

等曾报道^[7-9] 肿瘤细胞膜上存在分子量为 210,000、145,000、96,000、75,000 的蛋白组分,与 L_{7811} 质膜中含量较多蛋白组分有相似处。其中哪些组分确属肿瘤细胞膜特异而共有的,值得进一步与不同来源的正常细胞进行比较研究。

根据 Bergelson 报道^[10] 淋巴细胞白血病患者细胞膜脂质流动性大于正常淋巴细胞,可能由于患者淋巴细胞中 Ch/PL 比小于正常所致。本文作者曾测定正常 615 小鼠胸腺及脾细胞中 Ch/PL 比,为 0.81,经鉴定 L_{7811} 白血病细胞亦属淋巴细胞,在本文测定 L_{7811} 细胞及质膜中 Ch/PL 比分别为 0.61 和 0.66,均低于正常淋巴细胞测定结果,说明此参数可能作为某些肿瘤细胞膜的生化特异指标。

生物膜上磷脂的分布是与胞浆不同,从本文结果亦可看出在 L_{7811} 质膜中 PS, SM 的分布多于全细胞;但 PE 及 PC 的分布则较少。再有在 L_{7811} 白血病细胞质膜中具有较高含量 PS 及 SM,也不同于正常淋巴细胞。磷脂是一些酶的主要激活剂之一,质膜上磷脂组分含量及分布异常,也能影响膜结合酶如腺苷酸环化酶,ATP 酶及葡萄糖-6-磷酸酶等酶系统的活性,因此影响细胞生成的调节系统,从而引起细胞分化,增殖异常。所以对 L_{7811} 细胞膜磷脂含

量异常的意义,也是值得进一步研究的问题。

总之,采用腹水型 L_{7811} 白血病细胞分离质膜,取材方便,细胞来源多,用蔗糖分级梯度离心所得质膜制品,经 5'-核苷酸酶等质膜标志酶的鉴定看来,具有一定纯度。在其质膜中某些蛋白组分,Ch/PL 克分子比值,磷脂组分 PS 及 SM 的含量以及 5'-核苷酸酶,葡萄糖-6-磷酸酶活性等显示一定的变化,可能是肿瘤细胞质膜有关的生化标志物。因此认为 L_{7811} 白血病细胞质膜是可用作探讨细胞癌变机理和研究生物膜的结构和功能的一种适合材料。

参 考 文 献

- [1] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.
- [2] Tsai, C. H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **401**, 196, 1975.
- [3] Azoulav, E. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **110**, 301, 1965.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [5] Fairbank, G. et al.: *Biochemistry*, **10**, 2606, 1971.
- [6] Zak, B.: *Am. J. Clin. Path.*, **27**, 583, 1957.
- [7] Yamada, K. M.: *Nature*, Vol. **273**, 355, 1978.
- [8] Shiu, R. P. C. et al.: *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3840, 1977.
- [9] Robbin, R. et al.: *Adv. Cancer Res.*, **22**, 203, 1975.
- [10] Bergelson, L. D. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **210**, 287, 1970.

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]

超低温含水生物样品电子显微镜技术

杨 振 藩

(中国科学院生物物理研究所)

现代电子显微镜的分辨力已达到 0.2nm,但它观察生物结构,其分辨力几乎要低一个数量级。目前电镜观察生物结构的最好记录是对紫膜结构的研究^[1],能显示 1nm 的规则结构,表明紫膜具有二维结晶性质。对无规则生物结构的观察,以核糖体为例^[2],其分辨力只及 3—5nm。因此,目前生物样品电子显微镜分析

