

放射自显影在医学研究中的应用

张 家 兴

放射自显影是利用感光乳胶记录被研究材料中放射性物质分布和定位的方法。它的原理和普通照象一样,由于被研究材料中的放射性同位素放出的射线作用于感光乳胶,使感光乳胶中的卤化银感光形成潜影,经显影剂作用后感光的卤化银还原成为黑色的银元素颗粒,再经定影去掉未感光的银盐,便在乳胶中留下清楚的图象。因为放射性同位素本身能在与其紧密接触的感光乳胶中记录下自己存在的部位和强度等,所以称为放射自显影。

放射自显影已有约一个世纪的历史,第二次世界大战后发展较快,尤其近二十年来,其应用的广度和解决问题的深度都与以前大不相同。因此国内外都还把放射自显影作为新技术来介绍^[1,2]。

放射自显影可分为整体水平、组织水平和细胞水平三种,分子水平的工作尚处于初期阶段。本文侧重介绍细胞水平的工作。

放射自显影有它独特的优点,它不能被盖革或闪烁计数所代替,因为后者不能鉴别许多紧密聚在一起、互相之间只有几微米的辐射源,除扫描法外也不能给以直观的图片式的记录。在生物学和医学研究中,放射自显影已经显示出很大的优越性。它至少有以下的特点:

(1)放射自显影是形态学和摄影艺术结合的产物,能给以生动而直观的结果;(2)记录逼真确切,避免了某些研究方法所得的结果,在解释时难免带有个人的偏见的弊病;(3)放射自显影把形态、机能和代谢统一起来,可以研究生物体内的动态变化过程,这是放射自显影的独到之处,因而被称为现代机能形态学方法;(4)灵敏度高,对于达到细胞水平的生物样品作为实验对象时,放射自显影几乎是测量样品内放射性唯一的方法,在延长计数时间的情况下,甚至低到每天一次的计数率也有可能记录下来;(5)操作简便,易于开展工作。由于放射自显影具有上述优点,特别是近年来,由于核乳胶的改进和³H标记化合物的应用,放射自显影的分辨力使用电子显微镜已达0.1微米以下,在光学显微镜下达1微米,放射自显影的技术方法也有许多改进,在生物学和医学研究工作中得到普遍的应用。本文不可能述及它在各个方面的应用,只能概要地谈到与医学有关的某些学科中应用的情况。关于放射自显影的细节已有许多专著^[1,2],本文不拟评述。

进行放射自显影所需要的最基本的材料是原子核乳胶及合适的标记化合物。目前我国生产的核乳胶有核-II、核-III、核-IV、核-V四种型号^[3,4,5],其中核-II适用于甲种辐射,其余三种都是对乙种射线敏感的,只是对乙种辐射的灵敏度不同。据我们的体会,核-IV足以满足光学显微镜下细胞水平研究工作的要求。在放射自显影中应用较多的同位素是³H、¹⁴C、³²P、³³S和¹³¹I,较少应用的有⁵⁹Fe、⁶⁰Co和⁵¹Cr。近年来³H标记化合物应用极为普遍,因为它的平均能量只有5.7千电子伏特,在乳胶中的射程在1微米以下,具有高度的分辨力。

放射自显影在药理学及毒理学中是十分重要的研究手段。同位素标记的药物引入机体后,连续取材制备放射自显影标本就可以发现药物分布的时间过程和相对浓度。药物选择性定位用放射自显影很容易检查出来,如维生素甲集中在视网膜,阿托品在睫状体和虹膜,氯丙嗪在脉络膜,二甲基亚砜在晶体。这样的发现对于阐明这些药物的作用原理和副作用的原因是极其有价值的。这种技术对研究母体给药对胎儿的影响提供了有意义的资料。例如硫脲选择性地积蓄在甲状腺内,这就解释了新生儿甲状腺机能低下是由于母体在怀孕期间使用了这种药品。还发现四环素也可少量通过胎盘集中在胎儿骨骼内。放射自显影有时显示的是药物分解产物定位,如果药物的分解产物仍然带有同位素,就不表示母体化合物的分布和定位。例如³²P标记的三磷酸腺苷是非常不稳定的,注入机体后很短时间内放射自显影就将显示出标记的二磷酸腺苷和单磷酸腺苷的定位,还可能标记上核苷酸和配糖体。³²P-磷酸盐要有一半通过代谢途径分解和转变成其它带磷酸盐的化合物。如果应用不分解的化合物,问题就比较简单了。例如巴比妥(二乙基丙二酰脲)排泄前不分解,因此³H标记的巴比妥能确实地显示出这个药的分布和相对浓度。尽管有上述困难,许多出色的工作还是用能分解的药物进行的^[6]。

