

达。雄激素还可通过引起 Poly(A) 聚合酶活性增加等变化影响转录后加工。最后讨论了靶组织染色质结构特点及染色质上受体复合物结合位点的分布。

参 考 文 献

- [1] Mainwaring, W. I. P. 1977, In *The Mechanism of Action of Androgen*. pp 43—47, Spinger-Verlag, New York.
- [2] Anderson, K. M. & Liao, S. 1968, *Nature* (Lond.), 219: 277—279.
- [3] Fang, S. & Liao, S. 1971, *J. Biol. Chem.*, 246: 16—24.
- [4] Bishop, J. O. et al., 1974, *Nature*(Lond.), 250: 199—204.
- [5] Hiremath, S. T. et al., 1981, *Exp. Cell Res.* 134: 193—200.
- [6] Peeters, B. et al., 1982, *Eur. J. Biochem.* 123: 55—62.
- [7] Mpanias, O. D. et al., 1983, *Mol. cell Biochem.* 56: 145—154.
- [8] Chamberlin, L. L. et al., 1983, *Biochem.* 22: 3072—3077.
- [9] Xu, Y. H. et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 624—629.
- [10] Parker, M. G. & Mainwaring, W. I. P., 1978, *J. Steroid Biochem.* 9: 455—460.
- [11] Loo, R. M. et al., 1977, *Biochem. Biophys. Acta.* 477: 312—321.
- [12] Parker, M. G. et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 6996—7001.
- [13] Chen, C. et al. 1979, *J. Steroid Biochem.* 11: 401—405.
- [14] Parker, M. G. et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 12—15.
- [15] Jacob, S. T. et al., 1976, *Biochem. J.* 153: 733—735.
- [16] Hiremath, S. T. & Wang, T. Y. 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1200—1205.
- [17] Liao, S. et al., 1981, Cellular dynamics of androgen receptor and protein induction in the Ventral prostate. in *The Prostate Cell Structure and Function Part A*, pp 381—389.
- [18] Hiremath, S. T. & Wang, T. Y. 1982, *Cell Bio. Interl. Rep.* 6: 279—285.
- [19] Gorski, J. & Cannon, F., 1976, *Annual Review of Physiology* 38: 425—450.
- [20] King, W. J. & Greene, G. L., 1984, *Nature*(Lond.) 307: 745—747.
- [21] Welshon, W. V. et al. 1984, *Nature* (Lond.) 307: 747—749.
- [22] Tymoczko, J. L. & Liao, S. 1971, *Biochem. Biophys. Acta.* 252: 607—611.
- [23] Hiremath, S. T. et al. 1981, *Biochem. Biophys. Acta.* 653: 130—138.
- [24] Mainwaring, W. I. P. et al., 1976, *Biochem. J.* 156: 129—141.
- [25] Gazit, B. et al., 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 1787—1790.
- [26] Liao, S. et al., 1973, *Nature N. B.* 241: 211—213.
- [27] Barrack, E. R. & Coffey, D. B. 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 7265—7275.
- [28] Klyzsejko-Stefanowicz, L. et al. 1976, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 1954—1958.
- [29] Nyberg, L. M. & Wang, T. Y. 1976, *J. Steroid Biochem.* 7: 276—273.

扫描电镜的细胞表面分子标记术*

洪 龙 生

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

细胞表面分子的一个重要特点是与特异的配体结合, 并能将信息传至细胞内使之产生生物效应。要了解细胞表面分子的上述特点常需测定它们的分布和数量。早先, 人们^[1]曾用荧光标记的配体在光镜下观察细胞表面分子, 以

后为弥补光镜分辨率的不足而用免疫酶标^[2], 或铁蛋白标记^[3], 使它能在透射电镜(TEM)下观察, 但 TEM 的每一个超薄切片中所得的表

* 承蒙顾国彦教授的直接指导和周郑老师的不断鼓励、帮助, 特此致谢。

面积太少。采用连续超薄切片,工作量又太大。扫描电镜(SEM)的分辨率比光镜高得多,立体感强,样品的制备也相对较易,逐步成为研究细胞表面的有力工具。通过近二十年的探索,在测定细胞表面特异分子和基团的分布与数量方面建立了一些方法,积累了不少经验。本文仅就 SEM 的细胞表面标记术作一简述。

