

應用光學與電子顯微鏡研究培養在金質網格片上游離的細胞

Cell Culture on Gold Grids For LM, TEM, And SEM Study

羅 時 成*

摘 要

觀察培養於金質網格片上的金魚 (*Carassius auratus L.*) 黃色色素細胞應用光學顯微鏡, 穿透和掃描電子顯微鏡並比較這三種工具在細胞學研究的優缺點, 並且介紹用高壓穿透電子顯微鏡研究細胞三度空間構造的方法。

前 言

自從 Harrison 於 1907 年第一次用培養液培養游離神經纖維細胞後, 培養游離細胞的技術不斷發展, 而且廣泛地成爲研究細胞的一種方法。(Wolf and Quimby, 1969)。培養游離細胞可以研究某種細胞單獨存在時的特性, 而且便於在光學顯微鏡下作各種實驗。電子顯微技術發展後, 許多有關游離細胞細微構造的報告陸續發表 (Wessells, *et. al.*, 1973; Chang and Goldman, 1973; Obika *et. al.*, 1978), 由於培養的游離細胞比普通組織細胞薄, 在準備作電子顯微觀察時所遭遇的困難較多; 再者電子顯微照片只提供細胞二度空間結構的資料, 於是 Porter (1975) 首先發展以高電壓 (1000 K. V.) 穿透式電子顯微鏡觀察整個細胞三度空間的結構。本實驗是更進一步探討應用光學與電子顯微鏡研究培養在金質網格片上的細胞。

材料及方法

金質網格片 (Grid) 之處理: 首先用濃硝酸處理 300 孔金質網 (Polyscience, Inc, Warrington, PA.) 一小時, 然後用蒸餾水沖洗數次, 或者用丙酮和酒精處理金質網效果一樣。將處理乾淨的金質網放在一片載玻片上 (10 × 10 mm), 然

後覆上一層 Formvar 薄膜, 經紫外光照射三十分鐘, 則可用來培養游離細胞。

培養游離的細胞: 每次實驗取用三至四隻七公分左右長的金黃色金魚 (*Carassius auratus L.*), 以攝子取下背部附近的鱗片置於 Hank 氏平衡液 (Gibco, Grand Island, New York) 內有 penicillin (100 I. U/ml) 和 Streptomycin (100 μ g/ml), 換洗三次後, 鱗片浸置於平衡液內含 0.5% Collagenase (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo.) 一小時, 然後以吸管輕微沖掉較鬆散的細胞, 將鱗片放置於含有低濃度 Collagenase 的培養液 (內含 80% 199 液和 20% 小牛血清) 隔夜, 以含 0.02% EDTA (ethylene diamine tetracetic acid) 和 0.25% Trypsin 的游離液游離附在鱗片上的細胞 (Winchester *et. al.*, 1976), 用離心試管收集游離細胞以 1000g 的離心速率將細胞沉積於試管底, 去除游離液, 細胞懸滴於培養液中, 然後培養在附有金質網格片的載玻片上, 在 20°C 的培養箱內培養二至四天。

細胞處理: 細胞長在金質網格片上後, 先用光學顯微鏡觀察並照相, 然後用 3% Glutaraldehyde 固定一小時, 經緩衝液沖洗三次後, 再用 1% 的鉻酸固定和染色十分鐘, 以蒸餾水沖洗三次後再用 5% 的 urayl acetate 染色十分鐘, 沖洗後讓細胞自

*本系系友, 現地址: Dept. of Biology, Wayne State University, Detroit, Michigan 48202.