技术的发展,电镜分辨力不是一个限制因素,许多实验说明主要限制是生物样品制样方法不完善及观察时电子束对样品结构的破坏效应^[3]。

低温电镜技术可以解决以上二个限制因素。因为电子束对低温样品损伤小,另一方面冰冻制样省去了常规制样的固定,脱水、包埋等过程,明显减少了制样损伤。目前这一技术受

到重视,已经发展了一系列技术,如冰冻刻蚀、冰冻断裂、冰冻干燥、冰冻升华和冰冻切片。但它们有二个共同缺点:(1)样品必须干燥或复型,(2)样品仍然要升温然后在室温下观察。这二个缺点和低温电镜的基本设想有矛盾。真正的低温电镜技术应该是在低温条件下直接观察冰冻的含水样品。但因冰冻含水样品的制备和转运比常规方法困难的多,加上含水样品对电子束更敏感,因此这个技术长时间未受到重视。1974年 Taylor 对冰冻的含水过氧化氢酶晶体进行电子衍射实验,分辨力达 0.3nm,最近由于超导低温电子显微镜的建立及超导电镜的一些实验,证明在绝对温度 4K 条件下有所谓的“冰冻稳定作用”它可能发展成一个新的技术领域,即超低温含水生物样品电镜技术。据估计用这个技术有可能使电镜对生物非规则结构观察的分辨力由目前的 2—3nm 提高到 1nm,可以预料该技术将可能进一步受到重视^[7]。

本文主要介绍以下三个方面:

一、超低温对样品的“冰冻稳定作用”

近 20 年的电子显微镜研究表明,生物样品在电子束轰击下,当电子束剂量超过 100 电子/nm² 时,样品结构开始破坏,剂量再增加时样品出现质量丢失。可是用电镜观察和照相时样品总要承受一定的电子剂量。例如观察一个薄的无规则结构的样品时,如果要获得 1 nm 分辨率,据计算至少需要数千电子/nm² 的剂量,显然大大超过安全剂量。

许多实验证明在低温下电子束对样品的损伤减小。例如辐射反应减弱,样品中的重金属离子位移减小,样品质量丢失和污染减小。但是因为含水样品的辐射敏感性比干燥样品大,因此当电镜观察低温含水样品时,实际效果并不比常规方法好多少。

最近利用西德 munich 的 Siemens 实验室的超导透镜低温电子显微镜研究生物结构,得到了鼓舞人心的结果。Dietrich 等观察了细菌的细胞壁和聚羟丁酸薄层,并指出在绝对温度 4K 时,含水样品的电子敏感性比常温条件下降

3—4 个数量级。Knappek^[4] 1980 用一系列有机晶体进行电子衍射实验,研究低温对样品结构的保护作用,并指出在液氮温度 4K 附近显示明显的“冰冻稳定效应”,样品结构保存的很好。方法是测出使第一级衍射点 (0.5nm) 的强度减小到它原来强度的 1/e (37%) 时所需的剂量值 De,亦就是样品结构表现一定程度破坏时的剂量值。比较绝对温度 4K 和 300K 时的 De 值,就可以计算出超低温对样品的冰冻稳定增益。表 1 列出 7 种有机化合物晶体在 4K 和 300K 条件下的 De 值和相应的超低温冰冻稳定增益。实验结果明显优于以前一些实验。其部分原因归功于超导低温电镜本身。超导低温电镜的透镜系统和样品室全部浸于液体氮中,透镜线圈处于超导态,没有任何能量输入,能使样品真正达到液氮温度 4.2°K。而以往的低温电镜观察大多使用液氮冷却的样品室,样品实际温度约 100K。少数工作使用液氮冷却的样品台,样品温度在 10K 左右。所以只有 Siemens 实验室的超导低温电镜才是真正在液氮温度观察样品,被认为只是在这个温度才表现出明显的“冰冻稳定作用”。另一方面电子束轰击样品亦会

表 1 有机晶体的“低温冰冻稳定作用”测定, De 值
(电子数/nm², 加速电压 80KV)

晶 体	4K	300K	增益
一磷酸腺苷	20000	60	330
三磷酸腺苷	23,000	60	370
Cromoglycate	70,000	120	58
石 蜡	11,000	380	29
苯基代丙氨酸	2,600	80	33
硬脂酸	7,300	140	52
1-缬氨酸	2,000	30	67

产生热量,一般认为在常规工作条件下,受电子轰击后样品温度将升高几度。如果使用导热性能差的塑料支持膜,大剂量短时间照明或厚层样品时,温度升高更多,De 值明显减小。所以应该使用导热好的碳支持膜、薄层样品和小剂量长时间照射,这样才能减小温升,使 De 值增加。超导低温电镜的另一个优点是样品室没有温度梯度,因而样品漂移和振动很小,有可能进

