

028208

Q4
4

生理科学新技术

鲁子惠 顾锡根 编著

科学出版社

1985

内 容 简 介

本书是从新近国内九种刊物中,选择有关生理科学及仿生、统计的一些新方法、新技术的资料。其主要内容包括:组织学技术、电生理学技术、免疫电泳学技术、生物化学和生物物理学技术、生殖生理学技术、仿生学技术、简明生物统计方法等。

可供生物学、医学、临床、生产等科学技术工作者参考,也可供大专院校有关专业师生和研究生参考。

生 理 科 学 新 技 术

鲁子惠 顾锡根 编著

责任编辑 吴爱珍

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1985年4月第一版 开本:787·1092 1/16

1985年4月第一次印刷 印张:17 1/2

印数:0001—7,900 字数:405,000

统一书号:14031·75

本社书号:3943·14

定价: 4.10 元

前 言

科学的任务,是要认识世界,进而改造世界。认识世界是靠我们人类的感官,但感官能力有一定的局限,超出这个局限,就无能为力了。不过人们可以借助已有的知识,制造出新的工具,设计出新的方法,来扩大我们感官的能力。譬如有了望远镜,可以使我们对宏观世界扩大了眼界;有了显微镜,可以使我们对微观世界扩大了认识。又如发明了破坏脑部的办法,可以推知动物脑部的机能和该部与别处的联系;发现了条件反射的方法,可以推知动物大脑的功能,和训练人和动物的生活习惯,进而对于医学也起了协助的作用。时至今日有了电子显微镜更扩大了对微观世界的认识,组织化学发现脑中许多新的联系,仿生学、电子计算机、控制论,模拟了动物身体的机能,进而向人类最复杂的语言、思想境界进行探讨。总之新的技术和新的方法,不仅扩大了我们感官的能力,使我们向世界的深度和广度扩大认识,而且使我们认识世界事物是怎么运行,它们为什么那样运行,因而增长了我们改造世界的手段。所以我们深感科研方面的新技术新方法及时提供给研究人员是很重要的。

学科的分门别类只是人为地划分,宇宙间的现象绝不是一门学科所能全面认识的。最近有所谓边缘学科,就是研究的对象,必需两门学科或两门以上的学科去进行探讨,得到解决形成的科学。其实哪些学科可以单独地完全彻底地解决一种现象呢?譬如生理学,也必须借助于组织学、解剖学、物理、化学、近来尤需要电子学、控制论甚至数学的协助。所以我们搜集生理学的新技术,并不严格限于生理学的,而是搜集与生理学邻近的学科,边缘的学科,甚至比较更广泛的新方法新技术也酌量收录。这样可能对生理学工作者起到启发敦促的作用。

新技术新方法是不断发展的;旧的技术和方法也可能产生新的应用,获得新的认识。譬如神经生理学,最初只能观察神经的组织部位,继而进行切割一部分脑组织看它行为上有什么缺陷,推知脑的机能,后来由于电学的发展,可以借电流计、示波器等观察和记录脑部的电活动(如脑电图),再进一步可用微电极记录一个脑细胞的活动,也可以注入微量药物,观察一个细胞的反应。所以,所谓新技术新方法,经过若干时间可能成为旧的,或被淘汰,但在当时自有其作用;而且旧的方法,还可产生新的应用。所以我们搜集的方法,不一定限于完全新的,但现时还在应用的,产生过很大作用的,我们也酌量收录。如有可能的话,我们将继续搜集陆续出现的更为新创的方法和技术,续出第二集。

这些新方法新技术对科研的功绩,当然仍属于原著者,我们只作了搜集介绍的责任。我们搜集的资料,本集只限于国内,以后希望扩大范围翻译国外的一些新方法新技术。

不过我们的水平不高,见识不广,搜集不够全面,编排不够恰当,望读者推荐新的资料,并指正我们的错误。

鲁子惠

目 录

前言	iii
第一章 组织学技术	1
一、荧光组织化学技术	1
二、脊髓单个神经元的辣根过氧化物酶细胞内染色	6
三、酶标记技术	7
四、生物学中的电镜放射自显影术	8
五、HW4 型乳胶在电镜放射自显影术中的应用	16
六、试用邻苯二甲酸二丙烯酯作包埋介质的一些经验	20
七、放射自显影在医学研究中的应用	22
八、电镜上的生物样品制备技术	30
九、蛋白质分子的电子显微镜观察与制样技术	31
十、电子显微镜的发展概况及其在生物学上的应用	37
第二章 电生理学技术	41
一、立式自控微电极拉制器	41
二、针型微氧电极的研制与应用	48
三、显微注射技术	50
四、一种新的动物癫痫实验模型	54
五、一个适用于针麻原理研究的猫脑定位方法	55
六、一种多用途的神经脉冲频率分析器	59
七、定时方波测痛仪	67
八、小型无线刺激器	68
九、小型遥控刺激器	70
十、水下记录用脑电前置放大器	73
十一、记录单个神经细胞放电用的负电容补偿式高输入阻抗前置放大器	76
十二、一种改进的甩尾测试及其在针刺镇痛实验研究中的应用	80
十三、用相关分析技术分析针刺时外周神经干中传入纤维活动的尝试	84
十四、一个简单、自制的用于肌肉等长收缩记录的机械电换能器	93
第三章 免疫电泳技术	97
一、免疫电泳	97
二、免疫电泳基本类型	108
三、聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳	131
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳	133
五、梯度凝胶电泳	150
六、凝胶等电聚焦电泳	153
七、直立平板式连续浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳	154

八、细胞电泳技术及其在生物学和医学中的应用·····	158
九、聚丙烯酰胺凝胶电泳实验操作·····	167
第四章 生物化学和生物物理学技术·····	175
一、非孕尿中三种雌激素的气相层析测定法·····	175
二、尿孕二醇气相层析测定·····	180
三、妇女血浆中黄体酮的竞争性结合蛋白分析法·····	182
四、电子自旋共振在实验医学中的应用·····	186
五、荧光偏振技术在肿瘤研究中的应用·····	194
第五章 生殖生理学技术·····	196
一、家兔精子获能实验方法·····	196
二、测定精子获能的荧光标记法·····	197
三、家兔受精卵的移植·····	198
四、组织块培养·····	199
五、器官培养·····	201
六、利用多杯法体外培养人子宫内膜·····	201
七、体外受精·····	203
八、排卵时间的检查·····	205
第六章 仿生学技术·····	208
一、有髓鞘神经纤维冲动传导的计算机模拟·····	208
二、JSY-1 型生物医用计算机·····	219
第七章 简明生物统计方法·····	229
一、概述·····	229
二、计数资料的统计推断方法·····	236
三、计量资料的统计推断方法·····	252
四、相关与回归·····	267
原始文献·····	272

