

# 试用邻苯二甲酸二丙烯酸酯作包埋 介质的一些经验

上海实验生物研究所电镜组

在电子显微镜应用的初期, 由于没有找到一种适用于生物标本的包埋介质, 不能切得薄片, 所以关于生物材料超微结构的研究工作取得的进展不大。1949 年 Newman 等人提出用甲基丙烯酸酯作为生物材料的包埋介质, 但随后的实践表明, 甲基丙烯酸酯对细微结构有严重的影响。例如, 因聚合过程不均而产生的应力会破坏或分解标本的结构, 单体在聚合时收缩很大, 受电子束照射时不稳定等等。于是, 促使人们去寻找并相继采用了各种较合适的包埋介质, 例如, 目前全国各有关实验室使用的国产 618 环氧树脂, 聚酯类的 Vestopal (Kellenberger 等, 1956), 环氧类的 Araldite (Glauert 等, 1956), Epon (Kushida, 1959) 和 ERL (Spurr, 1969) 等。在这些包埋介质中, Epon 812 被认为是较理想的包埋介质之一; 但据资料报道, 它也有粘度大、能引起皮炎 (Luft, 1961) 等缺点。1973 年, Mets 等人提出采用邻苯二甲酸二丙烯酸酯作为包埋介质。

一般认为, 一种理想的包埋介质应具有的条件是: (1) 材料来源丰富、易得; (2) 粘度低, 使之易于渗入组织和便于操作; (3) 在固化前应能与有机溶剂如酒精、丙酮等完全溶合; (4) 聚合温度应尽可能低, 聚合时的收缩或膨胀系数小; (5) 聚合后有好的切割性能; (6) 在受到电子束照射时具有良好的稳定性, 等等。基于这些要求, 我们试用 Mets 等报告的邻苯二甲酸二丙烯酸酯的配方, 一年多来在实际工作中加以改进, 经与 Epon 812 初步比较, 认为这种包埋介质除了其韧性和收缩性比 Epon 812 稍差外, 它具有来源方便、配方简单、粘度低、切割性好、图像清晰和性能稳定等优点。

## 材料和方法

邻苯二甲酸二丙烯酸酯 (上海试剂总厂生产) 是一种粘度非常低的琥珀色液体, 其中含有阻聚剂氢醌。在实际使用时, 我们用 2% NaOH 溶液把氢醌洗脱, 具体方法与处理甲基丙烯酸酯时所用的完全相同。为了去除水份和获得较纯的邻苯二甲酸二丙烯酸酯, 我们采用真空减压蒸馏加以处理。蒸馏所得的邻苯二甲酸二丙烯酸酯为无色或淡黄色透明液体。

邻苯二甲酸二丁酯 (上海溶剂厂生产) 是一种增润剂, 可通过改变其含量的多少来调节包埋块所需的硬度, 少则硬, 多则软。

过氧化苯甲酰 (广州化学试剂厂生产) 是一种催化剂, 它含有一定的水份, 在实际使用时, 其用量可根据其含水量适当调整。但我们认为其含量不宜过多, 过多则会使包埋块发生脆裂, 过少则不易使包埋块聚合。

包埋介质的配方如下:

|            |       |
|------------|-------|
| 邻苯二甲酸二丙烯酸酯 | 76 毫升 |
| 邻苯二甲酸二丁酯   | 20 毫升 |
| 过氧化苯甲酰     | 4 克   |

在配制包埋介质时, 尽管它们的粘度都非常低, 但是因为过氧化苯甲酰是固态的, 所以仍然应该充分搅拌以使它完全溶解, 否则就会聚合不均。这种包埋介质在 4℃ 的冰箱中可以存放半年左右。

组织材料的固定、脱水、包埋和染色都按一般的常规方法进行。其具体安排过程如下: 用 4.8% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH 7.4) 固定一个半小时后, 用磷酸缓冲液洗涤三小时, 在洗涤期间经常加以摇动和更换新鲜缓冲液。接着用 2% 锇酸磷酸缓冲液 (pH 7.4) 作重固定一个半小时, 漂洗一下后用各级浓度的酒精脱水。从酒精至包埋介质过渡的程序如下: 先在二分之一纯酒精加二分之一包埋介质的混合液中浸一小时, 再在三分之一酒精加三分之二包埋介质混合液中浸一小时, 然后移入包埋介质中浸泡过夜。次日即可放入 65℃ 烘箱中进行聚合。

在脱水、介质过渡、浸透和包埋时所用的 100% 酒精和包埋介质, 都需经无水硫酸钙处理, 尽可能地吸去剩余的水份, 以使脱水浸透完全。在各步骤中均使用含有催化剂的包埋介质, 这样既简化了操作, 又可使包埋块聚合均匀。聚合作用在 65℃ 的烘箱中经 72 小时即可完成。聚合时要注意温度稳定。聚合后应将包埋块存放在含有硅胶的干燥器中, 否则组织包埋块容易吸潮而变软, 以致在切片时造成划痕 (或称振荡纹)。如果出现这样的情况, 可将组织块放回至 65℃ 烘箱中再烘半天至一天, 硬度仍能恢复。反之, 若嫌组织块过硬, 可将它放在空气中暴露半天至一天。这种包埋介