行小剂量长时间照相, 亦就减小电子束对样品的加热效应, 使样品可以保持在液氮温度。

超导低温电镜观察生物样品效果也是很好的。对响尾蛇毒素 (crotoxin) 晶体和响尾蛇毒蛋白 (rattlesnake Venon Protein) 的电子衍射实验亦证明了相同的“冰冻稳定作用”。这种“稳定作用”可以由 Seigel(1961) 的工作解释。Seigel 实验指出电离辐射可以使冰产生原子氢, 但冰如处于液氮温度 4.2K 时, 原子氢将停在原位不移动, 而当冰温度上升到 15K 时原子氢发生移动, 并开始与其他元素反应。

我们可以设想“冰冻稳定作用”表现如下: 电子束对样品结构的损伤主要是由于它与样品原子中的电子的非弹性碰撞。在 10^{-13} 秒内有几十电子伏特的能量转移给样品电子, 并使这个电子由原子中辐射出去。非弹性碰撞过程不受温度影响, 因此“冰冻稳定作用”对这个过程没有作用。但样品系统因突然的能量输入而被扰动, 必须经历一些连续的化学反应及随之造成的原子和分子重排才又达到一个新的平衡状态。这种原子和分子重排大到可以被电镜观察到时即称为细微结构破坏。而“冰冻稳定作用”对这个过程起稳定作用。液氮温度可以使这个反应系统维持在一个中间态, 不再进一步发展成细微结构变化或延缓这一变化过程。在室温及高于液氮的温度下这种中间态是不稳定的, 它会立刻导致明显的结构变化, 亦就降低了被观察样品的分辨率。

二、冰冻含水样品制备技术

活细胞中的大部分组成是水, 占总重量的百分之七十到八十。大部分水以自由水状态存在, 小部分与生物大分子相结合, 形成所谓的水化层, 这种水化层是维持细胞稳定结构的必要部分。常规电镜制样必须经历固定, 脱水和包埋等步骤, 致使细胞结构的水环境发生巨大变化, 这样必然会引起细胞结构的改变和损伤。

冰冻含水样品制备技术避开了以上操作, 但是含水样品在冰冻时又产生了冰晶对结构的破坏问题。通过一系列研究指出: 冰晶破坏一

般可从细胞水平和分子水平来分析。

细胞水平 当包围细胞和细胞结构的自由水被冰冻时, 自由水形成二个相, 即不断膨大的冰晶相和余留的浓度逐渐增加的液相, 后者最后变成为由浓缩的溶质构成的易熔相。冰晶相的膨大是低温制样时的结构损伤主要原因。

分子水平 冰晶相亦会影响生物大分子结构水化层内的结合水, 但是结合水的晶化是否会影响大分子结构及细胞结构的高分辨力观察, 还有待研究。由目前的实验结果看分子水平的冰冻损伤对高分辨率电镜观察影响不太大。

对于不固定的不用冰冻保护剂的含水样品的冰冻制样技术, 为防止产生冰晶, 如何以最快的速度降温成为最主要的技术问题。冰冻速度应该高于 10^3K/秒 才能达到所谓的玻璃态, 即冰晶非常细小, 在电镜下已看不到任何结构损伤的状态。冰的热导率较低, 样品只能在离表面的一定深度内达到快速降温。仅只有小体积样品如薄膜 (约 $10\mu\text{m}$) 或小滴 (约 $20\mu\text{m}$) 能获得玻璃态的冰冻。因此大组织应切成小块, 小滴可以制成悬浮液, 在支持膜上铺成薄层, 才能迅速冰冻。通常应用液氮快速冰冻。一些软组织可用氮霜或液化丙烷/丁烷或液氮快速冷冻。技术难点是如何把样品铺成小于 100nm 厚度的薄层, 冰冻后又需保护使它不被蒸发干燥。即使在 173K 时冰的蒸发速度是 10nm/秒 。曾设计用二层膜中间夹样品层的方法、湿箱法等, 以减少水份蒸发。但这些方法都很复杂又费时, 操作需要特别细心和耐心。

某些样品如蛋白质晶体, 使之在包裹小量母液的条件下冰冻, 然后在电镜的样品室中用控制加热的方法使过剩的母液升华, 适当控制可以使样品部分干燥, 最后获得只包含维持结构所必须的结合水。接着把样品降到冰不升华的温度进行电镜观察。这种使过剩水升华的方法能特别好的保存结构并获得反差很好的图象。这个方法要求工作电镜具有特别高的真空系统, 以便使升华水汽不能回凝于样品表面, 同时还要求使用特别干燥的底片。

