

植物材料的冷冻超薄切片制作法

林亚康

(杭州大学生物系)

冷冻超薄切片法比常规超薄切片法步骤少、速度快,它不需接触到剧烈的化学试剂及脱水、包埋等,并能良好地保存细胞中的一些水溶性物质,在电镜下所观察到的细胞结构更接近于自然状态。因此,它比较适合于形态学、电镜细胞化学和元素的X-射线微区分析等研究领域。

虽然冷冻超薄切片有许多优点,但其应用仍不如一般超薄切片那样普遍,其主要原因是冷冻超薄切片在技术上还存在着不少问题和有一定的局限性。例如:样品中易形成冰晶,切片易碎、易丢失、收集困难,某些结构并不如一般超薄切片清楚等等。尤其是植物材料,一般含有较多的水分(液泡)和较硬的细胞壁,其困难就相对要大些。现就植物材料的冷冻超薄切片制作法和在制片过程中常遇到的一些困难及其克服的办法作一介绍。

植物材料的冷冻超薄切片制作程序大体上包括如下五个方面:取材、冷冻固定、切片、切片的收集和染色。

一、取材

取材应具有代表性,根、茎、叶应取较幼嫩的组织为宜。把材料置于一只培养皿中,材料下垫一张滤纸,放在冰槽上(培养皿最好在冰槽中冷却),用双面刀片把它切割成一定的形状和大小,形状以长方体或正方体为宜,体积尽可能小,必须在1立方毫米以下。因为样品小,在以后的冷冻、切片中就较容易。

二、冷冻固定

样品的冷冻固定是整个过程的关键,如果固定不当,样品内就很易形成冰晶,一旦冰

晶形成,既破坏了细胞的精细结构,又致使超薄切片难以进行,切下来的样品往往会变成粉末。冷冻固定可以分为两类,一类是由Christensen、Hodson等发展的方法^[1],将材料不经任何预处理,直接进行快速冷冻;另一类是将材料作适当的预处理,即用戊二醛作预固定,然后用冰冻防护剂渗透,再进行快速冷冻。第一类方法的优点是步骤少、速度快,它适用于可溶性物质的放射自显影和X射线微区分析等。但该方法难度更大,多数材料不易冷冻好,更易形成冰晶,而且整个步骤包括电镜观察都必须在低温下进行。第二类方法适用于大多数的研究用途,尤其是作形态学和细胞化学的研究,并且这种方法比较容易做。现在大多数采用第二类方法,常用1—2.5%戊二醛作预固定,因为经戊二醛固定的材料,仍能保存大多数酶的活性,并且戊二醛对于膜结构和微丝、微管具有良好的保存作用(图2、3、4)。但也有人如Bernhard等用甲醛蒸汽来固定肌肉组织取得了较好的效果^[2],Hall认为这种方法对植物组织无明显的效果^[3]。

目前常用作冰冻防护剂的试剂有三种:甘油、二甲亚砜(DMSO)和蔗糖液。常用的甘油浓度为20—30%,DMSO为20%,蔗糖为0.5—2.3M,但必须根据不同的材料选择不同的试剂和不同的浓度。徐伟等用30%的甘油在动物组织中获得了较好的冷冻效果^[4]。Tokuyasu认为把植物组织用0.5—2.3M蔗糖溶液渗透10—20分钟,常能产生好的结果^[5]。我们对植物材料用25—30%甘油和蔗糖作为冰冻防护剂试验,结果用1—1.5M蔗糖液渗透30分钟更有效,它可以使整个样品都能冷冻好,可作连续切片。一般情况下,含水量较

多的组织蔗糖浓度稍高一点,而含水量较少的组织蔗糖浓度可略低点。虽然蔗糖在切片中有时会造成局部污染,但可以用0.1 M磷酸缓冲液漂洗几分钟,即可洗去蔗糖。其办法为:用一只培养皿(最好是蜡盘)置于冰槽上,在蜡盘上滴几滴缓冲液,将切片漂浮在缓冲液上,几分钟后即可。

