

技术与方法

三种常用染液对胞外囊泡的负染效果评价

仲为国¹ 王富强² 王自彬^{2*}¹南京医科大学资产管理处, 南京 211166; ²南京医科大学分析测试中心, 南京 211166)

摘要 该研究对磷钨酸、钼酸铵和醋酸双氧铀三种染液对胞外囊泡负染的效果进行了对比。结果发现, 醋酸双氧铀染液具有最佳的染色效果, 其他两种次之。结果还发现了三种不同类型的囊泡结构。

关键词 胞外囊泡; 外泌体; 透射电镜; 负染

The Evaluation of Negative Stain of Extracellular Vesicles with Three Types of Dye Liquor

Zhong Weiguo¹, Wang Fuqiang², Wang Zibin^{2*}¹Assets Management Department of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;²Analytical and Testing Center of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract The phosphotungstic acid, ammonium molybdate and uranyl acetate were employed as the dye liquor, in comparison the negative stain of extracellular vesicles. The result showed that the uranyl acetate provides far great clarity than the other two dye liquor, and we also found three types of extracellular vesicles.

Keywords extracellular vesicles; exosomes; transmission electron microcopy; negative stain

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是在细胞膜上生成并以出芽的方式分泌到细胞外的磷脂双分子层包裹的小囊泡, 直径30 nm至数微米, 其内包含蛋白质、脂类、DNA和RNA等多种成分, 起到与附近及远距离细胞通讯的作用^[1-2]。外泌体(exosomes)是一种直径小于150 nm的EVs, 而采用经典的超速离心加0.22 μm滤膜过滤提取外体的方法, 得到的其实是一些小EVs的混合物^[3-4]。对提取的外泌体进行形态鉴定的经典方法是负染后进行透射电镜观察, 该方法具有简便快捷的优点。常用负染染液有多种, 每种染液都具有不同染色的特性。本研

究针对常用的三种电镜负染染液对EVs的负染效果进行了对比, 期望能取得最佳EVs负染方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 EVs来源 采用差速离心方法提取的肺癌细胞(A549)培养液上清胞外囊泡, 用2%多聚甲醛溶解沉淀, 4 °C保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 磷钨酸和钼酸铵购于国药集团化学试剂有限公司; 醋酸双氧铀购于德国默克公司; 透射电镜(型号: TECNAI Spirit BioTWIN)购于美国FEI公司。

1.2 方法

采用漂浮法进行EVs附着铜网的制备及后续的染色步骤(图1)。操作如下: (1)吸取50 μL EVs悬液标本滴在封口膜上, 将铜网有膜面置于液滴上, 静置20 min, 滤纸吸去残液; (2)PBS漂洗5 min; (3)1%戊二醛固定5 min; (4)ddH₂O漂洗8次, 每次2 min; (5)分别

收稿日期: 2017-08-01 接受日期: 2017-08-29

南京医科大学科技发展基金(批准号: 2015NJMUZD008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-86869343-830, E-mail: wzb0909@126.com

Received: August 1, 2017 Accepted: August 29, 2017

This work was supported by the Science and Technology Foundation of Nanjing Medical University (Grant No.2015NJMUZD008)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86869343-830, E-mail: wzb0909@126.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:15:56

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1715.004.html>

用不同染液负染2 min, 滤纸吸去残液; (6)室温干燥铜网, 透射电镜观察。

2 结果

2.1 磷钨酸负染

在透射电镜下可以观察到典型的囊泡结构, 直径30~100 nm。一种为单层膜结构的囊泡, 具有一定的立体结构, 囊泡表面有轻微凹陷, 呈现杯底状(图2

箭头1所示); 另一种为具有双层膜结构的囊泡, 立体结构不明显(图2箭头2所示)。此外, 染色背景具有很多不规则颗粒, 成分不明。

2.2 醋酸双氧铀负染

在透射电镜下可以观察到典型的囊泡结构, 直径20~100 nm。可以观察到三种形态各异的囊泡, 一种为单层膜结构的囊泡, 具有一定的立体结构, 囊泡表面或者光滑呈球形, 或者皱缩呈现梅干状(图3箭