第一章 组织学技术

一、荧光组织化学技术^[1]

荧光组织化学技术又称为甲醛诱发荧光的组织化学方法。它是用甲醛与单胺类物质发生缩合反应而产生具有荧光化合物的方法。荧光组织化学不仅用于形态学的研究，还能用于神经元中或神经元外单胺的合成、储存、运转、摄取、释放、分解代谢以及某些药物对它们的影响的动态研究。近年来，在单胺神经元形态学的基础上用荧光组织化学和生理学、药理学结合起来，做了大量的工作。

(一) 荧光反应化学

Falck-Hillarp 荧光技术是利用甲醛气体和单胺物质发生缩合反应，其反应的原理是：某些单胺类和甲醛发生两步反应而产生具有强荧光的产物，可在荧光显微镜下显示出来。第一步反应是 β -芳基乙胺与甲醛发生缩合反应形成一个中间物 Schiff 碱基而生成一个四氢衍生物；四氢衍生物在蛋白催化下被甲醛脱氢而生成 3,4-双氢-衍生物（见图 1）。

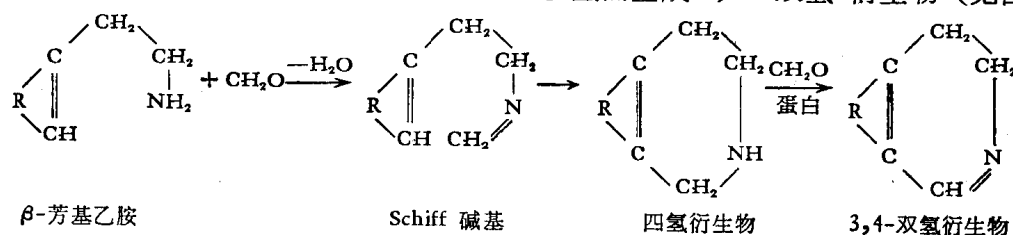


图 1

1. 儿茶酚胺与甲醛的反应

图 2 表示儿茶酚胺(多巴胺 DA 和去甲肾上腺素 NA)与甲醛的组织化学反应，DA 和 NA 与甲醛反应时，首先分别形成 6,7-双羟-1,2,3,4 四氢异氮萘，再脱氢变成 6,7-双羟-3,4 双氢异氮萘与其互变异构体醌结构形成随 pH 的平衡，这是 N-杂芳香族-羟基化合物。在溶液中，波长在 360—480 毫微米（最大 390 毫微米）之间有强的吸收，在 405 毫微米和 480 毫微米处分别有最大的激发波和发射波。在固态时激发波长高峰在 410 毫微米，发射波长在 480 毫微米，荧光实际上是蓝色的。但在荧光显微镜下观察时，常用在 490 毫微米以下的强吸收的阻断滤色片，因此，看起来儿茶酚胺的荧光是绿到黄绿色。

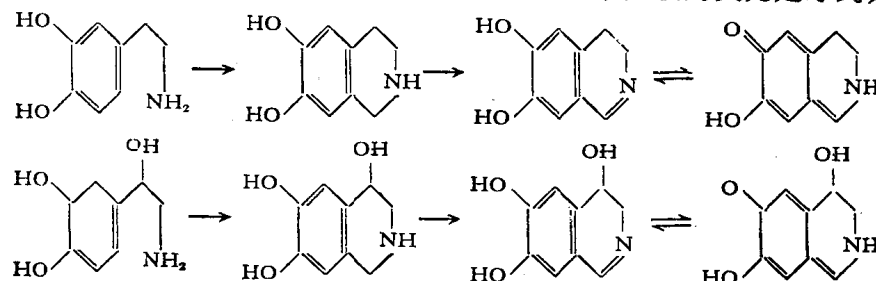


图 2 儿茶酚胺与甲醛的组织化学反应

2. 五羟色胺(5-HT)与甲醛的反应

5-HT 与甲醛的反应见图 3, 反应的第一步是 5-HT 与甲醛缩合形成 1, 2, 3, 4-四氢- β -咔啉。反应原理和儿茶酚胺与甲醛的反应相似。5-HT 荧光体的激发波长在 410 毫微米左右, 而它们的发射波高峰约在 525 毫微米, 比儿茶酚胺荧光体长 40—50 毫微米。用强吸收 490 毫微米以下波长的阻断滤色片, 在荧光显微镜下可看到 5-HT 的荧光是黄色的, 因此可与儿茶酚胺的荧光相区别。

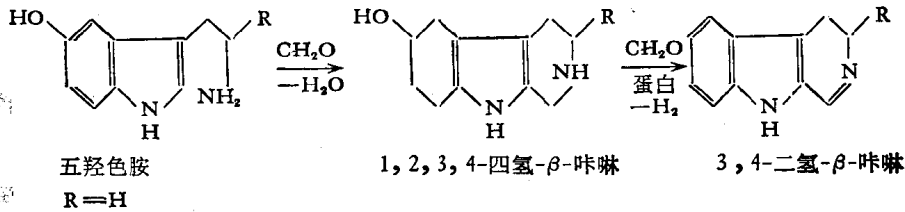


图 3 5-HT 与甲醛的组织化学反应

(二) 材料和方法

实验动物以成年大白鼠为例, 雌雄均可, 体重 250 克左右, 正常动物不作任何注射药物的处理, 以作对照; 为增加单胺荧光强度, 在动物处死前 5 小时腹腔注射单胺氧化酶抑制剂——尼尔酰胺 (nialamide 300 毫克/公斤)、或在动物处死前 4 小时注射优降宁 (pargyline 300 毫克/公斤) 或在动物处死前 24 小时注射苯乙肼 (phenelzine 50 毫克/公斤)。所有注射药物的动物进行组织化学操作时与正常动物的条件完全相同, 以进行比较。为确定含单胺细胞的解剖位置, 少数正常动物在制作荧光的切片上, 每隔 5 片作焦油紫染色, 进行观察。

1. 取材

(1) 将动物直接杀头取材; (2) 动物在乙醚或戊巴比妥麻醉后杀头取材; (3) 在戊巴比妥麻醉下活体取材。取出脑后, 立即放在 0—4℃ 的任氏液中洗涤血液, 剥去脑膜, 然后铺在一个冰台上取材, 用刀片切下所需的脑组织, 如延髓、脑桥、脑干或取脊髓作实验材料。所取组织块一般在 3—4 毫米³ 左右, 不宜太大。但如果冰冻干燥的真空度较高, 可达 10⁻⁶ 毫米汞柱以下, 象小白鼠的整个脑组织也可以干燥。取材应越快越好, 尤其是定量分析更应迅速。为此, 在取材之前应准备好标签, 待组织块取下后, 立即将标签贴在组织块中央, 标签是用软铅笔写在薄的白纸上, 因组织块很小, 标签上写字很困难, 所以只能用简单的符号或号码。如 ·, ×, △, ○, 或 1, 2, 3……。标签粘在组织块上一般不会脱落, 只有当真空干燥到一定程度时, 标签才脱落, 但这时标记已印在组织上, 可以认出。