然乾燥，以 Philip 201 在 80 K.V. 觀察，然後用真空蒸著機將金蒸著在細胞上再用 JEOL, JSM-2 掃描式電子顯微鏡觀察。

結 果

除了黃色色素細胞 (Xanthophore)，其他非色素細胞如表皮細胞 (epidermal cell)，纖維細胞 (fiberblast) 也同時在金質網格片上生長。圖一顯示一非色素細胞於穿透式電子顯微鏡下的結構，多數胞器集中在細胞核附近，而此處較厚無法分辨胞器詳細構造，較薄處，則可分辨 Stress fiber, microfilament 和 microtubules 的結構，甚至還可以知道 microtubule 的起始和長度。

黃色色素細胞的色素顆粒受腎上腺皮層刺激素 (ACTH) 的刺激而擴散 (Ozato, 1977)，圖二顯示一受 ACTH 刺激的黃色色素細胞，由於黑白照片，無法分辨色素顆粒的分佈，在光學顯微鏡下此細胞色素顆粒呈擴散狀，此細胞只有部分長在金質網格片上，故僅能看到部分細胞本體和樹狀的分枝。圖三是穿透電子顯微鏡下同—黃色色素細胞，色素顆粒為胡蘿蔔素清晰可見，或單獨存在或集成堆分佈於樹狀突內 (dendrite)。圖四是同一色素細胞在掃描式電子顯微鏡下的結構，細胞本體較厚處，就是穿透式電子顯微鏡下所見較黑的部分，樹狀突則有厚有薄，色素顆粒存在較厚之處。

討 論

光學顯微鏡的優點在於可觀察活的細胞，因此可觀察細胞的運動，胞器的運動及細胞生理的活動，但受解像力 (resolution power) 的限制，無法辨認微細的構造，穿透式電子顯微鏡是目前觀察細胞微細構造最好的工具，但準備工作較為繁瑣，掃描式電子顯微鏡的準備程序雖較簡單，但只能觀察細胞表面的特殊結構，此三種顯微鏡優缺點的比較可參考 Dayson (1974) 所著細胞學內的附錄。本實驗乃第一篇報導綜合這三種各有優缺點的工具來觀察同一種細胞。

整體細胞穿透電子顯微研究 [Whole mount transmission electron microscopy (WMTEM)] 是近年發展出的新技術 (Buckley and Porter, 1975) 其優點可免除包埋和切片的步驟，同時能

觀察胞器在細胞內的立體結構，(細胞同一位置以不同角度照兩張相，然後用立體放大鏡同時觀看這兩張相片，胞器即呈立體影像)，和“細胞骨骼” (Cytoskeleton, 包括 microfilaments 和 microtubules) 的分佈，起始長度 (見圖一; Celis *et. al.*, 1978; Osborn *et. al.*, 1978)。以負染色法還可觀察這些“細胞骨骼”的基本結構分子 (Kuczmarski and Rosenbaum, 1979) 和 microfilament 的形成 (Lo *et. al.*, 1979b)。

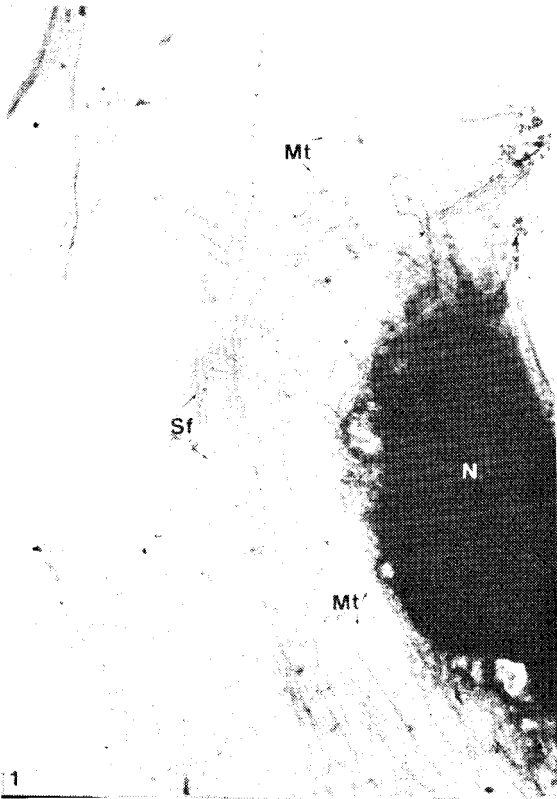
許多關於 WMTEM 的報告 (Buckley and Porter, 1975; Beyer and Porter, 1977; Kuczmarski and Rosenbaum, 1979) 均強調細胞須經絕對乾燥 (Critical dry) 處理，本實驗以自然乾燥法 (Air dry) 處理，所得結果亦不遜色，故無絕對乾燥器設備的實驗室可採用自然乾燥法。

