

少量贴壁培养细胞电镜原位包埋方法的探讨

翟楠 吴轶成 陈新宇 易静 杨洁*

(上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025)

摘要 该文探讨了对少量贴壁培养细胞较易操作且能保存较好超微结构的透射电镜样品包埋的方法。将Hela细胞分为三组: (1)不使用环氧丙烷, 将树脂胶囊直接倒扣包埋于塑料培养皿; (2)不使用环氧丙烷, 将细胞爬片倒扣包埋于胶囊; (3)使用环氧丙烷并将细胞爬片倒扣包埋于胶囊。将三组带有细胞的树脂胶囊进行超薄切片, 电镜观察后发现, 第一种方法包埋简便, 超薄切片上无细胞缺失孔洞, 且超微结构保存较好。

关键词 培养细胞; 原位包埋; 透射电镜

Study on the Methods of *In Situ* Embedding Monolayer of a Few Cells for Electron Microscopy

Zhai Nan, Wu Yicheng, Chen Xinyu, Yi Jing, Yang Jie*

(Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract We proposed to investigate an optimized *in situ* embedding method of monolayer with a few cells for transmission electron microscopy. Cultured Hela cells were divided into 3 groups. Group 1: placed the resin capsules inversely on the plastic culture dishes during embedding preparation without propylene oxide. Group 2: placed the slides of cell samples inversely in the resin capsules during embedding preparation without propylene oxide. Group 3: placed the slides of cell samples inversely in the resin capsules during embedding preparation with propylene oxide. Cut the ultrathin sections of resin capsules which contained the cell samples from the 3 groups, and studied with transmission electron microscope. The results showed that the method used in Group 1 was the best among the three: the resin capsules did not contain the hole caused by missing of cell samples, and the ultra-structure was well kept. Moreover, embedding preparation steps were easy to operate.

Key words cultured cells; embedded *in situ*; transmission electron microscope

在贴壁培养细胞的透射电镜常规制样方法中需要大量的细胞(1×10^6 或以上), 常用胰酶消化或者将细胞刮下, 离心成团后再制样, 但上述两种方法都会使细胞形态和细胞间的相互关系发生改变^[1]。目前广泛运用的转染细胞或者原代培养细胞数量往往较少, 按照常规方法很难制样。原位包埋技术既能解决细胞数量少, 又能较好地保持样品的原貌^[2]。在

原位包埋制样方法中, 常将细胞培养在盖玻片等载物上, 再用盖玻片等载物倒扣在树脂胶囊上^[3], 或者直接用树脂胶囊在细胞培养容器上倒扣^[4], 聚合后将胶囊取下进行切片观察。本文通过对这两种原位包埋方式以及是否使用环氧丙烷所产生的差异进行比较, 试图寻找一种对于少量贴壁培养细胞, 既容易操作又能较好保存细胞超微结构的包埋方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人宫颈癌Hela细胞系来自上海交通大学医学院易静课题组。细胞培养在含10%胎牛血清、100 U/mL

收稿日期: 2014-09-26 接受日期: 2014-10-30

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776480, E-mail: pollyyj@189.cn

Received: 2014-09-26 Accepted: 2014-10-30

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776480, E-mail: pollyyj@189.cn

网络出版时间: 2014-11-18 15:11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0293.html>

青霉素和100 U/mL链霉素(均购于美国Gibco公司)的DMEM(购于美国Hyclone公司)培养基中常规培养(37 °C, 5% CO₂)。待细胞活力大于90%后, 种板, 铺2片玻璃盖玻片于直径为6 cm细胞培养皿中, 令细胞生长爬片, 培养至汇合度约为80%后收集。将Hela细胞分为三组: 第一组为贴壁于塑料培养皿的细胞, 两片细胞爬片分别为第二、三组。

