

一种简易冰冻断裂装置及其实验方法*

吴玉薇 鲁崎唔 傅广礼

(中国科学院生物物理所六室电子显微镜组)

一、引言

冰冻断裂技术是电子显微镜样品制备技术之一。这项技术的主要特点是能够揭示生物膜的结构,它为目前流行的关于生物膜的“流动镶嵌模型”提供了实验依据,从而为研究生物膜结构与功能的关系提供了新的信息。

早在1950年 Hall, C. E.^[1] 和 Mexyman, H. T.^[2] 就利用真空复型法对经过冰冻处理的非生物材料进行了研究。他们的工作为以后的冰冻断裂和冰冻刻蚀技术奠定了基础;1957年, Steere, R. L. 首次成功地在电镜下观察了一种植物病毒的冰冻刻蚀复型标本;1961年, Haggis 又利用冰冻断裂技术研究了人红血细胞的结构。此后,这项技术的原理和方法不断得到完善,应用范围越来越广,逐步成为生物超微结构研究中的一项重要手段。

通常所称的“冰冻刻蚀”技术与冰冻断裂技术的实验步骤基本是一致的,但冰冻刻蚀的实验步骤中多一“刻蚀”过程。所谓“刻蚀”,即在高真空中使断裂样品温度上升至该真空度下冰的升华温度(1×10^{-5} torr 时,约 -100°C 左右),从而使样品断裂面部分冰晶升华。断裂仅暴露膜间的结构,而刻蚀的结果则可增强这些结构的立体感。而且可暴露生物膜的表面结构。在实验装置上,冰冻刻蚀技术中还需用加热及测温部件。

二、原理

生物组织中含有大量的水分,当它被冰冻固定时,往往由于形成大块冰晶而破坏了细胞的超微结构形态。冰晶大小与冰冻速率的关系极大。为了尽量减小冰晶的大小,以使在电镜分辨率下不影响对结构的观察,可采取两种方法:一是加快冰冻速率,二是使用甘油等冰冻保护剂。

如果对冰冻固定的材料加一外力,使其发生断裂,那么,在材料的断裂面上就会暴露细胞内部结构。这样,我们再按照电子显微镜的一般复型技术,制成冰冻样品断裂面的标本复型,进行电镜观察,就可以从中得到有关细胞和细胞器超微结构的各种信息。根据 Branton^[5] 等人的观点,冰冻断裂在生物膜结构处发生时,断裂面总是沿着生物膜中间的疏水区产生。因此,冰冻断裂的结果,不仅一般地揭示了细胞和细胞器的超微结构,更重要的是它还暴露了生物膜层之间的内部形态。这一点是目前其他手段无法比拟的。

三、实验装置及方法

六十年代以来,国外一些厂家已生产了各

* 本工作得到生物物理所工厂邢洲勋等同志及微生物所电镜组刘如臻同志的大力支持,特此表示谢意。

种商品冰冻刻蚀仪,同时,一些实验室里也创造了许多大同小异的简易冰冻断裂或冰冻刻蚀法。我们参照新西兰人 Bullivant, S. [6,7] 等人的简易方法,对冰冻断裂技术作了一段摸索,初步取得了一些结果,现介绍如下。

1. 实验装置

全部装置为一台普通真空镀膜机和一套自行加工的黄铜质样品冷冻台(图1)。冷冻台由直径为80毫米、厚约25毫米的上下两块圆柱体及一个同样大小、厚约3毫米的顶盖组成。上冷冻台中开有两条分别与表面成45°角和90°角的防污染隧道。隧道宽约5毫米,长约25毫米。两条隧道在上冷冻台的下表面中央处汇合。下冷冻台的上表面中部钻有一排五个直径约

2毫米、深度为2.5毫米的样品池,池间距离约为4毫米。上下冷冻台重合后有一销钉定位,以保证五个样品恰好暴露于上冷冻台的两条隧道汇合口处。顶盖上装有一小铜环,以便用铁链与镀膜机钟罩内一升降连杆相连接。

2. 实验步骤(图2)