2. 骤冷

为使神经组织中的单胺递质不发生位移和扩散, 防止组织发生化学变化和坏死, 尽可能地保持组织内部结构和化学物质的生前状态, 必须用很低的温度迅速冰冻。如温度不够低, 胞浆和细胞间隙未结合的水容易形成破坏组织的冰结晶, 在切片上将看到一个一个的空洞。骤冷的冷冻液种类很多, 荧光组织化学最常用的是液氮 (−185℃) 或液态空气 (−195℃), 但后者易爆炸。常用液态氮, 但取好的组织不能直接丢入液态氮, 这样在组织的表面将形成一层气化氮, 有碍温度的传导而降低组织块内热的扩散, 达不到骤冷的目

的。因此,骤冷需要在各种媒介物中进行,即把组织放在被液氮冷却了的媒介物中骤冷。我们用的媒介物是异戊烷,瑞典组织化学家用的是丙烷和丙烯的混合物,比例为 9:1。经骤冷的组织块,往往有破裂现象。骤冷的具体操作是:先将液氮倒入保温瓶(半瓶足够),然后把盛有异戊烷(20 毫升)的玻璃管浸入保温瓶的液氮中,再把已取好的组织块迅速移入一个具有长柄的铜网篮里,最后把盛有组织块的铜网篮浸入已被液氮冷却的异戊烷中进行骤冷,骤冷时间为 15—30 秒,视组织块大小,一般不少于 15 秒钟。骤冷后的组织直接放在液氮中或固体 CO_2 中保存。

3. 冰冻干燥

冰冻干燥是指组织在真空中通过冰点以下的温度,使组织中的冰全部升华而出,从而迅速地去掉组织中的水分,达到干燥的目的。为达到这个目的,有很多种冰冻干燥机,对荧光组织化学技术是适用的。瑞典科学工作者用于荧光组织化学的“冷指型”干燥装置,干燥效果好,容量大,可同时处理很多标本。芬兰 Eränkö 设计的一种“冷指型”干燥系统,既简便、干燥率又高,适于荧光组织化学的要求。我们以上述二者为参考,设计了一套冰冻干燥装置,它包括:真空机器泵(一级泵),油扩散泵(二级泵),冷凝管和冷指管四个部分,如图 4。不用冷凝管也可以,但为了提高干燥效率,可以继续去掉组织中大约 3% 的残余水分,在冷指管和二级泵之间连接一个冷凝管是很有好处的。在连接前,先将扩散泵油(国产 KS-扩散泵油)灌入扩散泵内 1—1.5 厘米深已够,扩散泵油为淡黄色,使用一定时间后,因扩散泵油氧化而呈棕色,便需换新油。四个部分的连接处都应涂上一层高真空油脂(国产高真空油脂 1 号),在连接点的外面再用真空封蜡(玉门炼油厂 80 号真空封蜡)密封。连接好之后,不再搬动。根据经验,我们这个装置的真空度估计可达 10^{-4} — 10^{-6} 毫米汞柱,干燥率较好,简易节省。真空泵和油扩散泵国内有供应。冷凝管和冷指管一般小的玻璃工场都可吹制,玻璃的材料需用国产的 95 料或进口的 GG-17。冷指管包括两个部分,即冷指管和套在冷指管下端的盛放组织块的冷指杯(图 4b)。冷指管的直径可任意选择,但它与长度的比例约为 1:16,我们用的管径约 5 厘米,其长度约 80 厘米。根据水分子从组织到冷凝面所走的路程和所谓平均自由程间的关系来估计,冷指管的下端即冷凝面和组织块之间的距离以 35—50 毫米为宜,否则会影响干燥率。

冷指管的冷却剂为固体 CO_2 加丙酮,其温度为 -86°C ,用液氮也可以。组织干燥的温度,即组织在冰冻干燥过程中被保持的温度,要维持恒定,瑞典工作者是通过套在组织外面的乙烯醇(ethanal bath)浴中螺旋管的涨缩单位的恒温器来调节,Eränkö 是用二乙草酸盐(diethyl oxalate)和固体 CO_2 冷却到 -40°C 。用苯乙醚和固体 CO_2 可冷却到 -34°C ,或用 50% 的酒精加固体 CO_2 可以冷却到 -30°C 左右。

骤冷后的组织,在进行冰冻干燥时收集在组织块容器中(图 4 c),容器用 1:1 的铝和锡制成,其底面和周围应与盛放组织块的冷指杯底面和内侧面密切接触,容器表面打一些

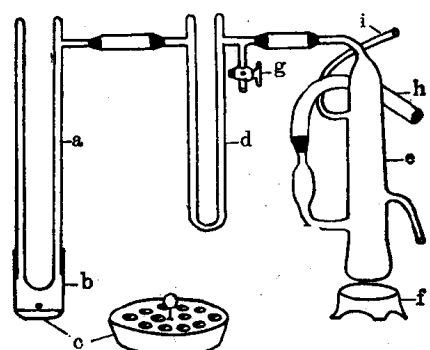


图 4 冰冻干燥仪装置简图

- a. 冷指管; b. 冷指杯; c. 放组织块的金属容器; d. 冷凝管; e. 油扩散泵; f. 电炉 g. 真空活塞; h. 连接机械真空泵和油扩散泵的真空橡皮管; i. 油扩散泵上的接水橡皮管。

洞眼,组织块放在洞眼中,每个放一块。我们的容器共有 25 个洞眼。容器中央装有一圆环,用一根较长的吊钩钩在圆环上,可以方便地放入冷指杯或取出组织块。

冰冻干燥的操作程序是:

(1) 将骤冷后的组织收集在组织容器中,然后把组织容器迅速放入冷指杯。

(2) 把盛有组织标本的冷指杯套在冷指管上,同时开动机器泵,冷纸杯便牢牢地吸在冷指管上。

(3) 将盛有苯乙醚或 50% 的酒精和固体 CO_2 的冷浴套在冷指杯外面,让组织块浸入冷浴下 1 厘米左右。

(4) 冷指管内先加丙酮,加到管长的 $\frac{1}{4}$ 或 $\frac{1}{5}$ 即可,然后加满固体 CO_2 。

(5) 机器泵开动半小时后,再开电炉给油扩散泵加温。

(6) 在冰冻干燥过程中,经常用高频火花真空测定器检查真空干燥系统有否漏气,如干燥装置的玻璃部分呈红紫色,即表示真空度低,呈淡绿色到无色表示真空度较高。

(7) 随着冰冻干燥的进行,冷指管和冷浴中的固体 CO_2 不断消耗,应陆续添加,并时时量其温度。冷指管中固体 CO_2 下降慢,则表示真空度高。

(8) 冰冻干燥时间为 3—5 天,国外多为 5—7 天。停止干燥前,先撤掉冷浴,继续干燥 2—4 小时,让组织块回升到室温,然后在盛有组织块的冷指杯外套上高于室温的热水浴(35°C 左右)。提高组织块温度,使之取出时不致吸收水分。

(9) 停止抽气前半小时关掉电炉,让扩散泵油冷却,避免油的氧化。

(10) 旋开干燥装置的进气活塞,让干燥系统与大气压力平衡,随后立即关掉机器泵,拿下冷指杯,取出组织块。

4. 甲醛处理

已干燥的组织块,立即进行甲醛反应。如组织干燥的程度符合要求,则甲醛反应是整个技术过程中的关键。反应的方法是用热的甲醛气体熏已干燥的组织标本。甲醛气体由三聚甲醛产生。以防甲醛气的漏出,否则将明显地减少反应产物的荧光强度。我们用的反应容器是小干燥器,干燥器必须洗净、烘干,在盖和底接触处涂一层薄而均匀的真空油脂,盖上后便是一个密闭的反应容器。

甲醛反应包括反应时间、温度、甲醛的量以及甲醛的湿度等四个因素。前三个因素是容易掌握的,反应时间为 1 小时。温度为 80°C ,在 80°C 的恒温干燥箱中进行即可。三聚甲醛的量按反应容器容积算,每立升为 6 克。甲醛湿度用硫酸调节,即在反应前直接在 6 克三聚甲醛中加 50% 硫酸 2 毫升。甲醛反应的具体操作步骤如下:

(1) 按反应容器容积的大小,称量好三聚甲醛,放在干燥和干净的培养皿里,然后加上一一定量的 50% 硫酸。

(2) 将培养皿放在干燥器底层,密盖后,移入 80°C 的恒温干燥箱中预热 10—15 分钟。

(3) 把干燥好的组织块尽快地移到有洞眼的硬纸盒里,再将纸盒放在已预热的干燥器中的瓷板上,密盖干燥器,在 80°C 的恒温干燥箱中 1 小时。

(4) 1 小时后,取出组织,进行真空包埋。

5. 真空包埋

组织块经甲醛反应后,尽快地在真空中包埋,最常用的包埋剂是石蜡,如用环氧树脂

包埋,则可切更薄的片子。包埋是在两个相互连接的包埋瓶中进行(图5)。两个瓶连接时,应在连接的磨口面上涂上一层高真空油脂。石蜡(熔点为52—54℃)放在a瓶中,不宜过多,离瓶底1—1.5厘米即可。先用60℃的热水浴把石蜡熔化,然后开动真空泵,抽掉石蜡中的空气,直到气泡消失后20分钟左右,停止抽气。去掉热水浴,待石蜡冷却凝固后,迅速把甲醛处理过的组织块倒入b瓶,然后再开动真空泵抽气,并在a瓶外面加60℃热水浴熔化石蜡。

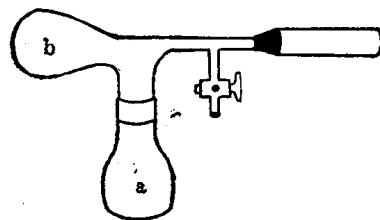


图5 真空包埋瓶简图

抽气半小时左右,将b瓶倾斜,使组织块落入a瓶的石蜡中,透蜡10—15分钟,即可去掉热水浴,停止抽气。组织块在热的石蜡中透蜡时间不宜过长,以免影响荧光。经透蜡的组织块,可在空气中包埋,荧光不致丧失。已透蜡包埋的组织块,可保存在盛有五氧化二磷的干燥器中,放在黑暗处一两个月或更长时间都可以。

6. 切片、贴片和盖片

按常规石蜡切片法切片,片厚8微米。贴片和盖片的方法是:先将洗净和烘干的载玻片放在40℃左右的烘片台上,在载玻片上滴几滴液体石蜡,然后将切好的蜡片轻轻地移到载玻片的石蜡油上,因液体石蜡的温度有40℃左右,这样,蜡片一方面可慢慢展平,同时液体石蜡逐渐将蜡片上的石蜡熔化掉,达到展片和脱蜡的目的。待液体石蜡将蜡片上的石蜡熔化后,即可用盖玻片盖片。国外多用 entellan 和二甲苯混合液作为封盖剂,而常用的加拿大树胶(Canada balsam)因荧光太强是不能使用。在贴片时,还应注意,不可用水,以防荧光物扩散。封盖好的片子,应立即在荧光显微镜下检查。如不立即检查,需放在盛有五氧化二磷的干燥器中,避光保存。

7. 荧光显微镜检查

通常用单筒荧光显微镜。在双筒显微镜下观察,荧光的强度将减少一半。光源最好用较强的高压汞灯。如没有荧光显微镜,只要有荧光光源,把它装在普通光学显微镜上也可。因为一般的光学玻璃能够透过长波紫外光,其本身是无荧光的。我们用的普通显微镜配上 HBO₅₀ 的荧光光源,激发光滤色片用 BG₁₂(4毫米, Schott and Gen),吸收滤光片由淡绿色滤光片(GG9/1毫米)和桔黄色滤光片(OG1/1.5毫米)合用,把它装在目镜下,以阻断紫外光对眼睛的损害。一般的明视野和暗视野聚光镜都可以使用,但后者更好。在聚光镜和观察标本之间加一点甘油作浸渍剂可增加荧光亮度。由于荧光图象反差大而光度弱,照相时,曝光时间比普通显微照相长得多。我们曝光的时间为10—15分钟,用国产21°的胶卷。每次荧光检查时间最长不要超过3小时,时间过长,汞灯的光强度逐渐下降,标本在紫外光照射下5分钟后,荧光强度也明显降低。检查结束后立即熄灭光源,如欲再用,须待汞灯充分冷却。