除了评价药物以外,某些重要的物质如激素、蛋白质、核糖核酸、脱氧核糖核酸、致癌物质的代谢和合成以及免疫学的研究都可以应用放射自显影。

放射自显影在血液学中已成为一个基本的研究工具^[7]。血细胞的增殖、分化、成熟和死亡的规律及维持造血系统动态平衡的规律决定了血细胞的动力学,只

是放射自显影在血液学中应用之后,才得到细胞动力学的确切的资料。

制备骨髓和血液的自显影标本可以先对动物注射标记化合物,人体骨髓可用体外培养的方法进行标记。骨髓中有不同系统的细胞,除红系统和粒系统外,还有巨核细胞、淋巴细胞、浆细胞和单核细胞等,无论哪个系统又都分为原始细胞及各种不同成熟阶段的细胞。这些细胞混杂在一起,若想研究某一类型细胞的功能状态,只有使用放射自显影方法才有可能,因为它可以对骨髓细胞进行单个分析。骨髓细胞的自显影可提供下列基本情况:

1. 标记细胞的类型;
2. 某类细胞标记百分率;
3. 标记在细胞哪一个部分;
4. 一个细胞标记的数量;

5. 在细胞中以什么样的化学型式标记。举例说明如下:人的骨髓细胞用 ^3H -TdR(用 ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷)在 37°C 培养3小时(0.25微居里/毫升,比活性1.8毫居里/微克分子),曝光两天,所得到的结果是:

(1) 中幼以前的幼稚细胞被标记,晚幼以后的细胞、浆细胞和淋巴细胞不发生标记。

(2) 大约50%早幼粒,35%中幼粒,60%早幼红,35%中幼红细胞被标记。

(3) 标记总是定位在核内。

(4) 每个细胞的平均颗粒计数:每个早幼粒及早幼红细胞平均有60个颗粒,中幼粒及中幼红平均40个颗粒。因为 ^3H 的涂片自显影的效率为5%(即有5%的蜕变能被记录下来),因此60个颗粒=5%总蜕变,曝光期间总蜕变数则为 $60/0.05=1200$ 次,曝光时间2天衰变的数量=原有 ^3H 总量的0.03%(按衰变公式求得),因此每个早幼红及早幼粒细胞平均含 ^3H -TdR分子数为 $1200/0.0003=4\times 10^6$ 分子。 ^3H 自显影是个特殊的例子,因为它的 β 粒子射程在单位密度物质中大约只1微米。其它发射 β 粒子的同位素的效率则由每个人射电子产生颗粒的能力和几何因素(geometry of the system)进行粗略的计算。 β 最大能量大于1兆电子伏的同位素,每个人射电子产生约0.5个颗粒,0.4—0.9兆电子伏约产生1个颗粒,0.1—0.3兆电子伏约产生1.5—2个颗粒。放射自显影的几何效率约50%(约一半被记录下来),以 ^{32}P 为例:

平均颗粒计数=10个/每个细胞(0.5个颗粒/ β)
=20个入射电子(几何效率为50%)
=曝光期内共40次衰变

如果曝光时间为14天,这恰好是 ^{32}P 的半衰期,因此平均每个细胞含80个 ^{32}P 原子。

(5) 用核糖核酸酶处理,活性不能从细胞上去掉,而用脱氧核糖核酸酶处理则完全去掉活性,这说明 ^3H -

TdR掺入脱氧核糖核酸。从这个例子可以得出以下结论:

① DNA(脱氧核糖核酸)合成发生在早期幼稚细胞而停止于晚幼红和晚幼粒。因为除了减数分裂外,不合成DNA的细胞不发生分裂。早幼红和早幼粒合成DNA的速率比中幼红和中幼粒高。

