我认为，除肿瘤、炎症、衰老、放射病外，还有许多重要生命现象都值得从活性氧的作用方面来进行研究。

参 考 文 献

[1] 诸岡良彦：呼吸と循環，24(9)，765—770，1976.
[2] 浅田浩二：生化学，48(4)，226—257，1976.
[3] Jeffrey Bland: *J. Chem. Educ.*, 53(5), 274—279, 1976.
[4] Jeffrey Bland: *J. Chem. Educ.*, 55(3), 151—157, 1978.
[5] Турков: М. Н. Успехи современной Биологии, 81 (3), 341—354, 1976.
[6] 浅田浩二：蛋白质核酸酵素，23，(3)，200—213，1978.
[7] Beauchamp C. and Fridorich I.: *J. Biol. Chem.*, 245(18), 4641—4646, 1970.
[8] Repine, J. E. et al.,: *J. Clin. Invest.*, 64(6), 1642—1651, 1979.
[9] Rosen, H. and Klebanoff S. J.: *J. Clin. Invest.*, 64(6), 1725—1727, 1979.
[10] 八木国夫等：最新医学，33(4)，653—740，1978.
[11] Pain, A. J.: *Biochem. Pharm.*, 27, 1805—1813, 1978.
[12] Yoshihiko Ōyanaqui: *Biochem. Pharm.*, 27, 771—782, 1978.
[13] Panqanamala, Rao V. et al.: *Prostaglandins*, 17 (2), 155, 1979.

[本文于 1980 年 6 月 5 日收到]

冰冻断裂和冰冻刻蚀技术

鲁崎唔　吴玉薇　傅广礼

（中国科学院生物物理所电镜组）

一、技术特点及发展概况

冰冻断裂和冰冻刻蚀*统称为冰冻复型技术，是电子显微镜常规样品制备技术之一。所谓冰冻断裂就是将生物样品快速冰冻后施一外力，使其发生断裂，再于低温下，在样品的断裂面上制成复型，用透射电镜观察；如果样品断裂后，先使其断裂面上的冰部分升华，再制成复型作电镜观察，这就是冰冻刻蚀。

在冰冻复型技术中，由于无须象超薄切片技术那样对样品作剧烈的化学固定、脱水、渗透，包埋以及染色等处理，因此，它所提供的生物超微结构图象可以更接近于活体时的状态；更重要的是，能够直观地揭示出生物膜平面的内部结构，从而为生物膜的研究提供新信息。

电镜冰冻复型技术早在五十年代初期已经出现；1957 年被首次成功地应用于生物材料的研究中，1961年第一台商品冰冻刻蚀仪问世。但是，这项技术在一段较长时期内并未引起生物学家们的足够重视。直到六十年代中期以后，在一场有关冰冻复型结果解释的争论中，搞清了生物膜结构的冰冻断裂机制，这才使得生物学家们认识到这项技术的独特作用。同时，由于双复型技术[1]的出现以及电子束投影，旋转投影、放射自显影、立体对电镜术、超高真空等技术在冰冻复型技术中的应用，而使得该项技术更趋完善。

二、原理和方法

冰冻复型技术包括样品的冰冻、断裂、刻蚀、复型制备和清洗几个步骤（图 1）。

1. 生物样品的冰冻

冰冻，即将小量生物样品骤然浸入一种液态冷冻介质中使之固定。样品冰冻固定的好坏是整个技术成败的关键。理想的冰冻固定标准应该是样品中的水分不生成冰晶，而达到所谓“玻璃化”状态。但实际上完全的“玻璃化”几乎是不可能的。从形态学角度来讲，只要冰冻时样品中形成的冰晶小到不足以干扰对样品超微结构的观察即可。一些作者认为，要达到上述目的，

* Freeze-etching 亦译作冰冻蚀刻或冷冻蚀刻。

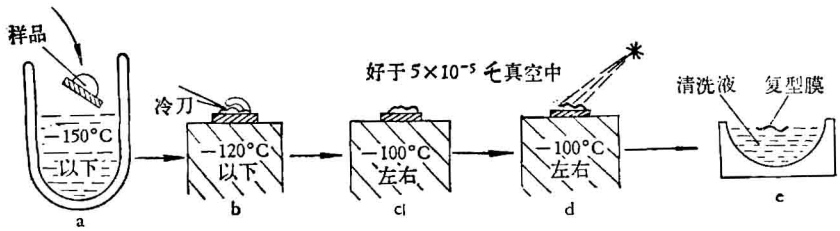


图1 冰冻复型技术实验步骤示意

需在0.01秒以内使样品温度由其冰点下降到重结晶点以下。常压下，生物样品的冰点为−2℃——5℃，重结晶点为−70℃以上。因此，前述条件的冷却速度，大约相当于10^3—10^4℃/秒。

