

介绍一种显示酸性磷酸酶超微结构的标本制作方法

组织胚胎学教研组 顾文祥

随着当代科学技术的飞速发展，很多研究工作都进入细胞生物化学和超微结构的分子水平，为了进一步将细胞形态和机能的研究紧密结合起来，近20多年来已发展成一门超微细胞化学的新学科，研究的范围很广，包括糖元、核酸、酸性磷酸酶、硷性磷酸酶、脂酶和ATP酶等等。我们由于科研工作的需要，曾对细胞溶酶体的酸性磷酸酶电镜标本制作技术进行探索，现将该技术的操作过程初步介绍如下。

方 法

一、取材：取培养9~16天的正常人胚肾细胞，用橡皮刮子将细胞从培养瓶壁上轻轻刮下，然后将此细胞悬液吸入离心管中，用转速2,000/分离心20分钟。

二、前固定：倾去上清液，于沉淀中加0.1 M二甲肼酸钠缓冲液 (pH=7.2) 轻洗10分钟，再以5% (或2.5%) 戊二醛二甲肼酸钠缓冲液在4°C下固定1~2小时。此时可用玻棒轻拨细胞沉淀块以使游离。

三、冰冻切片：固定后吸出固定液，用0.1 M二甲肼酸钠缓冲液洗10~30分钟，立即以冰冻切片法将细胞块 (或组织) 切成40~50微米厚切片。

四、孵育：将细胞切片孵育于37°C Gomori作用液 (pH=5) 中5~15分钟。

Gomori作用液配法：

- 硝酸铅 0.12克
 - 0.05M醋酸钠缓冲液 (含7.5%蔗糖) * 100毫升
 - 3% β-甘油磷酸钠 (慢慢加入) 10毫升
- 上述作用液经过滤后于使用前先置37°C温箱预热1小时。

* 0.05M醋酸钠缓冲液 (pH=5)	92.5毫升
0.05M醋酸	30毫升
0.05M醋酸钠	70毫升
0.22M蔗糖	7.5毫升

五、对照：

- 1、切片于90°~100°C中煮沸10分钟。
- 2、或Gomori作用液中不加β-甘油磷酸钠。
- 3、或作用液中加0.01M氟化钠。

六、后固定：孵育后组织片用0.05M醋酸钠缓冲液 (pH=5) 浸洗20分钟，再以1% 锇酸缓冲液于4°C下固定1小时。

七、脱水包埋：固定后用Palade缓冲液洗30分钟，双蒸水洗10分钟。

50%丙酮	10分钟
70%丙酮	10分钟
90%丙酮	10分钟
纯丙酮	10分钟
纯丙酮	10分钟
纯丙酮：包埋剂618 (1:1)	1小时
纯包埋剂618 (37°C)	2小时
纯包埋剂618 (胶囊, 37°C)	过夜
纯包埋剂618 (60°C)	聚合24小时

包埋剂618配方：

环氧树脂618	6毫升
十二烷基琥珀酸酐 (DDSA)	4毫升
5%邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)	0.5毫升
2, 4, 6三 (二甲氨基甲基) 苯酚 (DMP-30)	0.1毫升

八、切片染色和观察：细胞块经超薄切片后用醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色或不经染色即可用电镜观察。酸性磷酸酶沉淀出现在溶酶体上 (见图)，当孵育时间长时也可在细胞核和细胞质内发现。

讨 论

早在1955年，Sheldon等⁽¹⁾就在被钨酸固定的小鼠小肠上皮细胞中使用Gomori法，再以电镜显示出超微结构的酸性磷酸酶定位。1961年以后，有人分别研究肝^(2, 3)、肾⁽⁴⁾、组织培养细胞⁽⁵⁾、

脑⁶和动脉壁平滑肌⁷等细胞溶酶体的酸性磷酸酶超微结构定位。超微细胞化学的标本制备过程中要求做到既能保持酶的活性稳定性,又能保持超微结构的高度完整性。因此对细胞化学和电镜标本的每一个操作细节都应特别注意。

一、固定:用**铁酸**固定大鼠肝组织时,酸性磷酸酶活性仅能保存1~2%;而用甲醛固定虽能保存酶活性的大部分,但却不足以保存细胞超微结构的完整性。1963年Sabatini最早将戊二醛用于电镜细胞化学中的固定。虽然戊二醛对固定溶酶体的酸性磷酸酶活性的能力和甲醛差别不大,但戊二醛固定的冰冻切片,如用4~6.5%戊二醛固定1~2小时仅穿透组织薄外层,中心未固定,中心部的可溶性酶或反应产物常可扩散到周围,造成假象定位。因此目前常用戊二醛前固定和**铁酸**后固定以纠正这个缺点。

二、冰冻切片:最早用组织块进行孵育,但因组织较厚而使固定不佳,因此易产生反应产物假象定位,后来主张在孵育前先把不同组织块用冰冻切片切成50微米、40微米或25微米厚,再进孵育液。块染和冰冻切片孵育时的结果有时并不一致。

三、孵育:必须严格掌握孵育时间。过度孵育可使反应产物扩散到邻近无酶区,电镜观察酶的扩散比光镜观察更为明显。一般在超微结构水平上孵育的时间要比光学显微镜孵育的时间短得多,如酸性磷酸酶通常只用5~15分钟。孵育后可不经硫化铵处理,因电镜能观察无色沉淀。

四、对照观察:进行超微细胞化学观察时需同时用细胞化学的光学显微镜方法作对照观察,以作比较。

(此工作是1975年在中国医学科学院流行病学研究所电镜室进修时,在洪涛老师的指导下进行的。)(图见插页14)

参 考 文 献

1. Sheldon H, et al: Exp Cell Res 9: 592, 1955.
2. Essner E, et al: J Biophys Biochem Cytol 9: 773, 1961.
3. Goldfischer S: Amer J Path 43: 511, 1963.
4. Miller F, et al: J Cell Biol 23: 519, 1964.
5. Brunk U, et al: J Ultrastruc Res 38: 192, 1972.
6. Brunk U, et al: J Ultrastruc Res 38: 1, 1972.
7. Shio H, et al: Amer J Path 76: 1, 1974.