② 标记的细胞群中,只有一部分(30—60%)被标记,因此可以推测DNA合成过程只占间期的30—60%。这种推测只有初期未标记的40—70%的细胞经较长时间的培养都能得到标记才是正确的。

③ 高比活性的 ^3H -TdR标记DNA较为合适。

骨髓和血细胞的自显影研究已经对红细胞血红蛋白的合成,对各种细胞的蛋白和核酸的合成及骨髓细胞增殖的动力学做出了贡献。

^3H 自显影还常被用来做为评价细胞活力的指标。除 ^3H 以外,在血液学中用放射性铁研究红系统,用 DF^{32}P (^{32}P 标记的二异丙基氟磷酸盐)研究成熟的粒细胞,也都是很有用的方法。

特别值得指出放射自显影为研究造血作用的规律和动力学参数开辟了新的途径。只要知道细胞群标记的百分数和有丝分裂数,通过简单的计算,就可以确定细胞周期的某些常数,这对研究血液病时血细胞的组成很有意义,这种分析对血液病的诊断、治疗和判断预后都具有重要的价值。Killmann等(1964)所做的分析就是一个例子。晚幼粒细胞平均过渡时间(细胞在这个阶段停留的时间)等于3.5天。在1000个骨髓细胞中有361.4个不分裂的细胞。这些细胞应该3.5天(84小时)更新一次。由此可知每小时有 $361.4/84=4.3$ 个细胞进入晚幼粒阶段。注入体内的 ^3H -TdR有50%的机率标记白细胞的增殖池。1,000个骨髓细胞有206个有分裂能力的中性粒细胞,103个细胞被标记。因此周期时间(t_g)= $103/4.3=24$ 小时。有丝分裂池的细胞分裂时间等于 ≈ 8 小时的情况下,这些作者估计细胞的平均过渡时间,原始粒细胞为23.3小时,早幼粒为78.3小时,中幼粒为37.4—126小时,不分裂的中性细胞为84小时,有丝分裂池的时间为3.5—9.5天。

放射自显影在细胞学中的应用使分裂细胞群的细胞周期时间的测量完全革新。1953年以前只认为细胞周期由两个阶段组成,即间期和有丝分裂期。Howard等在1953年用放射自显影观察到植物细胞在间期合成DNA,他们还注意到不是整个间期而是间期的一部分合成DNA,他们把这一部分称为DNA合成期(S 期),在间期有两个间隙(gaps),一个在 S 期前称 G_1 期(合成前期或分裂后期),一个在 S 期后称 G_2 期(合成后期或分裂前期)。1954年Lajtha证明哺乳动物细胞同样存在 G_1 , S , G_2 期和 M 期(有丝分裂期)。只有用标记的DNA前体的放射自显影才能详细研究细胞周期的各期。一般来说,细胞周期时间为8—30小时,

G_1 1.5—14 小时, S 6—9 小时, G_2 1—5 小时, M 0.5—1 小时。不同细胞群的周期时间和周期中各期的时间差异很大,即使是同一细胞群,各期时间也随细胞群的损伤情况和内部稳定状态平衡情况而有差异。在细胞群受损伤时,组织可通过缩短增殖周期时间和增加增殖细胞群的数目,动员 G_0 细胞进入 G_1 即改变增殖细胞群和非增殖细胞群的比例来达到恢复的目的。在肿瘤治疗中,按细胞动力学安排治疗措施,对某些肿瘤已收到很大效果。射线对细胞周期有显著的影响。大鼠经丙种射线连续照射后骨髓中幼红细胞 (normoblast) 周期显著缩短。正常哺乳动物细胞周期时间 9—74 小时,平均 33 小时,照射后为 8 至 54 小时,平均 18 小时。射线对细胞周期各期的影响,一般来说按以下顺序 $M < G_1 < S < G_2$, G_2 期对辐射最敏感。研究急性放射病条件下敏感组织的细胞动力学,寻找促进细胞增殖的措施,加速放射损伤的恢复是值得探讨的一个课题。