为使样品温度迅速地由其冰点降至重结晶点以下，通常可采用下述措施：

1）用冰冻保护剂对样品进行预处理　某些物质在一定条件下渗入细胞后，可以在不引起细胞结构发生明显变化的前提下降低生物样品的冰点或升高其重结晶点，或既降低其冰点又提高其重结晶点。也就是说，渗入这类物质可以减小生物样品上述两个临界点间的温差。这样，当样品被冰冻时就能缩短其温度由冰点降至重结晶点以下所用的时间，达到防止形成大冰晶的效果。这类物质称为冰冻保护剂。实验表明，一些样品在经过冰冻保护剂处理后，只要冷却速度在10—100℃/秒，便很容易获得1毫米厚的样品"玻璃化"层。

常用的冰冻保护剂是20—30%的等渗甘油溶液。用法是将新鲜样品切成约1×1×3毫米³，置于甘油溶液中渗透后，再进行冰冻。动物样品的渗透时间为一小时至数小时，植物样品则为一至数天。

除甘油外，蔗糖、二甲亚砜、乙烯基乙二醇等也可起到冰冻保护作用。

2）在液态氦作冷冻剂　由于液氦的温度约为2°K，与样品间的温差极大，故当样品投入其中时，二者的热交换速度很高，从而达到快速冰冻的效果。

3）高压冰冻法　水的压力—温度相图表明，压力增高时水的冰点降低。根据这一原理，H. Moor 设计了一种高压冰冻装置，可使样品在2,000巴左右的高压下被冰冻。此时，纯水的冰点降至−22℃，晶核形成及冰晶生长速度均大为降低，仅以10^2℃/秒的冷却速度便可在样品中获得0.2—0.3毫米厚的"无冰晶"区。不过，在这种条件下细胞的高压致死效应所引起的超微结构的改变，尚有待于研究。

4）喷雾冰冻法　L. Backmann 用喷雾器将悬浮液样品以10μ数量级的小滴形式喷射到冷冻介质中。此时，样品的冷却速度可高达10^5℃/秒。

5）中间冰冻介质的应用　液氮是一种常用的冷冻介质。但由于其沸点（−196℃）较低，当样品投入后发生剧烈的沸腾，在样品周围产生绝热的气泡层，降低了样品的冷却速度。因此，多数作者已不采用将样品直接投入液氮的冰冻方法，而是先将一种"中间冷冻介质"用液氮冷却固化，再使其温度逐渐回升；当中间介质开始融化时，将样品投入其中冰冻固定，然后，再将样品转移至液氮中进一步冰冻和保存。中间冷冻介质应具有热容量大、热导性好、冰点低，沸点高等性质；常用的有液态丙烷、丙烯、异戊烷以及佛里昂22和佛里昂12等。

生物材料的热导性差，因此，不论采用何种冰冻固定方法，都是越接近样品表面的区域"玻璃化"程度（即细胞结构保存程度）越好。

2.生物膜的冰冻断裂机制

断裂的目的是为了暴露样品的结构。一般作法是先将冰冻固定的样品转入真空镀膜机中的冷冻台上，（维持在−120℃以下）抽真空，待真空度达到最佳状态（起码好于5×10^{-5}毫米汞柱）时，用冷刀（其温度不高于样品温度）削去冰冻样品浅层部分，产生一断裂面。需要指出的是，断裂过程实际上并非沿着刀刃通过的地方，而是在刀刃到达的前方沿着结构薄弱的

途径发生"碎裂"。因此，在微观上，断裂面不是光滑的平面，而是象浮雕似的反映出细胞结构的凹凸不平的面。对这一断裂面制成复型进行镜检，便可得到样品的三维结构信息。

细胞是个膜系统。在正染色的超薄切片图象上我们看到总宽度为75—100Å的两条黑线，及其间隙构成的质膜、核膜、线粒体膜和内质网膜等所谓生物膜结构的断面图。此外，在冰冻复型图象中，还能看到它们的平面图（图2，见封三）。这个膜平面是脂质双层膜的哪一个平面呢？也就是说冰冻断裂是沿着生物膜结构什么途径发生的呢？搞清楚这个问题对于生物膜结构与功能的研究有着重要的意义。

