DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.05.020

参 考 文 献

1. Fung YC, Yen RT, Tao ZL, et al. A hypothesis on the mechanism of trauma of lung tissue subjected to impact load. J Biomech Eng 1986; 110(2):50
2. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, et al. A laboratory model for studying blast overpressure injury. J Trauma 1987; 27(4):349
3. Richmond DR, Galordy CS, Damon EG, et al. DASA-AEC-Lovelace Foundation blast-simuationl facility. Techanical Progress Report No.DA-49-146-XZ-372 1966: USA DASA 1853
4. Owen-Smith MS. Explosive blast injury. Med Bulle US Army Eur 1981; 38 (7-8):36
5. Draeger RH. Blast injury. JAMA 1946; 132(13):762
6. 王正国。冲击伤：几种常见的冲击伤。北京：人民军医出版社，1983:138～139

(收稿：1991.01.04；修回：1991.06.06)

改良低温包埋胶体金免疫电镜技术

孙 榆 蔡文琴 李 巍 邓晓林 李国荣* (第三军医大学训练部 组织学与胚胎学教研室)

近年来，胶体金方法广泛应用于生物学研究中，为确定抗原存在的部位提供了一种检测手段。但在常规电镜制样操作过程中，因高温聚合等因素的影响，致抗原活性部份丧失，易导致该法的失败。80年代初，Lowicryl K4M（以下简称K4M）作为低温包埋剂用于免疫电镜样品制备的包埋后染色[1]。K4M是一种低粘度的包埋剂，可在低温（-20℃）下，由紫外线光照射聚合。不需经加热等程序[1,2]。因此，既能较好地保存组织结构，又能较多地保存抗原活性。目前国内应用低温包埋胶体金免疫电镜技术仅限于病毒的定性观察，在组织学方面尚未见有报导。我们应用K4M包埋免疫电镜技术对心肌细胞内心房颗粒的心钠素进行胶体金标记定位。实验中对K4M包埋方法[3]进行了改进，并对心房肌的常规电镜包埋和K4M低温包埋标本的胶体金标记效果进行了比较。现介绍如下。

1 方 法

取人心房肌约1 mm^3，环氧树脂618包埋按本室常规电镜样品制备方法进行。K4M包埋按下列改良程序进行。

组织块固定于Zamboin氏液，4℃，2h～4h。0.1M PBS漂洗，除去黄色。于4℃，在30%乙醇中脱水30min；于-20℃，在50%，70%，80%，90%，100%×2乙醇中各脱水50min。K4M纯包埋剂与100%乙醇按1:1比例混合，于-20℃浸透1h，然后移入K4M纯包埋剂与100%乙醇按2:1比例混合液中，于-20℃浸透过夜，最后于K4M纯包埋剂（-20℃）浸透24h。将胶囊置于自制的包埋架上放入紫外线灯箱（紫外线灯管6W，波长360nm一支），样品与照射源的距离约为30cm。于-20℃，经紫外线照射聚合48h后，移至室温继续聚合72h。在包埋剂配方上，我们改用微量注射器抽取（加针头）：

交联剂	0.27ml
单 体	1.73ml
称取起动剂	10mg

*：现工作单位：山东师范大学测试中心

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

切片厚度70nm左右，捞于无支持膜的镍网上，按包埋后胶体金免疫电镜染色法进行[3]。常规电镜包埋的切片经10%过氧化氢10min，以增进树脂的穿透性。低温包埋的切片不需此步骤。切片置于1%牛血清白蛋白（BSA）10min，以封闭某些非特异性结合部位。心钠素抗体孵育37℃，2h。然后移至4℃过夜。（其中环氧树脂包埋组血清工作浓度为1:500，K4M包埋组血清工作浓度为1:1000）。漂洗后置于胶体金标记抗体（SPA 1:10）中1.5h，37℃。再漂洗后，醋酸铀及枸橼酸铅染色分别为10min、12min，最后进行电镜观察。

2 结果与讨论

本实验证明：（1）K4M低温包埋组虽操作程序较环氧树脂组略嫌烦琐，但能较好地保存抗原活性。在相同的实验条件下，所需血清工作浓度低，心房颗粒上所附金颗粒明显多于环氧树脂组。（附表，图1，2）。（2）本实验所作系列改良，如以微量注射器抽取包埋剂代替称重包埋剂；以价廉的Zamboin氏液代替昂贵的PLP液作固定剂；缩短脱水时间及改良聚合方法等。既缩短了操作时间，又简化了操作程序，提高了实验效率，获得了较为满意的实验结果，可供推广应用。



图1 K4M包埋组切片
示心房颗粒上所附金颗粒×65000

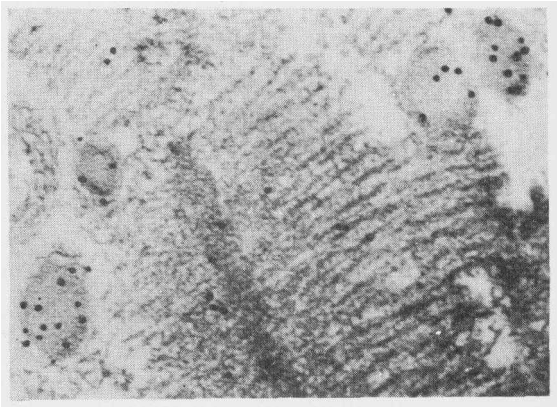


图2 环氧树脂包埋组切片
示心房颗粒上所附金颗粒×60000

附表 K4M组与环氧树脂组心房颗粒内含金颗粒数比较（各随意计数30个心房颗粒）（$\bar{x}\pm S\bar{x}$）

	K4M包埋组	环氧树脂包埋组	P
金颗粒数	26.3±0.98	5.8±0.21	<0.01

（实验中，得到本室蒋文萍及微生物学教研室张雪、万泽生的大力协助，特此致谢。）

关键词 低温包埋；胶体金；免疫电镜

参考文献

1. 杭振镳 蔡文琴，主编。电子显微镜术在临床医学的应用。重庆：重庆出版社，1988:50～59
2. Jean-Dominique Acetarin, Ecic Carlemalm, Werner Villiger. Developments of new Lowicryl resins for embedding bilogical specimens ate even lower temperaturse. Journal of Microscopy 1986; 143:81～88
3. 蔡文琴 王伯沄，主编。实用免疫细胞化学。成都：四川省科技出版社，1988:156～157

（收稿：1991.03.02；修回：1991.07.16）

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