一、标记物的选择和制备

标记物(Marker)必须是在 SEM 下易于识别,稳定性好,并能直接或间接地与细胞表面分子专一地结合的颗粒(或分子)。

SEM 对标记物的要求如下:

1. 形状和大小 应选择易与背景的形态有区别的、形状一致、大小均匀的标记物。如果细胞表面有圆形突起物,则圆柱形或杆状的标记物就比球形的好。若需同时观察两种不同受体的分布,可使用两种不同形状的标记物。

标记物的大小应略大于 SEM 的分辨率。比如,要获得细胞表面特异分子的分布图和数量,在高分辨率的 SEM 下使用 10—50 毫微米大小的标记物,可不致于遮盖细胞表面本身的结构(如微绒毛,褶皱等);用直径 80—150 毫微米的标记物,可在低倍率的 SEM 下同时观察到几个标记细胞。此外,标记物必须是稳定的,即在 SEM 样品制备过程中,其大小、形状不变。通常使用的固定法既能固定细胞,也能稳定标记物。标记物长期存放容易产生自凝。一旦自凝,不仅分子大小发生变化,其表面性质也有改变,以致在细胞表面出现非特异的结合,故标记物常需新鲜制备。

2. 种类 表 1 中列举了目前国内外已使用的几类标记物。

(1) 血蓝蛋白 存在于无脊椎动物(如文蛤、螺类、蜆等)的淋巴液中。由于取材容易,纯化简便^[4],大小有别,形状各异,又具有双

表 1 细胞表面标记物

名 称	直径大小(纳米)	形 状	特异性能
1. 生物大分子:			
血蓝蛋白—海 螺	35×50	圆 柱 体	以共价键形式 通过 NH ₂ 连接
中国蜆	25	圆 柱 体	
文 蛤	60	球 形	
铁蛋白	10—15	球 形	
烟草花叶病病毒(TMV)	15×300	棒 形	
灌木矮缩病病毒(BSV)	30	球 形	
猿猴空泡病毒(SV ₄₀)	40—50		
噬菌体 T ₄ , T ₂	220	头尾结合	
2. 人工合成颗粒:			
聚苯乙烯胶乳球	200—1000	球 形	以羧化为结合形式
聚甲基丙烯酸酯	500—1000	球 形	
共聚微小球	30—340	球 形	
含铁葡聚糖	20—40	球 形	通过 NH ₂ , COOH, OH 共价结合
胶体金	5—150	球 形	通过 $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$ 或 NH ₂ 共价结合
3. 其它:			
荧光素			
过氧化物酶反应产物	根据反应时间不同可能在 30—50		粗糙的圆形
³ H 放射自显术柱子	200—300	不规则的银粒沉淀	

功能基团,对伴刀豆球蛋白A(ConA)有高亲和性,故广泛用以测定细胞表面ConA受体的分布^[5]。若将血蓝蛋白与抗体分子或其它分子连结,通过抗原—抗体,或受体—配体反应,可检测细胞表面其它分子的分布。

(2) 病毒颗粒和噬菌体 常用的病毒颗粒和噬菌体的繁殖、纯化都较简易。如纯化烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV),只需将感染了病毒的烟草叶抽提物离心,10—15%蔗糖梯度,50,000 g 离心2小时即成。又如噬菌体T₄,培育于大肠杆菌(E. Coli B)中,纯化时将细菌裂解,低速离心除去细胞碎片,上清液在11,000 g 离心30—40分钟,沉淀悬浮于PBS中,再离心一次即可。已有多种植物病毒和一种动物病毒作标记物。TMV适于低倍SEM下观察,在高倍SEM下,因它的分子较长会遮盖细胞表面另一些(邻近的)分子的结合位点。TMV在纯化或标记过程中有时会断裂成长短不一的断片,而不易与细胞表面的微绒毛或突起相区别。芜菁黄色花叶病病毒(Turnip yellow mosaic virus),灌木矮缩病病毒(Bushy stunt virus),南方豆荚花叶病病毒(Southern Bean mosaic virus)等也都被用作标记物。此外,猿猴空泡病毒(SV₄₀)也用作过标记物。噬菌体(T₄、T₂)^[6](图1)具有清晰的六角形头部,加上尾部,直径约220毫微米,适于在低倍率的SEM下使用。

