基础研究 文章编号：0253-3626(2009)08-1008-03

离心速度及时间对培养细胞透射电镜样品制备的影响

范京川，王 红，徐 晨，罗子国，巫静娴
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨消化离心法中不同的离心条件对培养细胞超微结构的影响，寻找最佳的离心速度及时间。方法：将培养细胞消化后分成不同的离心速度和时间组，电镜下比较各组细胞超微形态的变化。结果：当离心速度低于 800 r/min，8 min 时，无法收集到足够的细胞量。离心速度 2 000 r/min，15 min 时细胞挤压变形，胞浆出现撕裂等人工假象。离心速度在 800～1 500 r/min，8～15 min 时制样较容易，细胞超微结构保存良好。结论：消化离心法制备培养细胞透射电镜样品，其最佳的离心速度和时间是 800～1 500 r/min，8～15 min。

【关键词】培养细胞；消化离心；样品制备；超微结构；电镜
【中国图书分类法分类号】R329.2；Q249 【文献标识码】B 【收稿日期】2009-05-12

The influence of centrifugal speed and time on TEM sample preparation of culture cell

FAN Jing-chuan, et al
(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influences of different centrifugal conditions on the ultrastructure of cultured cells in the digestion centrifugation to find out the best speed and time of centrifugation. *Methods*: The cultured cells after digested, were divided into groups according to different digestion centrifuge speed and time, and the changes of cell morphology in each group at different centrifugation time and speed were compared under transmission electron microscope. *Results*: Enough cells could mot be collected with the centrifuge speed less than 800 r/min, 8 min. The cells were deformed due to extrusion or the cytoplasm was torn with the speed of 2 000 r/min, 15 min. With the speed of 800～1 500 r/min, 8～15 min, it was more proper to prepare samples and preserve cell ultrastructure. *Conclusion*: It is ideal to prepare TEM samples of cultured cells by using the cells being digested and centrifuged with speed at 800～1 500 r/min and time of 8～15 minutes.

【Key words】Cultured cells; Digestion centrifuge; Sample preparation; Ultrastructure; Electron microscope

生物电镜技术在医学科研与病理诊断中发挥着重要的作用。其中生物透射电镜技术最常用，其样品制备质量的好坏直接影响电镜观察结果。透射电镜样品通常分为两类：一类为组织块，其常规样品制备技术已较成熟和完善；另一类为游离组织，包括体液和培养细胞等。目前，培养细胞的收集有多种方法，其中消化离心法最为常用[1]，但该方法中离心速度及时间的掌控与样品处理人员的经验有很大关系，操作不当往往会造成细胞变形、撕裂等人工假象。特别是当细胞量特别少时，其离心速度和时间的选择更为重要。为了解决培养细胞收集困难、容易产生人工假象等问题。本实验将离心速度与时间差异对细胞形态结构的影响进行详细地对比，以期找到一种简便易行且对细胞超微结构保存良好的培养细胞收集及透射电镜样品制备流程。

1 材料和方法

1.1 细胞的来源

宫颈癌 Ca Ski 细胞系由我校病理教研室提供。

1.2 细胞的收集

宫颈癌 Ca Ski 细胞置于含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养基，37℃，50 ml/L CO_2 条件下培养在 18 个 100 ml 培养瓶中，待每个培养瓶中细胞量达到 1×10^6 个后，将培养液倒掉，用 0.1% 胰蛋白酶消化，细胞悬液分别摇匀注入 18 个 1.5 ml EP 管中。

作者介绍：范京川（1981-），男，助理实验师，
研究方向：医用电子显微镜技术。
通讯作者：王 红，女，实验师，E-mail：984410189@qq.com。
基金项目：重庆市高等学校优秀人才资助计划项目[渝教人(2009)2 号]。

1.3 细胞的离心

将装有细胞的 EP 管每 3 支随机分成一组，按表 1 设定的离心速度和时间进行分组后离心。

1.4 电镜样品制备

用吸管将离心后 EP 管中上清液缓缓吸出，再沿管壁缓缓加入预冷的 4%戊二醛固定液，在 4℃固定 1～1.5 h[2]后直接在 EP 管中进行常规电镜样品固定、脱水和包埋。超薄切片后在 H-7500 透射电镜下观察拍照。