1. 冷冻前的预处理

(1) 将样品用1—2.5%戊二醛(0.1 M磷酸缓冲液或0.1 M二甲砷酸钠缓冲液, pH7.2—7.4)在冰箱中固定0.5—2小时。固定的时间不同的材料和不同的组织要有所不同,一般含水量较多、较幼嫩的组织,如油菜、菠菜的叶和植物的原生质体、愈伤组织,固定时间可短些,一般30分钟到1小时即可。而固定液不易渗入的一些组织,如禾本科植物的叶以及大麦、小麦、水稻的花药等,固定时间可适当长些。

(2) 把经戊二醛固定过的材料转移到1—1.5 M蔗糖溶液中,渗透20—30分钟,一般当样品下沉到底部就可。

2. 快速冷冻

样品经过预处理之后即进行快速冷冻。常用的有三种冷冻方法:(1)用液氮直接冷冻法;(2)中间冷媒法;(3)金属接触法^[4]。我们用的是第一种方法,此法简单易行,不需任何复杂的工具,只要一只广口保温瓶即可。其方法是:先将经过固定、冰冻防护剂处理的材料切成约0.1立方毫米大小,并使切面成为长方形(如果材料在固定前已切成一定的规格,就不必再切或略作修整),平整地放在样品台上,样品台顶上滴一点蔗糖液,蔗糖液不宜太多,只要能够粘住样品就可以。这样的好处是冷冻后的样品在切片前不必作任何修整就可切片。因为没有特殊的工具,冷冻后的样品要进行修块是一件很不容易的事,即使用切片机来修块,也常会使样品发生断裂。

样品放好后用一根绝热性能好的塑料棒或小木棒作把柄插入样品台的小孔中,然后将样

品台连同材料一起插入液氮中,待温度达到平衡后,就可以转移到超薄切片机上进行切片。

但应用此法必须注意的是,当样品投入液氮后,在样品周围常会形成液氮的汽泡层而影响冷冻速率。为防止这一点,必须将样品台擦洗干净,除去容器中的液氮气体分子。Sjöstrand等曾用一个真空泵连接杜瓦瓶,可以使液氮的温度接近固态氮的温度,用这种超冷液氮再来冷冻样品能得到较好的冷冻效果^[6]。

三、切片

1. 冷冻超薄切片装置

用于冷冻超薄切片的装置早期的有Cryostat,现在商品有Reichert FC-150、Sorvall FTS bowl和LKB Cryokit。Cryokit能应用到LKB、Reichert和Sorvall的Porter-Blum MT-2等超薄切片机上。Cryokit一般用液氮作冷冻液,温度可降到-170℃,它使用比较方便,在不做冷冻超薄切片时,可把Cryokit移开,并且可以在室温下使用。

2. 切片方法

切片常用的有两种方法,即液槽法和干刀法。液槽法常用DMSO作槽液,但它温度不能太低,60%DMSO在-60℃下就要冻结,并且DMSO不适用于某些细胞化学和免疫化学,它会抑制酸性磷酸酶(acid phosphatases)的活性,切片在用缓冲液或水洗去DMSO的同时,也会把某些细胞内含物洗去。

用干刀法就可以克服这些缺点,它可以在很低的温度下作连续切片,所制作的切片可以不需接触任何试剂直接上电镜观察。但干刀切片易受环境条件的影响,尤其是湿度的因素,对冷冻超薄切片干扰最大,在春、夏、秋三季中尤为突出。如果室内湿度高,在刀口上常会结成冰花,使得切片无法进行。要解决这个问题,必须使室内的湿度尽可能低。为此,在室内我们除用去湿机外,还要使切片机上的冷冻室尽量保持一个“密闭”的环境,并在冷冻室内放置一些变色硅胶以降低湿度,收到了一定的

效果。

3. 切片时温度的控制

切片的温度要根据样品的种类和切片的厚度而定。温度低虽然能切出较薄的切片,但会使样品发脆,切片易碎,不易成连续切片。温度过高会使样品发软,切不出较薄的切片。**Appleton**认为在冰晶点 -60°C 以下的温度对绝大多数生物材料既安全又好。在切片期间部分切片常会丢失,要减少切片的丢失,**Roomans**等认为切片时的温度必须很低,他们把样品的温度控制在 -140°C — -145°C ,刀的温度在 -100°C 对酵母进行了切片。发现这么低的温度,尽管样品很易碎,但有减少切片丢失的优点^[7]。

