文章编号:1000-5404(2007)24-2375-02

技术方法

培养神经细胞透射电镜样本制备方法的探讨

陶忠芬[1],可金星[1],陈继兰[2],路 菊[1],文 灿[3],黄文琪[1],肖桃元[1] (第三军医大学基础医学部:[1]中心实验室,[3]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]成都中医药大学基础医学院实验中心,成都 610000)

提 要:目的 探讨培养神经细胞透射电镜样本制备的新方法。**方法** 分离SD大鼠大脑皮层神经细胞,培养于铺有琼脂糖和多聚赖氨酸薄膜的盖玻片上,适时固定、取膜,按常规程序制作超薄切片,电镜观察。**结果** 电镜观察神经细胞及髓鞘超微结构清晰,原有位置关系和连接方式保存良好,可见细胞间的紧密连接。**结论** 薄膜细胞培养法是培养细胞超微结构研究的好方法,也适用于培养细胞电镜免疫组化、电镜原位杂交的研究。

神经细胞间的连接是神经元传递信息的重要结构。通过这种连接,神经元间形成复杂的神经网络和神经通路,完成神经系统的各种功能活动[1]。研究培养细胞间结构关系,长久以来采用细胞原位包埋切片法[2]。该方法操作较复杂,切片难度大,由于培养的单层细胞数量少,不易反复切片,所以成功率低。本实验探索了培养神经细胞透射电镜样本制备的薄膜细胞培养法,效果理想,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Neurobasal A培养基、B27添加剂购自Gibco公司,L-谷氨酰胺、多聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine,PDL)、胰蛋白酶、神经生长因子(NGF)和琼脂糖粉购自Sigma公司,CO_2培养箱THERMO FORMA 3111,荷兰菲利浦PHILIPS-TECNAI 10透射电镜。

1.2 培养盖玻片的包被

1.2.1 盖玻片处理 先将10 mm×10 mm盖玻片逐片浸泡于95%乙醇(含1%盐酸)中过夜,再用95%乙醇冲洗2次后,用清洁丝绸擦干,置于直径为33 mm的培养皿中(3张/皿),牛皮纸包装后高压灭菌,37 ℃烤干。

1.2.2 琼脂糖包被 配制0.2%琼脂糖(质量体积分数)溶液,将粉状琼脂糖加入三蒸馏水中,置90 ℃水浴,每10分钟摇晃混匀1次,待琼脂糖完全溶解后将水浴温度维持于60 ℃,保持琼脂糖溶液为液态,将琼脂糖滴在盖玻片上,液滴量以足够铺满盖玻片表面为宜,稍后吸去多余的液体,使盖玻片表面覆有一层很薄的琼脂糖,厚度大约为10~20 μm,将盖玻片置于超净台内过夜自然晾干。

1.2.3 多聚赖氨酸包被 用0.01 mol/L硼酸(pH 8.5)溶解PDL,铺在包有琼脂糖的盖玻片上,室温过夜后灭菌双蒸水漂洗3 min×3次,置超净台内过夜自然晾干。

1.3 细胞的分离、培养

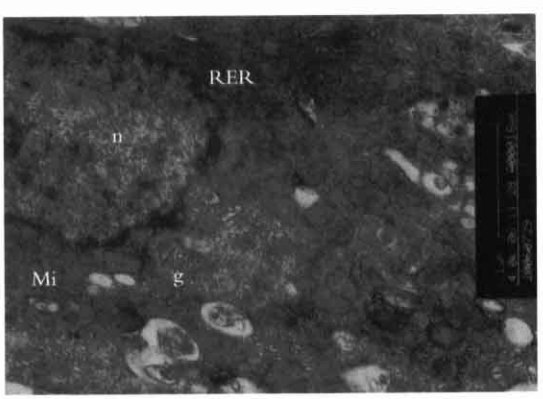
无菌条件下分离出新生SD大鼠大脑皮层,仔细剥离脑膜,剪碎,D-Hanks液漂洗组织2次,置37 ℃含0.125%胰蛋白酶的D-Hanks液中消化30 min,小牛血清终止消化,轻柔吹打后过200目筛网,1 100 r/min离心,收集细胞,加入全培养液(含Neurobasal A、B 27、终浓度为2 mmol/L的L-谷氨酰胺和终浓度为1.0 ng/ml的NGF),调细胞数约为10^5 ml^{-1},接种在经上述处理的盖玻片上,约50 μl/盖玻片,置37 ℃、5% CO_2培养箱,2 h后添加全培养液至铺满孔底,每3天半量换液1次。