1.5 图像分析

随机选取每组照片中 5 对细胞，利用北航 CM2000B 病理图像分析系统测量每对细胞间的最近距离，并计算其均数作为该组细胞的平均细胞间距。

2 结 果

当培养细胞的量相对恒定时（以 1×10^6 个为例），离心的速度及时间对细胞收集的量及制样过程的难易程度以及细胞形态的影响较大。

2.1 离心速度及时间对细胞收集的量及样品制备过程的影响

详见表 1。当离心速度低于 800 r/min，8 min 时，无法收集到足够的细胞。离心速度达到 800 r/min，8 min 时可收集到细胞，但细胞量较少，样品制备难度较大；延长到 15 min 后情况有所改善。离心速度增加到 1 500~2 000 r/min，细胞收集量都比较理想，但是 2 000 r/min，15 min 组细胞团块密度较大，固定和脱水效果不理想。

2.2 离心速度及时间对细胞超微结构的影响

细胞超微结构的保存情况详见表 1、图 1。

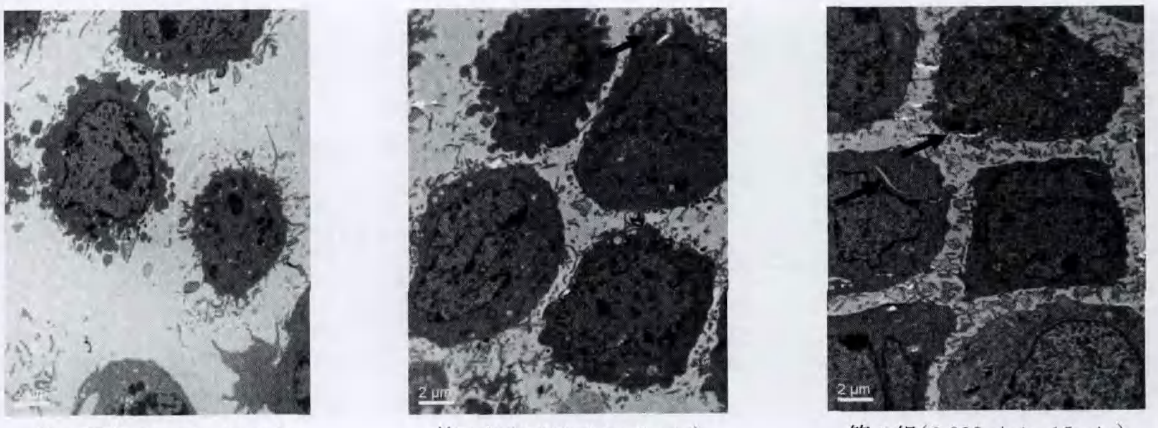
3 讨 论

培养细胞透射电镜样品制备常用的方法有原位包埋法、琼脂模具法、刮除离心法、消化离心法等。原位包埋法可完好的保留原细胞的形态，但操作困难、技术难度较大、切片耗时长；琼脂模具法需要先制作琼脂模具，操作繁琐；刮除离心法会造成

表 1 消化离心法中离心速度及时间对培养细胞的影响

组别	转速 (r/min)	时间 (min)	收集到合适的细胞量 *			收集细胞难易程度	样品制备难易程度	细胞间平均间距(μm)	超微结构保存情况
			管 1	管 2	管 3				
1	800	8	-	-	+	难	难	1.62 ± 0.61	细胞数较少。细胞表面微绒毛形态正常。细胞内细胞器正常。
2	800	15	-	+	+	较易	较易	1.12 ± 0.30	细胞密度适中。细胞表面微绒毛形态正常，但数量较第 1 组有所减少。细胞内细胞器结构正常。
3	1 500	8	-	+	+	较易	较易	0.96 ± 0.25	细胞有轻微挤压。表面仅有少量微绒毛。细胞内细胞器结构保存较好。
4	1 500	15	+	+	+	易	易	0.93 ± 0.14	细胞有轻微挤压，表面仅有散在的微绒毛，细胞间见少量散落细胞碎片。偶见胞质内人工裂痕，细胞器等内部结构保存较好。
5	2 000	8	+	+	+	易	易	0.83 ± 0.15	细胞挤压更加明显。表面光滑，微绒毛肿胀、脱落，细胞碎片散落在细胞间。胞质内出现人工裂痕，细胞器正常。
6	2 000	15	+	+	+	易	易 **	0.76 ± 0.20	细胞挤压严重，外形由圆型变为“方形”。细胞表面微绒毛缺失，细胞间可见大量细胞碎片。胞质内人工裂痕常见。