(3) 铁蛋白 一般从马脾中提取纯化而得^[7]。其分子直径约为10—15毫微米(随材料制备方法的不同而略有差异)。目前国内常用的SEM一般尚观察不到铁蛋白颗粒。

(4) 人工合成的胶乳微小球 Molday等^[8]人工合成了多种规格的聚乙烯胶乳颗粒,直径从30—340毫微米,可以选择使用。这种颗粒缺乏特异的反应基团,常需接上各种化学功能基团如羧基、氨基或羟基等后方能使用^[9]。这种小球称为共聚小球。共聚小球能大量合成,稳定性强,大小均一,加 $20 \times 10^{-3} \text{ mol/L NaN}_3$ 可长期贮存。若小球中包了荧光染料^[9]则既能

在荧光显微镜下,又可在SEM下观察^[10](图2)。利用不同直径的共聚小球,还可在同一个细胞上观察到不同受体分子的分布^[11](图3),或区分不同类型的细胞^[12]。上海医化所也合成了有功能团的羧化聚苯乙烯胶乳^[13],并成功地标记了A型红血球表面的A抗原。但目前国内制备出的胶乳颗粒直径还太大,大小也不完全一致,因而影响了检测的精度。

(5) 胶体金粒 Horisberger等^[14]用胶体金粒作标记物,在酵母细胞上已得满意结果(图4)。胶体金有两大优点,一是制备简便,能制成各种大小。通过表面的负电荷能吸附抗体分子、植物凝集素和蛋白A(Protein A)等。其二,金是重金属,电子密度强,具有强烈的二次电子散射,TEM、SEM都可使用。胶体金易聚集成团,引起非特异性吸附,若在制备时加防护剂则可避免。用胶体金作标记物的具体操作和注意事项可参阅文献^[15]。

(6) 其它标记物 过氧化物酶也可用于标记。酶能催化产生电子密度较强的产物,故也有应用辣根过氧化物酶,或用抗酶抗体连成的“酶桥”间接标记细胞。它的直径大小根据酶反应时间的长短而有差异。一般约为30—50毫微米。缺点是形状不规则,有时易与粗糙的细胞表面混淆。此外,还有³H-放射自显术的银颗粒、荧光素分子和氧化硅小球等。

二、配体(Ligand)

标记物一般不能与细胞表面特异分子直接相连,除非通过配体。配体是能与细胞表面某种分子或基团特异结合的物质。配体选择的要求是特异性强,亲和性高。目前最广泛使用的配体有植物凝集素^[12],抗体分子^[9]和药物^[16]等。

1. 植物凝集素 是一类能与特异的糖结合的蛋白质。细胞表面有多种糖蛋白,它们各具特异的生物学功能,因此可用植物凝集素来标记和观察它们在细胞表面的分布和数量。一种糖蛋白含有多种糖类残基,而糖残基的种类

有限(仅约9种),故不同糖蛋白常含有同种糖残基而与同种植物凝集素起反应,因此植物凝集素作为配体的特异性不如抗体分子强。

2. 抗体分子 细胞表面分子大多有很强的抗原性,能引起相应的抗体。一般抗体分子为免疫球蛋白G(IgG),它有二个功能团,为了避免因其结合而引起细胞表面分子凝集,通常先经木瓜蛋白酶水解成Fc和F(ab)₂两部分。F(ab)₂再经含巯基的物质处理可得单价的F(ab),F(ab)与IgG具有相同功能,能与细胞表面相应的分子结合而表现其亲和性,避免了上述的缺点。