起初，以H. Moor为代表的一部分人认为：断裂面是沿着双分子膜的极性端与其相邻的介质之间发生的，也就是说，冰冻断裂的结果暴露了生物膜的自然内表面或自然外表面（图3a. b）。

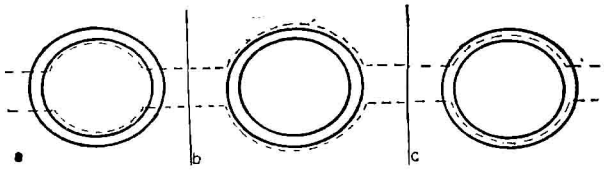


图3 生物膜冰冻断裂机制示意图

D. Branton等人则提出，在多数情况下断裂面是沿着生物膜双分子层内部的疏水区将膜本身一分为二的，即冰冻断裂揭示了生物膜双分子层中间的内部平面结构（图3c）。

为了证实上述观点，D. Deamer和D. Branton[2] 首先利用C^{14}标记的人造硬脂酸双层膜和层膜系统进行冰冻断裂实验，结果表明，断裂是沿着双分子层中间的疏水区发生的。

接着Pinto da Silua和D. Branton[3] 又利用一种双功能有机试剂将铁蛋白标记在红细胞膜上，再对这种红细胞膜分别作超薄切片和冰冻复型观察。由于铁蛋白核中的铁元素具有使电子发生散射的特性，因而在超薄切片上可以看到铁蛋白是被标记在红细胞膜表面上的，在冰冻复型的断裂面上，看不到标记铁蛋白，而在经过刻蚀后出现的那个平面上又清楚地看到了直径约120Å的铁蛋白颗粒（图4a. b；见封三）。因此，他们的结论是：冰冻断裂一般是沿着膜的双分子层中间的疏水区产生的，而刻蚀过程则揭示了生物膜的自然表面。

这种膜撕裂理论已得到普遍承认。

3. 刻蚀的作用和条件

刻蚀实际上是个冰冻干燥过程。即在高真空中使断裂的冰冻样品升温至该气压下冰的升华温度，并在此温度下停留数十秒至数分钟，使样品断裂面上的冰部分升华。

刻蚀的作用有二：一是增强样品图象的立体感；二是暴露出样品断裂面上仍被冰覆盖着的某些结构。

真空度为1×10^{-5}毫米汞柱时，刻蚀温度为−100℃左右。此时，每秒钟约有20Å厚的冰从样品断裂面上升华；同时，由于气体分子的碰撞作用，也有部分升华的水分子会重新凝聚在样品断裂面上造成污染。因此，在刻蚀过程中有必要在样品周围创造一冷阱环境，以便将升华后的水分子全部或大部捕获。

4. 复型的制备

刻蚀过程完成后，立即以45°角对样品断裂面蒸发约数十Å厚的金属层（通常为铂），再以90°角蒸发100—200Å厚的碳作支持层。这样，在样品断裂面上便形成一张反映出样品结构的铂-碳复型。复型经过清洗处理，便可捞至铜网上作镜检之用。

复型制备中需注意下述问题：

1）铂蒸发方式　冰冻复型上铂粒子的粗细决定了此项技术的分辨本领。为了减小铂粒度，通常采用铂与碳混合蒸发的方法。即将一段6—7厘米长、0.1毫米粗的铂丝缠绕在一支光谱纯碳棒的尖端，这一端与另一支碳棒的一端相配作成一铂蒸发源。在高真空下以45°角将上述全部铂丝及少量碳蒸发至样品断裂面上。采用这种混合蒸发法，在真空度好于1×10^{-5}毫米汞柱时，复型上的铂粒度可细达20—30埃（Å）。

2）蒸发源与样品间的距离及铂蒸发时间　铂蒸发时蒸发源尖端的局部温度高达

2,000℃左右。如此强烈的热辐射有可能破坏样品结构，最终在图象上出现卵石状的“微熔”现象。为了避免这一情况，铂蒸发源与样品间距一般要保持在11—14厘米；同时，整个铂蒸发过程应在数秒钟内完成。

