

术,并加以改进,制备出电泳纯的全组蛋白及其组份。

2. 对组蛋白的紫外吸收光谱分析表明,组蛋白的吸收光谱的共同特征是:吸收高峰在275毫微米,在280毫微米处有“肩胛”;而所含各组份的吸收光谱各有其特异性,与所含碱性氨基酸的多寡有对应关系,由此预测出  $F_{2a2}$  中所含碱性氨基酸的比值为19.2%。

### 参 考 文 献

[1] Kirschenbaum, D. M.: Atlas of protein spectra in

the ultraviolet and visible regions, p. 6, 132, 133, 1971.

[2] Johns, E. W.: Histones and nucleohistones, 1, 1971.

[3] Butler, J. A. V., Johns, E. W. & Phillips, D. M. P.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 209, 1968.

[4] Croft, D. N. & Lubran, M.: *Biochem. J.*, **95**, 612, 1965.

[5] Munro, H. N. & Fleck, A.: *Methods of Biochemical Analysis*, **14**, 113, 1966.

[6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.

[7] Panyim, S. & Chalkley, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337, 1969.

[8] Oliver, D. et al.: *Biochem. J.* **129**, 349, 1972.

[本文于1977年4月11日收到]

## 电子显微镜冷冻制样技术

### ——冷冻超薄切片技术

龚 祖 埏      沈 菊 英

(中国科学院上海生物化学研究所)

电子显微镜超薄切片技术的发展开拓了组织学和细胞学的显微和亚显微结构的研究。二十多年来,人们对分子水平及亚显微水平的生物结构的认识与以前相比,在很多方面有不少本质的变化。结构是功能的基础。对生物结构的研究必然会导致对功能问题的进一步探索和阐明。因此近年来,基于普通超薄切片技术的细胞化学、细胞免疫学放射自显影等技术不断获得发展。普通超薄切片技术虽然还在不断发展和提高之中,但是目前在样品制备上还不可避免地需要进行固定、脱水、包埋、染色等一系列化学处理,这在一定程度上导致生物结构发生变化和破坏,同时使得很多物质丧失其原有的生物活性,例如酶的活力、蛋白质的抗原性等。此外,大部分可溶性生物高分子及其它物质也在这个过程中被抽提掉,因此限制了这些技术的发展和运用。人们较早就认识到,生物组织的快速低温冷冻不仅能较好地保存其原有结

构,而且在很大程度上能保持一些生物高分子的活性,所以从60年代中期开始,如何把低温冷冻和超薄切片技术结合起来,为高分辨率电子显微镜提供冷冻超薄切片样品先后在几个实验室中探索。七十年代初,冷冻超薄切片装置开始以商品生产供应,就进一步促进了这一技术的研究和发展。本文结合我们的初步工作,对冷冻超薄切片技术和它的应用范围作一比较系统的介绍,简单综述用冷冻超薄切片提供的样品观察结果和进展状况,以期这一技术在我国的研究中,发挥它应有的作用。

### 冷冻超薄切片样品的制备

原则上讲,经低温冷冻的样品,可以不经任何处理,直接进行冷冻超薄切片后进行电镜观察。例如 Bernhard<sup>[1]</sup>等曾用新鲜的大白鼠肝脏组织经用液氮致冷的异戊烷冷冻后直接进行切片,但获得的切片质量较差,组织结构保存也不

好,并且在低温的槽液中,切片容易分散,捞片困难。所以目前大多数实验室还是采用一定的固定,封装,冷冻,染色等步骤。

### 1. 固定

固定的目的,主要是使组织的结构保存完整。普通超薄切片中使用的锇酸固定剂要损伤和破坏生物高分子的活性,所以在冷冻切片技术中不再使用。从电镜的细胞化学和免疫化学以及X光衍射和其它的一些研究中,了解到作为预固定用的戊二醛固定剂不仅固定效果较好,而且能在一定程度上保存大分子的生物活性,所以用作温和的固定剂最理想,迄今为止的冷冻超薄切片研究也给予同样的结果。但是组织的形态结构和生物活性上保存常常互为矛盾,在一定条件下,固定时间长,固定剂浓度高对前者有利,而不利于后者,因此在具体工作中,要选择适当的固定剂浓度和固定的时间和温度等等,以便兼顾两者,或者根据工作的目的,以强调保存形态或活性而定。

目前使用戊二醛的浓度为1.5%—3%,最常用的是2.5%。戊二醛配置在0.1—0.2克分子浓度pH7.2的二甲砷酸盐缓冲液中。我们把戊二醛配置于0.1克分子浓度pH7.2的磷酸缓冲液中也能获得较好的效果。戊二醛固定时间从15秒到2小时不等,但从切片的厚度,组织形态的保存,切片时平滑和规则性以及生物活性的保存来看,固定时间以一小时较为适宜。固定时放置在室温或4℃水浴中均可。