质的切片有较好的强度和稳定性, 可以不用支持膜而直接捞在载网上。

## 结果和讨论

细胞结构的细节是否保存得好, 除了固定作用的因素之外, 与所选用的包埋介质也有一定的关系。Ito (1962) 曾报道过, 在采用环氧树脂 Epon 812 包埋组织材料之后, 才发现原来认为是因固定不及时而引起的死亡后变化, 是由甲基丙烯酸酯包埋介质产生的假象。为了说明邻苯二甲酸二丙烯酯的性能, 我们用 Epon 812 进行了初步对照观察。

图版 XII 和图版 XIII 所示的鼠肝细胞图片, 除了所用的包埋介质不同之外, 其它过程完全相同。从图片中细胞器的细节结构和反差情况来看, 两者的差别并不显著。细胞核与胞质也比较丰满。这说明邻苯二甲酸二丙烯酯在聚合时对细微结构的影响并不严重。

与 Epon 812 比较的结果表明: 在组织包埋块的性能方面, Mets 等的配方稍逊于 Epon 812。Epon 812 的包埋块在切割时呈韧性, 而邻苯二甲酸二丙烯酯则呈脆性。我们改变配方, 增加二丁酯的含量, 发脆的程度有所改善, 但仍不能达到 Epon 812 那样的韧性。这方面的缺点有待于今后进一步摸索解决。可切得的薄

片一般在 500 埃左右。

我们在实践过程中, 曾发生过包埋块脆裂和聚合不匀的现象。我们推测, 除了 Mets 等在报告中提到的与邻苯二甲酸二丙烯酯的纯度有关之外, 与过氧化苯甲酰的含量也有关系。我们采用现在的配比, 则从未发生过包埋块开裂的现象。搅拌均匀也是一个重要因素, 因为往往由于粘度不大, 而忽视了过氧化苯甲酰的溶解是否完全和均匀。

邻苯二甲酸二丙烯酯含有一种油状物质, 尤其在未经减压重蒸处理的材料中特别明显, 聚合后可以清楚地看到有油状物溢出。经减压重蒸处理后这种现象得到了改善, 所以是否有必要进行重蒸处理, 需视商品的质量而定。

一般来说, 这种包埋材料粘度低、配比简便, 能观察到清晰的图象。更重要的是这些材料完全立足于国内, 为今后开展超显微结构的研究工作提供了一个有利的物质条件。

## 参 考 资 料

Mets, M. et al: *J. Ultrastructure Research*, 42, 337, 1973.

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]

(上接第 28 页)

## poly I:C 的生物功能实验\*

### 1. 在细胞上诱导干扰素的能力

用三种不同浓度的 poly I:C, 对人胚肺细胞诱导干扰素。攻击病毒: 水泡性口炎病毒 (VSV); 染料摄入法测定结果, 见表 4 (表中,  $DU_{50}$  单位是: 被保护细胞摄入中性红的量为正常细胞的 50% 时, 其干扰素稀释度的倒数的对数。下同)。

表 4 poly I:C 在人胚肺细胞诱导干扰素的能力

| poly I:C 剂量<br>(微克/毫升) | 诱导干扰素能力<br>( $DU_{50}$ 单位/毫升) |
|------------------------|-------------------------------|
| 100                    | 20                            |
| 10                     | 10                            |
| 1                      | 1                             |

### 2. 在小白鼠体内诱导干扰素的能力

用三种不同剂量的 poly I:C 在体重 14—16 克的小白鼠体内诱导干扰素, 取其血清处理第二代鼠胚细胞, 以 VSV 病毒作为攻击病毒, 染料摄入法测定结果, 见表 5。

### 3. 抗病毒效果

用浓度为 1 微克/毫升的 poly I:C 作用于人胚细胞, 能保护 50% 以上的细胞免受 210 TCD<sub>50</sub> 副流感 (仙台株) 病毒的攻击; 65.7% 的细胞免受 40—231

表 5 poly I:C 在小白鼠体内诱导干扰素的能力\*

| poly I:C 剂量<br>(微克/只) | 诱导干扰素能力<br>( $DU_{50}$ 单位/毫升) |
|-----------------------|-------------------------------|
| 100                   | 675.1                         |
| 25                    | 206.4                         |
| 2.5                   | 38.9                          |

