

# 电子显微镜放射自显影操作方法的比较

卢宝廉 张善千 张玉华

(中国科学院动物研究所)

电子显微镜放射自显影方法, 能够把结构和功能联系起来, 对研究某一标记物在细胞内的部位及动力学问题等提供了良好的方法。但此方法有很多细节掌握不好就会影响结果。下面分六个问题谈谈:

## 一、乳胶稀释比例

目前使用较多的有国产核子乳胶 HW<sub>4</sub> 及进口乳胶 Ilford L<sub>4</sub> 等。颗粒直径 1400 Å 左右, 要涂成单层均匀的颗粒(见图 2), 不要重叠(见图 1), 也不要有空隙(见图 3)。这与乳胶稀释

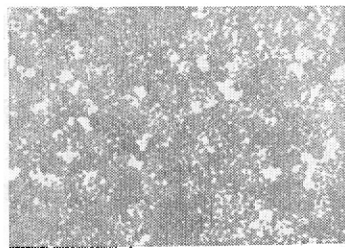


图 1 HW<sub>4</sub>核子乳胶 1:2 银颗粒重叠

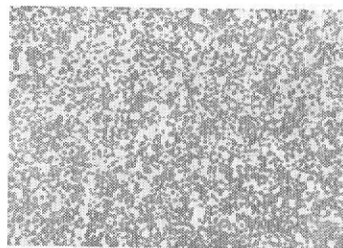


图 2 HW<sub>4</sub>核子乳胶 1:4 银颗粒单层, 密度适用

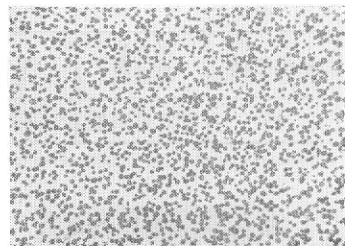


图 3 HW<sub>4</sub>核子乳胶 1:6 银颗粒太稀, 空隙太多

的倍数有关。一般使用的比例, 以 1:4 效果较好, 即取乳胶 1 份加重蒸馏水 4 份, 在 40°C 水浴中溶化, 轻轻搅匀, 放置半小时, 等气泡跑掉后待用。操作必须在暗室暗红灯下, 室温 20°C,

相对湿度50%的条件进行。

二、标记放射性同位素剂量

为了获得高分辨力的放射自显影象，应选择能量低的同位素<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C作标记源。标记剂量问题很重要，同位素标记物进入动物体后，要代谢掉一部分，衰变一部分，进入某种组织后，经过一系列取材、固定、脱水、包埋等制片过程，又损失掉一部分，切成超薄切片时（厚度400—800 Å），每片上的放射性强度要能足以使银粒子曝光，但剂量也不是越大越好，剂量太大，会造成组织、细胞的放射损伤，本底加强，分不清标记部位。根据我们摸索<sup>3</sup>H标记化合物的剂量，动物按每克体重引入同位素0.1—1微居里，血细胞、癌细胞等培养液每毫升中同位素也不能超过1微居里（每毫升中约4百万个细胞）。

三、超薄切片包埋剂的比较

比较了三种常用的包埋剂：甲基丙烯酸酯、环氧树脂 Epon 812 及苯二甲酸二丙烯酯（见表1，图4、5、6）。

表 1 三种常用包埋剂的比较

项目	苯二甲酸二丙烯酯	环氧树脂 Epon 812	甲基丙烯酸酯
细胞结构	很细致	很细致	聚合时易膨胀收缩，产生人为假象细胞内空隙加大，细胞变形
切片难易	能切大的薄片	不易切成薄片	易切成薄片
包埋时环境要求	不怕潮湿	怕潮湿、易吸水	不怕潮湿
切片透明度	好	切片厚则差	好

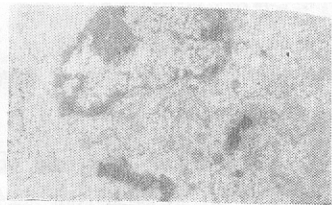


图 4 苯二甲酸二丙烯酯包埋 12500×

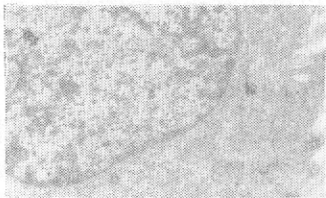


图 5 Epon 812 包埋 22000×

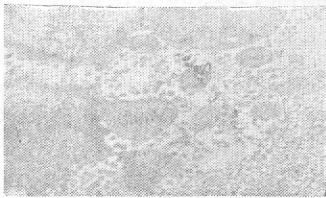


图 6 甲基丙烯酸甲、丁酮包埋 15000×

四、涂胶方法

涂胶方法直接影响乳胶膜的厚度，厚了分辨力低，同时使结构模糊不清（见图9），透光度差，观察、照像效果不好，我们试了如下几种涂胶方法：

（一）金属环法 作一个小的丁字台，直径1—1.5厘米。木桩向上，捞好片的铜网放在顶上，另外用一不锈钢圈（圈丝直径0.15—0.2厘米，圈直径3—4厘米），在已溶化稀释好的乳胶中沾一下，提起，乳胶在圈中由于表面张力形成一薄膜，对准丁字台套下去，铜网上就沾上一层乳胶，乳胶层很薄，分布均匀，可作半定量研究用。线粒体、颗粒内质网、糖元颗粒等清晰细致，放射性同位素标记在线粒体上（见图7）。