据笔者的经验,对于植物材料来说,样品的温度控制在 -90°C — -110°C ,刀温控制在 -70°C — -90°C 为宜。在此温度内比较容易获得连续的超薄切片带。较好的切片带在显微镜下观察往往象一条极薄的玻璃纸。

四、切片的收集

切片的收集是冷冻超薄切片中一个较难的问题。如果是用液槽法切片,问题并不大,与常规超薄切片收集方法相当。如果是用干刀切片,那么收集切片的困难就显得突出。如收集方法不当会使切片皱折、重叠,甚至丢失。现将干刀切片的收集法介绍如下:

一种方法是用一根眼睫毛收集切片带,再用一根冷却的铜棒把切片按在覆盖有**Formvar**膜的铜网上^[8]。

另一种方法是用一滴 2M 或蔗糖饱和液粘取切片,然后置于载网上,再将蔗糖用水洗去^[9]。但此法不适用于未经固定的样品,由于蔗糖和水的表面张力会使切片散开和丢失。在这种情况下,**Tokuyasu**和**Singer**建议在蔗糖溶液中加入一些明胶(0.5—2%)。用低浓度的蔗糖溶液来洗铜网^[9]。

这两种方法虽有优点,但也有缺点,前者切片易碎和丢失,后者捞取方便,但水洗时易

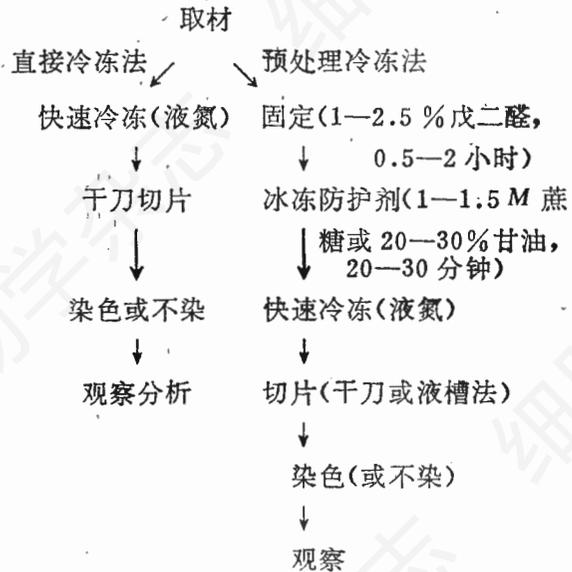
使某些细胞内含物流失。作者采用了将铜网直接粘取切片带的方法,即:在切片过程中用一根毛发按住切片带以免切片带发生卷曲,然后用覆盖有**Formvar**膜的铜网,膜面朝下,直接粘取切片。但铜网不宜过冷,否则会粘不住切片,一般当铜网从室温下移入刀台上稍停一下便可粘取。此法简便,且效果好。

所粘取的切片可以立即转移到室温中,但这样由于冰的融化易损伤细胞中的某些精细结构,为防止这一点可将所捞取的切片先置于冷冻室内若干小时,后再移到室温中。

五、染色

作形态学观察的切片,最快的方法是用0.1—2%硅钨酸或磷钨酸($\text{pH } 7-7.2$)负染,在切片上滴一小滴染液,染色10—30秒,然后用滤纸把染液吸干。也可以用0.5—3%醋酸铀和柠檬酸铅作正染。再者就是不经任何染色,直接上电镜观察,此法适用于元素的X-射线微区分析和形态观察等。

综上所述可将制作植物材料的冷冻超薄切片过程归结如下:



