

一种新的生物组织固定方法

——微波辐射固定

赵 敏

(第三军医大学野战外科研究所, 重庆 630042)

提 要

微波辐射使生物组织均匀产热, 灭活酶, 可以广泛用于光镜、电镜、常规染色、各种特殊染色及免疫组化研究中组织标本的固定。固定液浸泡微波固定的方法可用于大块组织的快速固定, 且染色效果更好。是一种较为理想的固定方法。

关键词 微波辐射, 组织固定, 组织学, 超微结构

固定是组织结构及超微结构研究中制作切片的基础之一。固定能防止组织自溶及变性、凝固或稳定蛋白, 并能加强组织对随后制样过程的耐受力, 增强染色效果。目前, 多用化学方法及低温固定组织。尽管人们知道, 组织加热至 57℃ 时, 其自溶作用完全停止^[1], 但加热作为组织固定的方法并未能用于组织学及超微结构研究。以热传导的方式加热组织不能使大块组织内的温度均匀升高, 必然导致组织的自溶、变性。微波(MW)辐射可使含水组织快速而均匀产热, 一般认为这是微波辐射固定组织的主

要机制^[2]。近年来, 随着微波技术的发展及微波炉的普及, 微波作为一种新的组织固定方法, 引起了人们的注意。从 70 年代初到现在, 这一技术日趋完善。其具有快速固定较大组织块、方法简便、可靠、组织抗原性保存较好等优点。为此, 本文将简要介绍这一方法的原理及其应用。

微波固定的原理

MW 是一种高频电磁波, 频率范围: $3 \times 10^8 - 3 \times 10^{11} \text{ Hz}$, 波长 1—1000mm。MW 按波

- 5 Ek K, Righetti P G. *Electrophoresis*, 1980; 1: 137
- 6 Fägerstam L, Söderberg L, Wahlström L *et al. Protides Biol Fluids*, 1983; 30: 621
- 7 Haff L A, Fägerstam L G, Barry A R. *J Chromatogr*, 1983; 266: 409
- 8 Lindblom H, Söderberg L, Cooper E H *et al. J Chromatogr*, 1983; 266: 187
- 9 Lindblom H, Axjö-Fredriksson U B, Cooper E H *et al. J Chromatogr*, 1983; 273: 107
- 10 Britton V J, Beadling L C, Barry A. *Liquid Chromatography*, 1983; 1: 176
- 11 Einarsson R, Renck B. *Toxicon*, 1984; 22: 154
- 12 Righetti P G, Krishnamoorthy R, Gianazza E *et al. J Chromatogr*, 1978; 166: 455
- 13 Ogston A G. *Nature*, 1946; 157: 193
- 14 Krishnamoorthy R, Bosisio A B, Labie D *et al. FEBS Lett*, 1978; 94(2): 319
- 15 Righetti P G, Gacon G, Gianazza E *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 85: 1575
- 16 Gacon G. 12th FEBS Meeting, Dresden, Abstr. 1978; 926
- 17 Righetti P G, Gianazza E, Bosisio A B *et al. In: Frigerio A, McCamish M eds, Recent developments in chromatography and electrophoresis* 10, Amsterdam. Elsevier, 1980: 89
- 18 Righetti P G, Menozzi M, Gianazza E *et al. FEBS Lett*, 1979; 101(1): 51
- 19 Suttmar J, Dyr J E. *Electrophoresis*, 1989; 10(10): 704
- 20 Rowlands D G, Flook A, Payne P I. *Electrophoresis*, 1988; 9(12): 820
- 21 Booz M L. *BioPharm*, 1989; 2(1): 44

[本文于1990年3月5日收到, 8月7日修回]

长可分为毫米波(1—10mm),厘米波(1—10cm),分米波(10—100cm)。其量子能级为 10^{-5} — 10^{-2} 电子伏特,属于非电离辐射^[3]。MW作用于生物体,可被反射、折射、吸收或贯穿整个生物组织。被吸收部分的MW,其电磁场激励极性分子(如水、蛋白质支链等),使其发生 180° 高速旋转,由于MW频率不同,这种旋转的频率亦不尽相同。市售家用微波炉可使极性分子旋转 2.45×10^{10} 次/s。这种分子间及分子内的高速运动,可以在组织内快速、均匀地产热,并使蛋白质凝固^[2]。含水较多的组织(肌肉、内脏等)受微波的热作用明显。MW波长越长越易于透入组织。MW能量被组织吸收,除产生热效应外,还有场效应、光化学反应、电磁共振等^[4]。MW产生的 10^{-5} 电子伏特的光子能非常小,不足以改变共价键,但很容易改变非共价键,如氢键、分子间范德华力等,这些非共价键对生物分子的功能是非常重要的^[2]。

