

电镜技术中生物标本包埋剂的聚合损伤和切片质量的探讨

王芸庆 高俊峰 郝宏党

(中国医科大学电镜室)

电镜技术所使用的生物标本包埋剂,其重要作用在于能使标本切得薄到足以充分发挥电镜的分辨本领。最好的包埋剂应当使标本最少损伤、切片质量良好、对镜下观察干扰最少。通用的包埋剂由50年代的甲基丙烯酸酯过渡到现今常用的环氧树脂和聚酯。在使用中所遇到的问题主要是聚合损伤、切片质量和射线损伤。结合我们的工作经验,就前两个问题初步探讨如下。

聚合损伤是甲基丙烯酸酯的显著缺欠。Riddle (1954年)测得甲基丙烯酸甲酯单体聚合后的体积缩小约为21%,而甲基丙烯酸丁酯约为15%。包埋剂常用甲、丁酯混合液,其中主要是丁酯。可以设想,在丁酯聚合后体积缩小15%的情况下,其线性收缩小于5%,这个量对于组织细胞形态改变的影响可以认为是微不足道的。事实上,通常难以看出由于包埋剂聚合时体积收缩而引起的细胞超微结构的改变。相反的,由于聚合引起的组织膨胀倒是难以避免的。其结果使组织成份互相分离、照片内容显得很“空”。严重时,撕裂的细胞成份好象喷散开一样,所以叫做“炸裂损伤”。Watson (1963年)解释“炸裂”,是由于组织微细结构的凝胶效应加速了组织内部单体的聚合。相对于组织周围的未聚合单体来说,组织内溶于单体中的聚合体形成高渗体系。其结果,使周围介质中的单体迅速进入组织内,导致组织块产生渗透性膨胀,最坏时体积可增至原来的8倍。“渗透性膨胀”的理论可以解释,为什么 Borgsho 等用预聚合的甲基丙烯酸酯增加组织块外围的包埋介质粘度,就可使组织块内外聚合速度配合,以减

小组织内外的渗透梯度,从而在一定程度上能够控制聚合损伤。我们实验室采用这种方法,制备二种不同粘度的预聚合液体。组织块脱水经过包埋剂透入之后,使之在低粘度预聚液中浸透过夜,然后加高粘度预聚液于胶囊中45℃进行聚合,约4小时硬化,升温至60℃20小时充分聚合,结果比较满意。由于甲基丙烯酸酯包埋剂可获得较薄的切片,不染色也有较好的反差,如能注意控制聚合损伤则仍有一定的使用价值。

甲基丙烯酸酯是线状聚合,聚合体的长链交织成为固体,易被溶剂和加热所破坏,以不同方法测得在电子轰击下约有50%升华,引起微细结构变形。针对这种射线损伤,串田(1961年)用交联剂二乙烯苯使聚合的长链交联成为三维结构,试图增加聚合体的稳定性。Watson (1963年)提出加交联剂阻止聚合体膨胀,尽管做了许多努力,也只能得到部分的成功。60年代,交联固化的环氧树脂和聚酯代替了甲基丙烯酸酯。

环氧树脂的聚合与甲基丙烯酸酯不同,甲基丙烯酸酯聚合时,单体的不饱和双键只要被引发剂的一个自由基触发后,分子间立即以极高的速度进行连锁反应呈线状聚合。这种聚合是排他的。可是环氧树脂聚合时,必须加入大量的非环氧分子进行交联固化,成为三维的网状聚合体,这种外加的组份称为固化剂。固化剂必须是有二个功能团的化合物。电镜技术常用的固化剂是酸酐。

聚合体的机械性能决定于交联程度。而交联程度又取决于酸酐与树脂的比例(A/E)以及

聚合条件。因此，精确地计算酸酐的用量和适宜地控制聚合条件，就成为获得良好切片的关键因素。高度交联的树脂很难切片，工业用树脂聚合体的 (A/E) 在 0.85—1.0 之间。Luft (1961 年) 改进酸酐和树脂的比例，使用 Epon 812 时选择 A/E 为 0.7，切片效果最好。A/E 称为“切片质量”。

环氧树脂是不同大小分子的混合物，没有固定的分子量。国产环氧树脂通常用环氧值（每 100 克树脂中所含有的环氧基克当量数）、国外习惯用环氧当量（相当于一个环氧基的环氧树脂的重量数，以克表示）来计算固化剂的用量。二者的关系是： $\text{环氧值} = \frac{100}{\text{环氧当量}}$ 。

