

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

甲醛-2.5% 戊二醛混合固定液 500 毫升, 以稍快速度进行灌注。灌注液主要经由腰动脉, 肋间动脉等进入脊髓, 流出液由右心房的开口排出体外。为促进灌注液通畅运行, 我们在灌注瓶上连以二联球, 向灌注液面加压。

灌注之后, 迅速用解剖器材去除动物脊柱上的肌肉, 再以骨钳打开椎管, 当露出脊髓时应立即向椎管内注入 2% 三聚甲醛-2.5% 戊二醛混合固定液, 以浇灌整个脊髓, 待整个椎管打开后, 用解剖刀切断脊髓神经, 取出已僵硬的脊髓, 切下需要的脊髓节段, 再投入 2% 三聚甲醛-2.5% 戊二醛混合固定液中固定 2 小时。固定之后, 放入 0.1M 二甲基砷酸钠缓冲液过夜漂洗。

在漂洗过程中, 我们应用次甲基蓝染色法标示出脊髓的神经细胞, 在解剖显微镜下切取预定观察的各神经细胞群, 再放入 0.1M 二甲基砷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 配制的 1% 锇酸中固定 2 小时。固定后的组织, 用乙醇和丙酮脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, 超薄切片后观察。

我们应用上述灌注固定法得到的脊髓电镜标本如图版 I 的图 1, 2, 3 所示, 从标本中可以看出神经细胞的各种微细结构, 突触内的各型小泡以及其它结构保存得皆较完好。

灌注前使用抗凝血剂、血管舒张剂和调节渗透压的尿素等处理动物, 对完善地灌注脊髓起到良好的作用^[3]。应用三聚甲醛-戊二醛混合液做为灌注固定液, 是由于考虑到甲醛可能

先迅速地穿入组织, 进行临时固定, 随后戊二醛再作永久固定^[1]。我们所采用的二联球简易加压法, 对从腹主动脉灌注大动物是很必要的。另外, 我们在漂洗过程中, 使用的次甲基蓝染色法, 能够清楚地标示出神经细胞的所在部位。这样便可做到准确地选取脊髓中任一区域的神经细胞群进行电镜观察。

附: 三聚甲醛-戊二醛混合固定液配制法

1. 0.2 M 二甲基砷酸钠缓冲液 (pH 7.4)

蒸馏水 75 毫升

二甲基砷酸钠 4.28 克

0.1 N 盐酸 加 5.5—6 毫升, 把 pH 调至 7.4。

再加蒸馏水至 100 毫升。

2. 4% 三聚甲醛-5% 戊二醛混合固定液

蒸馏水 20 毫升

三聚甲醛 加 2 克于蒸馏水中, 水浴加热 (60—70°C) 并进行搅拌。

1N 氢氧化钠 加入 1—3 滴, 溶液变透明为止。再置于流水中冷却之。

25% 戊二醛 10 毫升

0.2 M 二甲基砷酸

钠缓冲液 20 毫升

无水氯化钙 0.025 克

当配制 0.1 M 二甲基砷酸钠缓冲液缓冲的 2% 三聚甲醛-2.5% 戊二醛混合固定液时, 把 4% 三聚甲醛-5% 戊二醛混合固定液和等量的 0.1 M 二甲基砷酸钠缓冲液配合到一起即得。

参 考 文 献

[1] Karnovsky, M. J.: *J. Cell Biol.*, 27, 137a, 1965.

[2] Coimbra, M. et al.: *J. Neurocytol.*, 3, 199, 1974

[3] 山鸟崇等: 电子显微镜试料技术集, 299, 1970。

[本文于 1978 年 2 月 1 日收到]

