

用国产环氧树脂 #600 作为电子显微镜生物标本包埋剂的研究

中国医学科学院分院电子显微镜室

前言

由于电子显微镜技术的不断发展,用甲基丙烯酸丁酯和甲基丙烯酸甲酯作为生物样品的包埋剂已不能适应需要。在50年代末,60年代初,国际上已经逐步用体积收缩率小的环氧树脂和聚脂树脂类包埋剂来代替甲基丙烯酸酯类包埋剂。

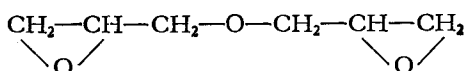
我室于1965年与北京化工研究所协作研制国产环氧树脂 #618 (国统号 E-51) 作为包埋剂,并获得较好结果。但由于 #618 环氧树脂的粘度比较高(2,000 厘泊/25℃),对生物样品的渗透性较差,浸泡过程所需时间较长,从脱水液到包埋液(Epon 812 也一样)需中间过渡,使得操作过程比较烦杂。因此,找寻一种粘度低、体积收缩小、操作更简单的包埋剂就成为近年来生物及医学电子显微镜工作者的共同迫切愿望。

我们在晨光化工厂的大力支持和指导下,几年来对一系列国产环氧树脂和环氧树脂活性稀释剂进行了探索。在此我们介绍国产环氧树脂 #600 (亦可做活性稀释剂)作为电子显微镜生物样品包埋剂的方法。

材料和方法

1. 环氧树脂 #600——二缩水甘油醚

结构式



分子量 131

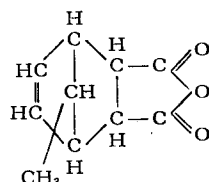
粘度 4—6 厘泊 (25℃)

沸点 90—103℃/22 毫米汞柱;无锡树脂厂生产。

2. 环氧树脂 #618 (国统号 E-51) 全国各树脂厂均有生产。

3. 固化剂 甲基内次甲基四氢邻苯二甲酐 (Methyl Nadic Anhydride), 简称 MNA。

结构式



它是浅黄色液体。分子量—178;熔点—12℃。上海试剂三厂生产。

4. 加速剂 2,4,6 三(二甲氨基甲基苯酚) [2,4,6-Tri (Dimethyl amino methyl phenol)], 简称 DMP-30。分子量—265.42。上海试剂三厂生产。配方如表 1。

表 1

用 材 重量 比例 #600:#618	环氧树脂 混合液 (#600+ #618) (以毫升 计算)	固化剂 MNA (以毫升 计算)	加速剂 DMP-30 (以毫升 计算)	适用期 (以天 计算)	粘度 (厘泊/ 25°) (估计 值)
100:0	100	160	5.2	7—8	<100
80:20	100	150	5.0	7—8	<150
70:30	100	140	4.8	7—8	<200
60:40	100	130	4.6	7—8	<250

配制方法: (#600 + #618) 混合树脂 + 固化剂 MNA + 加速剂 DNP-30, 每加入一种试剂时都必须充分搅拌。

我室应用 (#600 + #618) 按 80:20 的重量比配成贮存液, 取 100 毫升, 再加入固化剂 MNA 150 毫升, 然后加入加速剂 DMP-30 5.0 毫升,

配成“包埋液”。并用此“包埋液”对组织细胞、骨髓、血液等进行包埋,均得到满意的结果。

生物样品的制备方法

1. 固定 切成体积小于1厘米³的生物组织块,经戊二醛(3.8%, pH = 7.2—7.4)预固定30分钟至1小时后,用磷酸缓冲液(pH = 7.2—7.4)充分冲洗;再经1% 锇酸缓冲固定液(pH = 7.2—7.4)固定2小时(在冰箱中进行)。

2. 脱水 把双固定后的生物样品块逐级丙酮脱水:30%丙酮液—15分钟;70%丙酮液—15分钟;90%丙酮液—15分钟;100%丙酮液—10分钟,以上各步骤在冰箱中4℃进行。100%丙酮液—10分钟;100%丙酮液—10分钟,以上两步在室温中进行。

3. 浸透 把脱水后的样品用干燥的牙签挑到“包埋液”中浸透1—1.5小时。

4. 包埋 把样品浸透过的或另配制的“包埋液”用干燥的滴管分装入干燥的胶囊中。再把浸透过的组织块分别用牙签挑入胶囊中。

5. 固化 把上述胶囊放入60℃烤箱中烤2小时后,再升温到80℃烤24小时或60℃烤36小时即可。待温度逐渐降至室温后进行超薄切片。

结果

固化后的包埋块呈淡黄色透明固体。有优良的超薄切片性能,很易获得干涉色为“灰白色”的连续大切片。

超薄切片经32%醋酸铀(乙醇,丙酮或水溶液均可)染15—30分钟;枸橼酸铅(Reynolds法)染5—12分钟。

电子显微镜观察结果说明:(1)此种“包埋剂”的固化物在电子轰击下是稳定的,无升华现象产生;(2)细胞保存完整,无爆裂的现象,这说明此“包埋剂”的收缩率是比较小的;(3)细胞浆内细胞器和核的基质均匀,无空化及凝聚现象,微细结构保存完整,细致、反差良好,清晰(见图版IV图11,12)。

