

HW 4 型乳胶在电镜放射自显影术中的应用

姚山麟 关首任 严缘昌

(中国科学院生物物理研究所)

在毛主席无产阶级革命路线的指引下,我国的科学技术事业迅速发展,生物学、医学研究中近代技术的应用日益广泛,电子显微镜放射自显影术即是其中之一。遵照毛主席关于**独立自主、自力更生**的教导,我们应用国产 HW 4 型细颗粒电子敏感乳胶*(以下简称 HW 4 乳胶),作了一些电镜放射自显影术的基本实验。

目前,电镜放射自显影术已成为亚显微结构实验室的常规技术之一。国际上,电镜放射自显影常用的乳胶是:Ilford L4, Gevaert NUC 307, Kodak NTE 和 Sakura NR-H1;其中以 Ilford L4 乳胶最为常用^[1-3]。

我国早在1959年就已研制成核2、核3、核4和核5等型的原子核乳胶^[4,5]。其中,核4乳胶对生物学的光学显微镜放射自显影是非常适用的,它的溴化银晶体的平均直径是2,700埃,对所有能量的 β 粒子均敏感。近期的 HW 4 细颗粒乳胶适用于电镜放射自显影^[3]。

本文介绍与 Ilford L4 乳胶(以下简称 L4 乳胶)相对照,应用国产 HW 4 乳胶的实验及结果。

样品的制备

1. 材料

以两组小金鱼(体长约10毫米,湿重20毫克)为材料,分别用玻璃微针逐条注射:³H-胸腺嘧啶(24.0居里/毫克分子),0.04微居里/条;³H-胸腺嘧啶核苷(26.0居里/毫克分子),0.2微居里/条。所用同位素标记化合物均为上海原子核研究所产品。注射后1.5—2小时期间,用1% OsO₄ (pH 7.8)固定;材料经系列酒精脱水后,用甲丁酯或 Epon 812 包埋。

2. 电镜放射自显影样品的制备

将切片水槽中厚为800—1,000埃的连续切片带,转移到涂有火棉胶(0.5—0.7%)支持膜的载玻片上(小心防止火棉胶膜被触破;一般在载玻片一端的1/3区域对称地放置四个样本),在干净空气中自然干燥后,对载玻片真空喷涂一层厚约50埃的碳膜。然后,在暗室红灯下,采用“平基法”制备单层乳胶膜:乳胶在45℃水浴中溶解,用重蒸馏水稀释,HW 4 乳胶的稀释比为1:5, L4 乳胶的稀释比为1:6(以上均为体积比);

用滴管吸取稀释后的乳胶,涂布于经45℃预热的水平的载玻片一端的2/3区域,静置5—10秒钟,把多余的乳胶倾掉,然后使载玻片垂直放置,在室温下干燥。

亦可采用其它方法来制备单层乳胶膜。在记录细胞中放射性源的分布时,致密、均匀分布的单层乳胶膜是必需的;否则,将不可能确切地揭示放射性源与显影颗粒之间的分布关系,更不可能进行定量分析。有些实验要求使用重叠层或双层乳胶膜,以保证实验结果的可靠性和再现性。

3. 光学显微镜放射自显影样品的制备

将厚切片(0.5—1微米)转移到预先涂有0.1%的明胶的载玻片上,用红外线灯或热板烘干;部分厚切片先经 Feulgen 反应染色;用经45℃水浴溶化的 HW 4, L4 和核4乳胶原液涂布或浸润载玻片。

4. 曝光和显影

超薄切片和厚切片样品,在涂布乳胶膜后一小时即可干燥。干燥后收藏于备有干燥剂的铝制避光盒中,置于4℃冰箱中曝光。

采用化学显影法。电镜样品使用了两种显影液: D19 全液,20℃,显影二分钟;菲尼酮-对苯二酚显影液(相当于 D-11),全液,24℃,显影三分钟。接着置于蒸馏水中30秒,1%醋酸溶液停影10秒;再置于蒸馏水中30秒,30%硫代硫酸钠缓冲液定影三分钟;最后用蒸馏水洗三次,每次一分钟。光学显微镜样品用 D19 全液,20℃,显影四分钟;停影、定影过程与电镜样品相同。