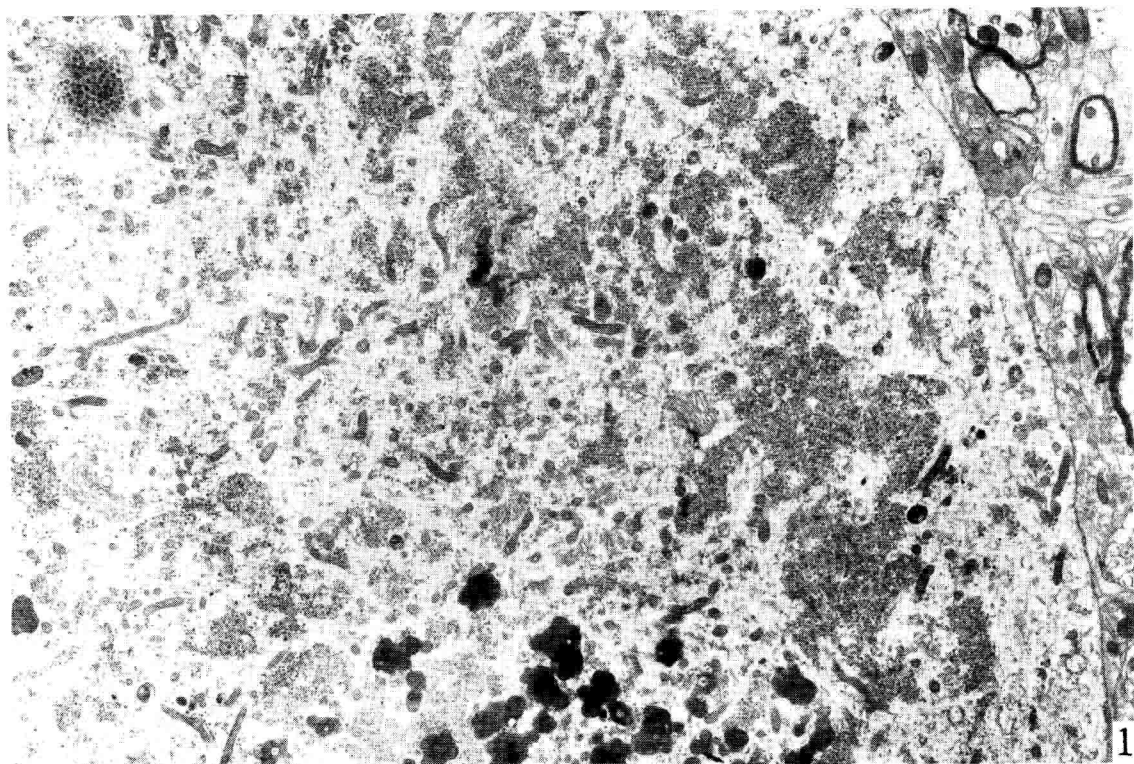


图 1 恒河猴脊髓前角运动神经细胞 6,000×

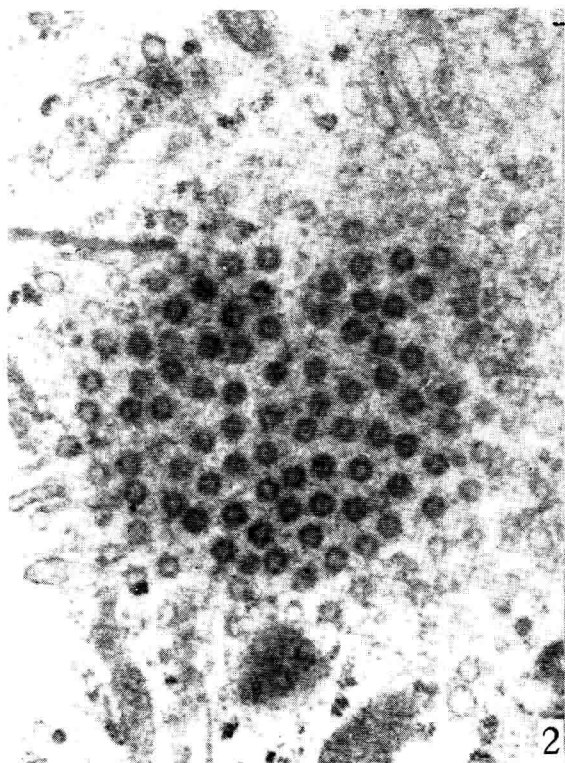


图 2 神经细胞核膜孔 34,000×

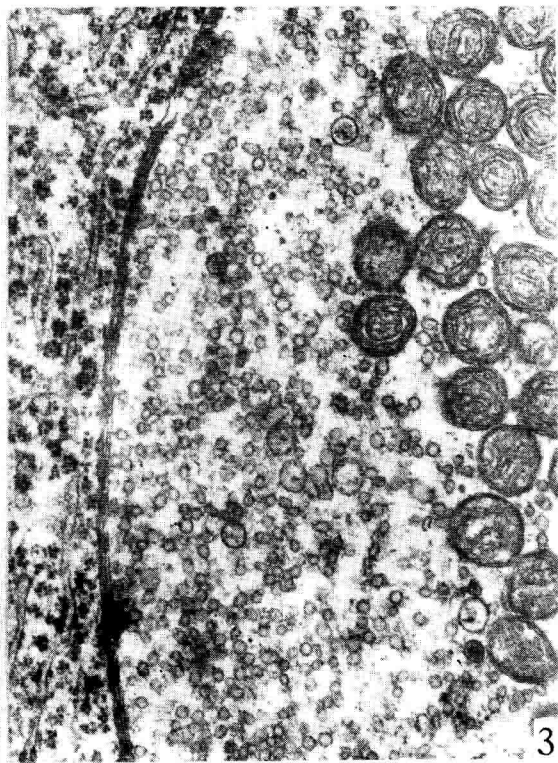


图 3 脊髓内轴体突触 26,000×