许多和 DNA 合成有关的问题,借助 3H 胸腺嘧啶核苷的放射自显影技术得到了研究。在给以足够量 3H -TdR 的条件下,不摄取 3H -TdR 合成 DNA 的细胞核,可以认为是暂时地或最终地离开细胞周期。注入 3H -TdR 后,只有合成 DNA 的细胞和增殖池的细胞受到标记。在注射放射性同位素后各类细胞立即受标记的细胞百分数 (脉冲标记) 与该类细胞的 DNA 合成时间 (S_t) 和细胞周期时间 (t_g) 相一致。群体中标记的百分数越高, S_t 占 t_g 的时间越长。细胞中标记的颗粒数与合成 DNA 的数量相一致。标记的细胞发生分裂时, DNA 平均地分布到子代细胞中,这使标记稀释,细胞分裂一次颗粒减少一半。

Post 和 Hoffman (1968) 编写了用放射自显影研究机体各个器官的细胞更新过程的论文综述。指出啮齿动物骨髓干细胞在体内的世代时间 (generation time) 为 15 小时, DNA 合成时间占 7 小时。红系统和粒系统细胞的 DNA 合成时间约需 5—7 小时,狗的中幼粒细胞世代时间估计为 16—18 小时,而原始粒及早幼粒细胞为 9 小时。白细胞成熟的时间为 3—4 天。受植物血凝素刺激能复制的循环淋巴细胞,周期时间为 10—12 小时, DNA 合成时间约需 6 小时。有些小淋巴细胞能活存 80 天,另外一类淋巴细胞在适当的抗原刺激下可转化为浆细胞,这样的细胞寿命比较短。在每天 50 拉得照射的条件下,增加了幼稚红细胞和白细胞的标记,说明扩大了增殖池。未成年小鼠骨髓干细胞对全身照射比成年小鼠更敏感。

Creamer (1967) 利用 3H -TdR 确定肠上皮更新周期。作者分析了肠隐窝的细胞动力学,指出人的隐窝上皮细胞 S 期是 10—14 小时, G_2 期 2—7 小时, M 期约 1 小时, G_1 期变化比较大,有些细胞进入另一个分裂周期,有些细胞变为成熟细胞,在胃和结肠还有些细胞进入长时间的间期。有证据表明十二指肠的隐窝细

胞同步地进行有丝分裂。计算有丝分裂各期的时间还可利用细胞新生率来表示。经计算人的回肠隐窝细胞新生率是 0.8 个细胞/100 个隐窝细胞/小时,空肠是 1 个细胞/100 个隐窝细胞/小时。作者还概括了各种因素对肠上皮更新速度的影响。射线照射后使肠上皮更新速度降低。И. А. Заленина 用自显影研究了胰腺再生时的 DNA 代谢,测定了标记细胞百分数和每个细胞颗粒数,指出胰腺受损伤后,最初二天内腺泡细胞中 DNA 合成受到抑制。第三天 DNA 合成开始加强,第五天合成增加,第七天 DNA 合成维持高水平。经过三个月腺体有了正常结构,标记指数也恢复正常水平^[1]。

放射自显影被成功地利用于研究创伤愈合。用 3H -TdR 和标记的氨基酸研究皮肤创伤。用自显影方法证实参加愈合过程的成纤维细胞主要是结缔组织的细胞在伤口局部再生的结果,而不是由血管系统进入伤口的细胞再生的结果。有些学者用自显影研究了身体不同部位创伤的愈合特点。

利用放射自显影可以研究芥子气和路易氏气及放射性物质透过皮肤的特点。

放射自显影为研究再生的规律提供了新的途径。如对再生肝进行了一系列的研究。研究了再生肝中细胞的增生和预先照射在增生过程中的意义。受照射肝细胞的增生水平比对照动物低。肝脏切除 2/3 以后细胞周期尤其是 G_1 期缩短。

用放射自显影研究增殖过程很有用途。进入颅内的 3H -TdR 多数在损伤的脑病灶的增生区被神经胶质细胞核利用。实验结果表明,不仅星状胶质细胞和小神经胶质细胞增生,而且少突细胞也增生,而神经节细胞不增生。