5. 剥离和染色

采用“平基法”制备乳胶膜时,需在显影后,将标本(即支持膜、切片、碳膜和乳胶膜)转移到载网上,方法是将标本从载玻片上剥离后使之浮于水面,将载网覆盖上去;用一贴有湿润滤纸的平板多孔吸气漏斗,将标本连同载网一同吸起;揭下滤纸(其上已吸附了标本)置干净空气中干燥后,即可取下标本。我们用0.7%火棉胶醋酸戊酯溶液制备支持膜,从载玻片上剥离标本时基本上未遇到困难;火棉胶膜稍薄时,不易剥离的

* 本实验所用 HW 4 乳胶和核4乳胶均由中国科学院原子能研究所提供

困难可能大一些,但可增强样品的反差。

电镜样品用醋酸铀和柠檬酸铅染色;未经去除明胶,故染色效果差一些。光学显微镜未经预先染色的部分厚切片,用1%甲苯胺蓝染色。

实验结果

在开始曝光后的第五、第七和第十天,分别取一部分光学显微镜放射自显影样品进行观察。

电镜放射自显影样品,则分别于开始曝光后的60天、90天和180天取一部分样品进行观察;并留一部分样品继续曝光。

国产HW4乳胶和L4乳胶,均可记录35兆电子伏 β 射线照射后的径迹,对所有能量的 β 射线是灵敏的;在室温、无干燥剂的储存条件下,经35兆电子伏 β 射线照射后所形成的潜影,在10天以后均全部衰退^[3]。用光学显微镜及电镜观察比较,HW4乳胶和L4乳胶显影后的背景颗粒,后者略高。

1. 单层乳胶膜的显影颗粒

在有火棉胶膜的载玻片上(无切片样品),用“平基法”分别涂布HW4和L4乳胶后,它们的单粒子层在白光下均呈现紫红色干涉光,其厚度判断均约为1,400埃。由图版I(封二)所示这两种乳胶单层膜的电镜照片,可见HW4乳胶膜(图版I左)的致密、均匀分布的单层溴化银晶体,在每平方微米内排列约45—50个晶体。同一批乳胶及不同批乳胶的多次涂布操作,通过电镜下大面积观察,证实了这一结果的再现性。

用稀释10倍的HW4乳胶和L4乳胶制备的单层膜,经光曝光后,用D19显影的电镜照片见图版II(封二),用菲尼酮-对苯二酚显影的电镜照片见图版III(封二)。由图可见,前者的银丝颗粒较为紧凑,后者的则较为伸展。这两种显影液的显影颗粒尺寸要比未显影颗粒大3—4倍;要比经常选用的L4乳胶显影液Microdol X的显影颗粒为大,但Microdol X显影液的灵敏度要比D19显影液低得多。图版II,III的结果表明,因为HW4和L4乳胶未显影颗粒的平均直径相同,其溴化银晶体结构本质上一致,所以经同一显影液作用的显影颗粒大小和形状也相同。

2. 光学显微镜生物样品的观察

光学显微镜放射自显影(厚切片)样品,一般在曝光后的第五或第七天(用核4乳胶的要早些),在不同组织的一部分上皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞和肌肉细胞中的核区,集中分布有显影的银颗粒。在小金鱼注射 ^3H -胸腺嘧啶到处死固定前,共约二小时,仅有一部分细胞是处于细胞周期的合成期,或恰好在合成期开始之前,而 ^3H -胸腺嘧啶是掺入到这些细胞核内的DNA中。这说明小金鱼在生长期各类细胞的增生是旺盛的。

我们还用蚕的育精囊为材料,由于它的细胞分裂

的同步性整齐,从注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷到处死动物、固定材料之间的间隔期较长,所以观察到有95%以上的细胞核被标记。

