

生物学中的电镜放射自显影术

郑 若 玄

(中国科学院生物物理研究所)

放射自显影是利用放射性同位素发射的带电粒子(α 或 β 粒子),作用于感光材料的卤化银晶体而产生潜影,再经显影把“像”显示出来,以研究该放射性物质在生物机体(整体的、组织的或细胞的和亚细胞水平的)内的径迹或颗粒定位的一种技术。由于采用各种不同的放射性示踪化合物,这种技术已被广泛地应用到农业、医学和生物学等领域中,成为生产实践和科学研究的有用工具之一。

电子显微镜放射自显影(以下写作 EMARG)是电子显微镜(EM)和放射自显影(以下写作 ARG)相结合的一种新技术。其主要优点是:(1)可显示微量放射性物质在组织或细胞内的分布。由于核子乳胶把带电粒子的作用累积起来,故即使是微量的低强度放射性物质的带电粒子,只要经过长时间(数天至数月)的曝光,就可以显示出来;(2)可显示放射性物质在细胞亚显微结构内的精细定位。光学显微镜 ARG 术,只能显示组织或细胞内放射性物质的粗略定位情况。EMARG 可以显示放射性物质在细胞内亚显微结构(如高尔基体、内质网或线粒体等)甚至提纯的 DNA 大分子的精细定位;(3)能在不破坏细胞结构完整的情况下,研究某些生物大分子(例如核酸、蛋白质、脂肪和酶等)在生物合成过程中的精细定位;(4)EMARG 过程中,核子乳胶层和含放射性物质的超薄切片紧密接触,既可减少由于散射所引起的带电粒子的损失,又可克服厚层组织中所出现的放射性自吸收现象。

一切事物总是一分为二的。EMARG 也有其局限性:(1)受电镜本身性能的限制,要求核子乳胶层很薄甚至是单层的卤化银晶体,这使穿透力强的高能 β 粒子的作用效率较差;(2)由于 β 粒子的能谱是连续的,加之受乳胶粒度所限制,使得分辨率受到一定的影响;(3)在超薄切片中必须含有一定量的放射性同位素,才能获得良好的结果,这可能引起生物体的放射损伤;(4)曝光时间较长,有的甚至需半年以上,才能获得实验结果。

目前,EMARG 的应用范围日益扩大,例如:关于核酸(DNA 和 RNA)的合成和代谢;蛋白质的合成、储存、转移和分泌;脂肪的合成;酶的定量分析;碘在甲状腺内的定位和代谢;亚显微结构与功能的关系;损伤的

恢复,以及卵母细胞内卵黄颗粒的起源和卵黄颗粒的 DNA 含量的研究等等。所用的生物材料也较广,诸如脊椎动物(如荷兰猪、大白鼠和小白鼠)、两栖动物(如蝾螈和蛙)、水生生物、植物、低等生物(如蓝绿藻、阿米巴、细菌和病毒),乃至被提纯的 DNA,等等。

图版 XVII(封三)是丰年虫壳腺细胞的 EMARG 照片。

基 本 原 理

核子乳胶和普通照相乳胶的基本成分,都是卤化银的微结晶在明胶中形成的悬浮体,它们的主要区别是核子乳胶所含卤化银量比较多,颗粒比较小,而且颗粒的大小较均匀。

放射性同位素的射线都能对感光材料发生作用。但只有 α 和 β 粒子适用于 ARG,其中 α 粒子能给出最好的分辨率。遗憾的是在具有生物学重要意义的元素中,没有一种是 α 粒子的发射体;因此,对于研究生物大分子的合成、代谢等细胞化学以及生理功能方面,发射 α 粒子的同位素便失去了它的价值。在生物大分子的主要组成元素中,都有发射 β 粒子的同位素(例如 ^3H , ^{14}C 和 ^{32}P 等),所以它是研究生物有机体 ARG 的重要工具。在 EMARG 中, ^3H 的应用受到人们的重视。

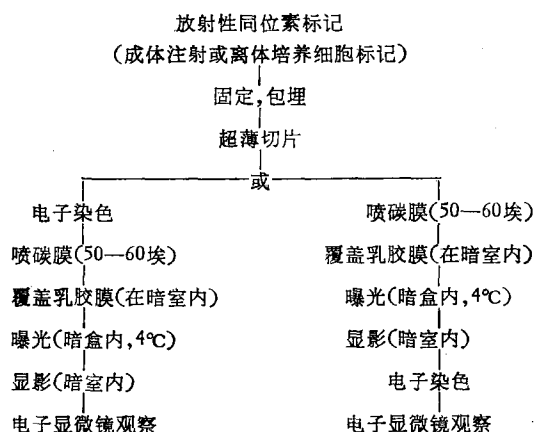
在普通的照相过程中,光子将感光层中溴离子的一个轨道电子击出,使成为溴原子;而被击出的电子为溴离子周围的银离子所俘获,使银离子变成银原子。这就是潜影形成的过程。ARG 的基本原理与此相同,只不过这里是由于带电粒子的作用而已。

