

免疫金标记肿瘤细胞表面抗原的 软X射线接触显微术观察*

魏道严 沈恒嘉

(安徽医科大学 合肥 230032)

徐文轩 唐鄂生

(中国科学院高能物理研究所同步辐射国家重点实验室 北京 100039)

摘要 在建立了适于软X射线接触显微术(SXCM)观察的细胞样品免疫细胞化学染色技术的基础上,对培养的Hep-2肿瘤细胞表面HLA-A₂抗原进行免疫金银染色,并应用SXCM观察。结果显示:肿瘤细胞表面抗原的免疫金银染色颗粒图像反差明显,立体感强,大小和形态各异的颗粒清晰易辨。

关键词 软X射线接触显微术,肿瘤细胞,免疫金银染色,表面抗原

自从同步辐射等高强软X射线光源使用以来,软X射线接触显微术(SXCM)得到了迅速发展^[1,2]。SXCM的特点是适于观察湿的厚样品乃至处于自然状态下的完整细胞等生物样品。高质量的SXCM图像不仅能提供样品的形态结构,而且还能提供样品内元素组成等方面的信息。然而,SXCM却难以区分那些元素组成相似而生物学功能千差万别的生物大分子,如受体、酶、抗原等^[3],这是从事SXCM研究者面临的一个必须解决的大问题。近年来迅速发展的免疫细胞化学技术,特别是胶体金标记技术,由于其具有许多优点,已广泛用于细胞表面或细胞内多糖、蛋白质、受体、抗原等生物大分子的精确定位;动态变化及其功能等方面的综合研究^[4]。因此,若能胶体金标记技术引入SXCM中,势必可克服SXCM的上述缺陷,扩大其应用范围。而其最大的优点在于借助软X射线吸收差微区分析或软X射线激发荧光微区分析,可实现在形态结构观察的同时,对受体等生物大分子进行分布和定量研究,这具有十分重要的理论和实际价值。本文旨在探讨将免疫细胞化学技术引入SXCM中的可能性,我们先对肿瘤细胞表面抗原进行免疫胶体金标记,然后在SXCM下进行观察。

1 材料和方法

1.1 材料

DX-1型细聚焦软X射线光源,由中国科学院高能物理研究所和南京紫金山天文台研制;正性电子抗蚀剂(光刻胶)——P(MMA-Co-MAA),由无锡化工研究设计院提供。

鼠抗人HLA-A₂单克隆抗体,卫生部武汉生物制品所生产;羊抗鼠胶体金标记的IgG(15nm),军事医学科学院微生物及流行病所产品;Hep-2肿瘤细胞株,引自武汉病毒研究所。

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1995-02-23,修回日期:1995-06-16

1.2 实验方法

1.2.1 细胞样品制备.实验取用对数生长期的Hep-2肿瘤细胞,胰酶消化洗涤后调成浓度为 2×10^8 个/L的单细胞悬液。取细胞悬液和抗人HLA-A₂单克隆抗体溶液各50 μ l混匀,孵育, D-HBSS洗涤后加入50 μ l的胶体金溶液,将孵育、洗涤后所获的细胞悬液涂布于表面覆有一层Formvar膜的电镜栅网上,待细胞干燥后用95%的乙醇固定,用硝酸银染色法对已标记的胶体金进行银染放大后备用^[6]。

1.2.2 曝光及显影.采用甩胶法在洗净的玻片上均匀涂敷一层光刻胶,将携有细胞样品的电镜栅网反扣于光刻胶膜面上,使两者密贴并固定后置软X射线光源样品台上,开启光源曝光,曝光毕,揭下电镜栅网,将玻片浸入显影液(甲基异丁基甲酮:异丙醇=2:1, V/V)中,对曝光后的光刻胶进行显影,使细胞SXC“复型”得以显现。

1.2.3 复型的SEM放大观察^[6].在显影后的光刻胶表面先小角度(10° — 15°)真空斜蒸一层金,厚约5nm,继而垂直均匀蒸碳,厚25—30nm。SEM观察时,加速电压控制在10kV左右。

2 结果及讨论

图1是HLA-A₂抗原IGSS染色阳性Hep-2肿瘤细胞瑞氏染色后的光学显微镜照片。图中细胞表面的黑色颗粒为经IGSS染色后的细胞表面HLA-A₂抗原,其颗粒清晰易辨,因此,我们认为此标本的制备是成功的。

将免疫金银染色(IGSS)技术引入SXC中的最关键问题是细胞样品的制备。由于IGSS染色步骤很复杂且需要使用多种试剂,特别是有些有机试剂可对光刻胶产生明显影响,因此,样品直接制备法(即将细胞直接涂敷在光刻胶上)是不适合的。而采用间接法也十分困难,因为该法是将细胞涂敷在一层厚度仅为75nm左右的Formvar膜上,复杂的免疫细胞化学染色过程就是在这层膜上进行的,经过反复的实验摸索终于克服了这一困难。