3. 电镜生物样品的观察

对HW4乳胶和L4乳胶的电镜放射自显影样品的观察,表明小金鱼各类细胞的核上分布的丝状显影颗粒,在核与核之间存在着数量上的很大差异[图版XIV, XV; XVI(封三)]。这可能是由于在 ^3H -胸腺嘧啶核苷注入体内后的二小时中,各类细胞所占有的细胞周期的合成期时间长短不同,而导致不同量的 ^3H -胸腺嘧啶核苷的结合所引起的。此外,在两组材料的三种曝光时间(60, 90, 180天)的大量样品中,还观察到相当数量的细胞核的高颗粒密度的标记,见图版XVI。这显然是电镜放射自显影的高效率的结果,也说明所用乳胶的灵敏度高。当然,这是与所采用的实验条件有关的。

图版XVI的结果还表明,HW4乳胶在曝光期间的潜影衰退即使存在也是很轻微的。对曝光60天和180天的样品的比较观察,也未见显影颗粒减少。同时,观察180天的对照样品,在视野中也未见自生背景显影颗粒增加。

小 结

本实验的主要目的在于了解HW4乳胶的基本性能,故所采取的技术措施着重于自显影的效率,而未仔细考虑自显影像的分辨率和反差。显然,在实际的电镜放射自显影术中,需对各个环节加以综合考虑,以尽可能同时取得效率、分辨率和反差的最佳结果。

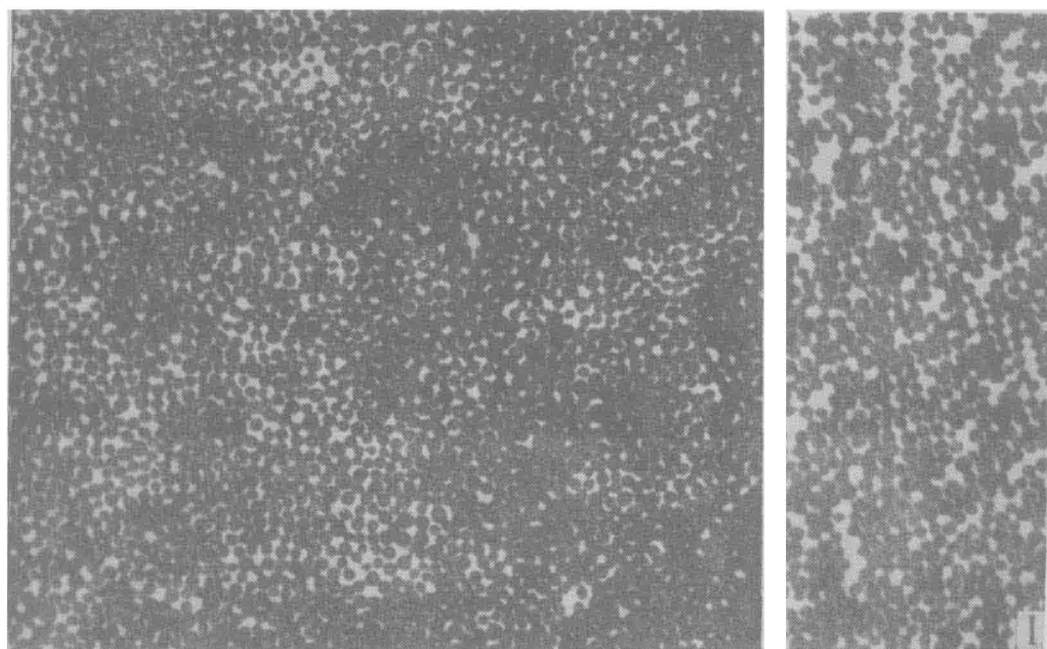
实验结果表明,HW4乳胶适用于一般的电镜放射自显影研究工作,制备单层乳胶膜时操作方便,曝光时的储藏条件简单,在自生背景颗粒和潜影衰退增加等因素制约乳胶有效性能之前,可进行十分长时间的曝光。HW4乳胶与L4乳胶的电镜放射自显影的最终结果是相同的。HW4乳胶也适用于光学显微镜放射自显影术,其显影颗粒在光学显微镜下清晰可见。