潜影衰退是指潜影的逐渐消失。在 ARG 过程中,许多因素可以引起潜影衰退的加速,值得注意。采取下列措施可以适当防止潜影衰退:(1)在低温条件下储存核子乳胶;(2)在低温并且最好在干燥的、有二氧化碳的或无氧的条件下曝光;(3)如果曝光时间较长的话,最好在有惰性气体(例如氮或氩)的条件下进行。

操 作 过 程

EMARG 的主要程序是:放射性同位素标记,生物材料的固定和包埋,超薄切片,核子乳胶膜的制备、曝

光,显影,染色(或在切片后即染色);见下表。



现将各步骤中的有关问题分述如下。

1. 放射性同位素的选择

前已述及,具有生物学意义的是发射 β 粒子的同位素。射线的能量越大、射程越长,其电离密度越小,EMARG的效率也就越低。所以,除少数特殊情况(例如研究甲状腺功能时使用 ^{131}I)外,对于研究生物大分子在细胞内的合成、代谢等,都日渐以 ^3H 标记化合物取代 ^{14}C 或 ^{32}P 所标记的化合物。

^3H 是发射 β 粒子的所有同位素中能量最低(最大能量=0.018兆电子伏)的一种,半衰期为12.46年,其粒子射程很短、电离密度比较大。在ARG中,除 α 粒子外,它的分辨率最好。

最大能量比 ^3H 稍大的是 ^{14}C (最大能量=0.155兆电子伏),它的ARG分辨率仅次于 ^3H ,但是由于它的半衰期很长(5,568年),而且散射比 ^3H 强,所以一般选用 ^{14}C 的较少。

目前,人们采用EMARG术,比较集中地研究DNA, RNA或蛋白质,在细胞超微结构的合成、定位和代谢情况,较多使用 ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷。 ^3H -胸腺嘧啶核苷已被公认为DNA的特殊前体,它进入生物体之后,很集中地标记在细胞核、细胞质中的线粒体或单股染色体上;甚至标记在被提纯的DNA大分子上(Rechenmann, R. V., 1967)。有人认为 ^3H -胸腺嘧啶核苷可以标记在核蛋白上,但其标记量少于标记细胞核中总 ^3H 的2.5%。不论是体内或离体实验条件下, ^3H -胸腺嘧啶核苷进入机体之后和DNA结合的量是很少的,大部分被降解了。 ^3H -胸腺嘧啶核苷进入细胞核是非常迅速的,例如注射到小白鼠体内之后,15分钟就标记到所有细胞核和细胞质中,30分钟后开始减少,24小时后只在细胞核的DNA中发现。关于 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记到DNA中的百分率,在注射入体内的条件下,一般为8—10%左右,但也有高至20%的。

用于标记DNA的示踪化合物,除较常用的 ^3H -胸腺嘧啶核苷之外,近年来开始使用 ^3H 标记的放线菌素

D。据报道, ^3H 标记的放线菌素D能测定微量的DNA。放线菌素D是一种抗菌素,为鲜红的多肽化合物。它和双链的DNA形成稳定的络合物,但不与单链DNA形成络合物;连结的程度取决于DNA的鸟嘌呤含量。这种药物可能是进入到DNA双螺旋的小沟处。光学显微镜ARG研究证明, ^3H -放线菌素D定位于细胞器中Feulgen阳性反应部分,或是用荧光显微镜测出的有核酸之处。EMARG也证明 ^3H -放线菌素D结合DNA的特异性,它与细胞核特别是其中的染色质有强烈的结合能力。这对于微量DNA的测定是有一定价值的。例如,关于蛙卵母细胞内的卵黄颗粒是否存在DNA的问题,以 ^3H -放线菌素D应用于EMARG,便显示出用Feulgen反应无法测出的微量DNA,而且证明它是定位于卵黄颗粒的表层。我们在丰年虫的卵母细胞中也得到相同的结果,见图版XVIII(封三)。在EMARG中使用 ^3H -放线菌素D来测定DNA,其独特的优点是:(1)能将使用其它示踪化合物或细胞化学方法难于显示的微量DNA标记出来;(2)它既可以在活体生物材料中标记,又可在已固定的生物材料脱水过程中或在切片之后使用。这就是说,它既适用于活体,又适用于失去代谢功能的生物材料。

2. 放射性同位素的给予剂量

放射性同位素的给予剂量,首先取决于生物体的大小,其次是考虑所给予的放射性同位素在生物体内的分布规律。生物体大的,或在进入生物体内后整体广泛分布的,给予剂量要大一些;反之,生物体较小,或在生物体内局部积聚的放射性同位素,给予剂量就要小一些。