三、标记物与配体的联结

1. 共价键结合法 戊二醛是一种常用的、能在二个氨基间交联的双功能交联剂。Avrameas^[17]用它将过氧化物酶与配体交联,施渭康^[7]等将铁蛋白、我们^[4]将血蓝蛋白与抗体分子或凝集素交联。交联可分一步或二步进行。具体操作是:一步法,用0.2毫升0.05%的戊二醛缓慢地加到2毫升含2—4毫克抗体分子和10—20毫克的标记物溶液中(溶液以0.01 mol/L PBS稀释),在25℃下搅拌1小时,再以甘氨酸终止反应。此法程序简便,但能形成五种产物:游离的抗体和标记物、抗体-标记物、标记物-标记物、抗体-抗体。二步法,标记物5—10毫克/毫升在PBS液稀释下与1—5%的戊二醛室温反应1—2小时,过量的戊二醛以Sephadex G 50层析柱洗脱,或以二次1立升的PBS液透析过夜。再加等体积的1—2毫克/毫升的抗体分子于上述活化的标记物溶液中,室温搅拌6—12小时,最后以甘氨酸0.05 mol/L浓度终止反应。二步法能减少分子间交联,特异性较高。

除戊二醛外,还有人^[13]用碳化二亚胺与羧基基团交联,产生能与氨基起反应的结合物。Singer还曾用m-二次甲苯、二异氰化物等作交联,但这些试剂与戊二醛相比,交联后产物的活力都低。许多生化学者用不均一双功能团试

剂作交联剂,取得良好效果。3-(2-吡啶二硫基)丙酸-N琥珀酰亚胺酯(SPDP)的一端为羧基,能与蛋白分子的氨基交联,另一端是双硫键,可与蛋白的巯氢基交联,可避免交联时产生多种成分的弊病^[18]。

2. 非共价键吸附法 聚苯乙烯胶乳球和胶体金表面虽不含化学功能团,但可非特异地吸附配体。疏水的胶乳小球一般以1毫克/毫升的悬液和0.2 mol/L的IgG在PBS pH 7.6下缓慢搅拌(4℃,6小时)使其吸附。胶体金在水中表面带负电荷,它能快速地吸附一层蛋白分子,但这种金粒在缓冲液中会絮凝,用聚乙二醇能阻止自凝。加NaN₃ 0.5毫克/毫升,并保存在4℃可维持二年以上不失活。蛋白的浓度、缓冲液的pH值对这种非共价键的吸附影响很大,故在联结前先要了解最适浓度等。如对胶体金,可先将配体倍比稀释,与一定浓度的紫红色胶体金液混合,加入适量NaCl,振荡3—5分钟后视溶液的颜色不再从紫红色变蓝色的那管稀释液为胶体金吸附的最适浓度。

3. 配体-标记物的纯化和注意事项用戊二醛等均一双功能团试剂作交联的反应物因有多种成分,在使用前需将配体-标记物分离出来。一般以柱层析分离纯化^[17],若使用亲和层析柱,则更能获得纯度好、活性高的结合物。利用某些连有糖基的凝胶可直接纯化某些相应的标记植物凝集素。此外,硫酸铵沉淀、超速离心^[19]、密度-梯度离心等都能达到纯化目的。测试纯化后结合活性的方法很多,常用的有免疫电泳法、抗体-抗体凝集法,血球凝集法等。结合物一般应灭菌或加 10×10^{-3} mol/L NaN₃贮存于4℃,避免冰冻保存(因冰融后常自凝和失活)。如果加了NaN₃,在使用前需去除,不然会影响抗原的分布和细胞的形态^[20]。

四、细胞表面分子的标记法与结果的分析

1. 标记细胞表面分子的方法,按结合物与细胞表面分子结合的形式可分直接法和间接法

两种。直接法:指细胞表面分子在适当的温度、时间、缓冲液等条件下与结合物直接(一步)结合(图1)。此法的优点是快速简便,细胞与配体结合仅需一次温育和洗涤,故当细胞与配体结合时可以控制细胞表面分子的重新分布,标出的位点也比间接法更接近于原位。但要注意选择的标记物之大小不能超过欲测分子位点的间隔,要求配体的纯度也较高。对抗体分子来说,自从单克隆抗体问世以来,纯度问题已经得到解决。