我们参照 Burke 等 (1971 年) 推荐的酸酐树脂重量百分比计算法，算出酸酐及树脂用量的配方表，常规使用，准确而方便。计算法如下：

	计 算 步 骤	MNA	DDSA	E
1.	A:E (克分子比) 0.7			1
2.	MNA:DDSA (克分子比)	75%	25%	
3.	计算 MNA:DDSA:E (克分子比)	$(0.75)(0.7)=0.525$	$(0.25)(0.7)=0.175$	1
4.	当量或分子量	178	266	170
5.	计算重量比例	$(0.525)(178)=93.5\text{克}$	$(0.175)(266)=46.6\text{克}$	$(1)(170)=170\text{克}$
6.	计算重量百分比 (总重量=310 克)	$\frac{93.5}{310} = 30.2\%$	$\frac{46.6}{310} = 15\%$	$\frac{170}{310} = 54.8\%$

DMP-30 可按包埋剂重量加 1.5%，根据上面计算出的百分比，列出包埋剂配方表，按每次包埋需要量配制，非常方便。

环氧树脂包埋剂配方表				批号×××
包埋剂(克)	MNA(克)	DDSA(克)	E(克)	DMP-30(毫升)
10	3.0	1.5	5.5	0.15
20	6.0	3.0	11.0	0.30
30	9.1	4.5	16.4	0.45
40	12.1	6.0	21.9	0.60
50	15.1	7.5	27.4	0.75

酸酐和树脂的百分比计算是采用重量/重量，表中应用缩写字及数值为：

E——环氧树脂（假设环氧当量测定为 170），

MNA——甲基纳迪克酸酐（分子量 = 178），

DDSA——十二烯基代丁二酸酐（分子量 = 266），

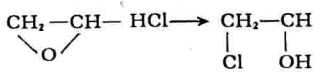
DMP-30——2,4,6-三（二甲氨基甲基）苯酚，

从经验：A/E = 0.7 时，切片质量良好。

MNA : DDSA = 3 : 1 的比例相当于 Luft 1961 年的配方。我们的经验，聚合体的硬度对切片质量影响不大，这个比例关系在 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下对一般组织适用。这时与树脂结合的酸酐量分配为 75% MNA，25% DDSA。

选择以上数值进行计算：

不同批号的环氧树脂其环氧当量都有相当的变化，所以对每批新树脂都需测定。我们采用盐酸丙酮法（燃化部 1972 年颁布的试行部标准 EG₂-741-72，E 型环氧树脂测定法）¹⁾，原理是，环氧基在丙酮溶液中与 HCl 进行当量反应。



用 NaOH 滴定反应剩余的 HCl 计算出被

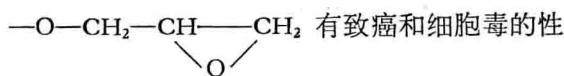
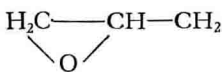
1) 环氧当量测定工作是在化学教研组商维邦同志大力帮助下进行的。

环氧树脂吸收的 HCl 克当量数,这也就是样品环氧树脂的克当量数,则环氧树脂的克当量

$$= \frac{\text{样品的重量(克)}}{\text{环氧树脂的克当量数}}。$$

环氧树脂粘度大,假如与酸酐混合不均或浸透不充分,都会影响聚合质量而使切片困难,出现颤痕或碎裂。因此必须注意充分搅拌,我们自制简易旋转式标本瓶摇动机,用红外线加温标本瓶。在 30℃ 的条件下摇动约 4 小时,可达到充分浸透。包埋后经 35—45—60℃ 各 24 小时固化。用玻璃刀可以很顺利地切得 500—600 埃的大形连续切片,用 150 网孔/3 毫米的铜网可不用支持膜捞片。

近年来许多实验室不断地寻找低分子量的环氧树脂或活性稀释剂,以求能够克服浸透的困难。但是,环氧化物和环氧树脂的毒性在于二个环氧基功能团,二个环氧基间碳原子越少毒性越大,已知二缩水甘油醚



有致癌和细胞毒的性质。我们使用上述方法,将脱水到无水丙酮那步的组织块直接放入包埋剂浸透。不使用任何活性稀释剂,聚合后的包埋块可达到良好的切片质量。

几年来,我们使用环氧树脂做包埋剂,注意了以下几个环节:测定环氧树脂的环氧当量,注意 A/E 的准确配方,和加温摇动促进浸透,分段加温并延长聚合时间,应用 Epon 812 得到稳定的切片质量(图版 II 的图 4,5)。

参 考 文 献

- [1] Watson, M. L.: *J. Appl. Physics*, **34**, 2507, 1963.
- [2] Luft, J. H.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409, 1961.
- [3] Luft, J. H.: *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*, p. 1—31, 1973.
- [4] Burke, C. N. et al.: *J. Ultrastructure Res.*, **36**, 119, 1971.