(1) 预处理 将新鲜的组织材料切成1×1×3毫米³的小条,置于4℃的25%甘油等缓冲液中渗透一小时左右,以防止细胞内水份在冰冻过程中形成大块冰晶。

(2) 冰冻 将经过预处理的样品置入下冷冻台上的样品池中,然后将这块冷冻台迅速投入盛于一塑料罐里的液氮中,以使样品冰冻固定;同时,将上冷冻台、顶盖以及一把装有刀

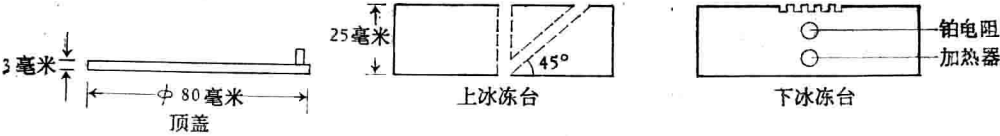


图1 简易冰冻刻蚀冷冻台示意图

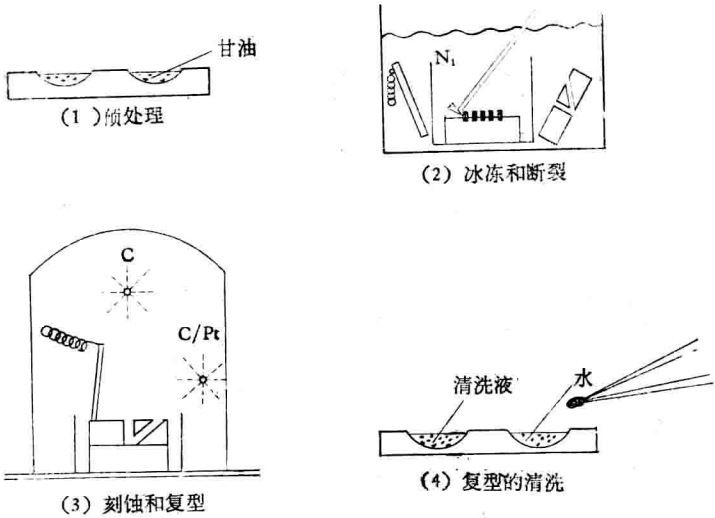


图2 冰冻断裂的一般操作步骤

片的长柄刀也投入液氮中预冷。

(3) 断裂 待冷冻台与液氮温度平衡后,用那把预冷过的长柄刀将突出于样品池表面的样品切去,得到一冰冻样品的断裂面。断裂后,将上冷冻台及顶盖依次序放好,连同塑料罐及其中的液氮一起转移到镀膜机上,装好铂电极

及碳电极,扣上钟罩,抽真空。

注意:

(a) 冰冻和断裂过程均应在液氮的液面以下进行。

(b) 塑料罐在镀膜机上的位置应保证铂电极和碳电极分别对准45°角隧道及90°角隧道;

样品与两对电极的距离均为15厘米左右。

(4) 复型 当钟罩内真空度达到最佳状态时(本装置为 6×10^{-5} torr), 用升降连杆将冷冻台顶盖掀起, 随即以 45° 角对样品断裂面蒸发一层铂膜, 以 90° 角蒸发一层碳膜。于是, 在样品断裂面上形成一铂-碳复型。复型时, 蒸发的铂粒子大小决定了此项技术的分辨本领。在真空度优于 1×10^{-5} torr 时, 分辨率约为 20 埃^[7]。

(5) 复型的清洗 复型步骤完成后, 从钟罩中取出冷冻台, 待温度稍回升后, 即用小铲将复型连同部分样品铲下, 置于 70% 的浓硫酸溶液中 2—3 天, 将粘在复型上的样品溶去; 再将复型用蒸馏水清洗一、二遍, 便可捞到铜网上, 晾干后进行镜检。

四、观察结果

我们用上述技术对小白鼠肾脏、心脏等进行了观察, 其中细胞的刷状缘、线粒体以及基底

膜均清晰可见(图版 III 图 1、2—图版 IV 图 3); 在小白鼠心脏内, 看到了完整的红血球断裂面(图版 IV 图 4); 在鸡败血症支原体 *S.* 菌体断裂面上可看见大小约 100 埃的蛋白质颗粒(封三图 5); 从玉米黄化幼苗提取的线粒体断裂面上, 也可见到膜上的蛋白质颗粒(封三图 6)。

参 考 文 献

- [1] Hall, C. E.: *J. Appl. Physics*, **21**, 61, 1950.
- [2] Meryman, H. T.: *J. Appl. Physics*, **21**, 68, 1950.
- [3] Steere, R. L.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 45, 1957.
- [4] Haggis, G. H.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 841, 1961.
- [5] Branton, D.: *Phil. Trans.*, **B**, **261**, 133, 1971.
- [6] Bullivant, S. et al.: *J. Cell. Biol.*, **29**, 435, 1966.
- [7] Bullivant, S.: In *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*, 67, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1973.