荧光组织化学技术还包括外周薄膜组织铺片(如虹膜、肠系膜等)和现在应用很广的显微荧光分光测定。将薄膜铺在载玻片上,再把载玻片放在五氧化二磷的干燥器中,空气干燥2—4小时,把干燥器连在真空泵上抽气3小时左右后进行甲醛处理,不用盖片便可观察。由于单胺荧光物具有特殊的激发和发射光谱,因此,应用显微荧光分光测定仪可以对各种单胺加以鉴别和定量,这方面国外资料很多。自 Falck-Hillarp 荧光技术发展以来,已有不少改良,其中主要有:中枢神经组织涂片法,脊髓终丝铺片法,荧光免疫法,以乙醛

酸代替甲醛的荧光法,摇动器切片法和冰冻切片法等。

二、脊髓单个神经元的辣根过氧化物酶细胞内染色^[2]

辣根过氧化物酶(HRP)目前广泛应用于中枢神经系统的研究,除 HRP 轴突逆行传送的方法以及将 HRP 用于免疫酶标组织化学技术外,近两年来又发展了以 HRP 研究单个神经元形态的技术。过去有些实验室原来用 Procion yellow 注入神经细胞进行染色,后来逐渐改用 HRP,因为它染出的树突长而多,特别是它所显示的轴突及其侧枝和终扣的清晰度和完整性,不但是 Procion yellow 所不能比拟的,而且与 Golgi 方法染出的相比也毫不逊色。如再予以复染,可以进一步观察与其他神经元的关系,同时还可作电镜观察。更有意义的是,在将 HRP 注入神经细胞前,可先对同一神经细胞的生理特性进行观察,所以,这也是一种将生理和形态结构结合起来进行研究的较好的方法。

实验动物为猫。将灌有 HRP 溶液的玻璃微电极插入腰段脊髓的背角或腹角的单个神经元内,获得稳定的细胞内电位记录,有时还对神经元的生理特性进行观察后,经微电极通电将 HRP 注入神经元内。微电极的尖端事先用碰撞法加折断,使其直径在 2 微米左右,然后用压力将含 4% HRP 和 0.2M 氯化钾的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液灌入微电极内,微电极电阻一般为 20 兆欧左右。通电时微电极尖端接正极,通电电流约为 5—20 毫安,通电量为 200—500 毫安·分钟(电流×时间)。一般通电时间约需 20—40 分钟,在通电过程中同时监视膜电位变化或腹根刺激引起的逆行动作电位,以确认微电极尖端始终在细胞膜内。通电完毕后将微电极退出细胞外,使动物存活 3—7 小时,再以 2% 多聚甲醛的磷酸缓冲液(pH7.4)经心脏灌流,随即取材置同一溶液内再固定 12 小时,经含 5% 蔗糖的磷酸缓冲液洗后,连续冰冻切片 60—100 微米,收集于含 5% 蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液中,经 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)溶液以及 DAB 加 H₂O₂ 溶液孵育,切片贴于涂有明胶液的玻片上。

用 HRP 染色的背角神经细胞,多位于背角 III—IV 层(按 Rexed 的分层)的外侧份,胞体大小多在 40 微米×15 微米范围之内。在 III、IV 的细胞多为长三角形,其树突有一定的朝向,有的全部伸向背角表面,其树突沿矢状面方向作扇形分布,伸展范围前后宽达 1,500 微米,左右范围只有 150 微米。有的侧向背、腹两个方向伸展,而不向两侧伸出,即使伸出也弯而向腹侧。在 V、VI 层的细胞多为中等的星状细胞,其树突向四周伸展,可达背索和外侧索的白质纤维之间,它们的轴突往往向腹侧行走,可进入背索、外侧索和腹索。

用 HRP 显示的许多腹角和背角神经元的树突广泛地伸入四周白质,深达白质的 1/2—3/4,横行于神经之间。看来,在脊髓的横切面上看到的从灰质向四周放射的条状结构,估计就是由许多神经细胞树突的远端和轴突的侧枝集聚成束所组成。这些横行于白质中间的树突过去对它的形态上结构和功能不十分清楚,由于电镜技术的进展到可以观察各种不同型式的突触,如在这方面作进一步的研究,对了解这些树突的远端与其他结构的连结及其可能的生理机能将会有所帮助。

通电流将 HRP 注入神经元时,为避免引起微电极尖端阻塞,所用电流不能太大,因此通电时间常较久,一般至少在 20 分钟以上,如时间过短,染色就太浅,不能显示树突

及轴突的末梢。但对较小的神经元,要使微电极尖端长时间地留在细胞膜内通电而不损伤细胞,常常是很困难的。如在通电过程中微电极尖端逸出细胞,重则使细胞死亡,染色失败,轻则造成细胞体周围 HRP 的污染,使细胞体轮廓不清,如注射比较成功的运动神经元,胞体外没有 HRP 的污染,树突、轴突和它的侧枝及终末都显示得较完整,其轴突因已出腹根仅追踪到 2.5 毫米长,但在它出腹根时染色仍为棕黑色,没有变淡的趋势,所以估计实际染出的轴突要长得多,而且染出的轴突远端渐变为淡棕黄色,可追踪到 9—15 毫米。

三、酶标记技术^[3]

研究哺乳动物促黄体生成素释放激素(LRH)的合成、分泌和对垂体前叶细胞的作用,对于了解生殖内分泌的调节控制和避孕药的作用原理有重要意义。除了应用生物及化学方法测定 LRH 的含量和代谢以外,免疫标记定位,如荧光标记、酶标记是很有用的手段。

(一) 兔抗 LRH 免疫血清的制备

5 毫克 LRH (中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组产品) 和 10 毫克 DS (分子量为 500,000), 溶于 5 毫升蒸馏水中, 1 小时后, 稀释至 9 毫升, 与等体积福氏全佐剂(羊毛脂:石蜡油=1:4, 含 2 毫升划刺用卡介苗)4.8 毫升百日咳疫苗磨成乳剂, 供 8 只家兔皮内一次多点注射。每兔还同时肌肉注射百日咳疫苗 0.5 毫升。三个月后取血, 选用放射免疫法测定效价和亲和力高的血清。

(二) 绵羊抗兔 IgG 的 IgG (简称羊抗兔 IgG-IgG) 的提取

操作均在 7—8℃ 进行, 用亲和层析法。以兔 IgG-琼脂糖 4B50 毫升装柱(1.5×25 厘米), 将羊抗兔 IgG 免疫血清(中国科学院上海细胞生物学研究所提供)上柱, 依次用含 0.15M KCl 的 0.01M 磷酸钾盐缓冲液 pH7.2 洗脱杂蛋白, 再以 3 M KCNS 洗脱羊抗兔 IgG-IgG, 收集 O.D.₂₈₀ 在 0.55 至 ∞ 部分。以含 0.15M NaCl 的 0.1 M 磷酸缓冲液 pH6.8 (PBS₁) 平衡的葡聚糖凝胶 G-25 柱去 KCNS, 浓缩至约 10 毫克 IgG/毫升, PBS₁ 透析, 离心取上清液, 备用。

