在细胞学方面，由于超薄切片法的出现和发展，人们利用电镜对细胞进行了更深入的研究。看到了整个细胞由管状和膜状结构的细胞器与多孔的核膜与细胞膜相互沟通。并进一步搞清了它们的结构与功能的关系。利用电镜还对细胞器(例如线粒体)的精细结构进行了研究(图3)。

电镜在发现和认识病毒方面起了很重要的作用。许多病毒，尤其是肿瘤病毒就是用电镜发现的。

在病理学方面，特别是关于肿瘤方面，利用电镜观察细胞的转化，最近几年从分子水平上对细胞转化的机制进行了研究。尤其是利用电镜观察受各种不同辐射剂量照射引起的变化，为辐射防护提供依据，保证人民健康，这将促进原子能事业更快发展(图4)。

在分子生物学中，利用电镜研究酶蛋白质的机能与其分子结构的关系和蛋白质合成的机制等。利用电镜还观察到正在进行转录和翻译过程的基因片段，直观地从分子水平上研究遗传的问题[4]。可以预期，电镜将是解释生命之谜的重要工具之一。

参考文献

[1] H. Hashimoto, A. Ono: *Jeol News*, **90**, 3, 1971.

[2] A. V. Crewe, J. Langmore, J. Wall and M. Beer: *28th EMSA*, p. 250.

[3] J. Wall and J. Langmore: *28th EMSA*, p. 252.

[4] O. L. Miller, *Scientific American* 1973, **228**, 3, p. 34—42.

电镜上的生物样品制备技术

中国科学院生物物理所电镜组

电子显微镜为我们提供了很高的分辨本领，使我们能观察到生物样品的超微结构，丰富了人们对微观世界的认识，推动了生物学从细胞水平发展到分子水平。

生物超微结构研究的新成就，是跟样品制备技术的不断提高和逐步完善分不开的。但目前已有的样品制备技术还远不能充分利用电镜本身的巨大发展，例如，目前用超薄切片法只能得到25 Å 左右的分辨率，跟电镜在技术上早已达到的2—3 Å 的分辨本领相比，尚有相当大的差距。这个差距本身对我们隐蔽着许多的结构细节，同时也说明我们不能满足于现有的制备方法。

电镜上的生物样品制备方法很多，其中以超薄切片法应用最普遍，可以说是一种基本的方法。简要说来，它可分为固定、包埋、切片和染色四个环节。

固定 目的是把细胞的生活状态保存下来，并获得一定的电子反差。自从 Sjöstran 等人发现锇酸所固定的生物材料宜于作电镜观察以来，锇酸就成了最常用的固定剂。它的优点是使样品获得较好的反差，但渗透极慢，因此固定时必须把组织块切得很小(小于1毫米^3)。戊二醛是一种渗透快、保存好的固定剂，缺点是固定后反差不好。目前普遍采用双重固定，即二者并用。

包埋 最初使用的包埋剂是 Newman、Borysko 和 Swedlow 发现的甲基丙烯酸脂(即有机玻璃原料)。但由于它聚合后形成长线状的大分子聚合物，聚合时伴随着不均一的收缩，体积损失20%左右，使样品造成了严重的人工损伤，并且在受到电子束轰击时易于升华，造成组织进一步破坏，同时污染了电镜。所以它已被环氧树脂所代替。环氧树脂的聚合体比较稳

定，在电子束轰击下不升华。聚合物是一种网状骨架的大分子，呈三度空间结构，体积变化小于5%，因而对样品不易造成人工损伤。

使用环氧树脂包埋时，必须注意防潮和彻底脱水。现在国内用国产环氧树脂618#来作包埋剂，国外常用的环氧树脂包埋剂有Epon 812、Araldite 和 Westopol W 等。

切片 现在多用玻璃刀，也有用钻石刀的。刀口的好坏是很重要的，因此必须严格地进行检查。

近年来又发展了冰冻超薄切片技术。它是用液氮把组织块和切片刀都冷却到 −50°—−140℃ 左右，在这种条件下切片。新鲜组织在用2.5%的戊二醛固定15—60分钟后即可进行冰冻切片。这种技术是为了满足细胞化学方面研究的需要。它不象通常超薄切片技术那么复杂，另一方面不需要脱水，因而使许多水溶性的细胞内容物得以保留。这对细胞化学研究是必不可少的。但是由于这种技术发展不久，不够完善，有许多问题尚待解决。

染色 目前常用的切片染色法是醋酸铀与铅盐的二重染色，这样能获得较好的反差。采用铅染时，要注意防止染色液与空气中的二氧化碳接触而产生碳酸铅沉淀，一般是采用氮气室。简单的方法是在染色皿内放置一些片状氢氧化钠来吸收空气中的二氧化碳，染色完毕后，再用低浓度的氢氧化钠溶液及蒸馏水冲洗。

阴性反差染色（负染色），是利用高密度的金属物质把生物标本包埋起来，使之与样品形成密度差别，从而突出样品的反差。一般多用磷钨酸和硅钨酸，具体操作方法很多，但无论使用哪一种方法，要得到理想的结果，都必须做多次预备实验。使用这种方法对悬浮的微小物体如病毒、离体的细胞器、原纤维等，都有较好的效果，这种方法在蛋白质分子的研究上也是很重要的。

还有同位素自显影技术，它是把标记同位素的生物样品，按常规超薄切片法制成超薄切片。在暗室内把切片盖上薄薄的一层核子乳胶，曝光（自显影）数星期，在此期间，样品内的同位素颗粒所发射的β射线使乳胶膜上溴化银颗粒感光，然后将切片经显影和定影处理，未曝光的溴化银颗粒被溶掉而留下感光的颗粒。这样，就可以在电镜下识别出标记的物质在细胞内的部位，这种方法已用在研究蛋白质合成机制上。

最近几年，在原有的真空喷镀技术、表面复型技术和超薄切片技术的基础上，又发展了一种冰冻蚀刻技术。简单地说，就是切断冻结的材料，作其切面的一级复型进行观察。具体可以分为以下五个步骤：（1）冰冻 将生物材料急速地(−100℃/秒)深度冻结，这能保持生物活性；（2）切割 将冻结的材料用冷刀（−100℃以上）切断，使其露出新鲜材料；（3）蚀刻 使切面的冰升华；（4）投影 将铂及碳蒸发到切面上，做复型；（5）剥离 把复型膜剥离开来。具体作法是将样品从真空中取出，在蒸馏水中（35℃—40℃）剥离出膜，将膜放在70%的H_2SO_4中数小时（3—4小时）将样品溶解，再进一步用蒸馏水洗膜几次，凉干后进行观察。

这种方法的优点是能获得其他方法所不能获得的微细结构。例如：用这种方法能看到双层膜之间的结构、细胞核孔的立体结构、核浆和线粒体膜的详细情况，甚至可以鉴别出病毒格子结构里的单个蛋白质分子。

冰冻蚀刻技术还存在着一定缺点，因喷镀的粒子较粗，采用这种方法时分辨力受到限制，但随着科学技术的发展，设备的改进、真空度的提高，这种限制终究会被打破的。

电镜上的生物样品制备方法还很多，例如表面复型法、投影法、细胞化学法、抗原抗体法、冰冻干燥法等等，这里就不一一介绍了。

近年来，人们试图利用高分辨率电镜看蛋白质分子的超微结构，虽然作了许多努力，但还没有找到令人满意的方法。现在多采用负染、投影等做多方面观察，也都不是很理想。可以相信，今后将会找出观察蛋白质分子自然状态的有效方法。