利用自显影研究肿瘤的方法已有专著,并已获得重要的资料。有三种用自显影研究人体组织增生的方法,第一个方法是静脉注射 3H -TdR,接着多次采取活体组织检查。这个方法有可能造成辐射损伤,国外有人用这个方法研究肿瘤的细胞周期。第二个方法是静脉注射 3H -TdR 后,手术切除肿瘤,根据合成 DNA 的细胞研究细胞周期。第三个方法是在体外把活检材料放在含 3H -TdR 的培养基中进行短时间培养,经 0.5—2 小时后制备自显影标本。用这种方法所得标记指数与静脉注射法相同。体外培养的方法既安全又适用,因此是比较好的方法。用自显影对许多肿瘤进行了研究,如对子宫颈癌研究表明,放射自显影指标的变化和子宫颈上皮细胞形态变化相一致,细胞形态的微弱变化,标记指数已经明显增加。在癌症部位发育成熟的细胞中,可以见到合成 DNA 的细胞,而在正常上皮中成熟的细胞不合成 DNA,这说明癌细胞的发育异常不仅表现在标记指数增加,而且细胞的分布也发生了变化。有的国家已把放射自显影应用于临床诊

断。对肿瘤穿刺物的质和量的评价同 ^3H -TdR 体外放射自显影结合起来,不仅可以观察肿瘤细胞的形态特点,而且可以评价肿瘤细胞的活性。

在内分泌学中运用放射自显影,可以深入了解激素在正常和病理条件下的意义。利用小鼠胚胎和新生小鼠 ^3H -TdR 放射自显影可以观察胸腺、脾脏淋巴滤泡和小肠中细胞的形成和移动。胸腺可以认为是周围淋巴器官中淋巴细胞的源泉。

用放射自显影研究各种代谢包括色素代谢具有理论和实际意义。用 ^{14}C 标记酪氨酸的放射自显影是测定有色素沉着的黑色细胞(象有色素沉着的皮肤、毛发、痣和黑色素瘤等组织)中酪氨酸酶活性的唯一现代化的方法。

在生物化学中,把放射自显影与纸电泳或纸层析结合起来,已成为非常通用而有效的分离和测定方法。例如在纸层析或纸电泳条上,不但能将神经细胞内核糖核酸中各种碱分成相距仅有 20 微米的层析带,而且还能测定每一个层析带上为数极少的放射性分子。

在遗传学研究方面,放射自显影已发挥了很大作用。细胞的染色体在生物特征的遗传方面究竟通过什么方式起的作用,主要是依靠细胞放射自显影技术得到阐明的。

细胞和组织体外培养和自显影结合起来,可以研究细胞代谢及细胞间的相互关系。Yokomuro 发现体外培养小鼠腹膜吞噬细胞和吞噬细胞之间及在吞噬细胞和淋巴结细胞之间,形成很细的胞质桥,用自显影阐明通过这种桥进行物质传递。

电子显微镜放射自显影近十余年来发展很快。自 1956 年首次实现电镜自显影以来,核乳胶的性能有迅速的改进。乳胶银粒的直径 1961 年用的是 1400 Å, 1965 年达 700 Å, 近年已达 300—500 Å。在此期间内,对于影响电子显微镜分辨力的因素,也进行了细致的研究。现在细胞学工作者已可在 36,000 倍或更高倍数下观察自显图象了。电镜自显影已对许多生命的重要物质(如蛋白质等)合成和代谢的研究做出了重要贡献^[9]。

如上所述,放射自显影有广泛的用途和特有的优点,但并不是完美无缺的。同样有某些缺点,例如注入 ^3H 标记的 DNA 前体,它本身就对细胞发生影响,首先是对细胞核和染色体发生影响。标本的活性较低时,实验周期较长。用于放射性的绝对测量,结果也不太精确等等。

最后扼要地谈谈关于实验方法的选择。制备放射自显影标本的方法有多种,要根据实验的性质加以选择,并非任一种方法都能说明同一个问题。以光学显微镜的放射自显影而言,有两种主要方法——颗粒密度放射自显影和径迹放射自显影。前者标本覆盖的乳