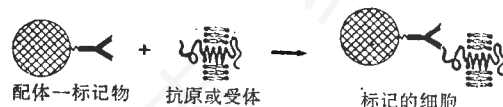


图1 直接(一步)标记法

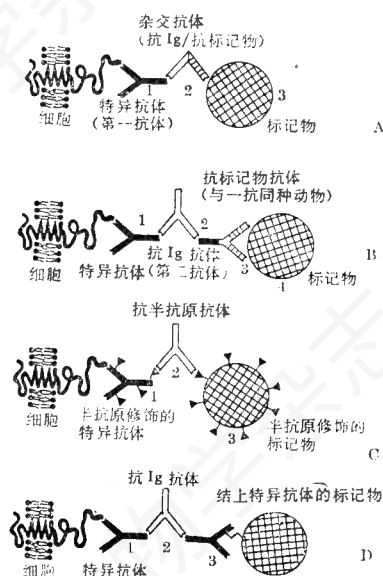


图2 间接(多步)法。数字表示结合步骤

- A. 杂交抗体法
- B. 未标记抗体法
- C. 半抗原夹心法
- D. 间接桥法

间接法:为防止在细胞标记过程中配体受损,或亲和力降低,需用间接法(图2)。此法包括二步:先接上抗细胞表面特异分子的抗体(称第一抗体,一般为兔血清),再用接好抗第一抗体的IgG(称第二抗体,一般用羊血清)的

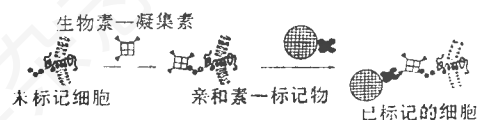


图3 生物素-亲和素(ABC)标记法

结合物,与结上一抗的细胞温育即可。由于免疫学的飞快发展,在标记中还可变换抗体分子的形式,其活性不变,效果更佳。如杂交抗体技术^[21],是将第一抗体的F(ab)与抗标记物抗体分子的F(ab)交联在一起。半抗原夹心法是以半抗原修饰一抗,再与结合物(抗半抗原的抗体与标记物相连)起反应。还有间接桥法^[9],未标记抗体法^[22]和生物素-亲和素(即ABC)法(图3)。这些方法虽有优点,但因操作程序过长,可能会引起细胞表面形态的改变和增加非特异性。

2. 标记细胞的操作步骤 生长在盖片上的,或吸附在涂有多聚赖氨酸玻片上的细胞,经生理缓冲液洗涤后,滴上结合物温育1—30分钟(直接法);或滴上第一抗体,温育、洗涤,再滴上第二抗体和/或结合物温育(间接法)。洗涤后将标记的细胞固定于0.2%戊二醛中(磷酸钠盐或磷酸缓冲液),1小时后便可进行SEM的样品制作。其程序如下:洗去戊二醛,细胞经“钨酸单宁酸-钨酸”法处理各10—30分钟,水洗后乙醇脱水,经醋酸异戊酯、临界点干燥,真空喷涂碳和金,SEM观察。

3. 结果分析 实验组如果是阴性,则要考虑(1)第一抗体(或配体),或结合物是否有活性?故标记前要测试它们的活力、最适浓度等,已建立的各种免疫学测试法都可使用。(2)不适当的标记条件也会导致阴性结果。如细胞在标记前先固定,则会使表面抗原或受体失活^[23],若未固定的细胞又可能在标记过程中引起细胞表面分子的重新分布^[24],或内吞而淹没。此外,可能由于标记物太大,在细胞表面产生了空间障碍而使结果呈弱阳性。若发生这种情况可考虑用间接免疫荧光术,或放射自显术,或免疫酶标,乃至以极短的温育时间来证

实细胞表面确有该种分子存在,再以较小的标记物(如铁蛋白、胶体金等)作标记物。实验组获得阳性结果时也不可随便轻信,每次实验中必须设计好相应的对照组,以证明实验组的特异性。如欲测凝集素受体,必须有相应的糖基作竞争抑制对照;若测细胞表面抗原,则必须先将该抗原位点封闭,或以正常血清替代抗血清作对照。