微波固定的应用及具体方法

微波最早用于脑组织中酶的灭活^[5],以阻止酶对某些物质含量的影响,保证这些物质测定结果的准确。70年代初,Mayers等将心、肝、肺、肾、肌肉等生物组织直接置于微波场中,发现这一方法能较好地保存组织结构^[6]。将标本浸泡在水、生理盐水或缓冲液中,可以更精确地控制温度、均匀升温,并防止组织表面干燥。Leong^[7]等将各个器官很大的组织块放在水中,升温至 $67-74^\circ\text{C}$,组织结构仍保存完好。Gower^[8]等则将附着有椎旁肌肉及软组织的脊柱浸泡在生理盐水中,经微波辐射固定,深埋在中央的脊髓组织结构仍非常清楚,缺点是硬度不够,切割不太方便。更多的研究者则将标本浸泡在各种固定液中经受微波辐射。在微波激励下,固定液中的固定剂更易同生物分子作用,发挥其固定作用。以戊二醛为例,仅仅是温度的升高就能成倍增加固定液中戊二醛单体(活性部分)的比例,25℃时,单体含量为25%,70℃时,戊二醛单体含量增加到60%^[9]。且固定后组织易切割^[8]。组织结构的形态计量学参

数,组织的皱缩程度、细胞核的直径等与常规方法固定的组织无显著差异^[10]。

在一般微波炉上确定升温时间的简便方法如下。以浸泡液温度为纵坐标、辐射时间为横坐标,确定一定量液体在微波炉内最大辐射量下的辐射时间-温度关系。即选取一定量的浸泡液,通常为50—100ml(根据所要固定的组织大小确定),置于微波炉内,最大辐射量下启动微波炉,分别于30s, 1min, 2min等迅速取出浸泡液,量取温度。绘出辐射时间-温度曲线(图1)。以后辐射固定时,就可以根据选定的温度,确定辐射时间^[11]。一般说来,微波辐射的时间及浸泡液的温度在一个很宽的范围内都能很好保存组织结构^[8,12]。

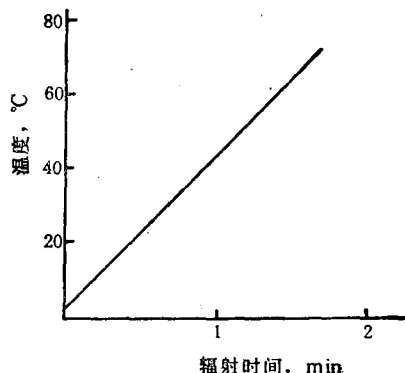


图1 30ml 浸泡液在630瓦微波炉内最大辐射量下的辐射时间-温度关系

市售微波炉的微波频率为2450KHz。该频率微波对肌肉的穿透深度是1.7cm,脂肪是11.2cm^[4]。因此,这一方法可用于 $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ 组织块的固定,而且时间少于两分钟^[10]。进行光镜标本固定时,可选用多种固定液,如福尔马林、Bouins液(5.2%甲醛、10%乙酸、75%饱和苦味酸)^[8]。在进行免疫组化研究时,也可选用生理盐水或缓冲液^[11]。微波辐射时间1—20min,浸泡液温度升至50—80℃固定效果都很好^[8,12]。辐射固定完毕后,就可进入常规制样的其他步骤。

微波辐射固定也能保存良好的超微结构,同时,不影响其立体计量学参数。线粒体及其他细胞器的面密度(S_v)与常规方法固定的测

量值类似,无显著差异^[2]。微波固定用于超微结构研究时,浸泡液可选用各种常规电镜固定液、Karnovskys液(2%甲醛、2.5%戊二醛、0.025% CaCl₂、0.1mol/L 二钾肿酸钠缓冲液,pH7.4)等。有人用生理盐水作浸泡液效果也很好^[2,12]。超微结构对辐射的时间和温度较敏感,所以升温时间应控制在1min左右,温度达到50±5℃时即应停止辐射^[2,12]。用于固定的组织块大小最好小于1cm³^[2]。整个过程仅需1—2min,之后即可进入后固定,也可放置过夜。

图2,3,4,5(见图版III)显示了Karnovskys液浸泡,微波辐射原位固定的兔脊髓组织结构和超微结构。

综上所述,微波辐射在生物组织内激励极性分子旋转,均匀产热、灭活酶,可有效地防止组织自溶,保存好组织结构和超微结构。结合一定固定液的应用,效果更好。整个过程仅需1—2min;可用于大块组织固定(光镜:2×2×2cm³,电镜:1cm³);组织结构保存良好;