以上仅仅是对植物材料的冷冻超薄切片制作法作一般性的介绍,但对不同的植物组织要作不同的处理,如果是花药,修块在冷冻前进

行较好；如果是花粉，那么在戊二醛固定后经慢速离心(500—800 g)5分钟，弃固定液，在花粉中可加入适量半凝状态的3%琼脂，琼脂凝固后取花粉密度较高的部分，把它切成一定的大小和形状，然后再进行下一步的处理；如果是愈伤组织，修块可在戊二醛固定前后进行。总之，由于植物材料种类多，变化大，而同株植物中各组织之间其含水量及软硬度相差也很大，其处理方法也必须作相应的修改。要做好冷冻超薄切片需要实践和体会，主要还是要靠自己的摸索。

参 考 文 献

[1] Hodson, S. and Williams, L., 1976, *J.*

Cell Sci., 20, 687.

[2] Bernhard, W. and Viron, A., 1971, *J. Cell Biol.*, 53, 798—808.

[3] Hall, J. L., 1978, *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam-Oxford-New York, 26—34.

[4] 徐伟, 门绍杰, 1980, *生物化学与生物物理进展*, 4, 18—22.

[5] Tokuyasu, K. T., 1973, *J. Cell Biol.*, 71, 894—906.

[6] Sjöstrand, F. S. and Elfvin, L. G. 1964, *J. Ultrastruct. Res.*, 10, 263—292.

[7] Roomans, G. M. and Seveus, L. A. 1976, *J. Cell Sci.*, 21, 119—127.

[8] Christensen, A. K., 1971, *J. Cell Biol.*, 51, 772—804.

[9] Tokuyasu, K. T. and Singer, S. J., 1976, *J. Cell Biol.*, 71, 894—906.

信息核糖核酸直接在琼脂糖凝胶上的原位杂交检测

何 全 品

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

核酸印迹法是已被广泛用于检测各种核酸分子及其片段的重要工具。直接在琼脂糖凝胶上做DNA分子杂交取得了很好的结果^[1,2,3]，但应用于RNA的原位杂交测定的报道还很少。

我们用此方法检测了大鼠肝癌BERH-2甲胎蛋白信使核糖核酸，结果良好。现将方法介绍如下：

(1) 将BERH-2细胞质总RNA(5—40微克，递

增5微克)在1.2%琼脂糖凝胶(含溴乙啶0.5微克/毫升, 8×10×0.3厘米)上用磷酸缓冲液(0.01M, pH 7.0)在30伏电压下电泳3—4小时；当指示染料进入凝胶后，从阴极到阳极方向循环电极液。

(2) 电泳结束并作紫外荧光照相后，立即把凝胶浸泡在95%乙醇中30分钟，接着把凝胶铺在透析膜或玻璃纸上并在其上覆盖滤纸，用吸水纸轻压吸干，或者在凝胶干燥器上干燥。

(3) 把完全干燥的凝胶(薄如滤膜，具韧性)装入塑料袋，并注入预杂交液(5×SSC/5×Denhardt's/10 mM EDTA/0.1% SDS/100微克酵母转移RNA/毫升)在42℃水浴中预杂交2小时，接着添加放射性同位素标记的探针cDNA_{AFP1}，杂交16小时。

(4) 洗涤，在2×SSC/0.1% SDS溶液中，42℃洗涤2次，每次30分钟；又在0.1×SSC/0.1% SDS溶液中室温洗涤2次，每次15分钟，然后干燥。

(5) 把干燥凝胶贴在X-光片上并加增感屏，放在-70℃冰箱曝光5天，洗片子。

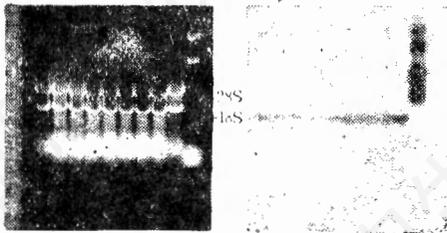


图1 BERH-2细胞质总RNA的凝胶电泳紫外荧光照相(A)和它与cDNA_{AFP1}的凝胶原位杂交放射自显影图谱(B)。右侧一行样品为pBR₃₂₂-AFP1克隆DNA

(接126页)