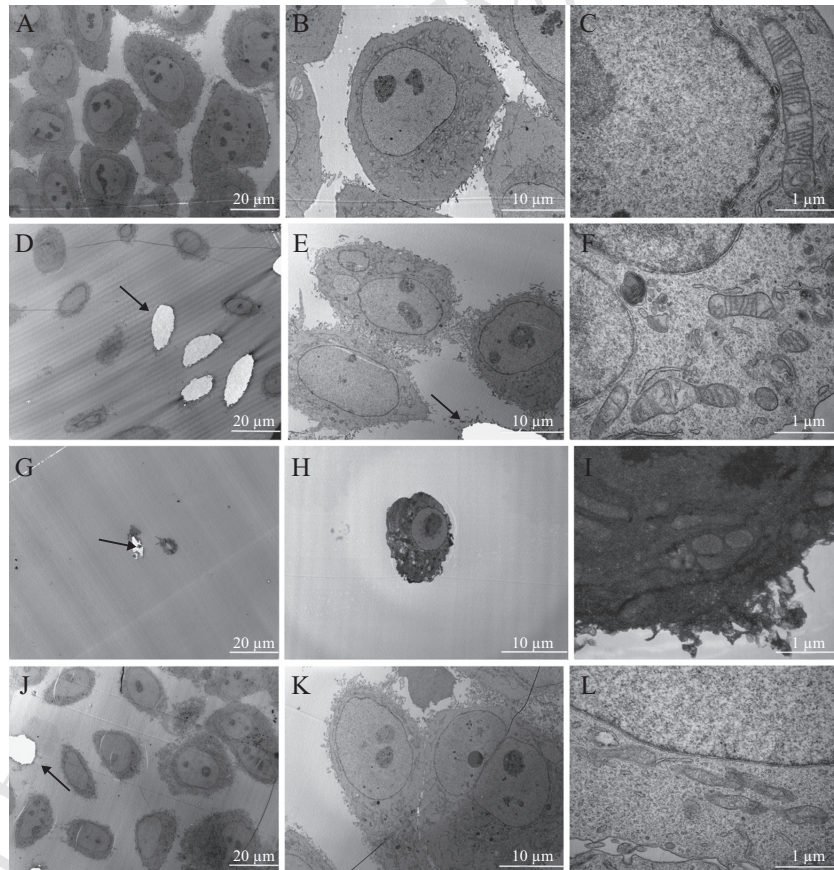
1.2 样品制备

将培养皿内的培养液倒出, 用0.1 mol/L PB漂洗2次, 每次5 min; 经过2%的戊二醛和1%锇酸固定后, 进行30%、50%、70%、80%、95%和100%的乙醇梯度脱水, 各浓度1次, 每次5 min; 后将其中一片细胞爬片取出, 移入玻璃培养皿中用100%环氧丙烷置换; 将Epon 812环氧树脂与纯环氧丙烷按1:1和2:1的比例进行浸透3 h; 然后用纯Epon 812环氧树脂浸透6 h; 培养皿和另一细胞爬片脱水后直接用纯Epon

812环氧树脂浸透6 h; 最后将纯Epon 812环氧树脂注入若干胶囊内, 将树脂胶囊直接倒扣包埋于塑料培养皿以及将细胞爬片倒扣于树脂胶囊上; 65 °C烤箱内聚合48 h。将聚合好的胶囊在酒精灯外焰上方烤数秒后取下, 使用Leica EM FC7超薄切片机进行切片和电子染色后, 置于PHILIP CM-120透射电镜(荷兰飞利浦公司)进行观察。

2 结果

第一组倒扣在培养皿底且不使用环氧丙烷的细胞, 电镜下细胞完整保留, 超微结构如线粒体、内质网等保存完好(图1A~图1C)。第二组包埋过程中不使用环氧丙烷的细胞爬片, 电镜下细胞形态和超微结构保存较好(图1E和图1F), 但呈现多个细胞缺失的孔洞(图1D和图1E黑色箭头所示)。第三组使用环氧丙烷进行常规制样的细胞爬片, 出现大量细胞

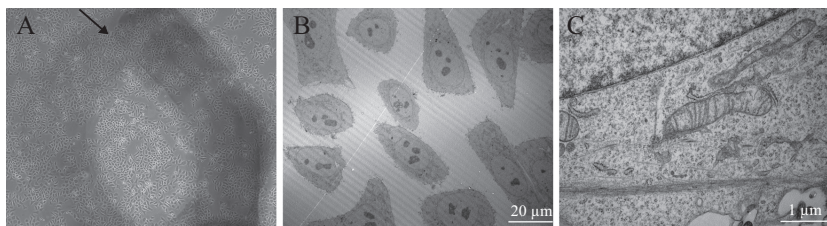


A~C: 第一组不使用环氧丙烷, 在培养皿上的细胞; D~F: 第二组不使用环氧丙烷, 在爬片上的细胞; G~L: 第三组使用环氧丙烷, 在爬片上的细胞。D、E、G和J中黑色箭头所示为细胞缺失孔洞。

A~C: the cells of Group 1 in the plastic culture dishes without propylene oxide; D~F: the cells of Group 2 in the coverslips without propylene oxide; G~L: the cells of Group 3 in the coverslips with propylene oxide. The black arrows in D, E, G and J represented the hole of cells' missing.