免疫组化染色效果比常规固定后的染色好。因此,是一种较为理想的固定方法。

感谢王正国教授指导,张屹同志提供光、电镜照片。

参 考 文 献

- 1 Drury R A B *et al.* *Carleton's histological technique*. Oxford: Oxford University Press, 1980:40
- 2 Login G R *et al.* *Am J Pathol*, 1985; **120**:230
- 3 张瑞钧.微波、放射线有害作用及药物治疗.北京:航天医学工程研究所,1987:1
- 4 陈代珠等,医用微波技术.北京:国防工业出版社,1987:117
- 5 Stavinoha W *et al.* *Pharmacologist*, 1970; **12**:257
- 6 Mayers C P. *J Clin Pathol*, 1970; **23**:237
- 7 Leong A S Y *et al.* *Pathology*, 1986; **18**:222
- 8 Gower D J *et al.* *J Neurosurg*, 1988; **69**:719
- 9 薛广波.实用消毒学.北京:人民军医出版社,1986:247
- 10 Hopwood D *et al.* *Histochemical J*, 1984; **16** (11): 1171
- 11 Leong A S Y *et al.* *J Pathol*, 1988; **156**:275
- 12 Leong A S Y *et al.* *J Pathol*, 1985; **146**: 313

[本文于1990年4月10日收到,10月19日修回]

胆红素瞬取法提取新技术

(北京市星火技术研究所技术培训班)

根据市场调查及一些用户反映,通常使用的生产胆红素方法工艺落后,提取率低,时间长,化学药品耗量大回收率低,并且产品中胆红素含量低。加上市场滑坡,销售价下降到6—10万元/公斤,造成很多生产者失败,使胆汁无人问津。

最近我所首创出不用氯仿,只往胆汁里加几种化学药品,10多分钟即可出含量在90%以上精品的瞬取法提取胆红素技术,30个胆可提取1克胆红素。每个胆0.3—0.5元,所用化学药品费用5元左右,设备

投资50元即可生产。

成本计算:胆汁 30×0.5+药品(5元)+工资(5元)=25元/克,市场售价6—10万元/公斤。每公斤至少能获纯利2.5万元。我处免费提供48家收购厂家地址。培训费:单位500元,个人400元。函授:单位200元,个人150元。来信咨询请附邮资伍角。通讯处:北京867信箱,20816组李群。邮政编码:100024

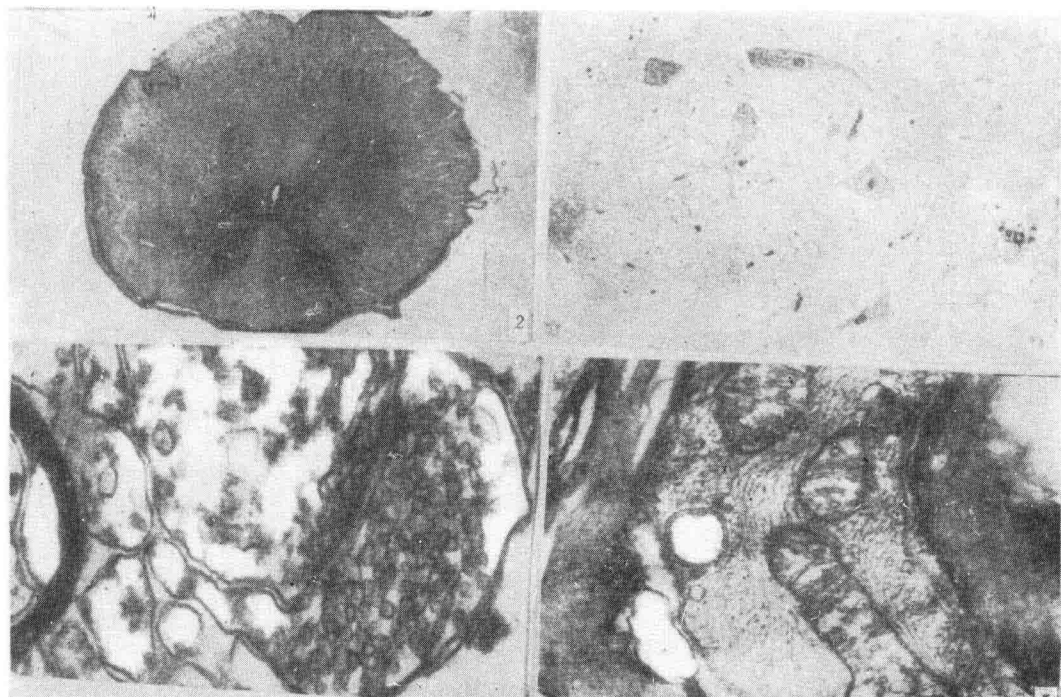


图 2 骨髓的横切面 HE 染色 $18\times$

图 3 前角神经细胞 HE 染色 $120\times$

图 4 突触结构 $40000\times$

图 5 神经细胞突起中的线粒体 $20000\times$