纤维支气管镜吸引术治愈 咯血后并发全肺不张一例报告

附属第一医院肺科 王一丁 沈兰珍

目前纤维支气管镜检查已在许多城市使用,对咯血后并发肺不张的患者,若能用纤维支气管镜在床边吸引,则既能吸除阻塞支气管的血块,又能探查引起出血的原因。由于操作方便,痛苦少,是一种治疗咯血后并发肺不张的好方法。在这方面,国内尚未见有报道,故特将我科应用纤维支气管镜吸引术治愈咯血后并发全肺不张一例报告如下:

患者凌××,女,29岁,工人,住院号123985。患上浸润型肺结核8年,无空洞。1978年11月20日因与家人吵架,突然咯血数口,经止血治疗,仍间歇咯血。至第3

天,咯血较多,且感气急,口唇发绀,至当地医院拍片,发现左侧全肺不张,于11月25日急诊入院。

体检及实验室检查:体温37.5°C,脉搏100次/分,呼吸26次/分。左胸叩诊浊音,呼吸音消失,右肺呼吸音增强。X线胸片:1978年1月6日,左上肺小片状淡薄阴影;11月23日,左肺呈大片密度增高而均匀的阴影,左侧横膈上抬,气管及右心缘向左移位。血红蛋白12.5克,白细胞9,650,中性72%,淋巴20%,单核5%,嗜酸性3%。

(下转165页)

纤维支气管镜吸引术治愈咯血后并发全肺不张一例报告

(正文见163页)

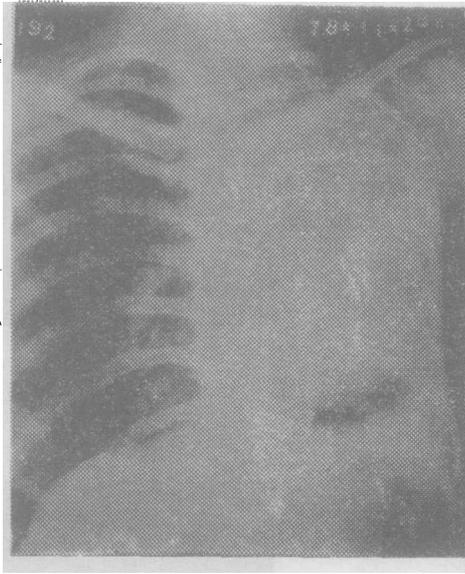


图1 左肺大片密度增高阴影，气管及右心缘左移，左横膈上抬

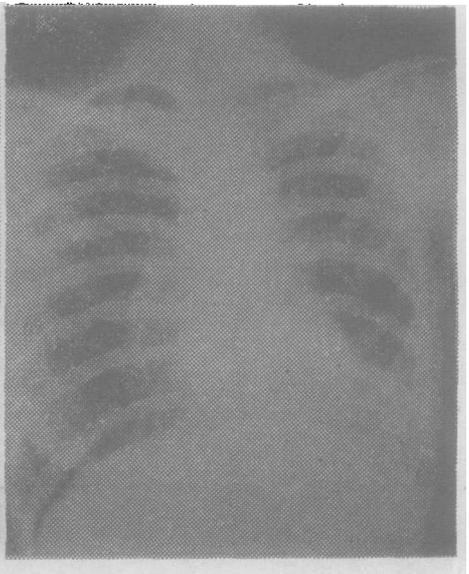
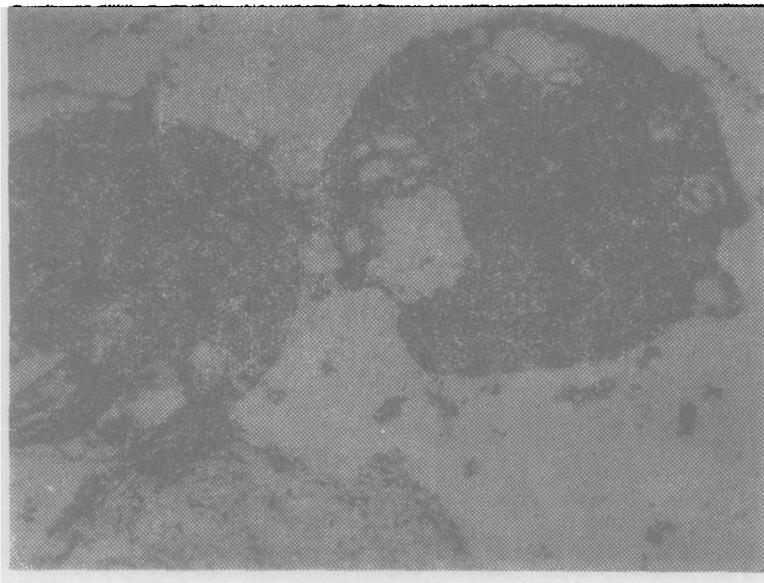


图2 左肺大片密度增高阴影已消失，气管、心脏、左侧横膈已复位

介绍一种显示酸性磷酸酶超微结构的标本制作方法

(正文见162页)



图示人肾培养细胞二个溶酶体，黑色沉淀颗粒为酸性磷酸酶。因二者机能状态不同，右侧溶酶体的酸性磷酸酶含量明显比左侧多。放大30,000倍