讨论

1. 此种“包埋剂”是目前国内外粘度最小的“包埋剂”。它具有如下特点:(1)对生物组织

的渗透性好;(2)适用期长(即各种成份配成“包埋液”后,在室温下较长时不固化、不变粘),因此能保持生物组织结构的均匀、完整、细致;(3)全部试剂均为液体,粘度不大,可以用体积来计算,用注射器来抽取,操作方便;(4)生物组织脱水后可以直接放入包埋剂中进行浸透,中间不要换浸透“包埋液”。而且还可使用此浸透“包埋液”来进行包埋。整个浸透过程需1.5—2小时,然后即可进行包埋。整个过程既节省人力,又可以保证质量。

2. 包埋块的硬度可以通过*600与*618比例变化来进行调整。在配方中*618的比例大些,可使包埋块硬些,反之就要稍软些。在实践中,我们发现*600成份多些微细结构似更细致。因此,在使用时尽可能选用80:20比例这组或纯*600这一组。

3. 存在问题和操作注意事项:

(1)各种环氧树脂均存在不同程度的毒性。*600可使少数接触者产生过敏性皮炎。因此,操作者最好带橡皮手套,室内保持空气流通。如有过敏反应者可用30%硼酸水(或1%盐水)浸纱布包扎;(2)吸潮性是酸酐类固化剂的通病。因为酸酐很易从空气中吸水变成酸,而失去对高分子聚合物固化能力。环氧树脂和加速剂也具有一定的吸水性。由于在生物样品的制备中,这些试剂的用量小,在固化时温度低、时间长,因而对湿度就很敏感。所以能否有效的防潮往往是实验成败的关键之一。

结论

1. *600环氧树脂配制的包埋剂,经试用证明,是一种稳定、可靠的包埋材料。细胞结构保存完整、细致、对比清晰,是当前较好的包埋材料之一。它适用于生物样品的超微结构研究。

2. 所用试剂全部国产,便于获得及推广。

3. 所用试剂均为低粘度液体,有利于生物样品的均匀浸透,配制方便,操作简单。

4. 固化物有良好的超薄切片性能。

[本文于1977年2月22日收到]

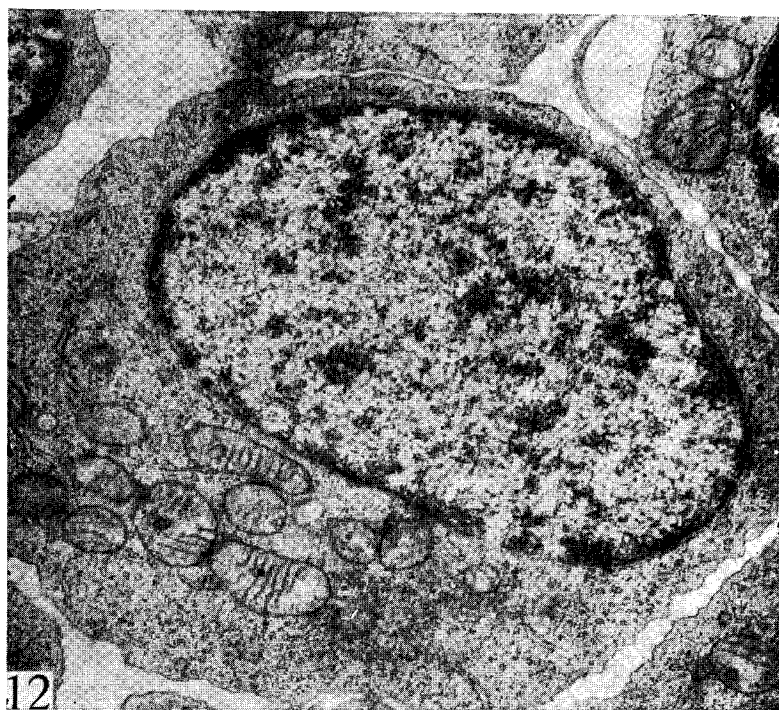


图 11 小白鼠心肌细胞 $\times 27,600$

图 12 人体急性白血病骨髓原始粒细胞 $\times 16,600$