(三) 辣根过氧化物酶——羊抗兔 IgG-IgG(HRP-IgG) 的制备

(1) 60 毫克辣根过氧化物酶(中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂生产, RZ 1.64 或 2.9) 加于 5 毫升(4.6 毫克)羊抗兔 IgG-IgG 中, 搅动使溶, 很慢地滴加 1% 戊二醛 0.25 毫升, 室温反应 2 小时后, 对含 0.15 M NaCl 的 0.1 M 磷酸缓冲液 pH7.4 (PBS₂) 透析过夜, 共换液 4 次。在冰浴内, 每毫升溶液加硫酸铵 0.313 毫克, 使达 50% 饱和度。9,000 转/分钟离心 15 分钟, 以冰冷的 50% 饱和硫酸铵洗涤至上清液无有色的未结合酶为止。沉淀以 PBS₂ 溶解, 充分透析去硫酸铵, 并以该缓冲液调至原来体积, 18,000 转/分钟离心 30 分钟, 上清液加等体积甘油, 分装, 低温冰箱保存。

(2) 160 毫克辣根过氧化物酶与羊抗兔 IgG-IgG 反应, 1% 戊二醛用量为 0.80 毫升, 其他条件同上。

(四) 组织切片

雌性成年大鼠, 断头放血, 取出全脑, 切下下丘脑部分, 前自视交叉, 后至乳头体, 包括灰结节部分。投入 Bouin 氏固定液, 4℃ 固定 12—24 小时或室温过夜。按常规水洗, 酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度为 6 微米。载玻片涂蛋白甘油。每隔 20 片切片取一片, 以相邻切片作为对照片, 贴在同一载玻片上, 40℃ 摊平, 37℃ 烘干备用。

(五) 免疫酶标记

用间接法, 组织切片按常规脱蜡, 经各级酒精至水。其中 75% 酒精中加碳酸锂。然后浸于含 FBS₂ 数分钟。按下列步骤标记:

(1) 与第一抗体反应: 用滤纸将切片上水分吸干, 分别覆上擦镜纸, 滴加 1:20 或 1:30 PBS₂ 稀释的兔抗 LRH 血清。对照片以正常兔血清代替兔抗 LRH 血清。37℃ 保温保湿 1 小时。以 PBS₂ 搅拌洗涤 3 次, 每次 10—15 分钟。

(2) 与 HRP-IgG 反应: 用滤纸将切片上水分吸干, 覆上擦镜纸, 滴加 HRP-IgG, 1:20 或 1:30 PBS₂ 稀释。37℃ 保温保湿 1 小时。PBS₂ 搅拌洗涤 3 次, 每次 10—15 分钟。用 HRP 含量高的 HRP-IgG, 稀释倍数可以提高到 1:40。

(3) 显色: 取 3, 3'-二氨基联苯胺(四盐酸)20 毫克溶于 0.05M, pH7.6 Tris-HCl 缓冲液 40 毫升。切片浸于此液, 在暗处, 室温(22℃ 左右)放置 10 分钟, 取出, 在溶液中加入 H₂O₂(1 滴 29% H₂O₂ 加 28 滴上述 Tris-HCl 缓冲液)16 滴后, 再将切片浸入, 暗处室温放置 20 分钟, 流水冲洗 10 分钟。

(4) 复染和封片: 切片移入蒸馏水, 按常规经系列酒精脱水, 二甲苯透明, 加拿大树胶或国产中性树胶封片。需复染细胞核的切片, 在显色、水洗后, 用稀释的苏木精染色液(1:4)染色片刻。流水冲洗分化, 再脱水、透明、封片。

四、生物学中的电镜放射自显影术^[4]

放射自显影是利用放射性同位素发射的带电粒子(α 或 β 粒子), 作用于感光材料的卤化银晶体而产生潜影, 再经显影把“像”显示出来, 以研究该放射性物质在生物机体(整体的、组织的或细胞的和亚细胞水平的)内的径迹或颗粒定位的一种技术。由于采用各种不同的放射性示踪化合物, 这种技术已被广泛地应用到农业、医学和生物学等领域中, 成为生产实践和科学研究的有用工具之一。

电子显微镜放射自显影(以下写作 EMARG)是电子显微镜(EM)和放射自显影(以下写作 ARG)相结合的一种新技术。其主要优点是:(1)可显示微量放射性物质在组织或细胞内的分布。由于核子乳胶把带电粒子的作用累积起来, 故即使是微量的低强度放射性物质的带电粒子, 只要经过长时间(数天至数月)的曝光, 就可以显示出来;(2)可显示放射性

物质在细胞亚显微结构内的精细定位。光学显微镜ARG术,只能显示组织或细胞内放射性物质的粗略定位情况。EMARG 可以显示放射性物质在细胞内亚显微结构(如高尔基体、内质网或线粒体等)甚至提纯的 DNA 大分子的精细定位;(3) 能在不破坏细胞结构完整的情况下,研究某些生物大分子(例如核酸、蛋白质、脂肪和酶等)在生物合成过程中的精细定位;(4) EMARG 过程中,核子乳胶层和含放射性物质的超薄切片紧密接触,既可减少由于散射所引起的带电粒子的损失,又可克服厚层组织中所出现的放射性自吸收现象。

但是,EMARG 也有其局限性:(1) 受电镜本身性能的限制,要求核子乳胶层很薄甚至是单层的卤化银晶体,这使穿透力强的高能 β 粒子的作用效率较差;(2) 由于 β 粒子的能谱是连续的,加之受乳胶粒度所限制,使得分辨率受到一定的影响;(3) 在超薄切片中必须含有一定量的放射性同位素,才能获得良好的结果,这可能引起生物体的放射损伤;(4) 曝光时间较长,有的甚至需半年以上,才能获得实验效果。

目前 EMARG 的应用范围日益扩大,例如:关于核酸(DNA 和 RNA)的合成和代谢;蛋白质的合成、储存、转移和分泌;脂肪的合成;酶的定量分析;碘在甲状腺内的定位和代谢;亚显微结构与功能的关系;损伤的恢复,以及卵母细胞内卵黄颗粒的起源和卵黄颗粒的 DNA 含量的研究等等。所用的生物材料也较广,诸如脊椎动物(如豚鼠、大鼠和小鼠)、两栖动物(如蝶螈和蛙)、水生生物、植物、低等生物(如蓝绿藻、阿米巴、细菌和病毒),乃至被提纯的 DNA,等等。

