严格的pH和防凝剂	简单,只需要用无热源小牛血清腹腔内注射
细胞存活情况	细胞大量死亡,活细胞很少	活细胞很多,很少死亡
染色体	经常发生肿胀	正常
成功率	低,不稳定	高,稳定

## 参 考 资 料

- [1] 吴政安,杨慧一:1980 动物学报 26(1):18—23.
- [2] Green, E. L. 1966 *Biology of the laboratory mouse*. 2 d. ed. New York.
- [3] Iriman, I. K., M. I. Davisson & T. H. Roder.: 1975 *Cytogen. Cell Gent.* 15:166—176.
- [4] Knight, S., N. R. Ling., S. Sell & C. E. Oxuard.: 1965 *Immunol.* 9:565—574.
- [5] Michael, G. F., A. M. Hawk., L. T. Wetzel & G. C. Boxill.: 1974. *Mutation Res.* 26:401—405.
- [6] Moor, H. P., P. C. Nowell., W. J. Melman., D. M. Battips & D. A. Hunger-

- ford.; 1960 *Exptl. Cell Reseach.* 20:613.
- [7] Nesbitt. M. & U. Franke 1973 *Chromosome.* 41:145—156.
- [8] Nicholas W. W. & A. Levan.: 1962 *Blood.* 20:106—126.
- [9] Rowley, D. & C. Leuchtenberger.: 1964 *Lancet.* 2:743—735.
- [10] Willard, G. H., I. B. H. Hoppe & P. Nellesheim.: 1965 *Proc. soc. Exptl. Biol. Med.* 118:993—996.

## 用扫描数据计算细胞颗粒密度\*

张跃进 蔡永和 华强

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

胚胎发育过程中,细胞中的颗粒分布随发育的进展发生变化。为了更确切地描述这些变化,就需要选择一定的指标进行测算。譬如间隙连接是细胞质膜的特化结构,由膜内颗粒(Intramembranous particle, 简称 IMP)聚集而成(见图版)<sup>[1]</sup>。这些 IMP 的分布面积的大小以及它们的密度等等都是说明它们变化的指标,也是发育生物学学者所关心和感兴趣的。要进行上述指标的测算,首先将颗粒分布的区域拍成电镜图片的正片或负片,然后经过反射式或透射式光密度扫描,同时将图像数字化,存入磁盘,由微处理机作进一步处理。

目前最常用的把一幅图像转换为适于输入到数字计算机的设备的设备是显微光密度计、飞点扫描器、析象管和电视摄像机数字化转换器。这些设备耗资都很昂贵。我们从现有设备情况以及需要处理样品的要求出发,把一台 CS-900 薄层扫描仪(或国产同类型号仪器),稍经改造后(以由单板机控制的步进电机,代替原设备上垂直方向扫描的驱动电机),使原有的 ZIGZAG 扫描(一种之字形的双向扫描)的分辨率提高近 4 倍。该设备原来垂直分辨率为每 mm 获得 1~2 个数据,经改造后为每 mm 能获得 7 个数据。这样便能将一幅不大于  $3 \times 10 \text{ cm}^2$  的图像(由于受 CS-900 扫描仪行程的限制)经其扫描和数字化后送入微处理机的内存。从行式打印机上获得的数字图像能满意地反映出原电镜照片上 IMP 分布的真实情况。

CS-900 是机械式扫描仪,其输出的电信号经由  $\mu\text{C-Z 80}$  单板机控制的 8 位 16 路 A/D 转换器数字化,获得的数字化图像由 TRS-80 的 BASIC 程序进行处理。其图像处理的窗口,类似于照相取景框。具体方法是在白纸上开一个窗口,其形状按所要处理的细胞内颗粒分布的范围而定,但因受输入设备扫描行程的限制其面积不得大于  $3 \times 10 \text{ cm}^2$ 。这样的窗口可以避免细胞颗粒出现在边界上而造成的误差。把开了窗口的白纸覆盖到放大适当倍数的电镜照片上,使窗口与所要处理的区域相重合,再将其置于 CS-900 薄层扫描仪中进行反射式光密度或透射式光密度 ZIGZAG 扫描,在计算机软件的控制下能获得一个反映照片上灰度值的二维数字矩阵。

TRS-80 微处理机的处理程序由一系列模块程序所组成。图 2 为程序框图。其中第一个程序模块是控制数据输入。第二个程序模块按某个确定的灰度等级阈值  $D_L$  来鉴别 IMP 及照片本底,同时给每个 IMP 定位。而  $D_L$  值可以从灰度等级直方图中得到<sup>[2]</sup>。

$$D_L = D_b - f(D_b - D_c)$$

其中  $D_b$  为直方图中灰度等级出现次数最多的值,  $D_c$  为灰度等级中的最小值,  $f$  为一个小于 1 的系数。当测得某位置上的灰度等级小于  $D_L$ , 那末该位置认为是照片本底,反之则

\* 曾弥白同志对本文提出许多宝贵意见,在此致谢。