厚的组织通常进行冰冻切片。冰冻含水样

品的切片尚没有统一的方法。有用液氮或液氮冷却的表面抛光的铜块或银块去迅速碰贴样品,或用注射器把样品悬液以一定速度注入入冷冻剂中,这些方法可以在离样品表面的一定深度内(约3—15 μm)得到无冰晶层。然后把冰冻样品移到冰冻切片机中切片。切片时和以后所有操作都应维持样品温度在其重结晶温度以下。水的重结晶温度下限是150K,生物材料的重结晶温度下限是203K。一般使用玻璃刀切片。样品温度高于203K时冰冻切片过程以切割作用为主,温度低于203K时则以冰冻断裂为主。温度低于150K玻璃刀很快变钝。断裂多于切割的时候切片质量变差,将不适宜作高分辨率工作。切片制成后应把它立刻收集于铜网上,储存于液氮中,以防止由于水分升华而使样品被部分干燥。总之,冰冻超薄切片机、切片技术和切片转运等都应进一步改进才能适应超低温含水样品电镜技术的要求。

三、低温超导电子显微镜

冰冻含水样品制成后,即可转移入低温电子显微镜,在运转过程中应保证样品温度不升高,亦没有凝聚污染。在电镜中样品应维持在要求的温度,为了使过剩水升华,样品室温度应能调节控制,而且要有很高的真空。

一般电镜不能达到上述要求。现代电镜几乎都带有液氮冷冻台,可以使样品维持在接近液氮的温度,以抑制样品的质量丢失和表面污染,但是达不到产生“超低温冰冻稳定作用”的温度。此外这类电镜仅仅使样品台降温,样品台与周围结构件之间存在明显的温度梯度,因而机械稳定差,热漂移大,不适合于高分辨观察,但用于电子衍射实验,效果还是很好的。

许多实验室使用自己设计的低温样品台进行冰冻含水样品实验。曾用液氮或液氮气体冷冻,外面围以液氮降低环境热辐射影响,以便获得最低温度。但是这种样品台体积大,不能装于普通电镜中,只能装在高压电镜中,而其操作性能又达不到普通电镜的水平。

最好的办法是使整个系统包括磁透镜,样

品台,样品支架都处于液氮温度。这样就要求设计新的适用于液氮温度的透镜系统。Siemens实验室 Dietrich^[5]调查了以往各种类型的超导透镜设计,并比较了它们的优缺点,在此基础上制造了一台包括超导物镜和超导中间镜的超导低温电镜。物镜和中间镜各由二个超导隔离型(Shielding type)透镜组成。图1是超导透镜的

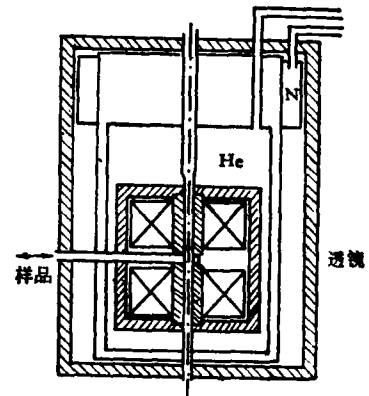


图1 超导透镜低温系统示意图

结构示意图。中心是由超导线圈组成的磁透镜,外面围着二个中间相连的液氮腔,液氮消耗是0.9升/小时。最外层为液氮腔。物镜还包括一个由侧面进样的样品台。透镜的轴场分布均匀,可以操作250KV的电子束。样品台包括一个圆盘样品支持架和光栏架,可以同时放入三个样品,样品台移动精度可达0.1 μm 。它有足够的空间放入一个倾斜装置。中间镜装在物镜下面,附有几个致偏板和一个相消散器。超导物镜和中间镜装在一台400KV电镜上。对这台超导低温电镜进行鉴定,结果是令人满意的。用无定型碳膜测定分辨力为0.2nm,用光学衍射仪分析照片也显示有0.2nm周期的衍射环。电磁场和机械稳定性由石墨氧化物晶体进行检测。在曝光长达6.5分钟的照相记录中仍然看到0.14nm的规则结构,由此说明样品移动至少小于0.02nm/分。图象分析证明系统稳定度小于0.01nm/分,创造了电镜机械稳定度的最高纪录。样品观察证明样品污染和质量丢失很小。用非常强的电子束长时间照射碳膜小孔,即以4安培/平方厘米的电子密度照射1.5