胶层较薄,以单个的银粒记录下乙种辐射,后者乳胶层较厚,银粒在射线通过乳胶层的路径上排成一串,具有典型的排列。制备和分析径迹放射自显影标本要比颗粒密度法复杂得多。

研究放射性在标本上的分布,以颗粒密度法为好,操作简便,分辨力也比径迹法高,乳胶不厚时,对标本观察和拍照都比较容易。如果要比较不同部位的放射性,径迹法比颗粒密度法要精确。径迹法可以用来进行放射性绝对测量。多数情况下仍然用颗粒密度法进行放射性相对测量。因为颗粒密度法比较易行,有较高的分辨力,肉眼或用光度计测量颗粒密度都较快。作径迹自显影比较困难,对径迹的计数比颗粒法更需要耐心和熟练,而且不易自动计数。

对多数光学显微镜放射自显影来说,颗粒法是适用的,分辨力可达 0.3 微米(^3H)至 10 微米(生物学研究中能量最大的同位素)。

颗粒密度法又分两种:剥脱膜法和液体乳胶法。多数实验用那种都可以。剥脱膜是定型的产品,有一定的敏感度和分辨力,重复性较好,可以用来研究放射性定位和相对定量,还可用于易溶解的同位素,贮存期也较长。

凡用剥脱膜能做的,用液体乳胶法几乎也都能做到,有时还要好些。用液体乳胶可以使选用的乳胶与标本放大倍数一致,标本放大倍数很高时要用细粒乳胶,这就不会影响对细胞细节的观察,标本放大倍数较低时用颗粒较大的乳胶就可以了。用液体乳胶还可使乳胶和同位素配合更适当,如 ^{32}P 需要最高的敏感度才能记录下径迹的起始部分,而 ^3H 用敏感性相当低的乳胶就有很高的效率,背景的雾点也比较少。

研究放射性在组织内的定位,液体乳胶法较好,通常要比剥脱膜法分辨力高,向标本上滴乳胶的操作很容易做,乳胶和标本粘附也较好。此外液体乳胶法没有明胶覆盖层,对标本染色、观察和照象都比较容易。

液体乳胶法厚度不均匀,这会给相对定量造成误差,相比之下剥脱膜法乳胶的厚度则要均匀得多。

最大能量很低的同位素如 ^3H 和 ^{125}I ,用液体乳胶法进行相对定量则不会遇到困难。因为这些同位素发射的射线在乳胶中的射程不会超过 2 微米,只要乳胶的厚度不小于 3 微米,就不影响乳胶的记录效能。这样做背景雾点会因乳胶加厚而增多,但雾点的数值毕竟是很低的,完全可以用液体乳胶法进行相对定量。能量高的同位素不能用液体乳胶法进行相对定量,剥脱膜法对任何同位素都适用。

本文简要地阐述了放射自显影在生物学和医学中作为一种研究方法的优点。并介绍了在细胞学、血液学、药理学以及肿瘤等研究工作中的应用。附录中包括简单的操作方法以及常见差错的纠正方法。

附 录

1. 自显影标本的制备

制备放射自显影的方法有多种,如液体乳胶法、剥膜法、双层乳胶法等等。它们的原理都是一样的,操作过程大同小异。一般的程序是制备细胞涂片或组织切片→覆盖核乳胶→曝光→显影和定影→染色→显微镜检查。

制备切片或涂片的方法与一般的组织学方法没有多大差别,不多赘述,但应注意组织中同位素的丢失、移位及交叉污染以及组织与乳胶接触形成假象等等。

现以液体乳胶法为例说明自显影的操作过程。这种方法简便易行,组织与乳胶接触紧密,乳胶厚度可自己控制。缺点是乳胶不易涂均匀。

涂布乳胶^[10] 在暗室中取一定量豚状核乳胶放到烧杯中,在 35—40℃ 水浴上熔化。待乳胶全部熔化后,每 10 毫升乳胶加 6-甘油 0.96 毫升和 2% 硫酸铬钾溶液 0.48 毫升,用玻璃棒轻轻搅匀。为了得到较薄的乳胶层,可将乳胶用蒸馏水 1:1 稀释。然后用滴管迅速滴在载玻片上,并立即用玻璃棒铺开。涂乳胶的操作应在水平台上进行。乳胶涂布完毕后,应将水平台降温,以加速乳胶冷凝及干燥。乳胶干燥后,将玻片装入暗盒进行曝光。