[本文于 1978 年 11 月 15 日收到]

脊 髓 电 镜 标 本 的 灌 流 固 定

宋今丹 李忠勤 赵雅元

(中国医科大学电镜室)

脑与脊髓对缺氧非常敏感, 是生物体内最难于固定的电镜标本之一。尤其脊髓更易受损, 动物死后线粒体便很快发生膨胀。为了完好地保存组织的超微结构, 对脊髓应采用灌流固定法。灌流固定法可使固定液直接到达脊髓内部, 迅速地进行原位固定。我们应用 Karnovsky^[1] 的三聚甲醛-戊二醛混合固定液, 参考 Coimbra^[2] 的腹主动脉灌流法, 对恒河猴的脊髓进行了灌流固定。具体步骤如下:

备好灌流装置, 将灌流瓶悬挂在离动物手术台 1.5 米的高处。把动物固定在手术台上, 向腹腔内注射 10% 氯醛糖(每公斤体重 2 毫升)麻醉动物, 同时向腹腔内注入肝素 5000 IU。20

分钟后再向腹腔注射 50% (w/w) 尿素(每公斤体重 1.5 毫升), 过 10 分钟后再继以 1% 亚硝酸钠 2 毫升注入动物腹腔之内。

打开动物腹腔, 找到腹主动脉, 以动脉夹阻断血流, 用小剪刀将腹主动脉剪一横口, 插入灌流插管, 以细线扎紧, 再取下动脉夹。随后打开动物胸腔, 剪破心包, 暴露右心房, 在右心房的右心耳上剪一小口之后, 再以动脉夹挟住位于膈肌上方的背主动脉。

动物经过上述处理后, 再行液体灌注。先以温热 (37°C) 的生理盐水 500 毫升, 以每分钟 80 滴左右的速度冲洗血液, 再继以冷却的 0.1M 二甲基砷酸钠缓冲液 (pH7.4) 缓冲的 2% 三聚