由于EMARG的切片很薄(500—1,000埃),要在这样薄的组织内获得满意的ARG结果,必须有足够的放射性同位素与之相适应。所以,不管是整体分布的还是局部积聚的放射性同位素,和光学显微镜ARG比起来,所需的剂量要大得多了。一般地说,用以研究核酸和蛋白质的 ^3H 标记的示踪化合物,成体动物注射剂量是每克体重为0.5—1微居里,细胞离体培养的剂量为每毫升培养液1—4微居里。

获得EMARG的满意结果与放射性对生物体可能引起的损伤之间,存在着矛盾。在离体培养条件下,培养液中 ^3H -胸腺嘧啶核苷的浓度低至1微居里/毫升,就呈现深度的放射生物学效应;在每毫升1.25—5.0微居里的培养液中培养24小时,HeLa细胞的生长就受到抑制,甚至 ^3H -胸腺嘧啶核苷的剂量小至0.02微居里/毫升,也会出现生长抑制效应。因此,有人主张离体培养的细胞,给予 ^3H -胸腺嘧啶核苷的剂量不要超过0.05微居里/毫升培养液。在哺乳动物体内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷,剂量只有0.5微居里/克体重,就能引起放射损伤。放射损伤除了和剂量大小有密切关系之外,放射性同位素处理的时间长短也是重要因素之一。

考虑到这一点,在使用较大剂量时,应尽可能缩短标记时间。

3. 生物材料的处理

(1) 固定和脱水: 给予放射性同位素的生物材料的固定和包埋,与电镜一般观察所要求的完全相同。

(2) 包埋材料: 用于电镜生物材料的包埋剂主要有两类,一类为甲基丙烯酸酯,另一类为环氧树脂。前者由于引起生物材料的收缩较大,故已逐渐为环氧树脂所取代。但是,在 EMARG 中,使用甲基丙烯酸酯包埋却有一定好处,即标本的电子染色时间很短就能获得满意的反差。而环氧树脂包埋生物材料的染色时间则较长,有的甚至需 3—4 小时,这样长时间的染色处理,如果在覆盖乳胶膜之前进行,可能引起放射性物质从切片中脱出;若是在显影之后进行,则可能由于明胶膨胀而导致银颗粒的丢失或移位。所以尽管甲基丙烯酸酯包埋剂存在着缺点,还是有人主张使用它。实际上,它所引起的生物材料的收缩程度,尚在 EMARG 的分辨率误差范围之内。但目前使用环氧树脂包埋的较多。

(3) 切片的厚度: 理想的切片厚度是尽可能的薄。影响敏感度和分辨率的主要因素之一是切片厚度。放射性同位素的含量与切片厚度有密切关系,这又直接影响曝光时间的长短。在一定量的放射性同位素的情况下,如果切片太薄,在单位时间内核子乳胶所获得的带电粒子的数目就少;反之,切片过厚时,将损失分辨率。如要切片较薄又保持良好的分辨率,则需要给予生物体以更多的示踪化合物,这会增加放射损伤的危险。

和光学显微 ARG 不同,因为 EMARG 的超薄切片很薄,自吸收现象不是一个重要问题。对于 ^3H 来说,即使切片厚度增至 1,000 埃,也无自吸收问题。

超薄切片厚度的判断,一般是依据在双筒放大镜下,直接观察浮在玻璃刀水槽液面上切片的干涉光颜色来估计(图 1);在 EMARG 中,通常选用银灰色至金黄色之间的厚度,这相当于 500—1,000 埃。在作准确的定量实验时,可使用入射光干涉仪对切片厚度进行精确测定。

4. 核子乳胶薄膜的制备

在超薄切片之后,需在切片上覆盖一层核子乳胶膜,然后进行曝光。由于电镜本身性能的限制,核子乳

胶膜不能太厚,一般要求卤化银晶体在乳胶膜成单层分布。制备单层的乳胶膜,对于分辨率来说是很理想的;但是在卤化银之间由明胶所形成的空间,将大大降低带电粒子对卤化银的作用效率,带电粒子穿过明胶而失去作用。很明显,对于微颗粒卤化银晶体重叠的乳胶膜来说,如果带电粒子射程超过单层卤化银的厚度,那么增加乳胶膜层就会提高敏感度。人们一般把所有合适的乳胶膜均称之为“单层”乳胶膜。所谓合适的乳胶膜,就是在卤化银之间明胶空间最小的薄层致密乳胶膜。据报道,把 Ilford L4 型核子乳胶膜的厚度从 1,300 埃增加到 2,700 埃时,敏感度提高 60%。此外,敏感度和带电粒子的射程有关。例如, ^3H 射程较短,即使把乳胶层厚度增加到约 1,700 埃以上,也不再影响敏感度;而对于射程较长的 ^{14}C 和 ^{35}S ,随着乳胶膜厚度增至 2,800 埃,敏感度将直线提高。这就是说,如果为了提高敏感度而增厚乳胶膜,还必须考虑所使用的放射性同位素的射程。