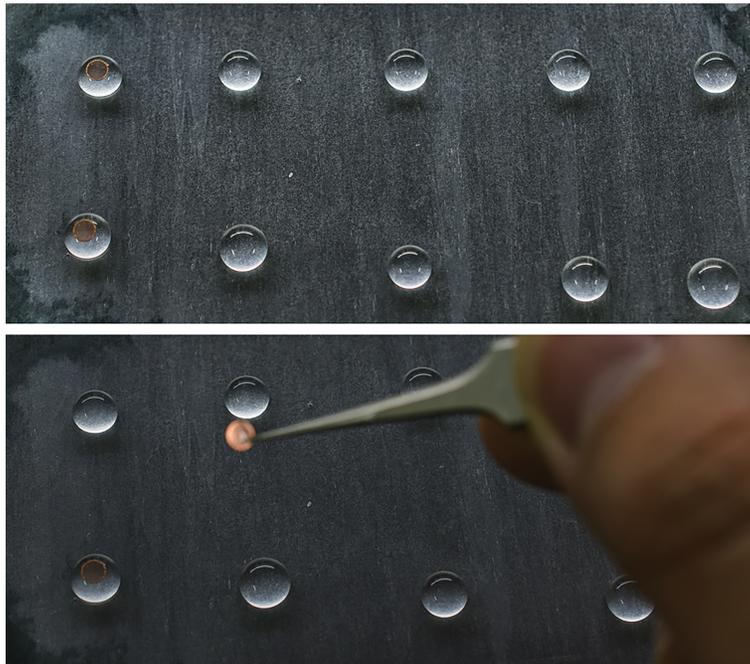
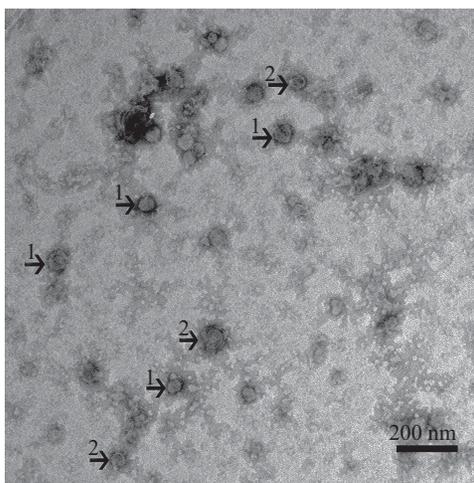


图1 采用漂浮法进行漂洗染色

Fig.1 Floating method was used to rinse and dye

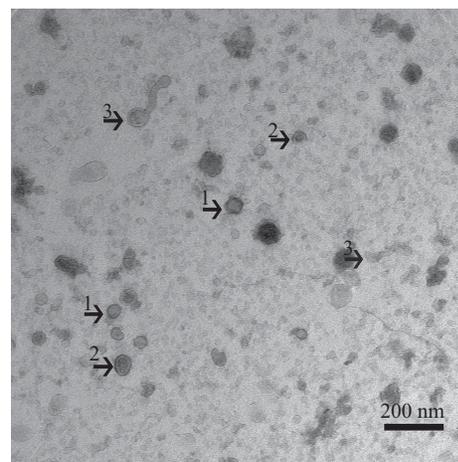


箭头1所示为单层膜囊泡, 箭头2所示为双层膜囊泡。

Arrows 1: monolayer vesicles; arrows 2: bilayer vesicles.

图2 磷钨酸负染EVs

Fig.2 The extracellular vesicles stained by phosphotungstic acid

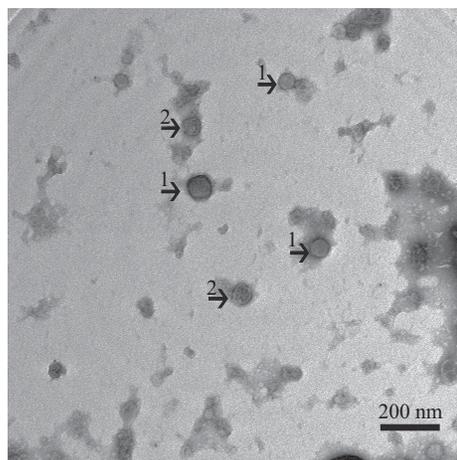


箭头1所示为单层膜囊泡; 箭头2所示为双层膜囊泡; 箭头3所示为管状囊泡。

Arrows 1: monolayer vesicles; arrows 2: bilayer vesicles; arrows 3: tubular vesicles.

