

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