之间存在一个动态的变化过程。在胞质分裂过程中,成膜体微管活跃的变化与细胞板的形成和壁物质的运输显然也是密切相关的。早前期核被膜荧光区的性质和意义也尚不清楚。所有这些问题都值得进一步研究。

图版说明

大蒜根尖细胞的间接免疫荧光照片,使用兔抗猪脑微管蛋白血清,羊抗兔IgG-FITC二级抗体。Olympus BH-RFL-W荧光显微镜观察,激发波长490 nm,阻挡滤光片0530。

图 1×600,图 2—12×1200

- 图 1 一个伸长细胞,示周缘微管。
 图 2 一个有丝分裂前期细胞,示发育早期的早前期带。
 图 3—4 前期细胞,示早前期带和核被膜荧光。
 图 5 一个前期细胞,示核表面聚合形式的微管。
 图 6 一个前期细胞,示纺锤体极在核表面形成。
 图 7 一个中期细胞,示对角分裂细胞的纺锤体。
 图 8—9 后期细胞,示有丝分裂后期纺锤体,可见纺锤体极丝(图 8)。
 图 10 一个末期细胞,示发育早期的成膜体微管。
 图 11 一个末期细胞,示扁桶状成膜体微管,中间有一不发光的环。
 图 12 一个末期细胞,示胞质分裂后期的成膜

体微管。

参 考 文 献

- [1] Gunning, B. E. M. & A. R. Hardham, 1982, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 651-698.
 [2] Lloyd, C. W., 1982, *Cytoskeleton in plant growth and development*. London: Academic.
 [3] Weber, K. et al., 1975, *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 459-463.
 [4] Osborn, M. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77: R 27-R 34.
 [5] Franke, W. W. et al., 1977, *Cytobiologie*, 15: 24-48.
 [6] Wick, S. M. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 89: 685-690.
 [7] Wick, S.M. & J. Duniec, 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 235-243.
 [8] Wick, S. M. & J. Duniec, 1984, *Protoplasma*, 122: 45-55.
 [9] 简令成、孙龙华、孙德兰, 1984, 小麦叶片细胞周质微管的研究, *实验生物学报*, 17: 149-159
 [10] Shelanski, M. L. et al., 1973, *proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 765-768.
 [11] Laemmli, U. K., 1970, *Nature*, 227: 680-685.
 [12] Valk, P. Van der. et al., 1980, *protoplasma*, 105: 27-43.

(接封三)

pBR 322-AFP₁ 由 Tilghman 构建, 周光宇教授赠送。用 Hind III 切出其中的 cDNA_{AFP₁} 并按 Rigby 等^[4]方法作缺口移位标记。

对 RNA, 特别是对 mRNA 的保存和检测, 此法具有以下优点: (1) 电泳前 RNA 不需用醛等试剂变性, 而试剂变性有时重复性较差; (2) 电泳后不需转移, 而转移前的处理(微碱溶液)往往容易引起 RNA 的降解, 并在转移过程中大分子 RNA 在胶上很难转移完全, 小分子 RNA 又会穿过薄膜而丢失。原位杂交图谱表明, RNA 的杂交带紧密清晰, 没有扩散现象。

此外, 在实际操作过程中, 我们还有以下几点体会: (1) 用乙醇浸泡凝胶既可防止核酸的降解而利于核酸的保存, 又可加快凝胶的干燥进程。(2) 如果在凝胶尚未完全干燥前动用, 容易使它变成皱缩不平, 即使发生了这种情况, 还可将它重新浸泡而得到纠正。

(3) 用预杂交液简短地平衡凝胶, 可使本底更清楚, 也可维持杂交液的体积。(4) 凝胶在干燥过程中会稍微膨胀, 但这不会影响杂交结果, 在作放射自显影之前把凝胶充分干燥可以保持杂交信号的强度和降低本底。(5) 凝胶的干燥用真空干燥法比吸水干燥法更有利于核酸样品的保留。(6) RNA 不经醛化及碱处理仍可检测。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
 [2] Alwine, J. C., et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350-5354.
 [3] 张志新等, 1985, *细胞生物学杂志* 7, 171-174.
 [4] Rigby, P. W. J., et al., 1977, *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.