DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.06.031

3 讨论

流动相中离子对试剂与甲醇的浓度对单胺类物质的保留时间影响很大。在本色谱分析条件下(1 mmol/L 离子对试剂、7.6% 甲醇、4.4%乙腈),6 种生物胺及其代谢产物得到很好分离,各物质的保留时间与国内外报道的数据很相近[3,4]。如果增加流动相中甲醇的浓度,减少乙腈的浓度,则各化合物的保留时间都有不同程度的减少,而增加流动相中离子对试剂浓度,各化合物的保留时间则有所增加,但这些改变不影响各化合物的出峰顺序。

本实验中采用磷酸调 pH,避免了使用过酸(如 HCl)或过碱(如 NaOH)物质来调 pH,这有利于系统及柱的保护。

关键词 单胺类递质;脑/分析;胎儿;反相离子对色谱;

参考文献

1. 张仁斌 徐修容.高效液相色谱—在医药研究中的应用。上海:上海科学技术出版社,1983:119
2. Tusell JM,Sunol C,Artigus F,et al. Neurochemical studies on catecholamines and indoleamines by high-performance liquid chromatograghy with electrochemical detection. Chromatographia, 1982; 20 (16):112
3. 阮金秀 杨晓敏.双柱双泵高压液相色谱电化学检测器测定大鼠脑中生物胺及其代谢产物。中国药理与毒理学杂志,1990;4(1):4
4. 叶惟冷。用高效液相色谱—电化学检测法快速灵敏分析生物样本中的单胺类递质及其代谢产物。生理学报,1987;39(4):412

(收稿:1992-03-28;修回:1992-06-19)

应用冷冻蚀刻方法的几点体会

刘 平 施同舟 (第三军医大学训练部电镜室) 630038
陈正堂 毛宝龄 (第三军医大学新桥医院呼吸中心) 630037

呼吸窘迫综合征(RDS)肺脏常规病理观察,已有不少文献报道,但对肺泡上皮和毛细血管内皮细胞连接改变的研究报道尚少,我们将电镜冷冻蚀刻方法应用于该研究中,取得了较为满意的结果,并从中总结出几点体会。

1 材料与方法

健康成年家兔 16 只,经麻醉后,随机分为 2 组:(1)改良的兔骨髓型 RDS 致伤组($n=10$);(2)生理盐水对照组($n=6$)。伤后 6 h 放血活杀,取大小约 5mm×10mm×2mm 的一块肺组织,放入 2.5%戊二醛固定液(0.2mol/L 二甲胂酸钠缓冲液配制),迅速修成约 1mm×1mm×3mm 的组织条,真空泵抽气,使肺组织块下沉。置 4℃冰箱过夜。经 0.2mol/L 二甲胂酸钠缓冲液清洗 3~5 次后,放入 30%甘油生理盐水中浸泡 8~24 h,以增强样品的防冻性能。再经修整,放入样品杯内,在液氮中快速冷冻,用日本 EIKO 技术公司制造的 FD-3 型真空冷冻制样装置进行冷冻断裂、蚀刻和镀膜。将带有铂-碳复型膜的样品取出,放入 40%铬酸腐蚀液中,30min 左右样品与复型膜完全分离,用双蒸水仔细清洗复型膜 3~4 次,捞取复型膜于不加支持膜的 200 目铜网上,待干燥后,在日立 H-300 型电镜下观察肺泡上皮和肺泡毛细血管内皮细胞的紧密连接(TJ)。

2 结果

电镜观察可见盐水组的肺泡上皮细胞连接紧密,PF 面(胞浆面)的索条丰富,粗细均匀,连续性好,相互交织成网(图 1)。肺泡毛细血管内皮的 TJ 多由两排大小均匀、排列规则的连续颗粒组成。致伤组肺泡

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上皮 TJ 的索条数目明显减少，排列紊乱，结构松散不能交织成网(图 2)，有的索条连续性突然中断，游离终端增多。肺泡毛细血管内皮 TJ 颗粒大小不均，排列不规则，可见节段性颗粒缺如，使连续排列的颗粒出现突然离断现象。



图 1 生理盐水对照组肺泡上皮细胞紧密连接(TJ)，PF 面索条丰富，交织成网 ×20 000

图 2 RDS 组肺泡上皮细胞紧密连接(TJ)，PF 面索条减少，离断(↑)，结构松散 ×40 000

3 体会

在进行肺的冷冻蚀刻制样时，我们体会应注意以下几点：①标本新鲜，固定良好。各种固定液应临时配制，置 4℃冰箱待用。固定时应及时抽出肺泡内的气体。样品装入样品杯前应认真修整，大小适中，力争在 1～2s 内用液氮冷却到-196℃，以避免冰晶形成。②严格控制仪器真空度和环境温湿度，这是冷冻蚀刻复型法成败的关键条件之一。根据我们反复摸索，认为在整个操作过程中，仪器真空度应优于 5×10^{-7} 乇，室温 18～20℃，湿度<60%。这样所得到的图像立体感强，反差良好，污染少，喷镀颗粒细，能充分显示细胞不同层次的微细结构。③腐蚀液的选择：将复型膜从组织上分离下来，是整个蚀刻制样程序中最后一步，也是获得良好结果的关键步骤。我们曾用次氯酸钠腐蚀液，并加入 0.1%胰蛋白酶进行细胞消化[1]，但效果不佳。一是复型膜易破碎，污染严重；二是组织被腐蚀后遗留下的白色絮状物长时间不能完全脱离复型膜。其原因可能与次氯酸钠溶液性质十分活跃，在空气中极不稳定，易分解失效有关。改用 10%的铬酸液后，30min 左右组织被彻底腐蚀，复型膜干净完整，组织结构良好。铬酸等酸性腐蚀液用于植物等难腐蚀的标本[2]，我们用于肺组织的冷冻蚀刻制样，效果满意。

关键词 冷冻蚀刻

参考文献

1. 杨怡。电子显微镜冷冻蚀刻技术-组织腐蚀及复型膜的清洁。解剖学杂志，1990，13(2)：167

2. Fisher K，Branton D. Methods in Enzymology. Academic Press，New York，1974；32(Part B)：35～44

(收稿：1992-01-29；修回：1992-05-21)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net