更细颗粒(约1,000埃)的国产HW3型乳胶的电镜放射自显影术实验,正在进行中。

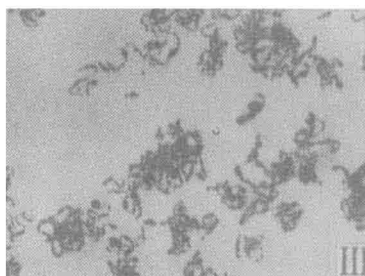
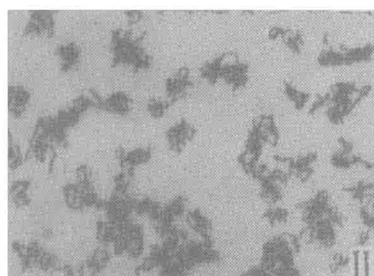
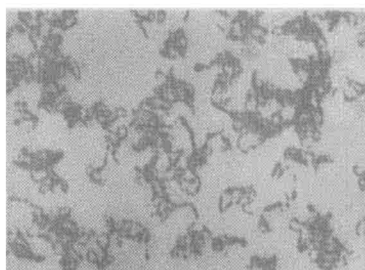
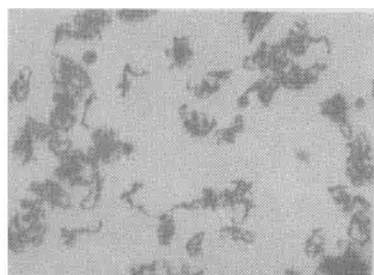
参 考 资 料

- [1] 何泽慧等:物理学报, 15, 131, 1959.
- [2] 陆祖荫等:物理学报, 15, 139, 1959.
- [3] 刘泳莲等:待发表.
- [4] Caro, L. G. et al: J. Cell Biol., 15, 173, 1962.
- [5] Salpeter, M. M. et al: J. Cell Biol., 22, 469, 1964.
- [6] 水平敏知等:Radioisotopes, 18, 338, 1969.
- [7] Granboulan, P.: J. Roy. Micro. Soc., 81, 165, 1963.

[本文于1975年3月18日收到]