（二）玻片漂膜法 玻片上先沾一层1%火棉胶膜，超薄切片用小白金丝圈（圈直径2毫米，圈丝直径0.1毫米），从刀槽中套起，小心放在玻片上，不要碰破膜，用金属环把乳胶套在玻片上，或用沾胶法涂胶，凉干后置冰箱中曝光，到时取出显影、定影、水洗后在水盆中将玻片上的膜漂浮在水面，将干净铜网放在有切片的膜上，捞起，凉干后观察（见图8）。此法效果很好，细胞核双层膜结构清晰，乳胶膜薄而平，核仁上同位素位置准确，缺点是步骤繁多，有时膜漂不下来。

（三）沾胶法 玻片上贴一条双面胶纸，把

有切片的铜网边贴在胶纸上,编号,然后在配好的乳胶中沾一下,直立于通风的暗盒中,待干后放入黑盒,置冰箱中曝光(见图9)。此法乳胶膜较厚,细胞结构不清晰,透明度差,标记同位素 $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷都集中在核肉,缺点是乳胶膜不均匀,铜网网格旁有人为假象。

以上三种方法,以金属环套乳胶效果较好。

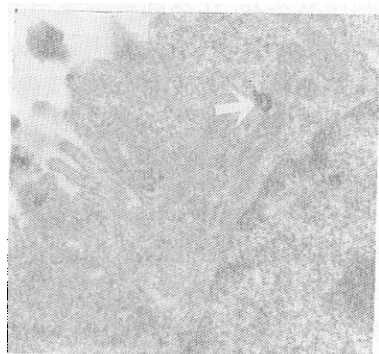


图7 金属环法放射自显影象 20000 $\times$   
(“ $\rightarrow$ ”有同位素处,下同)

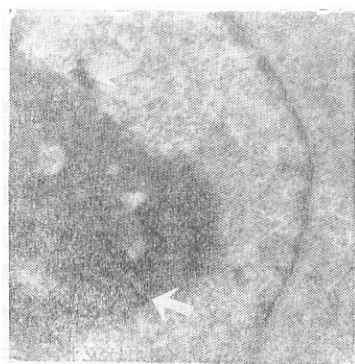


图8 玻片漂膜法放射自显影象 28000 $\times$

## 五、染色

染色采用醋酸氧铀及柠檬酸铅双染,使细胞结构增加电子密度,增强反差,我们试验了涂胶前染及涂胶后染两种方法(见表2)。

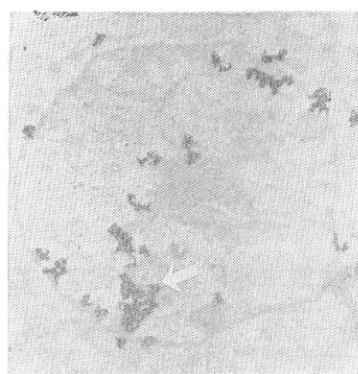


图9 沾胶法放射自显影象 15000 $\times$

表2 染色方法比较

	涂胶前染	涂胶后染
人为假象	铀沉淀物引起化学显影因而产生人为假象	显影后染不会出现人为假象
对显影颗粒影响	染色水洗过程中可能丢失一部分放射性物质,因而减少显影颗粒数	显影后染色不会减少显影颗粒数
染色	易染色,反差好	柠檬酸铅染液有去除乳胶中明胶的作用,使其反差增加。易在明胶上产生染色沉淀

试验证明:后染如果掌握得好,不出染色沉淀,效果比先染好。

## 六、曝光时间

样品至少分数组,按曝光不同时间,每半个月显影一组,电镜观察,如果有极少银粒说明曝光时间不够,尚可延长曝光时间;如已曝光的银颗粒(线团状黑丝)很多,而且本底也多(空白处也有银颗粒),表明曝光时间太长,一般认为曝光时间40—60天较好,40天时就已出曝光颗粒,90天则太长。

## 新 刊 预 告

为促进国内外环境科学学术交流,中国科学院环境科学委员会主办的《环境科学学报》(季刊)将于1981年3月创刊,由科学出版社出版。

《环境科学学报》为综合性学术刊物,主要刊登环境科学方面具有创造性和我国特色的基础理论和带基础性研究的学术论文;新技术、新方法及综合性的重大研究成果。

国内读者可向各地邮局订阅,国外读者向国际书店订阅。