*：指可以进行后续脱水切片等工作的最低细胞量，通常为肉眼可清晰分辨的细胞团块。表中(-)表示未到达最低标准，(+)表示达到最低标准或以上；**：收集到的细胞团块过于密集，影响固定和脱水效果



第 1 组（800 r/min、8 min） 第 3 组（1 500 r/min、8 min） 第 6 组（2 000 r/min、15 min）

图 1 各组细胞电镜下超微结构保存情况（箭头示细胞内人工裂隙）

细胞的丢失，收集到的细胞量较少，因此不适合常规培养细胞电镜样品的制作观察。

消化离心法是将培养的细胞直接用消化液消化下来，离心收集呈细胞团块，并按照一般组织块标本制备流程进行样品制备和切片[4]。其操作简单、制样及切片容易，因而是培养细胞透射电镜样品制备中应用最广泛的方法。然而离心的速度和时间对细胞超微结构的保存影响很大，目前各实验室选用的离心参数多与操作人员的经验有关，缺乏详细的实验对比分析。

我们的实验数据表明，离心速度直接影响到样品的收集。从第 1 组中 3 个 EP 管仅有一管收集到的细胞量符合要求可以看出，如果选择离心速度 800 r/min，离心时间 8 min，则所送细胞量至少需要达到 1×10^6 个，才可能达到样品制备的最低要求。并且细胞聚集常不充分，在制样过程中易散开，样品制备和切片的难度也随之增大。同时细胞间距太大，增加了在电镜下寻找细胞进行拍照的难度[2]。细胞量过少时，收集细胞需要增加离心速度和时间，但随着离心速度和时间的增加，对细胞超微结构的破坏也随之增加。若离心速度达到 2 000 r/min，15 min，细胞团块过于密集，固定剂和脱水剂不能良好的渗透到细胞团块中央，将影响超薄切片的质量。

在细胞超微结构的保存上，相同的离心速度，离心时间越短，对细胞超微结构保存越好；相同的离心时间，离心速度越低，对细胞超微结构保存越好。从第 2、3 组和第 4、5 组的比较可以看出，虽然收集细胞的难易程度与后续步骤的评分相近，但对超微结构保存情况有明显差别。离心速度较低的组别对细胞超微结构的保存明显好于离心速度较高的组别。说明离心速度对细胞超微结构的影响因素要大于离心时间，即离心速度越快，离心力越大，细胞挤压变形以及细胞质内出现人工撕裂的可能性越大[5]。当离心速度过快，离心时间过长，尤其是速度超过 1 500 r/min、时间超过 15 min 时，培养细胞将出现挤压变形、撕裂、微绒毛减少等人工假象。从实验结果来看，离心速度<1 500 r/min、时间<15 min 时，对培养细胞内部超微结构的影响较小。因此，离心速度 800~1 500 r/min、时间 8~15 min 可以认为是消化离心法最适宜的离心速度和时间。

4 结 论

消化离心法是培养细胞透射电镜样品制备中最常见、最方便快捷的方法。当细胞数量达到 1×10^6 个以上时，其最佳的离心速度和时间是 800~1 500 r/min，8~15 min。

参 考 文 献

[1] 应国华，主编.医学生物学电镜技术与细胞超微结构[M].香港:香港现代出版社，1993.76.

[2] 杨 怡，张 飒，周 涛，等.培养细胞电镜样品制备方法[J].解剖学杂志，2003，26(5):509.

[3] 张 彰.游离细胞透射电镜样品预处理技术[J].中国民权医学杂志，2002，14(5):265.

[4] 赵 刚，曾 嘉，杨海贤.培养细胞的超薄切片技术探讨[J].天津医科大学学报，2004，2(10):168.

[5] 张卓然，主编.培养细胞学与细胞培养技术[M].上海:上海科学技术出版社，2004.483.

[6] 刘连璞，安连兵，肖焕才，等.少量游离细胞电镜样品制备法[J].中华病理学杂志，1994，23(5):314.

（责任编辑：关蕴良）