小时,小孔孔径仅增加 2nm,说明辐射损伤是很小的。而常规观察条件是 0.1 安培/平方厘米,曝光 10 秒钟,辐射损伤极微。观察含有汞原子的有机化合物六苯汞,每个苯环与六个汞原子结合,汞原子呈六角型分布,相邻汞原子距离是 0.36 nm。在超导电镜中观察到一些六角型的象点,点距约 0.36nm,反映了汞原子的距离。照相的光学衍射分析也显示了 0.36nm 周期的衍射环。对生物样品的图象观察还有一些困难,但相信经过努力对非规则样品的分辨力由目前的 2—3nm 提高到 1nm 是完全可能的。

超导低温电镜对生物大分子的电镜三维重构技术也将起重要作用^[6]。三维重构技术要求对生物样品进行不同方位的多次照相,长时间的电子光束照射会造成生物样品辐射损伤。因

此要求电镜具有稳定性好,辐射损伤小,高分辨率等性能,只有超导低温电镜可以满足这些要求。

总之,超低温含水生物样品电镜技术是一项正在发展中的有希望的新技术。

参 考 文 献

- [1] Unwin, P. N. et al., *J. mol. Biol.*, **99**, 425, 1975.
- [2] Lake, J. A.: *J. Mol. Biol.*, **93**, 159, 1976.
- [3] Beer, M. et al.: *Q. Rev. Biophys.*, **7**, 211, 1975.
- [4] Knapek, E.: *J. Mol. Biol.*, **141**, 147, 1980.
- [5] Lsolde Dietrich: *Electron Micro Scopy*, Vol III, 173, 1978.
- [6] Hoppe, W.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 563, 1981.
- [7] Dubochet, J. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 133, 1981.

[本文于 1982 年 10 月 7 日收到]

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分离血红蛋白的研究

南 国 华 黄 文 长 熊 丽 萍

(江西医学院, 南昌)

本文采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳,借助圆盘电泳仪的简易装置,对正常血红蛋白及异常血红蛋白(Hb)等进行了分析,获得满意效果。

一、方 法

1. 凝胶制备 40%聚丙烯酰胺液(丙烯酰胺 38.4 克及甲叉双丙烯酰胺 1.6 克溶于蒸馏水至 100 毫升)1 份,20%两性载体(Ampholine, 国产、pH4—10)0.5 份,蒸馏水 3 份,0.25%过硫酸铵液(临用前配制)2 份,混匀,立即分装于内径 4 毫米,长 9 厘米的玻管中,胶长 6 厘米,日光下聚胶(约 2 小时),待胶聚合后,加样品,进行电泳。

2. 血红蛋白溶血液制备 耳垂采血数滴,用生理盐水 5 毫升洗涤三次,最后一次离心 20 分钟(3,000 转/分),压积红细胞,弃去上层生理

盐水,加入压积红细胞 2 倍体积的蒸馏水,使充分溶血,再加 0.5 倍体积的四氯化碳,振荡 2 分钟,离心沉淀(3000 转/分)15 分钟,取出红色透明上清液(即为 Hb 溶血液)。此液含 Hb 量为 5%。电泳前此液以蒸馏水稀释 10 倍使用。

3. 等电聚焦电泳 于凝胶柱上加稀释溶血液 10 微升(相当于 Hb50 微克),电泳上槽(阴极)缓冲液为 0.02MNaOH 液,下槽(阳极)缓冲液为 0.01MH₃PO₄ 液,电压 300 伏,电流 4 毫安,温度 6℃ 左右,电泳时间 2—3 小时。

4. 固定及染色 电泳毕,取出管内凝胶,以 10% 三氯醋酸固定过夜,可直接观察结果或以 Coomassie brilliant blue R250 染色约 1 小时后,再用脱色液(冰醋酸:95% 酒精:蒸馏水 = 10:25:65)脱色,至底胶色褪观察结果。如密封于 3% 醋酸的试管中可长期保存。