为了测定合适的乳胶层,最可靠的方法是把制备的乳胶膜置于载片上,用干涉仪测量。而普遍采用的简易方法,是根据经验由乳胶膜在载片上呈现的干涉光来判断(图 1)。

核子乳胶的使用过程,都要在暗室红光下进行。核子乳胶在常温下为半固体状态,当温度增高到 40°C 以上时则成液态。制备乳胶膜时,先按需要量取出,置于干净的小烧杯内,加入适当比例的重蒸馏水稀释,在 45°C 恒温水浴中溶解 15 分钟,溶解时用玻璃棒轻轻搅拌(大力快搅会产生许多泡沫,对以后操作不利)。许多方法都能制备均匀的乳胶膜。现将几种常用的方法简述如下。

(1) 环套法: 核子乳胶溶解后取出,置于冰浴 2—3 分钟,再在室温放置 15—30 分钟;这是为了使溶解后的乳胶成为粘胶状,便于下一步操作。乳胶成粘胶状后,用金属丝(白金、银或镍等)做成一个直径为 4 毫米的环(图 2a),用前洗净,浸入乳胶中(图 2b),轻轻提起,在环内即形成一单层乳胶膜(图 2c);然后,把这乳胶膜轻轻地直接套在置于小柱(用玻璃、有机玻璃或木料制成)顶上的有载网的切片上(图 2c)。或者,将标本置于载片上,使用大金属环制备和转移乳胶膜(图 2d)。把这些覆盖了乳胶膜的标本置于无尘处干燥,然后放在备有干燥剂的小暗盒内,在 4°C 条件下曝光。

金属环直径的大小,可根据需要而定。如是用于单个标本的,直径可以小一些(图 2c);如是用于载片上多个标本的,则要大一些(图 2d)。应注意到,环的直径大小以及乳胶粘度情况,均影响制得的乳胶膜的厚度。环的直径小或者乳胶的粘度大,形成的膜比较厚,反之则较薄。冰浴的时间要控制好,如冷却不够,在环内形成的膜会产生粗大的乳胶漩涡,也即膜是

乳胶	干涉光颜色	切片
	灰色	
500	银色	500
1,000	金色	1,000
	铜色	1,500
1,500	紫色	
	蓝色	2,000

图 1 乳胶和切片的厚度(埃)

不均匀的;反之,乳胶粘度太大会形成过厚的膜。

由于各种乳胶的物理特性不同,所以,对于不同型号的乳胶,使用环套法不一定能形成满意的乳胶膜。

(2) 浸涂法:这是将有放射性同位素的超薄切片,直接浸入已溶解好的乳胶中制膜的方法。采用浸涂法时,有如下两种比较常用的标本制备法:

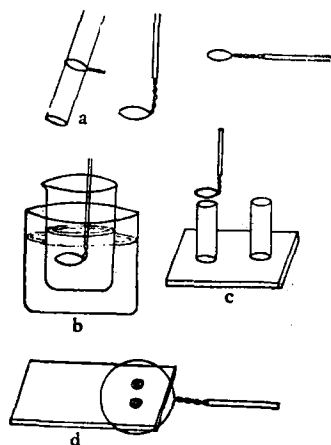


图2 环套法

其一,用一洗涤干净的载玻片,在其约三分之一处贴一小片双面胶纸,把超薄切片载网的边缘贴于胶纸上,每片载片可贴2—4个标本(图3a);涂覆乳胶时,把有标本的载片一端慢慢浸入并提起,用滤纸抹去载片背面的乳胶,垂直地置于无尘处的滤纸上令其自然干燥(图3b, c)。干燥后,标本连载片一起置于暗盒内曝光。

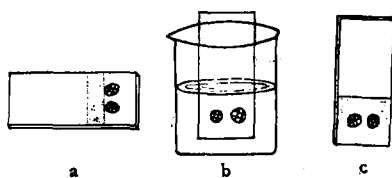


图3 浸涂法之一

其二,又称平基法。把载片洗净、干燥,一次浸入0.5%火棉胶溶液(溶于醋酸戊脂)中以涂上一层火棉胶膜;取出后,垂直放于下面垫有滤纸的架子上干燥。火棉胶膜越薄,标本的反差越好;但是,火棉胶膜稍厚些,则剥离较容易。火棉胶的浓度可为0.5—1%。切片时,把有火棉胶膜的载片平放着,滴上一滴蒸馏水,用一根细尖小木楔或小金属环,从切片刀水槽中捞取若干切片浮在水滴上(图4a)。去掉多余的水,在无尘处干燥。操作时应小心,不要损坏火棉胶膜。干燥后进行常规染色,可先用2%醋酸双氧水溶液染色,再用柠檬酸铅染色(图4b)。染色时间的长短取决于生物材料和所用的包埋剂。染色后用蒸馏水洗,干燥后,真空喷涂一层50—60埃厚的碳膜(图4c);按上法浸入乳胶内(图4d),取出后擦去背面的乳胶,垂直置于无尘处干燥;然后放在暗盒内曝光。经过曝光和显影后,把载片浸入蒸馏水15—30分钟,然后用小刀把有切片的乳胶膜和支持膜一起轻轻地从载片剥离,载片斜浸