(一) 基本原理

核子乳胶和普通照相乳胶的基本成分,都是卤化银的微结晶在明胶中形成的悬浮体,它们的主要区别是核子乳胶所含卤化银量比较多,颗粒比较小,而且颗粒的大小较均匀。

放射性同位素的射线都能对感光材料发生作用。但只有 α 和 β 粒子适用于 ARG,其中 α 粒子能给出最好的分辨率。遗憾的是在具有生物学重要意义的元素中,没有一种是 α 粒子的发射体;因此,对于研究生物大分子的合成、代谢等细胞化学以及生理功能方面,发射 α 粒子的同位素便失去了它的价值。在生物大分子的主要组成元素中,都有发射 β 粒子的同位素(例如 ^3H , ^{14}C 和 ^{32}P 等),所以它是研究生物有机体 ARG 的重要工具。在 EMARG 中, ^3H 的应用受到人们的重视。

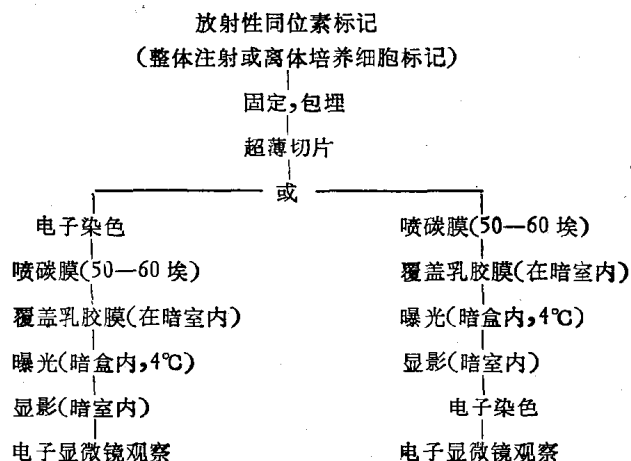
在普通的照相过程中,光量子将感光层中溴离子的一个轨道电子击出,使成为溴原子;而被击出的电子为溴离子周围的银离子所俘获,使银离子变成银原子。这就是潜影形成的过程。ARG 的基本原理与此相同,只不过这里是由于带电粒子的作用而已。

潜影衰退是指潜影的逐渐消失。在 ARG 过程中,许多因素可以引起潜影衰退的加速,值得注意。采取下列措施可以适当防止潜影衰退:(1) 在低温条件下储存核子乳胶;(2) 在低温并且最好在干燥的、有二氧化碳的或无氧的条件下曝光;(3) 如果曝光时间较长的话,最好在有惰性气体(例如氮或氩)的条件下进行。

(二) 操作过程

EMARG 的主要程序是:放射性同位素标记,生物材料的固定和包埋,超薄切片,核

子乳胶膜的制备、曝光,显影,染色(或在切片后即染色);见下表。



现将各步骤中的有关问题分述如下。

1. 放射性同位素的选择

前已所述,具有生物学意义的是发射 β 粒子的同位素。射线的能量越大、射程越长,其电离密度越小,EMARG 的效率也就越低。所以,除少数特殊情况(例如研究甲状腺功能时使用 ^{131}I)外,对于研究生物大分子在细胞内的合成、代谢等,都日渐以 ^3H 标记化合物取代 ^{14}C 或 ^{32}P 所标记的化合物。

^3H 是发射 β 粒子的所有同位素中能量最低(最大能量=0.018 兆电子伏)的一种,半衰期为 12.46 年,其粒子射程很短、电离密度比较大。在 ARG 中,除 α 粒子外,它的分辨率最好。

最大能量比 ^3H 稍大的是 ^{14}C (最大能量=0.155 兆电子伏),它的 ARG 分辨率仅次于 ^3H ,但是由于它的半衰期很长(5,568 年),而且散射比 ^3H 强,所以一般选用 ^{14}C 的较少。

目前,人们采用 EMARG 术,比较集中地研究 DNA, RNA 或蛋白质,在细胞超微结构的合成、定位和代谢情况,较多使用 ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷。 ^3H -胸腺嘧啶核苷已被公认为 DNA 的特殊前体,它进入生物体之后,能集中地标记在细胞核、细胞质中的线粒体或单股染色体上;甚至标记在被提纯的 DNA 大分子上(Rechenmann, R. V., 1967)。有人认为 ^3H -胸腺嘧啶核苷可以标记在核蛋白上,但其标记量少于标记细胞核中总 ^3H 的 2.5%。不论是体内或离体实验条件下, ^3H -胸腺嘧啶核苷进入机体之后和 DNA 结合的量是很少的,大部分被降解了。 ^3H -胸腺嘧啶核苷进入细胞核是非常迅速的,例如注射到小白鼠体内之后,15 分钟就标记到所有的细胞核和细胞质中,30 分钟后开始减少,24 小时后只在细胞核的 DNA 中发现。关于 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记到 DNA 中的百分率,在注射人体内的条件下,一般为 8—10% 左右,但也有高至 20% 的。

用于标记 DNA 的示踪化合物,除较常用的 ^3H -胸腺嘧啶核苷之外,近年来开始使用 ^3H 标记的放线菌素 D。据报道, ^3H 标记的放线菌素 D 能测定微量的 DNA。放线菌素 D 是一种抗菌素,为鲜红的多肽化合物。它和双链的 DNA 形成稳定的络合物,但不与单链 DNA 形成络合物;连结的程度取决于 DNA 的鸟嘌呤含量。这种药物可能是进入到 DNA 双螺旋的小沟处。光学显微镜 ARG 研究证明, ^3H -放线菌素 D 定位于细胞器中 Feulgen 阳性反应部分,或是用荧光显微镜测出的有核酸之处。EMARG 也证明 ^3H -放线

菌素D结合DNA的特异性,它与细胞核特别是其中的染色质有强烈的结合能力。这对于微量DNA的测定是有一定价值的。例如,关于蛙卵母细胞内的卵黄颗粒是否存在DNA的问题,以 ^3H -放线菌素D应用于EMARG,便显示出用Feulgen反应无法测出的微量DNA,而且证明它是定位于卵黄颗粒的表层。我们在丰年虫的卵母细胞中也得到相同的结果。在EMARG中使 ^3H -放线菌素D来测定DNA,其独特的优点是:(1)能将使用其他示踪化合物或细胞化学方法难于显示的微量DNA标记出来;(2)它既可以在活体生物材料中标记,又可在已固定的生物材料脱水过程中或在切片之后使用。这就是说,它既适用于活体,又适用于失去代谢功能的生物材料。

2. 放射性同位素的给予剂量

放射性同位素的给予剂量,首先取决于生物体的大小,其次是考虑所给予的放射性同位素在生物体内的分布规律。生物体大的,或在进入生物体内后整体广泛分布的,给予剂量要大一些;反之,生物体较小,或在生物体内局部积聚的放射性同位素,给予剂量就要小一些。

