

用水溶性环氧树脂包埋生物组织和制片方法

吴友吕

(复旦大学生物系电子显微镜室)

有各种包埋介质可用于生物组织的电子显微镜超薄切片和光学显微镜切片,其中以环氧树脂(如 Epon 812¹⁾、国产环氧树脂 #618 等)使用最广泛。但大多数包埋介质是不溶于水的。常规的组织脱水剂如乙醇、丙酮和环氧丙烷(propylene oxide),它们都是良好的脂溶剂,因此组织中脂肪和蛋白质可能在脱水过程中往往被流失,而引起细胞亚显微结构的人工损伤。近年来新出现的水溶性包埋剂也能作脱水剂使用,从而避免或减少了组织受常规脱水剂的损伤,保护了组织的细微结构,并且还可以进行某些细胞化学反应。可溶于水的环氧树脂称为水溶性环氧树脂,国产的有 #600 和 #662 等环氧树脂。关于水溶性包埋剂的应用,国内尚未见报道,本文就水溶性环氧树脂包埋生物组织和制片方法作一简要介绍。

材 料 和 方 法

(一) 试剂和性状

1. 环氧树脂 #600 无锡树脂厂产品,是一

种无色透明粘度为 4—6 厘泊(25°C)的液体,可溶于乙醇、丙酮和水中可作环氧树脂的活性稀释剂和增韧剂。

2. 环氧树脂 #662 上海树脂厂产品,是水溶性的甘油环氧树脂,色泽淡,粘度大于 300 厘泊(25°C)。

3. 环氧树脂 #618 上海树脂厂产品,是二酚基丙烷型环氧树脂,为淡琥珀色粘稠液体,粘度小于或等于 2500 厘泊(25°C)。

4. 甲基内次甲基四氢二甲酸酐(methyl nadic anhydride)简称 MNA,上海试剂三厂产品,特种规格为微黄色粘稠液体,倘用甲基 MN 酸酐(上海试剂三厂生产的实验试剂)在室温 20°C 以下半固化,用前需置 50—60°C 溶化。

5. 2,4,6-三(二甲氨基甲基苯酚)[2,4,6-Tri(dimethyl amino methyl phenol)]简称 DMP-30,上海试剂三厂产品,为微黄色液体。

6. N. N. 二甲基苯胺(N. N-dimethyl benzy-

1) Epon 812 是一种甘油基脂肪族环氧树脂。

lamine) 简称 BDMA, 上海试剂三厂产品, 近无色透明的液体。

(二) 生物组织的固定、脱水、浸透和包埋

组织块 (0.5—1 立方毫米) 用 4% 戊二醛 (磷酸缓冲液 pH 7.2—7.3) 固定 20—30 分钟 (4°C), 漂洗后用 1% 锇酸固定 1—2 小时, 组织经漂洗后可用环氧树脂 #600 或 #662 脱水, 方法如下:

1. 用环氧树脂 #600 脱水和浸透方法 将固定后的组织放入下液中:

50% #600 水溶液 5—10 分钟 (4°C)

70% #600 水溶液 5—10 分钟 (4°C)

90% #600 水溶液 5—10 分钟 (4°C)

100% #600 15 分钟 (室温)

100% #600 15 分钟 (室温)

然后用下述配方的包埋介质浸透, 并置换 2 次, 共浸透 1—2 小时 (室温)。

#600 80 克 } 8 克
#618 20 克 }

MNA 12 克

DMP-30 0.2 毫升

(或 BDAM 0.2—0.3 毫升)

2. 用环氧树脂 #662 脱水和浸透方法 固定之组织放入下液中:

#662: 水 = 1:1 10 分钟 (室温)

#662: 水 = 2:1 10 分钟 (室温)

#662: 水 = 3:1 10 分钟 (室温)

#662: #600 = 2:8 10—20 分钟 (室温)

然后用上述配方或下列配方的包埋介质浸透, 方法同上。

#600 80 克 } 8 克
#662 20 克 }

MNA 12 克

DMP-30 0.2 毫升

组织块经浸透后即可包埋在胶囊或特制的聚乙烯膜中, 在 60°C 聚合 24 至 36 小时; 或 50—60°C 2 小时后移入 80°C 24 小时。

(三) 用于光学显微镜的切片和染色

1. 切片 聚合后的组织包埋块经修整作薄片 (1—2 微米左右), 然后将切片放在干净载

玻片的水或稀甘油滴中, 用酒精灯微微烘干待染色。

2. 染色 可用如下几种染色液:

(1) Mollory 的 AMB 染色液的配制及染色。

① 0.5 克甲基蓝 (methylene blue) 和 0.5 克碳酸钠 (或硼砂) 加入 50 毫升蒸馏水。

② 0.5 克天青 II (azure II) 加 50 毫升蒸馏水。

临用前将①液和②液按 1:1 混合均匀 (不宜早配, 因易失效)。

染色时切片用 1% AMB 染液浸没, 放在酒精灯上微微烘 1—2 分钟 (或 60°C 3—5 分钟), 待液滴边缘出现干迹, 但不要使染液烘干, 即用滴管吸取自来水轻轻地洗去多余染液, 最后用蒸馏水洗一次。组织切片经染色后呈蓝绿色。如果第一次染色差, 可以复染。

(2) 碱性甲苯胺蓝染色液的配制及染色。

用 2.5% 碳酸钠 (pH 11) 配制 0.1% 甲苯胺蓝 (toluidine blue) 染色液。染色方法同 (1), 组织切片染色后呈蓝色或紫色。

(3) 碱性洋红 (品红) 和甲基蓝染色液的配制及染色。

① 新鲜配制 4% 的碱性洋红 (basic fuchsin) 水溶液 (70°C)。

② 2% 甲基蓝水溶液。

③ 0.1N NaOH。

切片用碱性洋红染色 1 分钟 (方法同前), 水清洗, 然后用 2 滴 0.1N NaOH 和 1 滴甲基蓝混合液染色 2 分钟, 水洗, 待干。洋红染色后组织切片呈粉红色; 甲基蓝复染后为蓝色。

以上染色均未除去切片的包埋介质。

3. 封片 为了长期保存切片, 可采用上述环氧树脂包埋液或中性树脂 (上海生物模型厂出品) 或 D. P. X. 固封剂 (英国产品) 封片, 室温或 37—40°C 干燥后进行光学显微镜检查。

(四) 用于透射电子显微镜的超薄切片和染色

用 LKB 超薄切片机进行超薄切片, 厚度 300 Å 左右; 切片以 5% 醋酸氧铀 (按甲醇: 乙醇: 水 = 1:1:2 配制) 染色 20—30 分钟, 再用柠檬

酸铅染色 5—10 分钟左右,水洗,干后镜检。

结果和讨论

本文采用国产水溶性环氧树脂 #600 和 #662 作生物组织的脱水剂和包埋剂。试验是用小白鼠肝组织经固定,不同浓度的环氧树脂 #600 脱水、浸透、包埋和作超薄切片镜检,组织超微结构情况见图 1。上述组织块在 50% 环氧树脂 #600 水溶液中于室温 (15—20℃) 下放置 2—3 天,组织块外表没有明显膨胀和收缩。如果放置数周后,组织则出现松散而溶液呈淡黄

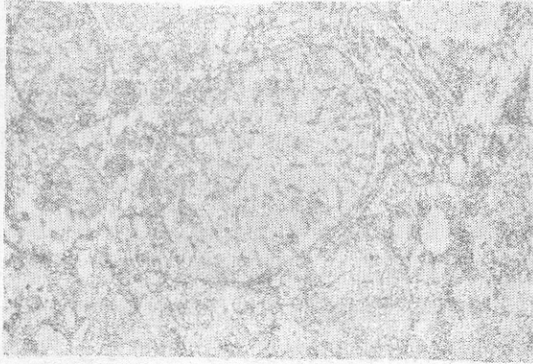


图 1 小白鼠肝组织 4% 戊二醛、1% 锶酸固定, #600 环氧树脂脱水 and 包埋 (25000×)

色。如果在 50% 环氧树脂 #600 水溶液中放置 16 小时后的组织块经 95%、100% 环氧树脂 #600 脱水、浸透、包埋和作超薄切片镜检,组织超微结构即出现人工损伤 (图 2), 故组织块在 50% 环氧树脂 #600 水溶液中不宜久留。由于脱水和浸透过程兼并进行,改善了以往环氧树脂难透进组织的缺点,也缩短了脱水、浸透时间,是目前国内较简便、较快速的水溶性包埋剂。Fujita, K. (1977)¹⁾ 用 Quetol 651 (乙二醇二缩水甘油醚) 进行组织的快速包埋,环氧树脂 #600 的分子量为 131 和粘度比 Quetol 651 小。

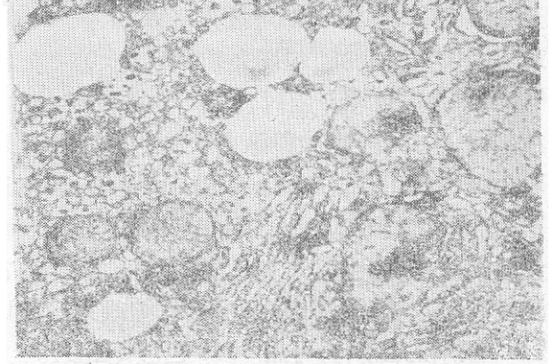


图 2 小白鼠肝组织 4% 戊二醛、1% 锶酸固定,在 50% #600 环氧树脂水溶液中放置 16 小时后出现的人工损伤 (线粒体嵴模糊、空泡增大等 (20000×)