\* 每组 10 只小白鼠, 三次实验的平均值

TCD<sub>50</sub>。VSV 病毒攻击; 74.6% 的细胞免受 31 TCD<sub>50</sub> 冠状病毒的攻击。

## 小 结

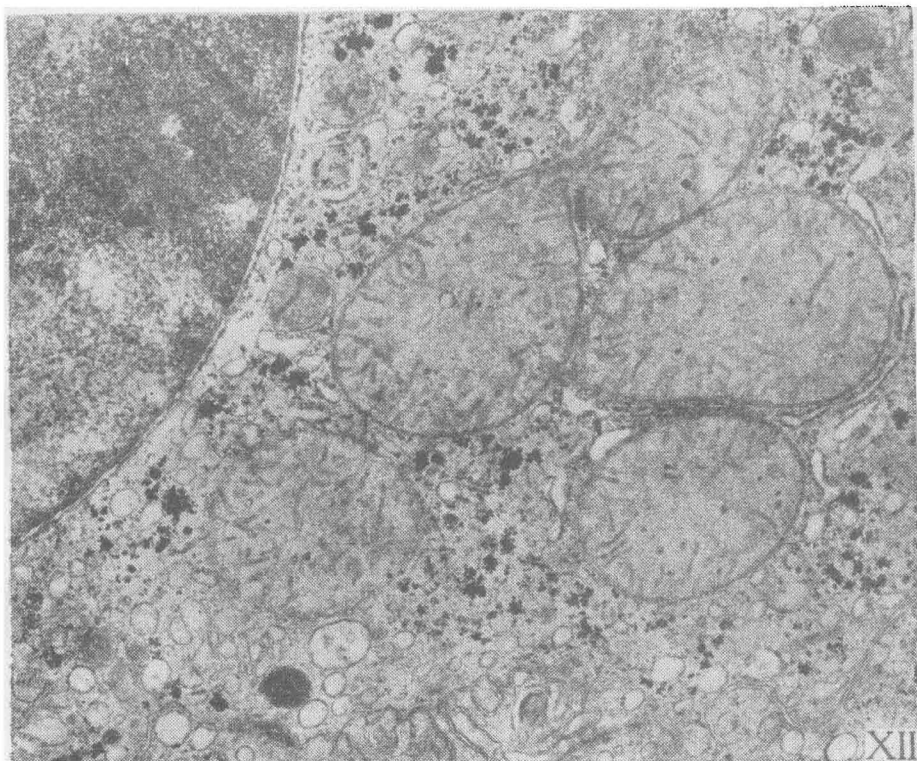
利用大肠杆菌多核苷酸磷酸化酶, 将不同方法得到的 CDP 和 IDP 分别聚合成 poly C 和 poly I, 在本实验条件下制备 poly I:C。经测定, poly I:C 具有规则的双螺旋结构, 分子量大, 均一性好, 产率较高。对于细胞和在生物体内有较高的诱导干扰素的能力, 对某些病毒感染有明显的保护作用。

## 参 考 资 料

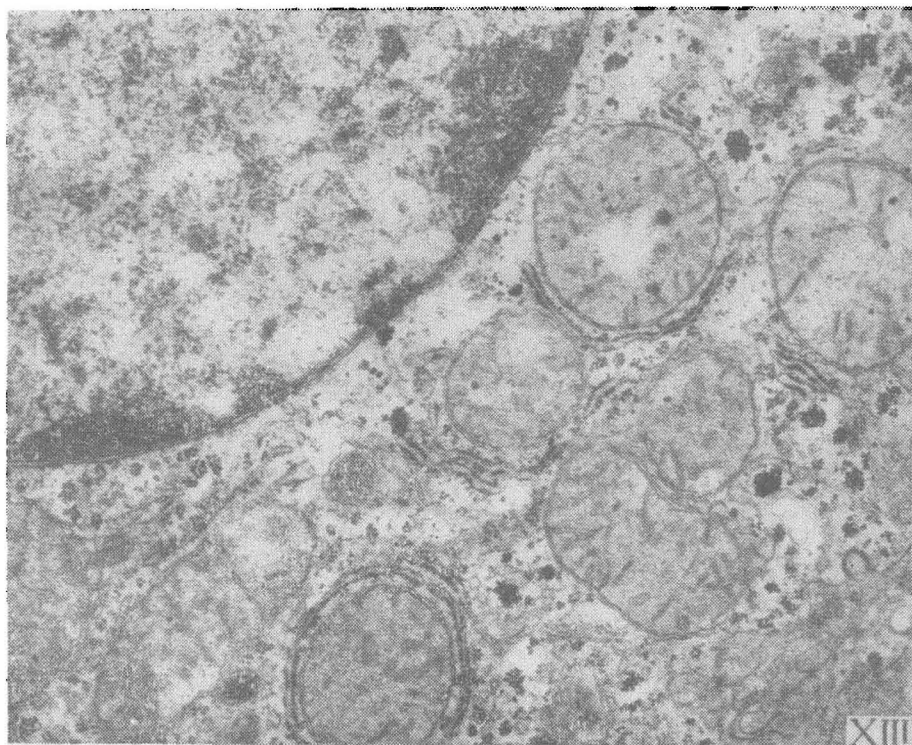
中国科学院微生物研究所: 核苷酸类物质的生产和应用资料汇编, 1, 1971。

[本文于 1975 年 5 月 12 日收到]

\* 实验是由中国人民解放军 59175 部队进行的



图版 XII 小鼠肝,邻苯二甲酸二丙烯酯包埋, 20,000 倍



图版 XIII 小鼠肝, Epon 812 包埋, 20,000 倍