入水中,有标本的膜即浮于水面(图4e);这时乳胶膜是朝上的,用镊子将载网置于有切片的乳胶膜上,再用滤纸或载片从水面上将它们一起捞起(图4f),置于滤纸上干燥。或在曝光和显影后,从载片上将切片-乳胶膜剥离一半,将载网置于切片原处,把载片往回拉,使切片-乳胶膜盖在载网上,随即取出(图4g, h);干燥后,沿载网周围剥离切片。如果不能剥离载片,可再将载片在水中浸泡直至膜能剥离。标本干燥后即可在电镜观察。

采用平基法时,在使用乳胶之前以及显影之后的操作都可在白光下进行,所以比较方便。从载片上剥离切片和膜时,有可能发生不易剥离的困难;造成这个困难的原因之一是载片没有洗干净,或者是火棉胶膜太薄。

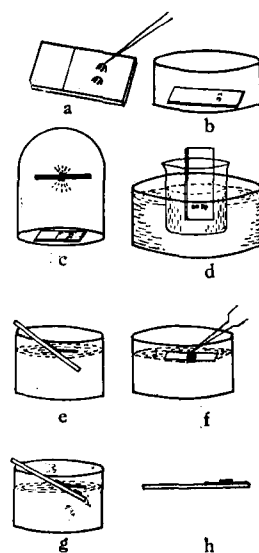


图4 浸涂法之二(平基法)

(3) 泡盖法:制备好的有载网的切片置于干净的载玻片或小柱顶上,用玻璃显微操作器毛细管的尖咀收集少量乳胶,轻轻地吹气,管的末端便形成一个泡,泡的直径约2厘米,覆盖于切片上,直至这个泡自行破裂,即形成均匀的单层乳胶膜。干燥后曝光。

此外,还有一些其它制备乳胶膜的方法,如离心法、镀银法等。目前,较易操作而被广泛采用的是环套法和浸涂法;其中,以平基法制备的乳胶膜较为紧密、均匀。

无论采用哪一种制膜方法,每次实验之前均应进行预备试验,把所制备的乳胶膜用电镜检查,以保证正式实验时能有把握地制备合适的单层乳胶膜。

5. 曝光条件

曝光,是指在切片上覆盖一层核子乳胶膜后,在暗盒内让切片中放射性同位素的带电粒子,与乳胶中的卤化银作用的过程。

曝光是 ARG 中的重要步骤之一。曝光条件对雾点的多少、敏感度和潜影衰退都有影响,所以应予注意。

(1) 温度:曝光时温度过高,会引起雾点增加;温度太低,则会降低敏感度。因为 EMARG 标本的曝光时间一般比较长,所以宜在低温曝光,一般为 4℃。但也有在室温曝光的。

(2) 湿度:曝光时,相对湿度最好为 45—50%。湿度太大,即使雾点增多,又加速潜影衰退。所以,在

曝光时暗盒内要放一些干燥剂。

(3) 曝光时间的估计: 决定曝光时间的因素是切片中放射性物质的含量、切片的厚度、带电粒子的能量与温度条件等。要做到准确地估计曝光时间是有一定困难的, 因此常常采取简单的办法来估计: 如果光学显微镜 ARG 标本需曝光一星期的话, 那么 EMARG 标本将需要曝光 2—4 个月。

6. 显影

显影作用是以每个卤化银晶体为单位, 从已曝光者开始的。在一般情况下, 不会使未曝光的卤化银晶体显影。

显影方法有两种: 化学显影和物理显影。化学显影是银离子和显影液间进行还原反应的过程, 即银离子被还原为金属银, 而显影液的离子或分子则被氧化。物理显影在定影之后进行, 先用不会严重损害潜影的硫代硫酸钠或其他溶剂溶去卤化银, 然后在含有还原剂、可溶性银盐以及可使银离子与氢离子保持在适当浓度的某种物质溶液中, 显出影像。在此过程中, 似乎主要是银离子的催化还原, 银是来自显影液中的可溶性银盐, 而不是原来的卤化银; 显影液中的银离子在潜影中心表面被还原。

(1) 显影液的选择: 显影液成分不同, 所显示的银颗粒形状和大小也很不一样。对于 EMARG 来说, 显影液的选择远比光学显微镜 ARG 的要求严格。电镜观察时, 如果显影颗粒过大, 既影响对亚显微结构的辨认, 又影响分辨率, 所以要求显影颗粒的粒度应尽可能小。