图版 I HW4 乳胶 (左) 和 Ilford L4 乳胶 (右) 的单层膜
12,500 倍

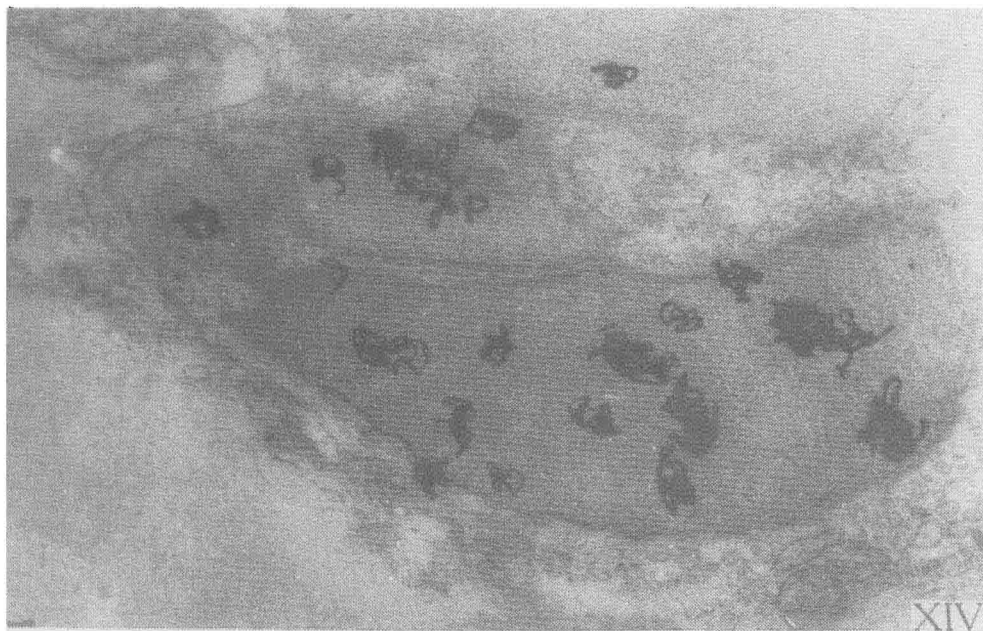


图版 II HW4 乳胶 (上) 和 Ilford L4 乳胶 (下) 的显影颗粒

D19 显影液, 7,500 倍

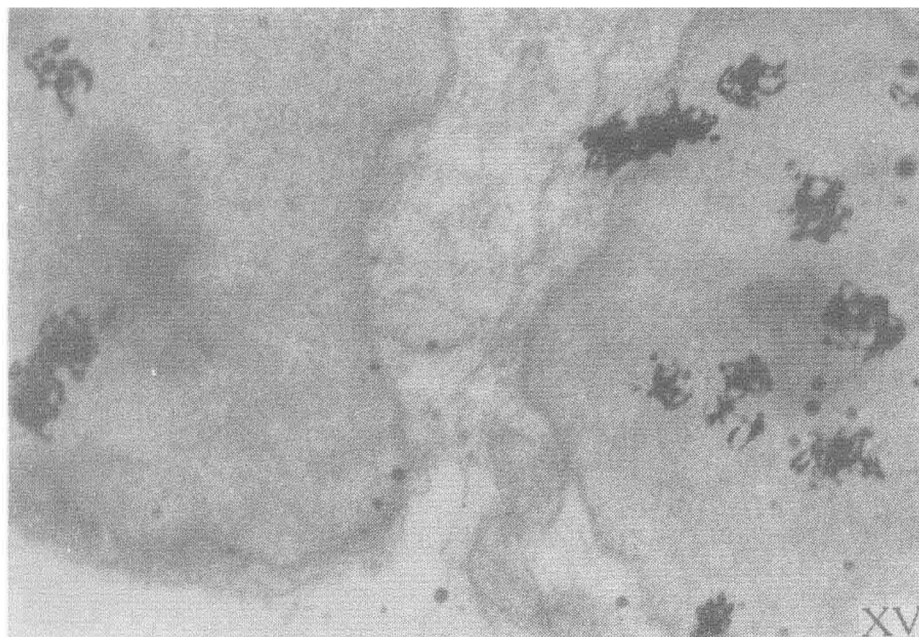
图版 III HW4 乳胶 (上) 和 Ilford L4 乳胶 (下) 的显影颗粒