3）复型的清洗　两次蒸发过程完成后打开钟罩，将铂-碳复型及粘在其下的样品置于清洗液中，以便将样品“溶掉”。复型的这一清洗实际上是对残留样品的氧化过程，因此，有多种强氧化剂可作为清洗液。常用者有6%的次氯酸钠溶液，70%的硫酸以及40%的铬酸等。也有人用酶溶液作清洗液。复型清洗所需的时间视样品及清洗液不同而异，可能为数十分钟至数天。

三、冰冻复型中生物膜面图象的基本解释

各种生物膜的主要成份是脂类、蛋白质以及少量糖类。在冰冻复型图象上显示的生物膜面上一般总是在光滑的底面上分布着40—200Å大小的颗粒。那么，这个光滑的底面和那些小颗粒各代表哪类物质呢？

D. Branton[4] 等人发现，无论是饱和还是不饱和脂肪酸，或者是带有不同极性集团的磷脂所构成的人工膜，它们的冰冻复型图象上均只显示出光滑的面；同时，水解程度及其他成份（如胆固醇）的混入，并不改变磷脂片层的冰冻复型的图象。因此他们认为，图象上的光滑底面代表膜中的脂类物质。

有人[4]用链霉蛋白酶来处理红细胞膜。在测定这种红细胞膜蛋白含量变化的同时，观察其冰冻断裂图象。他们发现，当红细胞膜上70%的蛋白质被酶解时，膜上的小颗粒几乎全部消失。由此判断，红细胞膜冰冻断裂面上的小颗粒是蛋白质。但也有人发现[5]，只有使用一种能够分解脂-蛋白复合物的试剂处理红细胞膜时，其冰冻复型图象上的小颗粒才全部消失；这些人还发现，尽管再生支原体膜中含有天然支原体膜的全部脂类和85%的蛋白质，而后者的冰冻复型图象上分布着许多小颗粒，前者则是光滑的。因此他们认为，膜上的小颗粒不是单纯的蛋白质，而是蛋白质与脂类的复合物。

目前，虽然对大多数生物膜的结构尚不完全清楚，但在膜的冰冻复型图象上所看到的颗粒物代表蛋白质功能团，这一点则是公认的。

四、冰冻复型技术所揭示的生物膜面的几种命名方法

如前所述，冰冻断裂时生物膜沿着其双分子层中间的疏水区被撕开，从而可以揭示出双层膜中间的两个平面；经过刻蚀又可以揭示出膜的部分自然外表面和部分自然内表面。为叙述方便起见，文献中常用下面几套符号来标示冰冻复型图象中所看到的上述四个生物膜面。以往常见的命名法是采用 A、B、C、D 四个字母（图5）。其中，A面代表贴近细胞质的断裂面。对细胞质膜而言，就好象我们站在质膜双层中间面对着细胞内所看到的那个膜面，对细胞器膜而言，就好象我们站在细胞器膜双层中间面对着细胞器外时所看到的那个面，**B**面代表不贴近细胞质的断裂面。**C**面代表质膜的自然内表面或细胞器膜的自然外表面；**D**面代表质膜的自然外表面或细胞器膜的自然内表面。

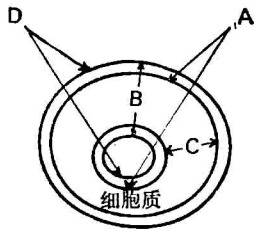


图5　A、B、C、D命名法示意图

在多数情况下**A**面上总是较密地分布着平均直径约85Å的小颗粒，而在B面上这种颗粒则显著减少。因此，也有人根据这种颗粒分布的多寡将**A**面称作（+）面，将B面称作（−）面。

有些作者则用 $\hat{F}$、$\underline{F}$ 和 $\hat{E}$、$\underline{E}$ 四个字母来分别表示生物膜的两个断裂面和两个刻蚀面（图6）。