长期曝光应将暗盒存入冰箱,并保持干燥,尽可能减少雾点和潜影消退(见下表)。曝光时间取决于标本的放射性强度和研究工作的性质,为了显示小量放射性同位素的定位,曝光时间宜长。为了阐明同位素在细胞和组织内的精确定位,曝光时间宜短。对半衰期长的同位素,活性小的标本应相应地增加曝光时间。为选择最佳曝光时间,预先测知标本活性强度或参照同类工作是需要的。但是,试验性曝光,即同样的标本不同时间进行显影以决定最佳曝光时间,常常是不可少的。

显影和定影 核 II 及核 III 用 ID₁ 显影液,核 IV 及核 V 用 ID₁b 显影液。显影时用五倍蒸馏水稀释原液,最后使显影液恒温于 19℃±0.5℃,将乳胶面朝上,根据乳膜厚度决定显影时间。乳胶厚 50 微米显影 30—35 分钟,10 微米显影 10—20 分钟,5—10 微米显影 5—10 分钟,2—5 微米显影 2—5 分钟。然后经清水漂洗(在自来水中蘸几下即可),放入 20℃ 酸性坚膜定影液中,待乳胶透明后再过一半的时间用自来水细流冲洗 1—1.5 小时后,晾干。涂片和切片可选用任何一种染色。切片常用苏木精-伊红染色,涂片常用 May-Grünwald 和 Giemsa 复染,单用 Giemsa 亦可。不染色标本可用相差显微镜检查。

2. 常见自显影标本差错纠正方法

在实际工作中,可能出现一些意外的差错,下面扼要地列出在制备标本的各个环节上可能出现的问题,以及解决办法,以供参考^[11]。

自显影标本差错检查表

出现的问题	可能的原因	处理方法
I. 雾点均匀地分布于整个玻片。	1. 涂乳胶前载玻片清洗不当。 2. 乳胶过热。 3. 乳胶太陈旧。 4. 乳胶含放射性物质(可能是标本中溶解出来的)。 5. 存在细菌: ①在明胶层中②在乳胶中③在覆盖层上。 6. 显影温度过高或显影时间过长。 7. 显影液贮存时间过长而氧化。 8. 曝光盒漏光或安全灯太亮。 9. 标本玻片贮存靠近金属如锌、铝或空气含硫化氢及有机过氧化物。	1. 用清洁剂溶液彻底煮沸,并用蒸馏水洗去清洁剂。 2. 加热不超过 40℃。 3. 使用新鲜乳胶,用前贮于冰箱。 4. 滴乳胶前至少冲洗标本 15 分钟,以去掉水溶性放射性物质。或用向玻片上倒乳胶的方法代替滴乳胶。 5. 对明胶溶液必须检查有无细菌生长。 6. 控制显影温度和时间。 7. 用未变色的显影液,每次用后弃去。 8. 检查曝光盒和安全灯。 9. 用 1% 明胶覆盖玻片;金属和木器表面涂上塑料;用含氮气体代替空气;玻片盒密封在塑料袋中。
II. 雾点分布在玻片上分布不均匀。	1. 呈条状或散在的颗粒。 2. 呈圆形或卵圆形或在乳胶最厚的部分。 3. 雾点沿着组织边缘或围在细胞的外周。 4. 只在标本上或周围有散在的雾点。	1. 检查清洗玻片过程。 2. 避免溅上其它液体,使乳胶玻片在相对湿度 50% 的冷空气中慢慢干燥。 3. 涂乳胶后,使玻片冷却然后慢慢干燥。 4. 浸洗标本至少 15 分钟,并多次换蒸馏水。