摘 要

近年来扫描电镜的细胞表面分子标记术有较大进展,使用的标记物已达十几种,这些标记物具有易识别、稳定性好等特点。使用的配体则有植物凝集素、抗体和药物三类。通常标记物与配体的连接采用两种方法,即采用交联剂的共价键法及非共价键吸附法。标记物-配体复合物可采用层析、离心等方法分离纯化,然后通过各种方法与细胞表面的特异分子结合,从而在扫描电镜下观察、分析这些表面分子的数量和分布。本文对该技术所涉及的实验方法及注意事项作了较详尽的讨论。

参 考 文 献

- [1] Coos, A. E. and M. H. Kaplan, 1950, *J. Exp. Med.* 91: 1—13.
- [2] Gonatas, N. K. and S. Avrameas, 1973, *J. Cell Biol.* 59: 436—443.
- [3] Tokunaga, J., T. Fujita, A. Hattori, and J. Müller, 1976, in "SEM" (O. Johari, ed.), Vol. 1. pp. 301—310 ITT Res. Inst. Chicago, I 11.
- [4] 刘 黎, 王新明, 洪龙生, 厉梅芳, 顾国彦, 1979, *Acta Biol. Exp. Sinica*, 12: 1—11.
- [5] 顾国彦, 刘 黎, 洪龙生, 1979, 科学通报, 24: 376—378.
- [6] Kumon, H., 1981, *Biomed. Res.* 2, (Suppl.) 41—48.
- [7] 施渭康, 卢延龄, 许河生, 葛锡锐, 1975, 生物化学与生物物理进展, 4: 8—10.
- [8] Molday, R. S., 1976, in "Principles and Techniques of SEM" (Hayat, M. A. ed.), Van Nostrand, Reinhold, NY. 5: 53—77.
- [9] Molday, R. S., 1983, in "Immunocytochemistry", pp. 117—154. Copyright by Academic Press. London.
- [10] 洪龙生, 1983, 细胞生物学会 1983 年年会论文摘要汇编, pp. 107.
- [11] Molday, R. S., 1980, in "SEM in Cell Biol. and Med." (Tanaka, K. ed), pp. 23—48.
- [12] Molday, R. S., W. J. Dreyer, A. Rembaum, and S. P. S. Yen, 1975, *J. Cell Biol.* 64: 75—88.
- [13] 徐迪惠和吕绳凯, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志, 1: 214—216.
- [14] Horisberger, M. and J. Rosset, 1977, in "SEM/II, IITRI", Chicago, pp. 75—81.
- [15] Hodges, G. M., M. A. Smolira, and D. C. Livingston, 1984, in "Immunoabelling for Electron Microscopy" (Polak/Varndell, eds.), Elsevier Science Publishers B. V.
- [16] Peng, H. B., P. C. Cheng, and P. W. Luther, 1981, *Nature*, 292: 831—834.
- [17] Avrameas, S. and T. Ternynck, 1971, *Immunochimistry*. 8: 1175—1179.
- [18] Stuchbury, T., M. Shipton, R. Norris, J. P. G. Malthouse, and K. Brocklehurst, 1975, *Biochem. J.* 151: 417—432.
- [19] Singer, S. J. and A. F. Schick, 1961, *J. Biochem. Biophys. Cytol.* 9: 519—537.
- [20] De Oetris, S. 1978, in "Methods in Membrane Biology" (Korn, E. ed.) 9: 1—201. Plenum Press. NY.
- [21] Hammerling, U., C. W. Stackpole, and G. Koo, 1973, *Methods Cancer Res.* 9: 255—282.
- [22] Gonda, M. A., R. V. Gilden and K. C. Hsu, 1979, in "SEM" (Johari, O. and R. P. Becker, eds.) 3: 583—592. SEM Inc., Ohare, I 11.
- [23] Van Ewijk, W., R. C. Coffman, and I. L. Weissman, 1980, *Histochem. J.* 12: 349—361.
- [24] Nicolson, G. L., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 457: 57—108.