以金質網格片培養細胞是因金不會產生任何毒素妨碍細胞生長，若金質網格片因經濟或運輸問題不易獲得，可將細胞培養在 Formvar 薄膜上，其準備法是將鑿有洞 (約兩公釐直徑) 的塑膠片覆上一層 Formvar (等水分乾燥後可見一層反光的 Formvar 薄膜覆著在孔上)，經紫外光滅菌則可作細胞培養，細胞生長並作完各種實驗後，將細胞固定，然後在緩衝液內以解剖針順著孔緣割破 Formvar，Formvar 薄膜則浮在液面，使 Formvar 薄膜張平後，以電子顯微銅網格片撈起經自然乾燥後則可用穿透式電子顯微鏡觀察，此法為 Buckley (1975) 所報導，成功率很高。

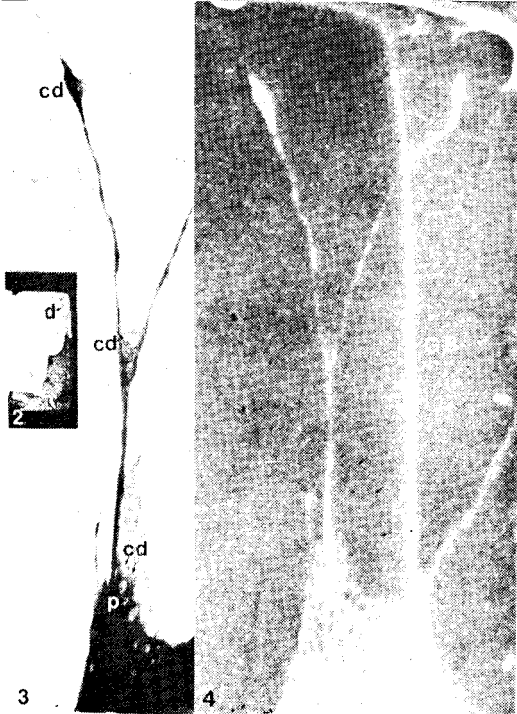
這類實驗一定要用培養的細胞，故無細胞培養設備的實驗室也許是一個問題，但不是一個很難克服的問題，只要有作普通微生物設備的實驗室都能作細胞培養，若連這基本設備都沒有，在游離和培養細胞時，就要特別注意桌面，器皿，工具等的完全消毒。

誌 謝

本實驗經費是由韋恩大學化學系教授鄭志清先生 (Tchen, T.T.) 的 Research Grants AM-5384 和 AM-13724 所提供。感謝鄭教授和 Dr. Taylor 給與研究的機會，場所和熱心的指導。



圖一 An non-pigment cell from the scale of xanthic goldfish shown in WMTEM, the most cellular inclusions are clustered in the nuclear region (N). Many microtubules (Mt) can be traced from one end to the cluster region. Stress fibers (Sf) and microfilament bundles are curved at the right upper region. 9200x.



圖二 A xanthophore from xanthic goldfish shows pigment dispersed with a light microscope, a dentrite (d) coming out from the cell body is shown in this micrograph. 1100x.

圖三 The same cell as fig. 2 shown in WMTEM, the cell body is too thick to be resolved, but pterinosomes(p), pigmentary organelles, can be distinguished. The second type of pigment, carotenoid droplets (cd) which are responsible to move, are either clustered or singularly located in the lamella and dendrites. 7100x.