为了统一生物膜面的标识符号，Branton、Moor 和 Bullivant 等人于1975年共同商定了

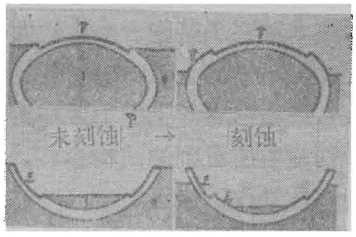


图6 E, F 命名法示意图

一套用 P、E 和 F、S 四个字母的命名法(图 7)。根据这一规定，每个膜面用两个字母表示。第一个字母为 P 或 E，表明其是否贴近细胞质，第二个字母为 F 或S，表明其是断裂面还是自然表面（即刻蚀面)。例如，PF 面代表贴近细胞质的断裂面（即 A 面)；而EF面则代表不贴近细胞质的断裂面（即 B 面)；而 PS 面和 ES 面则分别和 C 面及 D 面的意义相同。在未经刻蚀的图象上只需用两个字母 P 和 E 来标明生物膜的两个断裂面便可。

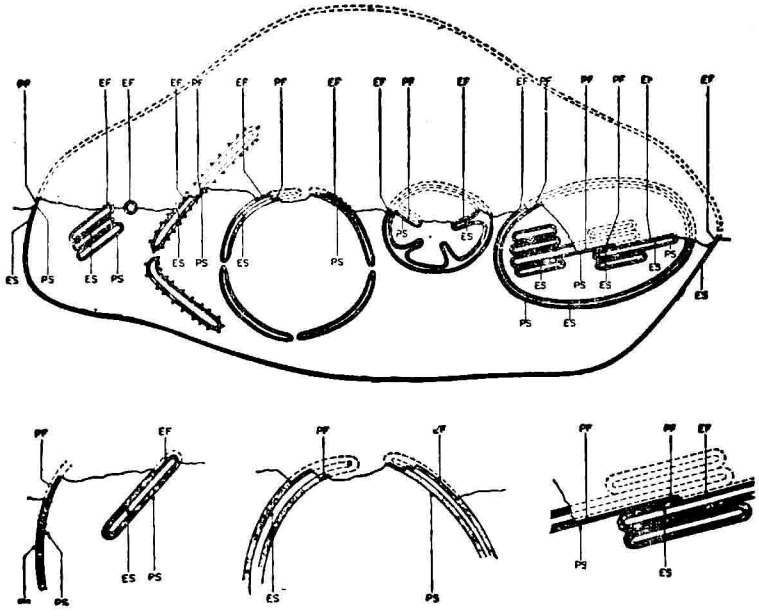


图7 用 P, E 和 F,S 命名法标示各种生物膜面的示意图

五、冰冻复型技术的某些应用

冰冻复型技术的应用十分广泛，通常是配合生化，生理等手段提供形态学上的信息。本文仅从几个方面略作提示，以供参考。

1. 在生物膜基本结构研究中的应用

冰冻刻蚀图象中所看到的各种生物膜两叶内侧小颗粒的不对称性，为 Singer 的生物膜“流动镶嵌模型”中蛋白质功能团是不对称地镶嵌在脂质双分子膜中的论点提供了直观的实验依据。又如，生物膜的侧向分相现象对膜功能的调节具有重要意义。有人[6]研究了 Ca^{++}、聚赖氨酸对膜脂分相的影响，用冰刻法直接证明 Ca^{++} 或聚赖氨酸引起的分相可导致在脂质体膜的脂区形成 100—1,000 Å 大小不等的圆形斑块结构。

2. 观察具有不同功能的生物膜的形态，以阐明其结构与功能间的关系

Branton 等人[4]用冰刻法对几种功能上不同的生物膜进行比较后发现，髓磷脂膜具有大面积的光滑膜面，而其他一些膜系统则显示出在光滑的膜面上分布着平均直径为85 Å 的颗粒物。这种颗粒物尤以叶绿体片层上最多。他们认为，颗粒的多寡反映了膜的生理活性的差异。叶绿体有进行光合作用的活跃机能，所以其片层上的颗粒最多，而包围在神经轴上的髓磷脂膜只起绝缘保护作用，故在其膜面上看不到什么颗粒物。

3. 比较病理和生理状态下膜结构的差异，以寻求病变原因

M. Ashraf 和 W. Mayr 用冰冻断裂法观

察局部缺血的心肌细胞和正常心肌细胞发现，前者肌浆网膜上的小颗粒较后者少。他们认为这种颗粒的减少反映了肌浆网膜上 Ca^{++} 摄取量的减少。又如，我国河北医学院[7]应国华、李文镇同志用冰刻法观察到胃癌细胞的核孔较正常者明显减少，认为这反映了胞核与胞浆之间的信息传输有了变化。