图 1 小白鼠肾脏冰冻断裂照片 图示近曲小管的基底膜部位及上皮细胞的部分细胞器 $\times 22,500$

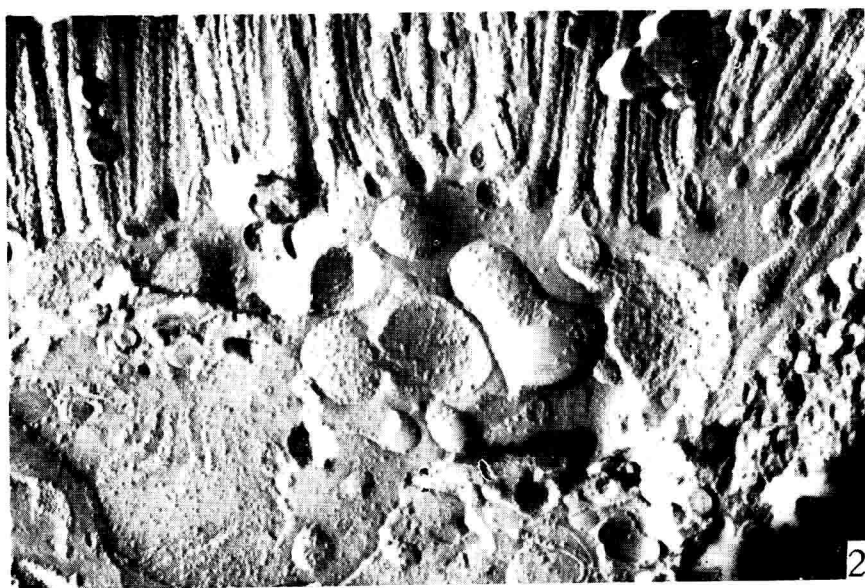


图 2 小白鼠肾脏冰冻断裂照片 图示近曲小管上皮细胞刷状缘部位 $\times 20,000$

图版 IV



图 3 小白鼠心肌冰冻断裂照片 图示线粒体 $\times 15,000$

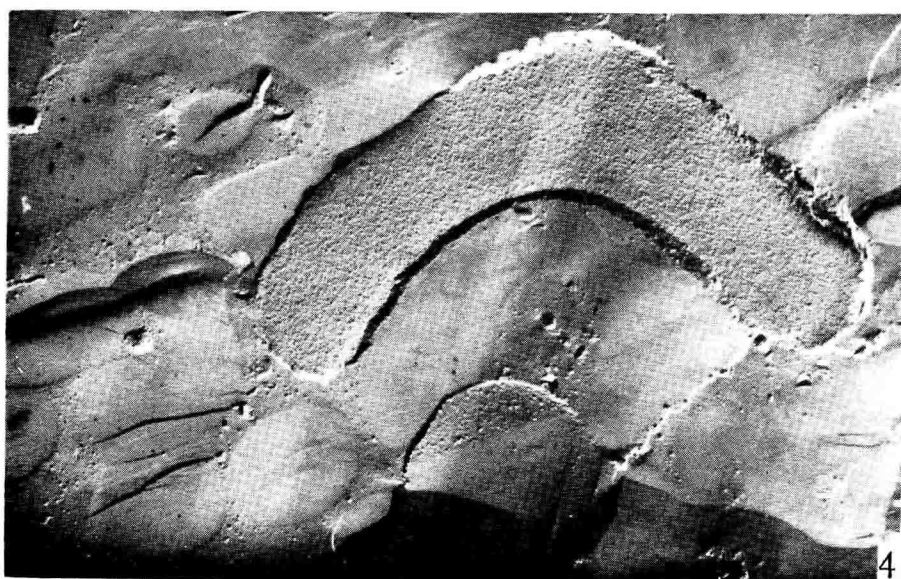


图 4 小白鼠心脏冰冻断裂照片 图示红血球断裂面 $\times 15,000$



图5 悬浮在20%甘油中的鸡败血症支原体菌体 Sb 菌体的冰冻断裂复型 $\times 45,000$

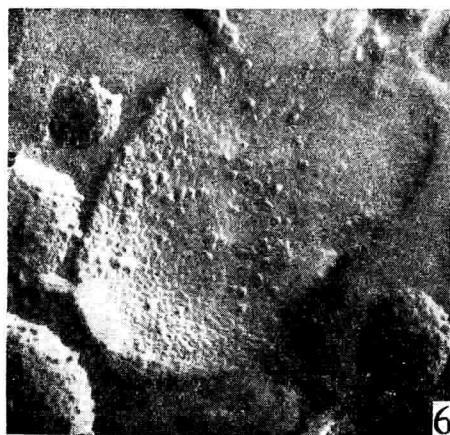


图6 从玉米黄化幼苗中提取出来的植物线粒体的冰冻断裂复型 $\times 91,000$

用闪光光解法研究了血红素蛋白与 O_2 或 CO 的结合,表明配基在接近血红素蛋白的活性中心前必需逾越四重障碍:(1)高粘度(≥ 200 分泊)溶剂对扩散的限制,(2)溶剂与蛋白质之间界面的活化焓,(3)珠蛋白本身的屏障,(4)最后在血红素上的结合步骤由居于支配地位的熵垒控制。由于这种结合是可以观察的,最内层的熵垒就有可能很好的加以研究。T. Yonetani 等(美)用钴卟啉取代法研究了肌红蛋白(Mb)和血红蛋白(Hb)与分子氧的相互作用,发现氧化的 CO Mb 中结合氧可与远端组氨酸残基形成氢键,用 EPR 光解法可以预测载氧血红素蛋白中远端残基的化学性质,并推导出氧结合的位置。Fe Hb 和 CO Hb 杂交四聚体的研究提供了鉴别协同性亚基相互作用中, α 亚基和 β 亚基之间区别的手段。EPR 和 NMR 的研究表明脱氧 Hb 和脱氧 CO Hb 中 α 亚基的辅基高度变形。根据这一特点可以监测 Hb 和 CO Hb 在配基相互作用中的别构转变。P. Eisenberger(美)用广延的 X 射线吸收精细结构测定法测出了 Hb 中 Fe 与 N 之间的距离,载氧状态时为 1.98 ± 0.01 埃,脱氧状态时为 2.055 ± 0.01 埃。Fe-N 距离的变化和卟啉环的弛豫,使 Fe 产生相对 N 平面的微小移位,表明与氧结合时, Hb 具有复杂而不同于局部的反应。

用中子散射法可以在含氘化亚基的溶液中测定大分子聚集体内各组成之间的距离。D. M. Engelman(美)用此法测出了大肠杆菌核蛋白体 30 S 亚基中 25 对蛋白质之间的距离,并根据这些数据得出了其中 8 种蛋白(S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_7 、 S_8 、 S_9 、 S_{10} 和 S_{12})的三维信息,推测了它们在核蛋白体内的形状和方位。

近年来在不同水平上,生物对象三维测体技术的研究也取得了一些新进展。L. D'Peachey(美)报道了 1 兆伏高压电镜的应用,由于电子束穿透能力加大,不仅能观察单层培养的完整细胞内细胞膜或细胞器的三维排列,使微管、微丝和微隔的组分清晰可见,而且还可借助于选择性染料观察厚达几微米的包埋标本中的三维结构。结合生物医学的研究 B. Quistoff 报道了用一种带显微铣刀的显微光导(直径 50 微米)用快速荧光光谱扫描法在 77°K 测定经过快速冷冻的活体组织内,线粒体黄素蛋白(FP)与吡啶二核苷酸(PN)的荧光强度比,以研究组织中不同区域的氧化还原状态,作出活体内不同组织代谢状态的二维和三维分布图,空间分辨力可及 3×10^{-5} 立方毫米,相当于肝组织内 40 个细胞的变化。三维测体中另外一种新方法是 P. C. Lauterbur 报道的 NMR 快速横切面造影法(Zeugmatography)。此法给活动物注射 Mn 离子,可缩短组织中水质子的弛豫时间,所观