明胶的膨胀与显影液的 pH 值有关, pH 值低于 7 时膨胀最少; 因此, 选用 pH 为中性或稍为偏酸的显影液比较好。此外, 高效率 and 产生的雾点最少也是重要条件之一。有人认为, 米吐尔-对苯二酚显影液, 例如 D19 或 D19b, 效率最高而且雾点适度, 可惜的是它的显影颗粒非常大; 而 Microdol X 显影颗粒较小, 但其效率却比 D19 或 D19b 为低。阿米多显影液 (Brussels 配方) 的 pH 值偏酸 ($\text{pH}=6.4$), 雾点的产生率相当低, 虽然显示的银颗粒是丝状体, 但比 D19 所产生的为小, 又因为靠近中性, 所以是比较合适的显影液之一。目前, 以使用 Microdol X 显影液为最普遍。

(2) 显影温度: 和一般化学反应一样, 显影液的温度高或低, 与其作用的快慢成正比。若温度高而时间掌握又不合适, 就容易产生过多的雾点。其次, 还应注意温度对核子乳胶中明胶的作用, 尤其是对于低温下曝光的标本, 如果立即在较高的温度下显影, 由于温差大, 会引起明胶的突然膨胀; 而明胶的膨胀, 必将导致银颗粒的移位, 严重的可能会引起丢失。所以, 显影液的温度以保持在 15°C 较为合适。但由于各种显影液性能不同, 实际工作中也有使其温度为 20°C 的。

(3) 显影时间: 显影时间的长短, 一般根据所用

显影液的特性、显影液温度、浓度以及核子乳胶的敏感度及其厚度等条件决定。在相同条件下, 显影颗粒的大小随显影时间的增加而增大, 而且雾点也相应地逐渐增多。所以, 适当选择显影时间是很重要的。显影时间不足, 不能恰当地将全部潜影显示出来; 时间过长, 会使一些未经放射性粒子激发的卤化银强迫显影, 造成雾点过多。目前, 根据所用的多数显影液, 一般是显影 2—4 分钟; 也有少数需要比较长时间的, 这需视显影液而定。

(4) 定影: 定影过程是把那些未经激发的卤化银从乳胶中溶去, 而又不损害银颗粒。理想的定影液, 应该是只溶解卤化银而保留银颗粒。硫代硫酸钠溶液, 是溴化银的强烈溶剂, 所以它是一种有实用价值的定影剂; 但是, 硫代硫酸钠也在某种程度上溶解银, 尤其是在有氧时溶解度更高。在含有重亚硫酸盐的弱酸性溶液中, 二氧化硫起氧化剂的作用, 促使银的溶解率增高; 在强酸性溶液中这种作用极为明显。因此, 比较起来, 对于 EMARG 标本的定影, 硫代硫酸钠溶液还是较好的, 一般的使用浓度为 20—30%。

(5) 水洗: 已经定影的标本, 含有大量的硫代硫酸钠, 去除这种离子可增加银颗粒的稳定性, 这就是水洗的目的。水洗时要用蒸馏水, 一般水洗数次, 每次 30 秒至 1 分钟。

7. 标本的处理

由于在切片上面覆盖着一层明胶, 这将大大地影响亚显微结构的清晰度, 所以, 经显影和定影后的 EMARG 标本, 还需经电子染色和去除明胶以提高反差, 才能满意的观察实验结果。

(1) 染色: EMARG 的标本和电镜普通标本一样, 使用铀和铅染色以加强反差。但在 EMARG 中, 在考虑反差适当的同时还应顾及其他因素。切片在覆盖核子乳胶膜之前染色, 称为先染; 切片在核子乳胶膜曝光和显影之后染色, 称为后染。先染的优点是切片上面没有乳胶膜, 给出良好反差的染色过程比较容易掌握, 不致由于染色而使银颗粒移位或消失; 缺点是可能在染色过程中移去一些放射性物质, 可能产生在曝光时干扰乳胶的化学基团。所以, 先染的标本在染色后必须于切片上喷涂一层碳膜 (50—60 埃), 以防止产生化学污迹。后染的优点是可较好地保存切片中的放射性物质, 可利用染色和去除明胶两者结合, 大大增强反差; 缺点是在去除明胶的同时, 将损失部分银颗粒或使银颗粒移位, 影响实验的正确结果, 还容易在明胶上产生染色沉淀。可见, 先染和后染都各有优缺点。如条件掌握的好, 就可能获得比较满意的结果。例如, 已有实验证明, 用柠檬酸铅染色会损失已显影的银颗粒, 但是如果将这种铅染液用 0.02N 的 NaOH 稀释 8 倍, 于显影后染色, 既能除去明胶又不损失已显影的银颗粒。强

(下转第 59 页)

1. 去盐

最常用的去盐法是使用透析袋*透析。细的透析袋透析效率高,所需时间短,但将蛋白质溶液从袋中倒出时,沾在袋壁上的蛋白质较多,需用较多的生理盐水冲洗,结果又有所稀释。因此对透析袋应有所选择。