4. 研究细胞间联接区的超微结构，以阐明细胞间物质运输，信息传递的途径

有人[6]用冰刻法观察到小肠上皮细胞之间的间隙连接为颗粒状物质排成的六角形结构，认为颗粒中央的凹陷处是通道，一个细胞的小分子(分子量 < 1,000)物质经此通道进入相邻细胞，而细胞内 Ca^{++} 的浓度则控制着通道的开合。

5. 其他

冰冻复型技术在细胞膜的融合、分化等过程以及膜的通透性研究中也有应用。此外，还有人用这项技术观察了某些含水生物大分子的形状、对这些大分子的大小和重量作了测定；冰冻复型技术在细胞形态学上的主要作用是证实了以往超薄切片中所看到的结构形态，并对某些形态的观察结果作了修正。

参 考 文 献

[1] Steere, R. L. and Moseley, M: *Proc. 27th Ann. Electron Microsc. Soc. Amer.*, 202—203, 1969.

[2] Deamer, D. W. and Branton, D.: *Science.*, **158**, 655—657, 1967.

[3] Pinto da Silva, P. and Branton, D.: *J. Cell Biol.*, **45**, 598—605, 1970.

[4] Branton, D.: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, Lond. B. **261**, 133—138, 1971.

[5] Tillack, T. W., Scott, R. E. and Marchesi, T. V.: *Fed. Proc.*, **29**, 489a, 1970b.

[6] 杨福愉等：《生物科学动态》，1979 年，3 期，2—17 页。

[7] 应国华、李文镇：日本临床电子显微镜学会杂志，**13**(3)，(付印中) 1980.

[本文于 1979 年 12 月 27 日收到]

会议简讯

首次全国生物系统的模型与辨识学术讨论会在北京召开

全国第一次生物系统的模型与辨识学术讨论会，于 1980 年 12 月 24 日至 28 日在北京召开。这次会议是由中国自动化学会生物控制论专业委员会和中国生物物理学会联合筹备的，来自全国 33 个单位的 44 名代表出席了会议。大会收到论文19篇，有 11 位代表报告了自己的工作。此外，还安排了“伪随机码相关仪”的表演。

会议听取了系统辨识一般方法、房室系统的建模与辨识、代谢系统的辨识、白噪声方法和伪随机码信号在生物系统辨识中的应用，以及系统辨识方法在生物医学中的应用等专题报告。美籍学者邱文中博士应邀作了有关“人工智能”的内容丰富的报告以及西德 Reichardt 教授访华学术报告的介绍。

建立模型与系统辨识是在解决工程技术系统的控制问题中发展起来的。从控制论的观点来看，生物体是由许多动态学系统组成的高度复杂系统，生物体内进行着复杂的信息处理和调节控制过程。由系统辨识可获得生物系统的动态品质信息。现在，它已应用于各种生物系统，其优点是：1. 可以无损伤地获得活体中一些不易直接测得的参数。如可以从吸呼气体的成分分析中，在线连续估计出心输出量，2. 可以得到体内调节系统的参数变化，它们可能反映机体从生理状态到病理状态的变化，更准确地诊断疾病。如用糖耐量试验中得到血糖动态系统的参数，可诊断不同类型的糖尿病，3. 获得了系统的准确参数，可以象工程中实现系统的最优控制那样，实现对病人的最优治疗。

最后，代表们讨论了我国生物控制论近期的发展方向，提出值得重视的问题：1. 房室分析在药物动力学、生化、生理研究中的应用，2. 电子计算机在处理各种生物医学信息中的应用，3. 白噪声及伪随机码技术在生物医学的非线性系统实验中的应用，4. 生物模型及系统辨识方法在生态学中的应用等。

生物系统辨识方法虽比较年轻，但世界各国都很重视，从这一领域发表的大量论文已经展示出它的生命力与美好前景。我国这方面的研究工作也有了一个良好的开端。 (会议秘书组)