图3 醋酸双氧铀负染EVs

Fig.3 The extracellular vesicles stained by uranyl acetate



箭头1所示为单层膜囊泡; 箭头2所示为双层膜囊泡。

Arrows 1: monolayer vesicles; arrows 2: bilayer vesicles.

图4 钼酸铵负染EVs

Fig.4 The extracellular vesicles stained by ammonium molybdate

头1所示); 另一种为具有双层膜结构的囊泡, 立体结构不明显(图3箭头2所示); 第三种为管状囊泡, 可以为单独存在的单层膜管状囊泡, 也观察到由双层膜囊泡突出的单层膜结构管状囊泡(图3箭头3所示)。背景可见诸多直径小于30 nm的单层膜囊泡, 形态不规则, 推测可能也是细胞分泌的小囊泡。

2.3 钼酸铵负染

在透射电镜下可以观察到典型的囊泡结构, 直径30~100 nm。一种为单层膜结构的囊泡, 具有一定的立体结构, 囊泡表面光滑呈球形(图4箭头1所示); 另一种为具有双层膜结构的囊泡, 立体结构不明显(图4箭头2所示)。此外, 染色背景尚可, 也具有很多不规则颗粒, 成分不明。

3 讨论

经过差速离心法或试剂盒法提取的外泌体, 其实是细胞外的总囊泡, 包含多种成分, 如各种类型的囊泡、蛋白质、脂类等。对外泌体进行形态鉴定的最可靠方法就是负染后透射电镜观察, 在电镜下找到符合外泌体形态特征的囊泡。负染色是利用高密度的重金属盐把微小的生物标本包围起来, 在黑暗的背景上, 样品的微细结构呈现阴性反差。一般要求染色剂具有较高的电子密度, 化学稳定性好, 与样品不发生化学反应^[5]。本研究选取磷钨酸、醋酸双氧铀和钼酸铵三种负染染液进行EVs的负染效果对比, 发现三种染液都能获得较好的染色效果, 但有所区别。磷钨酸是电镜形态学研究最常用的负染液,

具有配制简便、易存储的特点, 是病毒、细菌等负染最常用染液。但是经过笔者的试验发现, 磷钨酸染液对EVs负染效果相对较差, 染液在囊泡膜周围易聚集, 在电镜下观察发现, 囊泡边缘电子密度较高, 颗粒感明显。醋酸双氧铀的染色效果最佳, 能在电镜下分辨出三种典型的囊泡结构, 且囊泡形态结构清晰, 染色背景干净, 但是醋酸双氧铀染液见光易分解, 需要现用现配, 具有一定的放射性, 且试剂价格昂贵, 有条件实验室可选用。钼酸铵染液效果与磷钨酸类似, 但是对囊泡膜结构边缘染色更为清楚锐利。经过前期试验我们发现, 采用钼酸铵染液作为EVs负染的常用染液, 其具有易存储、毒性相对较低、试剂价格低的优势。对于本研究采用的染液浓度是经过多次试验得出的最合适浓度, 若期望获得良好的负染染色效果, 还需经过多次的试验确定最佳流程, 掌握染色的手法技巧。此外, 本研究采用的EVs经过2%多聚甲醛固定, 由于各电镜中心都需要预约排队才能开展实验, 新鲜提取的EVs经过固定后, 4 °C保存一周后仍具有良好形态, 避免了反复冻融对囊泡形态造成影响。

最新研究表明, 细胞EVs有多种类型, 形态具有多样性, 可分为不同亚型^[6]。本研究发现了三种不同类型的囊泡: 单层膜囊泡、双层膜囊泡和管状囊泡, 另有多种囊泡结构有待进一步明确其性质与成分。

参考文献 (References)

- Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306(7): C621-33.
- Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3. 22.
- Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell* 2016; 164(6): 1226-32.
- 武忠弼, 周晓军. 超微病理诊断学. 上海: 上海科学技术出版社 (Wu Zhongbi, Zhou Xiaojun. *Ultrastructural pathology*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers) 2003, 53-8.
- Zabeo D, Cvjetkovic A, Lasser C, Schorb M, Lotvall J, Hoog JL. Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *J Extracell Vesicles* 2017; 6(1): 1329476.