菲尼酮-对苯二酚显影液, 7,500 倍



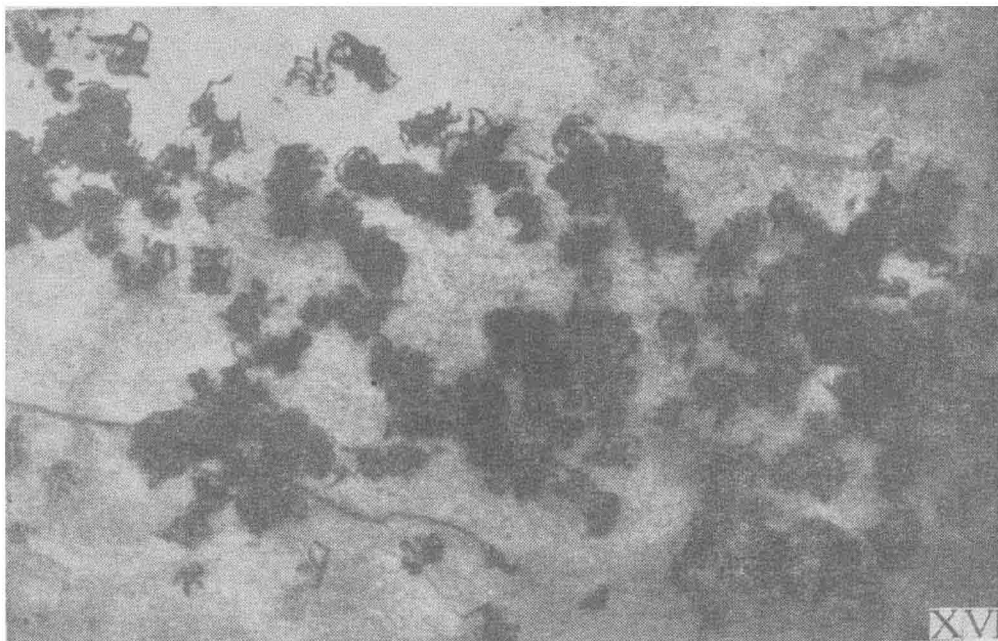
图版 XIV 小金鱼的上皮细胞核

HW4 乳胶, 曝光 60 天; 菲尼酮-对苯二酚显影, 3 分钟, 24°C; 15,000 倍



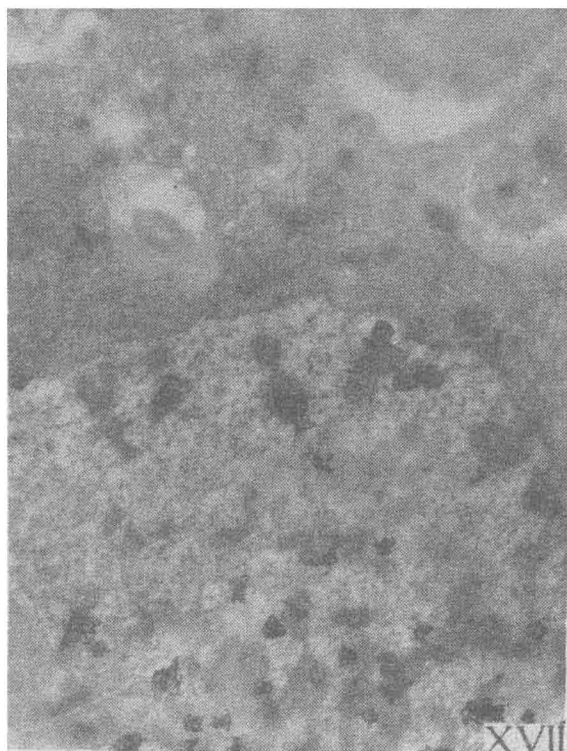
图版 XV 小金鱼的上皮细胞核

HW4 乳胶, 曝光 180 天; 菲尼酮-对苯二酚显影, 3 分钟, 24°C; 15,000 倍



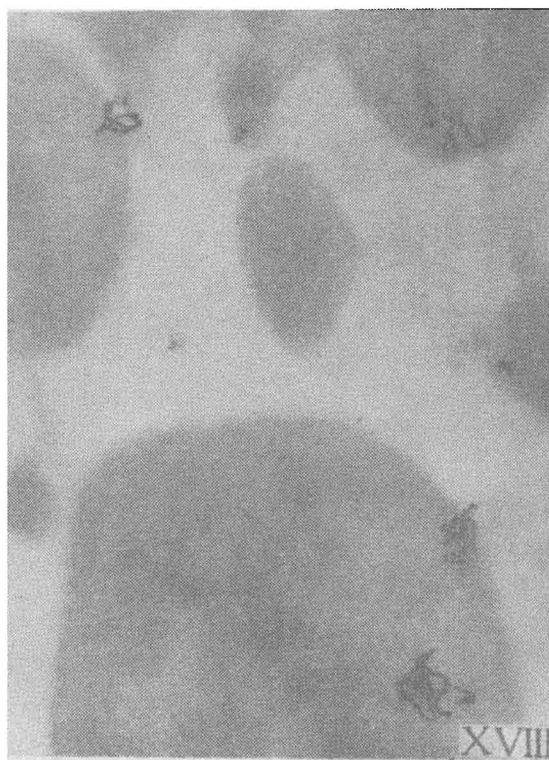
图版 XVI 小金鱼的上皮细胞核

HW4 乳胶, 曝光 60 天; 菲尼酮-对苯二酚显影, 3 分钟, 24°C; 23,000 倍



图版 XVII 丰年虫壳腺细胞

^3H -胸腺嘧啶核苷, 离体标记(2.9微居/毫升)1小时, 曝光 12 星期; 6,000 倍



图版 XVIII 丰年虫卵黄颗粒

^3H -放线菌素 D 标记, 22,000 倍(银颗粒显示在卵黄颗粒的边缘部分)