由于EMARG的切片很薄(500—1,000埃),要在这样薄的组织内获得满意的ARG结果,必须有足够的放射性同位素与之相适应。所以,不管是整体分布的还是局部积聚的放射性同位素,和光学显微镜ARG比起来,所需的剂量要大得多了。一般地说,用以研究核酸和蛋白质的 ^3H 标记的示踪化合物,整体动物注射剂量是每克体重为0.5—1微居里,细胞离体培养的剂量为每毫升培养液1—4微居里。

获得EMARG的满意结果与放射性对生物体可能引起的损伤之间,存在着矛盾。在离体培养条件下,培养液中 ^3H -胸腺嘧啶核苷的浓度低至1微居里/毫升,就呈现深度的放射生物学效应;在每毫升1.25—5.0微居里的培养液中培养24小时,HeLa细胞的生长就受到抑制,甚至 ^3H -胸腺嘧啶核苷的剂量小至0.02微居里/毫升,也会出现生长抑制效应。因此,有人主张离体培养的细胞,给予 ^3H -胸腺嘧啶核苷的剂量不要超过0.05微居里/毫升培养液。在哺乳动物体内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷,剂量只有0.5微居里/克体重,就能引起放射损伤。放射损伤除了和剂量大小有密切关系之外,放射性同位素处理的时间长短也是重要因素之一。考虑到这一点,在使用较大剂量时,应尽可能缩短标记时间。

3. 生物材料的处理

(1) 固定和脱水:给予放射性同位素的生物材料的固定和包埋,与电镜一般观察所要求的完全相同。

(2) 包埋材料:用于电镜生物材料的包埋剂主要有两类,一类为甲基丙烯酸酯,另一类为环氧树脂。前者由于引起生物材料的收缩较大,故已逐渐为环氧树脂所取代。但是,在EMARG中,使用甲基丙烯酸酯包埋却有一定好处,即标本的电子染色时间很短就能获得满意的反差。而环氧树脂包埋生物材料的染色时间则较长,有的甚至需3—4小时,这样长时间的染色处理,如果在覆盖乳胶膜之前进行,可能引起放射性物质从切片中脱出;若是在显影之后进行,则可能由于明胶膨胀而导致银颗粒的丢失或移位。所以尽管甲基丙烯酸酯包埋剂存在着缺点,还是有人主张使用它。实际上,它所引起的生物材料的收缩程度,尚在EMARG的分辨率误差范围之内。但目前使用环氧树脂包埋的较多。

(3) 切片的厚度:理想的切片厚度是尽可能的薄。影响灵敏度和分辨率的主要因素之一是切片厚度。放射性同位素的含量与切片厚度有密切关系,这又直接影响曝光时间

的长短。在一定量的放射性同位素的情况下,如果切片太薄,在单位时间内核子乳胶所获得的带电粒子的数目就少;反之,切片过厚时,将损失分辨率。如要切片较薄又保持良好的分辨率,则需要给予生物体以更多的示踪化合物,这会增加放射性损伤的危险。

和光学显微 ARG 不同,因为 EMARG 的超薄切片很薄,自吸收现象不是一个重要问题。对于 ^3H 来说,即使切片厚度增至 1,000 埃,也无自吸收问题。

超薄切片厚度的判断,一般是依据在双筒放大镜下,直接观察浮在玻璃刀水槽液面上切片的干涉光颜色来估计(图 1);在 EMARG 中,通常选用银灰色至金黄色之间的厚度,这相当于 500—1,000 埃。在作准确的定量实验时,可使用入射光干涉仪对切片厚度进行精确测定。

乳胶	干涉光颜色	切片
500	灰色	500
	银灰色	
1,000	金色	1,000
	铜色	
1,500	紫色	1,500
	蓝色	
		2,000

图 1 乳胶和切片的厚度(埃)

4. 核子乳胶薄膜的制备

在超薄切片之后,需在切片上覆盖一层核子乳胶膜,然后进行曝光。由于电镜本身性能的限制,核子乳胶膜不能太厚,一般要求卤化银晶体在乳胶膜成单层分布。制备单层的乳胶膜,对于分辨率来说是很理想的;但是在卤化银之间由明胶所形成的空间,将大大降低带电粒子对卤化银的作用效率,带电粒子穿过明胶而失去作用。很明显,对于微颗粒卤化银晶体重叠的乳胶膜来说,如果带电粒子射程超过单层卤化银的厚度,那么增加乳胶膜层就会提高敏感度。

人们一般把所有合适的乳胶膜均称之为“单层”乳胶膜。所谓合适的乳胶膜,就是在卤化银之间明胶空间最小的薄层致密乳胶膜。据报道,把 Ilford L₄ 型核子乳胶膜的厚度从 1,300 埃增加到 2,700 埃时,灵敏度提高 60%。此外,灵敏度和带电粒子的射程有关。例如, ^3H 射程较短,即使把乳胶层厚度增加到约 1,700 埃以上,也不再影响灵敏度;而对于射程较长的 ^{14}C 和 ^{35}S ,随着乳胶膜厚度增至 2,800 埃,灵敏度将直线上升。这就是说,如果为了提高灵敏度而增厚乳胶膜,还必须考虑所使用的放射性同位素的射程。

为了测定合适的乳胶层,最可靠的方法是把制备的乳胶膜置于载片上,用干涉仪测量。而普遍采用的简易方法,是根据经验由乳胶膜在载玻片上呈现的干涉光来判断(图 1)。

核子乳胶的使用过程,都要在暗室红光下进行。核子乳胶在常温下为半固体状态,当温度增高到 40℃ 以上时则成液态。制备乳胶膜时,先按需要量取出,置于干净的小烧杯内,加入适当比例的重蒸馏水稀释,在 45℃ 恒温水浴中溶解 15 分钟,溶解时用玻棒轻轻搅拌(大力快搅会产生许多泡沫,对以后操作不利)。许多方法都能制备均匀的乳胶膜。现将几种常用的方法简述如下。

(1) 环套法:核子乳胶溶解后取出,置于冰浴 2—3 分钟,再在室温放置 15—30 分钟;这是为了使溶解后的乳胶成为粘胶状,便于下一步操作。乳胶成粘胶状后,用金属丝(白金、银或镍等)做成一个直径为 4 毫米的环(图 2a),用前洗净,浸入乳胶中(图 2b),轻轻提起,在环内即形成一单层乳胶膜(图 2c);然后,把这乳胶膜轻轻地直接套在置于小柱(用玻璃、有机玻璃或木料制成)顶上的有载网的切片上(图 2c)。或者,将标本置于载玻片