[本文于 1978 年 2 月 1 日收到]

三碘甲状腺原氨酸的放射免疫测定 及其临床初步应用

连秉钧 许河生

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

何德华 邓守真 朱禧星 林祥通

(上海第一医学院华山医院)

三碘甲状腺原氨酸(简称 T_3)的放射免疫测定方法,是近年来甲状腺功能实验的主要进展之一。对于常见病,多发病的甲状腺患者的早期诊断,疗效观察以及了解患者甲状腺机能动态变化,测定其血清中 T_3 含量是一个重要的客观指标,并对于 T_3 甲亢具有特殊诊断意义。

T_3 是一个半抗原物质,分子量为 650,故不具有抗原性,但当它与蛋白质或多肽形成共价

复合物后,就具备免疫原性^[1]。因此制备高纯度的 T_3 且把它与大分子载体联结,是产生特异性抗血清的关键。我们采用了两种方法联结,并进行了比较。此外,对抗原纯化,标记,免疫反应中游离抗原和结合抗原的分离以及 T_3 与甲状腺结合球蛋白(简称 TBG)的结合阻断剂均作了摸索。现将工作中牵涉的方法学有关问题以及在临床应用的初步结果总结如下。



图 4 人胃主细胞和壁细胞 10,000×

4

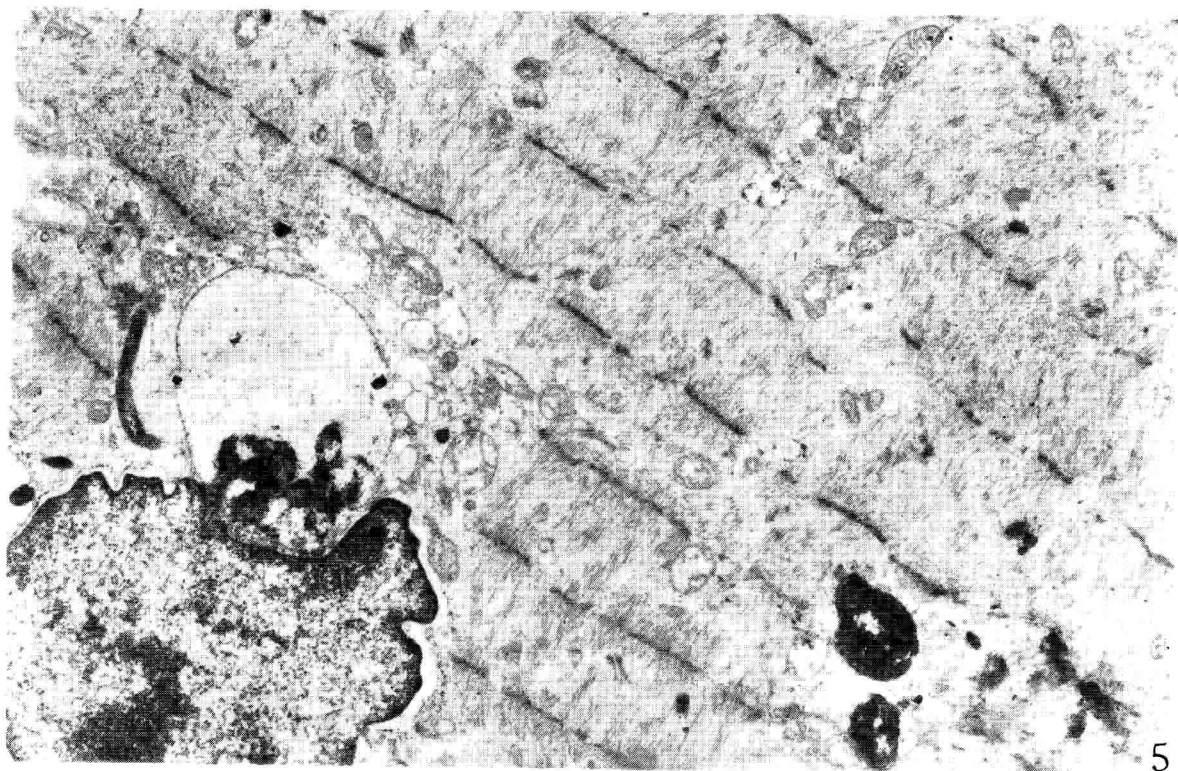


图 5 脊髓灰质炎恒河猴的萎缩肌纤维 17,000×

5