也有试用解聚的多聚甲醛或福尔马林蒸气作为固定剂,除对某些特定的组织(如淋巴组织)外,一般效果均不甚理想。Tokuyasu<sup>[2]</sup>认为,固定后的组织块如果不经封装,则先在0.1克分子浓度pH7.4的磷酸缓冲液中,在4℃时放置半天或一天后进行切片,效果较好。

### 2. 封装

冷冻切片中的封装步骤相应于普通超薄切片中的包埋。组织块是否经过封装,对组织的形态结构的保存影响不大。主要是对切片的质量能有所改进,特别是对一些易碎的组织,如淋巴结或分散的体系(细胞和细菌制剂)则封装是

必要的。冷冻超薄切片技术中使用的封装物质(封装剂),大都具有生物制剂的性质,如明胶,甲基纤维素,牛血清白蛋白,血纤维蛋白等,因此避免了在普通超薄切片中使用的毒害性较大的有机包埋剂。封装物质仅仅起一种外界包埋介质的作用,而不能渗透到细胞或组织内部,所以原则上和普通超薄切片中的包埋是不同的。

明胶的分子量约10万至100万,封装使用的明胶浓度为10%或20%的水溶液,在37℃时封装5—20分钟。再放入冰箱中冷却凝固<sup>[1]</sup>。由于明胶粘度较大,所以实际操作时,可先在80℃水浴中使其充分融熔,同时不断搅拌,再进行封装。

甲基纤维素的浓度为3—6%。在切片之前,在组织块上滴加一滴上述浓度的溶液,然后立刻浸在液氮中快速冷冻。如果先将样品用明胶封装,然后再用甲基纤维素支持,效果很好。并且有助于装样品,修样品及切片等操作。甲基纤维素尚可用来直接把新鲜的未固定的样品装载于切片机的样品头上。

在铁蛋白标记抗体技术中应用的牛血清白蛋白也可用作封装之用。方法是將浓度为10—20%牛血清白蛋白二甲砷酸盐缓冲液先用戊二醛交联,使之成为胶质状态,然后再逐滴稀释至最终浓度2.5%左右,在4℃时聚合2分钟。切片后,白蛋白在铜网上很易洗去。

冷冻切片时,修整组织块比较困难,所以在制备一般动物或植物组织时,可避免封装这一步骤,因为低温冷冻有一定的时间限制,不能花费很多时间来修整组织块,而且即使进行了修整,有时也会切到仅有明胶等封装剂而无组织的切片。

### 3. 抗冷冻处理

低温冷冻能在组织和细胞内引起冷冻损伤,主要是在冷冻过程中,组织和细胞内所含的水分结成小的冰块。冷冻组织内冰晶的形成和生长有不少的资料论述<sup>[3]</sup>。为了避免或减少冷冻损伤,除应采用快速冷冻外,在样品冷冻前,尚可进行抗冰冻处理。

组织块在快速冷冻前,可先浸入25—50℃

的甘油水溶液内 5 分钟至半小时, 然后立即进行冷冻, 效果很好。

Tokuyasu 比较了蔗糖、葡萄糖, 二甲亚砜, 甘油等抗冰冻效果, 认为蔗糖最好。蔗糖溶液浸泡不仅可以减少冰冻损伤, 而且对调节组织块的塑性也很有好处。因为组织块的塑性是影响切片质量的主要因素之一。一般讲, 最适切片条件是: 蔗糖浓度为 0.6—1.6 克分子浓度, 在冰浴中处理 10—30 分钟。但具体使用时, 应根据样品的性质和切片时的温度, 选择蔗糖的最适浓度以使切片顺利流畅。如在刀温  $-70^{\circ}\text{C}$  时, 对大白鼠的肾、肝、胰、睾丸等组织, 最适浓度为 0.9—1.1 克分子, 对横纹肌为 0.6 克分子, 对含有大量空泡和水分的组织, 如植物的茎、叶, 则蔗糖的浓度需增加至 1.4—1.6 克分子。

从资料报道看来, 有时未进行抗冰冻处理的样品也能获得较好的结果, 这主要还是决定于样品的性质。由于处理方法比较简单, 所以样品在冷冻前, 进行抗冰冻处理还是值得的。

#### 4. 冷冻

组织块的快速冷冻有直接和间接两种。直接冷冻最好使用液氮(沸点  $-196^{\circ}\text{C}$ )。我们也使用过干冰-乙醇。但样品冷冻以后, 不够坚硬, 造成切片困难。直接使用液氮时, 可将已进行抗冰冻处理的组织块先固定于样品头上, 快速浸入液氮后取出, 或将样品头先置于液氮之中, 然后将组织块浸入液氮固定于样品头上。前法简易省力, 速度较快。为了避免样品浸入液氮时的激烈蒸发, 引起对样品更多的冷冻损伤, 应用间接冷冻法也颇为广泛。此法是先使用液氮致冷一种液体(在液氮温度时)或固体, 然后再将样品冷却。被致冷的液体一般要求有较高的沸点和近于液氮沸点的熔点。目前使用较多的有丙烷(熔点  $-190^{\circ}\text{C}$ , 沸点  $-44.5^{\circ}\text{C}$ , 在  $-150^{\circ}\text{C}$  左右时粘度很低)和异戊烷(熔点  $-160^{\circ}\text{C}$ , 沸点  $+28^{\circ}\text{C}$ , 粘度较高)。还有氟利昂-12 ( $\text{CCl}_2\text{F}_2$ , 沸点  $-30^{\circ}\text{C}$ ), 氟利昂-13 ( $\text{CClF}_3$ , 沸点  $-81^{\circ}\text{C}$ ), 氟利昂-14 ( $\text{CF}_4$ , 沸点  $-128^{\circ}\text{C}$ ) 以及氟利昂-22 ( $\text{CHClF}_2$ , 沸点  $-41^{\circ}\text{C}$ ) 等。