续 表

出现的问题	可能的原因	处 理 方 法
5. 雾点在 某些细胞或 组织成分上。	5. 组织可能含有 还原物质。	5. 用蒸馏水较长时间 冲洗标本。
III. 细胞 上银粒不多, 背景上有一 些雾点。	1. 曝光时间太 短。 2. 同位素剂量不 够或用前同位素溶 液已分解。 3. 乳胶玻片贮在 潮湿的空气中, 潜 影消退。	1. 增加曝光时间。 2. 核对计算和稀释过 程。检查同位素溶液有 无细菌生长。 3. 玻片贮存前应保证 干燥。
IV. 细胞 上没有银粒 及背景上无 雾点。	1. 显影前把玻片 错放入定影液中。	1. 检查暗室操作。
V. 玻片 上某些区域 已知含有同 位素的细胞 上很少或没 有颗粒, 背 景上很少或 没有雾点。	1. 滴乳胶时由于 有气泡涂布不均 匀, 或乳胶没有完 全覆盖玻片。	1. 检查暗室操作和在 暗淡红灯下检查乳胶是 否涂匀。
VI. 对已 衰变的总数 来说, 银粒 不足。	1. 潜影消退。 2. 乳胶被玻片上 的水稀释。 3. 银粒被酸性定 影液溶解。 4. 银粒在染色过 程中被溶解。 5. 乳胶由于细菌 或过热而变坏。	1. 曝光过程保持干 燥, 用氮气代替空气, 把 乳胶玻片贮存在带干燥 剂的塑料盒中。 2. 滴乳胶前去掉玻片 上多余的水。 3. 在硫代硫酸钠和醋 酸中时间太长, 银粒会 被溶解。硫代硫酸胺定 影液可很快溶解银粒。 4. 某些染料和酸会溶 解银粒, 用前应先试验。 5. 更换乳胶。
VII. 银粒 消退或随时 间变褐。	1. 定影液没完全 去掉。	1. 定影后充分水洗, 去掉海波和酸。
VIII. 明胶 过染, 使区 分细胞困 难。	1. 明胶迅速吸收 某些染料。	1. 调整染液酸碱度。 2. 用带酸的甲醇脱 色。
IX. 细胞 不着色。	1. 染色时间不足 (染料穿过明胶的 时间不够)。	1. 增加染色时间。 2. 用等量蒸馏水稀释 乳胶。

参 考 资 料

- [1] Boyd, G. A.: *Autoradiography in biol. and med.*, 1955, New York.
- [2] Rogers, A. W.: *Techniques of Autoradiography*, 1973.
- [3] 陆祖荫等: 物理学报. 15 卷 (3), 139, 1959.
- [4] 何泽慧等: 物理学报. 15 卷 (3), 131, 1959.
- [5] 何泽慧等: 科学通报. (2), 43, 1957.
- [6] Gay, W. I.: *Methods of Animal Experimentation*, 2, 153, 1965.
- [7] Lajtha, L. G.: *The Use of Isotope in Heametology*, P. 73, 1961.
- [8] Busoh, H.: *Methods in Cancer Res.* 1: 45, 1967.
- [9] Jacob, J.: *Int. Rev. Cytol.*, 30, 91—181, 1971.
- [10] 天津感光胶片厂技术研究室: 原子核乳胶干版显影说明书。
- [11] Speirs, R. S. et al: "Tritium in the Physical and Biological Sciences", 2, 321, 1962, IAEA.

(上接 22 页)

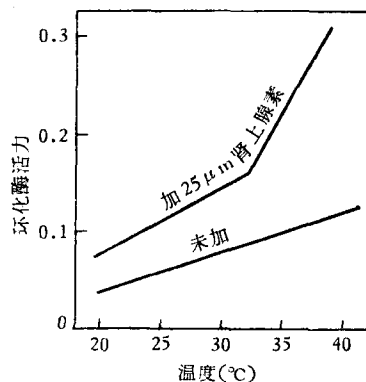


图 5 温度和肾上腺素对大鼠肝腺苷环化酶活性的影响

表 7 代谢中间物对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶热变性的影响
(变性条件: 酶在 3.2mM 底物、4mM 代谢中间物和 1%(V/V) 巯基乙醇存在下, 55°C 恒温 20 分钟, 加 Na_2CO_3 终止反应, 比色测活性)

代 谢 中 间 物	酶 相 对 活 性 %
无	100
AMP	68
ATP	58
二羟基丙酮磷酸酯	160
5-磷酸核糖-1-焦磷酸酯	228
核糖	59