图1 三组原位包埋的Hela细胞

Fig.1 Three groups of HeLa cells embedded *in situ*



A: 光镜下的Hela细胞(5×), 黑色箭头所示为培养皿外层底部记号; B、C: 按照第一组细胞的制样方法处理后的电镜下的Hela细胞。

A: HeLa cells under optical microscope (5×), and the black arrow represented the mark in the outer layer of culture dish; B,C: HeLa cells treated according to the sample preparation method of Group 1 under transmission electron microscope.

图2 在光镜下定位后进行原位包埋的Hela细胞

Fig.2 HeLa cells embedded *in situ* after locating under optical microscope

缺失的孔洞(图1G和图1J黑色箭头所示)和裂隙, 电镜下细胞皱缩(图1G和图1H), 超微结构保存较差, 分辨不清(图1I), 偶然可以得到良好的超微结构(图1K和图1L)。

在此技术基础上, 作者尝试在ZEISS AXIO倒置显微镜光镜下选取目标细胞(图2A, 箭头所示的是培养皿外层底部记号笔的痕迹), 经上述样品制备后用电镜观察, 得到理想的电镜结果(图2B和2C), 为少量贴壁培养细胞的免疫电镜样品制备提供了思路。

3 讨论

本文发现, 将细胞爬片倒扣在树脂胶囊上的两组细胞, 无论是否使用环氧丙烷, 都较易出现细胞缺失的孔洞, 而不使用环氧丙烷的两组细胞都可以得到很好的结果, 保存完整清晰的细胞超微结构, 推测可能是由于单层细胞比较薄, 较易被树脂渗透。其中, 不使用环氧丙烷直接倒扣在培养皿底部的包埋方式, 没有细胞缺失的孔洞。

在已有的原位包埋制样方法中, 用盖玻片等载物倒扣在树脂胶囊上^[3], 或者直接用树脂胶囊在细胞培养容器上倒扣^[4], 均较易出现细胞缺失的孔洞, 这可能是树脂胶囊在玻璃和塑料上聚合后, 将其取下时由于载体性质不同而导致细胞黏合的紧密程度

不同所导致的结果。值得注意的是, 由于置换剂挥发速度快, 细胞爬片在使用环氧丙烷进行置换过程中很难掌握制置换剂的挥发情况, 所以细胞容易变形皱缩, 且细胞容易出现裂隙。另外, 目前贴壁细胞的培养容器大多是塑料的, 置换剂环氧丙烷等有机溶剂也会使其溶解。

所以, 不使用环氧丙烷, 直接倒扣在塑料培养皿底部的原位包埋方法是目前较容易操作且能获得较好结果的方式。

参考文献 (References)

- 1 赵刚, 曾嘉, 杨海贤. 培养细胞的超薄切片技术探讨. 天津医科大学学报(Zhao Gang, Zeng Jia, Yang Haixian. Study on ultrathin sectioning technique of the culture cell. Journal of Tianjin Medical University) 2004; 10(2): 168-72.
- 2 钱晶晶, 管怀进, 朱昌来. 体外培养细胞原位包埋电镜样品的制作方法. 南京医科大学学报(自然科学版)(Qian Jingjing, Guan Huaijin, Zhu Changlai. ACTA Universitatis Medicinalis Nanjing, Natural Science) 2013; 33(5): 707-8.
- 3 于向民, 野田亨, 房丽华, 李玲. 盖玻片在培养细胞免疫电子显微术中的应用. 电子显微学报(Yu Xiangmin, Toru Noda, Fang Lihua, Li Ling. Application of cover slip to immunoelectron microscopy of culture cell. Journal of Chinese Electron Microscopy Society) 2004; 23(1): 94-6.
- 4 吕广艳, 曲淑贤, 高船舟, 吕淼, 赵莹, 高颖. 培养平滑肌细胞原位包埋超薄切片的准备. 大连医科大学学报(Lü Guangyan, Qu Shuxian, Gao Chuanzhou, Lü Miao, Zhao Ying, Gao Ying. Journal of Dalian Medical University) 2010; 32(2): 227-8.