透析袋应事先用水充分洗涤以去除增塑剂。将透析袋一端折叠,用橡皮筋结扎,试一下是否漏水,然后倒入待透析的蛋白液,蛋白液勿装得太满,应留一些空隙,并加入1—2个直径为5—7毫米的玻璃珠,以便在透析过程中翻转透析袋时,玻璃珠起搅拌作用,然后将袋的上端也扎紧,即可进行透析。开始可用流动的自来水,待大部分盐被透析出后,再改用生理盐水、缓冲液或蒸馏水,透析时最好在低温下进行。

电透析较普通透析法快得多,设备也不复杂,只需两支电极(如炭精棒)和一个输出功率较大的电压可调的整流器(不要求稳压)。开始透析时,由于盐的浓度较高,要用低电压(即使电压低时,电流也很大)。随着透析袋中盐浓度的降低(在去盐过程中要经常更换透析外液),应逐渐升高电压,直至将盐完全透出为止(此时电流值很小)。值得指出的是,由于电流(直流)通过透析内外液时能产生热,故应加以适当冷却,亦免引起蛋白质变性。

用葡聚糖(G-25)**去盐效果很好,如每次需要去盐的蛋白质溶液为10毫升(内含浓盐),则可用60×2厘米的G-25(已溶胀的)柱,用水或生理盐水(也可用

挥发性缓冲液如0.05N醋酸吡啶或碳酸氢铵等,这类盐在冷冻干燥时即可除去)平衡后,即可上柱,每次上10毫升蛋白质溶液,用水或生理盐水或上述挥发性缓冲液洗脱,洗脱液用分光光度计测定,测得的第一峰为蛋白质,第二峰为盐,此法去盐较透析法为快。

2. 浓缩

浓缩蛋白质溶液最好用冰冻干燥法(制成干粉)。冰冻干燥机有国产商品,也可用土办法自己安装(只需一个容量较大的真空泵、玻璃干燥器、大口暖壶、干冰、五氧化二磷及乙醇等)。

没有上述条件也可用透析袋进行浓缩,将待浓缩的蛋白质溶液放在透析袋里,两端扎紧后,置于搪瓷盘中,透析袋周围加入聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮或蔗糖,透析袋中的水分即可被这类化合物吸出来。吸过水分的高分子化合物还可以通过加热进行再生。

另一种浓缩方法是将盛有蛋白质溶液的透析袋悬挂起来,用电风扇吹风(最好在10℃以下进行),也可达到浓缩目的。

也可将装有蛋白质溶液的透析袋(直径小的)放在干燥器中,干燥器连接水泵进行抽气(负压浓缩法),也易达到浓缩目的。

* 天津人民造纸厂产,也可用玻璃纸代替

** 天津工农兵食品厂、上海生物化学研究所东风生化试剂厂产

(上接第54页)

碱性染液会消化明胶层,从而导致银颗粒的移位或消失,这是应注意的。

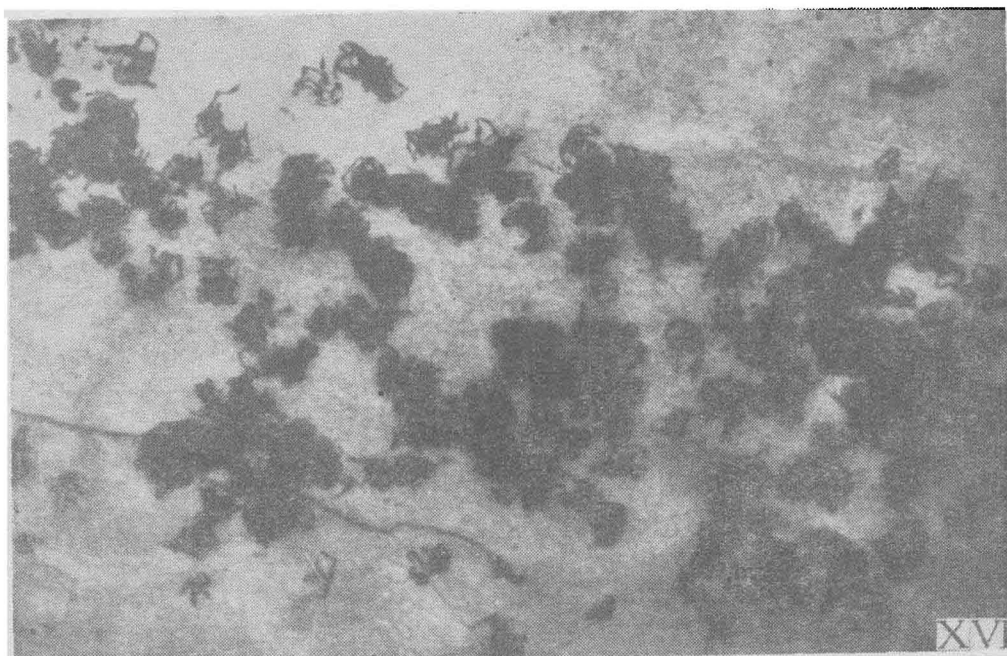
(2) 去除明胶:在标本显影之后去除明胶。或在去除明胶之后再染色,或在染色的同时兼除明胶。方法不同,效果不一,有的银颗粒有丢失或移位的现象,有的效果较好,没有影响银颗粒。去除明胶的方法很多。例如,用酶处理:显影后的标本用0.2%胰蛋白酶于38℃处理1小时,用蒸馏水洗数次;或用新鲜配制的0.5%高峰-淀粉酶(Taka-diastase)于室温处理10分钟,然后用蒸馏水洗2—3次。用酸处理:以0.1—0.2N醋酸于37℃处理5—15分钟,蒸馏水洗。用碱处理:以0.5N NaOH处理5—15分钟,用蒸馏水洗数次;或以0.1% NaOH处理数分钟,用蒸馏水洗。用水处理:标本置于37℃的蒸馏水中16小时。