1.4 透射电镜制样方法

培养14 d后,用37 ℃的0.01 mol/L PBS冲洗培养盖玻片2次,2.5%戊二醛预固定30 min后用细胞刮子轻轻地将细胞连同琼脂糖PDL膜一起刮下,继续投入2.5%戊二醛进行原位固定2 h以上,0.1 mol/L PBS漂洗2次,30 min/次。1%锇酸4 ℃后固定30 min,丙酮梯度脱水,3 min/次(70%丙酮配制的饱和醋酸铀4 ℃过夜)。经置换、浸透、环氧树脂618包埋(包埋时,将膜片皱折成团)、半薄切片定位、超薄切片、铅染后,用PHILIPS-TECNAI 10透射电镜80 kV观察,并照相。

2 结果

电镜下观察到神经元及突起相互间排列关系完好,各种细胞器如线粒体、高尔基体、粗面内质网、游离核糖体等结构清楚(图1),髓鞘结构清晰,可见细胞间紧密连接,完整的突触结构,并见到突触小泡(图2)。



RER:粗面内质网;Mi:线粒体;n:细胞核;g:高尔基体

图1 培养神经细胞的各种细胞器 (TEM×14 000)

作者简介:陶忠芬(1977-),女,重庆市人,实验师,主要从事电镜技术方面的研究。电话:(023)68752348

通讯作者:文 灿,电话:(023)68753935, E-mail: wencan@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-01-12;修回日期:2007-09-29



图2 培养神经细胞可见细胞间紧密连接(↑),完整的突触结构 (TEM ×20 000)

3 讨论

为了保存培养细胞原有的位置、毗邻关系以及细胞间的网络联系,透射电镜标本制备通常采用顶扣细胞原位包埋法,即将细胞培养在盖玻片上原位固定、脱水、浸透,在光镜下先选好被观察的细胞区域,然后顶扣包埋[3],固化后用液氮冷冻法将包埋块与盖玻片掰开。由于培养的单层细胞在盖玻片与包埋块掰开时易脱节,单层细胞不宜半薄切片定位,超薄切片的切面较局限,且操作复杂、技术要求高,成功率低。我们经反复摸索和尝试,采用薄膜细胞培养法,将细胞培养在涂有琼脂糖、PDL的盖玻片上,原位预固定后,再用细胞刮子轻轻地将细胞连同膜载体一起刮下,将膜载体皱折成团包埋,这样可切到多个面,并可反复切片,制样成功率高,同时能保持细胞间的相互关系,细胞超微结构也保存良好。本实验中,我们观察到神经元及突起相互间排列关系完好,各种细胞器如线粒体、高尔基体、粗面内质网、游离核糖体等结构清楚(图1),髓鞘结构清晰,可见细胞间紧密连接,完整的突触结构,并见到突触小泡(图2),说明该方法是培养细胞超微结构研究的好方法。

应用薄膜细胞培养法培养的其他细胞,进行组织化学/免疫组织化学染色、原位杂交,再采用透射电镜制样方法观察其超微结构,其操作步骤同前,可对细胞内抗原、基因进行亚细胞结构定位,尤其适合于细胞间连接组分的原位观察,如各种突触蛋白、细胞连接蛋白和细胞外基质蛋白等。

在操作中,包有琼脂糖的盖玻片置超净台内过夜应自然晾干,不宜采用烤干的方法,因为后者会使琼脂糖薄层出现裂纹。细胞培养的时间不宜过长,以免细胞老化。采用梯度脱水时间不可过长,3~5 min为宜。换液过程中,用吸管缓慢滴加或吸走液体,避免冲散细胞薄膜[4]。

关键词:培养细胞;透射电镜;样品制备

中图法分类号:R361.2 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 王秀琴,瓦龙美,姜 俭. 组织学与胚胎学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2003:53-55.

[2] 凌诒萍,俞 彰. 细胞超微结构与电镜技术——分子细胞生物学基础[M]. 上海:上海医科大学出版社,2000:87.

[3] 杨 怡,张德添,张 飒,等. 培养细胞透射电镜超薄切片制备方法[J]. 电子显微学报,2004,23(4):506.

[4] 陶忠芬,蔡永国,杨仕明,等. 树突状细胞扫描电镜样本制备方法[J]. 第三军医大学学报,2005,27(12):1299-1300.

(编辑 张大春)

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部