图 3 麝香腺体颈部绒毛 4% 戊二醛、1% 锶酸固定, #662 环氧树脂脱水, #600 包埋 (20000×)



图 4 非洲鲫鱼卵母细胞 4% 戊二醛、1% 锶酸固定, #600 环氧树脂脱水 and 包埋薄片 AMB 染色 (160×)

因此,用 #600 树脂包埋组织的时间表尚有缩短的余地。

Ltft (1961)²⁾ 首先采用环氧丙烷作为乙醇和环氧树脂的媒剂,能促进包埋介质易于浸透组织,可缩短浸透时间。Kushida (1963)³⁾ 用正丁基缩水甘油醚 (n-butyl glycidyl ether) (国内称 #501 环氧树脂稀释剂,上海树脂厂产品)和

后来用甲基缩水甘油醚 (methyl glycidyl ether) 作为环氧树脂包埋剂浸透组织的辅助剂。由于环氧树脂 #600 (二缩水甘油醚) 是环氧树脂的活性稀释剂和增韧剂,能和乙醇、丙酮互溶,故

1) J. Electron Microscopy 26: 165—166.

2) J. biochem. biophys. cytol. 9: 409—411.

3) J. Electron Microscopy 12: 167.

#600 树脂作组织的脱水剂时, 可以用 #618、Epon 812 等环氧树脂包埋剂包埋。如果组织用乙醇脱水, 还可以用 #600 作为乙醇和其他环氧树脂包埋介质的媒剂; 其浸透步骤为, 100% 乙醇脱水后用无水乙醇: #600(1:1) 浸透 5—10 分钟 → #600 5—10 分钟 → #600: 环氧树脂包埋介质(1:1) 10—20 分钟 → 环氧树脂包埋介质置换 2 次共 1—2 小时, 然后即可包埋。另外, 还有一种国产水溶性 #662 环氧树脂, 是一种甘油环氧树脂, 与水混和时, 其水分量超过树脂量则出现混浊。因此, 以 #662 作组织脱水从 1:1 浓度开始, 经 2:1、3:1 即可进入 (#600 + #662 + MNA + DMP-30) 的包埋介质(换 2 次)。在配制 #600 + #662 包埋介质时, 由于 #662 易吸水, 故在加入 MNA 前应加温除去水分。曾试用几种硬化剂(如 MNA, DDSA¹⁾, HHPA²⁾ 等) 和加速剂(如 DMP-30, BDMA, DMAE³⁾ 等) 促使 #662 包埋剂硬化, 由于其热变形温度较低, 聚合块在温度高时较软, 温度低时变硬, 收缩颇大。故以 #662 脱水的组织块可用 #600 包埋(图 3)。

在 #600 的包埋试验中基本上按中国医学科学院分院电镜室介绍的配方⁴⁾。在配方中使用 BDMA 取代 DMP-30 加速剂, 二者效果相似, 但是 BDMA 试剂颜色和粘度优于 DMP-30, 其聚合块的颜色亦较淡。原配方中的 MNA 气味甚浓, 且 MNA 在树脂固化后仍与高锰酸钾染色液起反应, 从而影响了组织切片的高锰酸钾

染色。曾试用 DDSA 取代 MNA, 其聚合块为淡棕色。用 HHPA 取代 MNA 时, 其聚合块颜色最淡。另外, 用 95% #600 环氧树脂水溶液配制包埋介质时, 当 MNA 加入时即出现混浊, 而再加入 DMP-30 后该混浊消失, 但是聚合块较脆。因此, 包埋介质中 MNA 是容不得半点水分的, 否则会影响切片性能。

组织薄片适于光学显微镜下细胞水平的研究, 薄片可直接用相差显微镜(phase microscope) 观察或用 AMB、甲苯胺蓝等染色后置普通显微镜下观察, 便于确定组织部位(图 4), 甚至可将所需的薄片再包埋和超薄切片。

近年来, 水溶性包埋剂的种类和应用发展较快, 但在国内尚属空白。国产的水溶性环氧树脂 #600 粘度低、浸透性好和操作简便、迅速, 可作脱水剂和包埋剂。但硬化后当天的切片皱褶和颤痕较多, 在保持组织超微结构上与国产环氧树脂 #618 包埋剂近似, 但均未超过 Epon 812 包埋剂。水溶性环氧树脂 #662 是一种甘油环氧树脂, 其粘度大于 #600 小于 #618, 颜色比 #618 淡, 在作脱水剂时浸透和操作没有 #600 好。

- 1) DDSA dodecyl succinic anhydride 为十二碳烯基丁二酸酐, 又称十二烷基琥珀酸酐。
- 2) HHPA hexahydrophthalic anhydride 为六氢邻苯二甲酸酐, 熔点 30—35°C。
- 3) DMAE dimethyl aniline 称二甲苯胺。
- 4) 《生物化学与生物物理进展》1978 年第 1 期 8—9 页。