当染色兼去除明胶相结合时,则将蒸馏水100毫

升、氢氧化钠4克、酒石酸钾钠1.6克和氧化铅适量的混合液煮沸15分钟,冷却后过滤;使用时稀释20—200倍(一般稀释100倍),染色后要充分水洗。此法对去除明胶及电子染色的效果均好。此外,还有柠檬酸铅染色法。

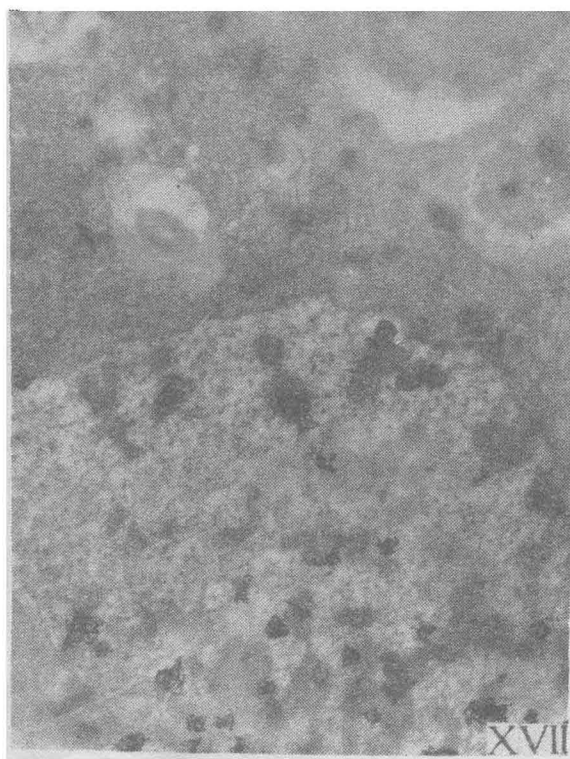
上述各方法均能去除明胶、增强反差,但往往会在去除明胶的同时引起银颗粒移位或减少的现象。因此,去除明胶时要先作预备试验,选择可靠的合适条件(如溶液浓度、温度和处理时间等)。否则,宁可反差差一些也不宜进行去除明胶。

上述各步骤完成并待标本干燥后,即可在电子显微镜下观察。现在,我国已经研制成功适用于电镜放射自显影术的微颗粒核子乳胶。在毛主席革命路线的指引下,随着科学研究的不断深入发展,电镜放射自显影术的应用必将更加广泛,电镜放射自显影术本身也必将不断地获得改进和提高。



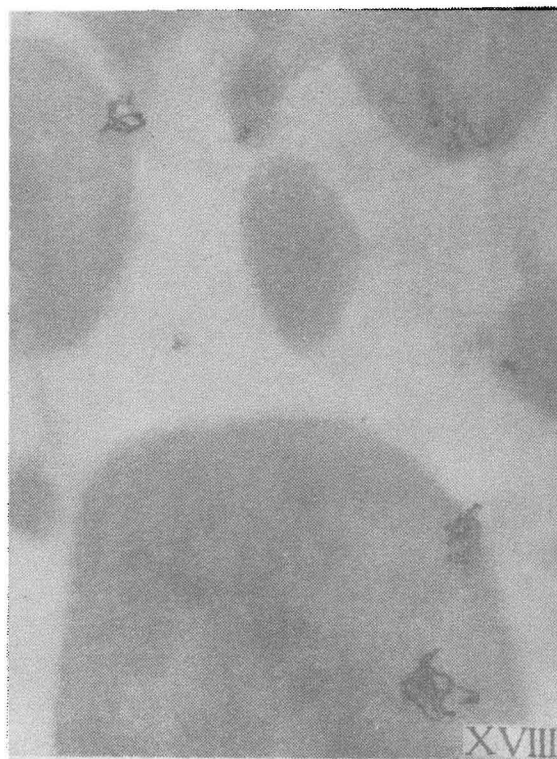
图版 XVI 小金鱼的上皮细胞核

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)