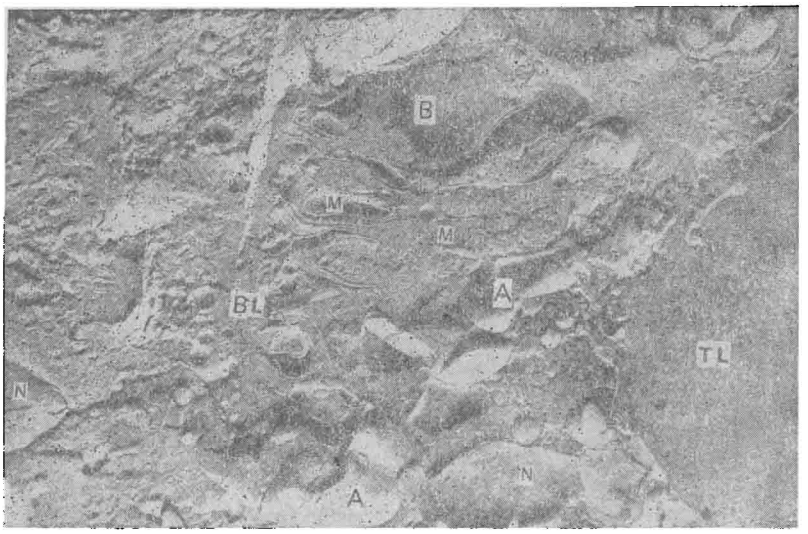
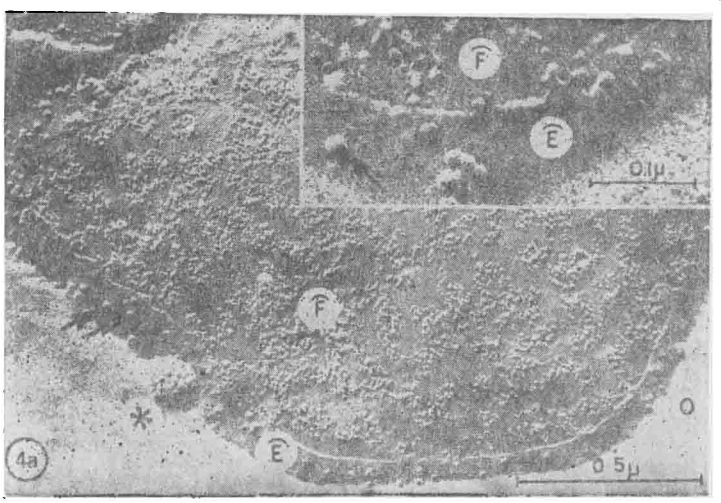


图 2　小鼠肾组织冰冻断裂照片

图中不仅可见远曲小管上皮细胞部分某些膜结构的横断面，亦可见到膜平面（A、B）。N——细胞核、M——线粒体、BL——基底膜、TL——管腔。（×15,000）



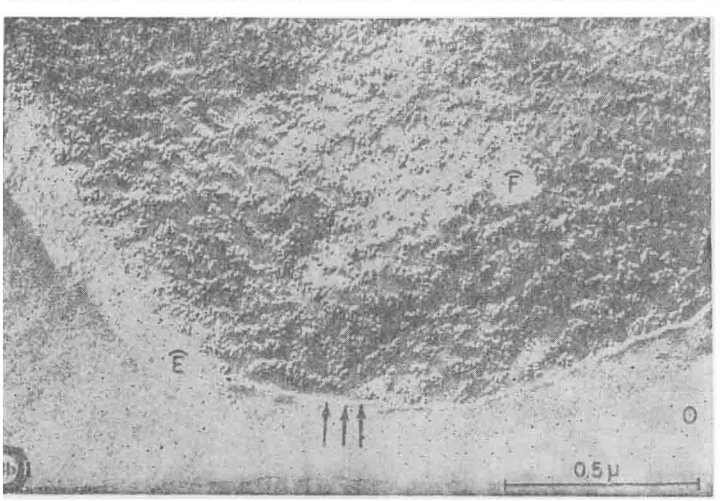


图　4

a. 用铁蛋白标记的红细胞膜的冰冻刻蚀照片。在断裂面 $\hat{F}$ 上分布着许多小颗粒，而在刻蚀面 $\hat{E}$ 上则看到直径约 120 Å 的标记铁蛋白颗粒（箭头所指）。

b. 未用铁蛋白标记的红细胞膜的刻蚀面 $\hat{E}$ 上无颗粒物。箭头所指为断裂面 $\hat{F}$ 及刻蚀面 $\hat{E}$ 间分界的一道嵴（引自 *J. Cell Biol.*, **45** (3), 600—601, 1970.）。