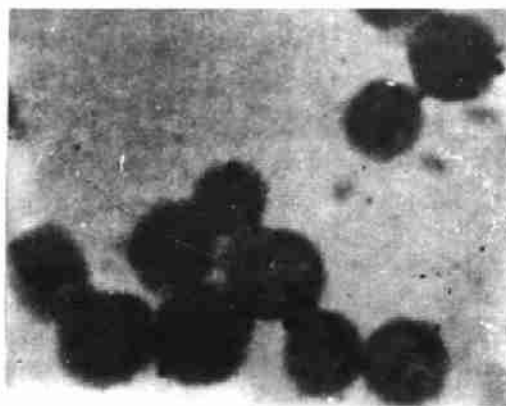


图1 位于电镜栅网上瑞氏染色后的Hep-2肿瘤细胞光学镜照片($\times 800$)

Fig.1 Wright's stained Hep-2 tumor cells on EM grid observed by light microscopy($\times 800$)

图2(a)清晰地显示出IGSS染色后Hep-2细胞SXC显微图像的特征,位于细胞膜上的免疫金银颗粒结构清楚,具有鲜明的图像衬底和显著的立体感。与图1相比较,图2(a)清晰地显示免疫金银颗粒间在大小和形态方面的差别,此外图中还可见较多的细胞细微结构,图2(b)为另一种肿瘤细胞IGSS染色后SXC复型SEM放大像,该细胞上所见到的免疫金银颗粒远较图2(a)为少。

根据上述结果,我们认为,进一步简化银染步骤而直接使用较大颗粒的胶体金试剂作为探针对特异性的生物大分子进行定位及分布研究是可能的。如果这一改进得以成功,则样品的制备将变得较为简单;由于银染而造成的本底增高将得以消除;对生物大分子进行定量研

究也随之成为可能。

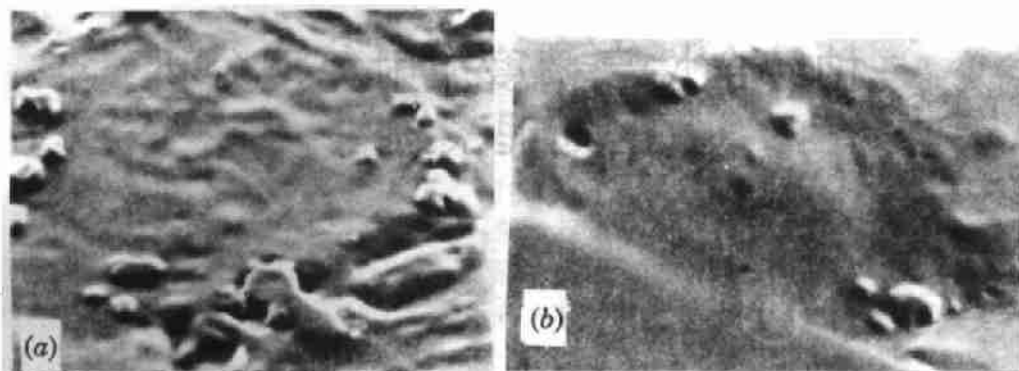


图3 IGSS染色后的两个Hep-2肿瘤细胞的软X射线接触显微图像的SEM放大像
(a) $\times 4700$, (b) $\times 5000$

Fig.3 Soft X-ray contact microimages of two Hep-2 tumor cells stained by IGSS and observed by SEM

参 考 文 献

- 1 Sayre D, Howells M, Kirz J, *et al* eds. X-ray Microscopy II. Berlin: Springer-Verlag, 1988:319
- 2 Shinohara K, Yada K, Kihara H, *et al*. X-ray Microscopy in Biology and Medicine. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1990:203
- 3 Sayre D, Howells M, Kirz J, *et al* eds. X-ray Microscopy II. Berlin: Springer-Verlag, 1988:356
- 4 蔡文琴, 王伯沅. 实用免疫细胞化学. 成都: 四川科学技术出版社, 1989:9
- 5 Waele MDM, Mey JDE, Renmans W, *et al*. J Histochem Cytochem, 1986; 34:1257
- 6 Cheng P C, Jan G J, eds. X-ray Microscopy. Berlin: Springer-Verlag, 1987:65

Observation of immunogold labelled tumor cell surface antigens by soft X-ray contact microscopy

Wei Daoyan Shen Hengjia

(Anhui Medical University, Hefei 230032)

Xu Wenxuan Tang Esheng

(Synchrotron Radiation National Laboratory, Institute of High Energy Physics,
Academia Sinica, Beijing 100039)

Abstract

After establishing the immuno-cytochemical staining technique of cell samples suitable for soft X-ray contact microscopy(SXCM), the HLA-A₂ surface antigens of cultured Hep-2 tumor cells were labelled by immunogold silver staining(IGSS) and detected by SXCM. The results reveal that the immunogold silver granules on the surface of Hep-2 tumor cells have sharp contrast and show stereo features, and the granules with different sizes and shapes can be clearly seen and easily identified.

Key words Soft X-ray contact microscopy, Tumor cell, Immunogold silver staining, Surface antigen