圖四 The cell of fig. 2 in scanning electron micrograph shows a thicker cell body and various thickness portion of dendrite. Two dendrites growing on the grid bar (GB) are revealed by scanning electron microscope which are not seen with a light microscope or transmitted electron microscope. Compare to fig. 3, it reveals that carotenoid droplets are located in the thicker region of dendrite, the lamella is too thin to be seen in this micrograph (arrow heads). 7000x.

參考文獻

1. Beyer, H.R. and K.R. Porter. 1977. Transformation in the structure of the cytoplasmic ground substance in erythrophores during pigment aggregation and dispersion. *J. Cell Biol.* 75:541-558.
2. Buckley, I. K. 1975. Three dimensional fine structure of cultured cells: possible implication for subcellular motility. *Tissue and Cell.* 1:51-75.
3. Buckley, I.K. and K.R. Porter. 1975. Electron microscopy of critical point dried whole cultured cells. *J. Microsc. (Oxf).* 104:107-120.
4. Celis, J.E., Small, J. V., Andersen, P. and A. Celis. 1978. Microfilament bundles in cultured cells: correlation with anchorage independence and tumorigenicity in nude mice. *Exp. Cell Res.* 114:335-348.
5. Chang, C.M. and R.D. Goldman. 1973. The localization of actin-like fibers in cultured neuroblastoma cells as revealed by HMM binding. *J. Cell Biol.* 57:867-874.
6. Dayson, R.D. 1974. *Cell Biology: a molecular approach.* Allyn and Bacon Inc., Boston, London, Sydney.
7. Kuczmariski, E. R. and J. L. Rosenbaum. 1979. Studies on the organization and localization of actin and myosin in neurons. *J. Cell Biol.* 80:356-371.
8. Lo, S.J., Tchen, T.T. and J.D. Taylor. 1979a. ACTH-induced internalization of plasma membrane in xanthophores of the goldfish, *Carassius auratus* L. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 86:748-754.
9. Lo, S.J., Tchen, T.T. and J.D. Taylor. 1979b. In preparation.
10. Obika, M., Lo, S.J., Tchen, T.T. and J.D. Taylor. 1978. Ultrastructural demonstration of hormone-induced movement of carotenoid droplets and endoplasmic reticulum in xanthophores of the goldfish *Carassius auratus* L. *Cell and Tiss. Res.* 190:409-416.
11. Osborn, M., Webster, R.E. and K. Weber. 1978. Individual microtubules viewed by immunofluorescence and electron microscopy in the same PtK2 cell. *J. Cell Biol.* 77:R 27-R 34.
12. Ozato, K. 1977. ACTH adenylyl compounds and methylxanthines on goldfish erythrophores in culture. *Gen. Comp. Endocr.* 31:335-342.
13. Wessells, N.K., Spooner, B.S. and Luduena. 1973. Surface movement microfilaments and cell locomotion. In "Locomotion of Tissue cells". Ciba Foundation Symposium. Vol. 14, pp. 53-82. Associated Scientific Publishers, New York.
14. Winchester, J.D., Ngo, F., Tchen, T.T. and J.D. Taylor. 1976. Hormone-induced dispersion or aggregation of carotenoid-containing smooth endoplasmic reticulum in cultured xanthophores from the goldfish *Carassius auratus* L. *Endocrin. Res. Comm.* 3:335-342.
15. Wolf, K. and M.C. Quimby. 1969. Fish cell and tissue culture. In "Fish Physiology". pp. 253-305. Edited by Hoar, W.S. and D.J. Randall. Academic Press: New York.

ABSTRACT

Goldfish (*Carassius auratus* L.) xanthophores were cultured and grown on formvar coated gold mesh electron microscope grids or formvar nets. These methods enable the examination of individual cells by three types of microscopy: 1) high resolution light microscopy, 2) transmitted electron microscopy, 3) scanning electron microscopy. The advantages and disadvantages of whole mount preparation for use in cell biology are discussed.