间接法使用被致冷的固体是纯度较高的铜

块或铜棒, 一端磨平抛光, 使其余部分浸入液氮, 仅留抛光表面露出液氮液面, 待其温度冷却到近于液氮并达到平衡时, 将样品轻轻接触于抛光表面, 很快拿起, 这样也能获得效果很好的冷冻样品。

必须注意, 样品冷冻必须待切片机的冷冻装置已装入致冷剂, 样品架及刀架已冷至相当低温时才进行, 这样快速冷冻后的组织块及样品头可立即装入已冷却的样品架上, 待其冷却至需要温度并达到平衡。这样可以避免冷冻样品在装入样品架前熔化。

#### 5. 冷冻切片

在商品的冷冻超薄切片装置尚未问世以前, 早期的研究都是在各自的实验室中, 对普通超薄切片机进行改装, 配备自己设计的冷冻装置后进行的, 因此缺少规范化。

Christensen 发展的冷冻超薄切片装置避免使整个切片机置于低温状态, 而将冷冻区限制在一冷冻箱内, 冷冻箱内仅包括被致冷的样品架和刀架, 这样就使得更易操作, 亦更易获得较低的温度和热平衡, 同时也使切片机的进刀机构和冷却系统分开。目前商品生产的冷冻切片装置基本均按此设计, 并各有改进。

冷冻超薄切片装置使用的致冷剂可以有液氮或干冰-乙醇两种, 前者可使样品冷却到  $-170^{\circ}\text{C}$ , 至  $-150^{\circ}\text{C}$  左右, 后者分别为  $-70^{\circ}\text{C}$  及  $-50^{\circ}\text{C}$  左右。在实际操作中, 虽然两者都可使用, 但从致冷质量和切片效果来看, 液氮比干冰为好, 虽然操作略为麻烦一些。切片时, 冷冻温度的选择根据样品而异。当样品转化至所谓“玻璃态”时, 才能进行切片, 所以选择的温度必须低于“玻璃态”转化点的温度, 至于刀温的选择, 需要根据切片时的平滑完整和切片后的伸展漂浮条件而定, 所以决定于样品及槽液两个方面。报道中切片时的样品温度从  $-20^{\circ}\text{C}$  至  $-90^{\circ}\text{C}$ , 刀温自  $-20^{\circ}\text{C}$  至  $-60^{\circ}\text{C}$  不等, 但对一般动物组织而言, 多数人认为以样品温度  $-70^{\circ}\text{C}$ , 刀温  $-50^{\circ}\text{C}$  时切片最为适宜, 因为样品温度低于  $-80^{\circ}\text{C}$  时, 发现切片容易碎裂, 质量较差。我们在样品温度  $-50^{\circ}\text{C}$ , 刀温  $-30^{\circ}\text{C}$  时, 也能获

得连续切片,但切片厚,电子束不能透过的“盲片”多。使用干冰-乙醇致冷时,就难以经常保持样品温度 $-70^{\circ}\text{C}$ 水平,如温度升高至 $-50^{\circ}\text{C}$ 以上,有时样品表面或部分熔化,即难获得切片。

冷冻超薄切片时,可以用玻璃刀或金刚刀,并有干刀法及湿刀法两种方法进行切片。

**干刀法** 干刀法不用槽液,使刀片直接沿着刀面伸展。干刀法方法简便,操作比较容易。但使用干刀时,捞片比较困难,资料中报道的几种方法常不能使用。如使用睫毛式探针将切片捞起,放至有膜铜网上,再用铜棒的抛光端进行压平伸展,实际操作却有困难,切片捞起时,常易沾在一起,而且切片一离刀面,就易溶化,有时肉眼不易找到,用铜棒压平有使切片沾掉和重叠的可能。也有介绍使用探针尖端蘸住饱和蔗糖溶液或2.3克分子浓度的蔗糖溶液一滴,至刀面上将切片沾起,因高浓度蔗糖溶液即使在 $-50^{\circ}\text{C}$ 时也不易立即结冰,有5—15秒的时间允许将切片转移至铜网上。但我们发现,高浓度蔗糖溶液粘性很大,不易干燥,当使铜网表面覆盖于蒸馏水表面进行洗涤时,切片常易漂散。我们先用探针将切片轻轻拨至刀面稍后,以免捞取时损伤刀锋,然后直接在铜网膜上滴加一滴磷酸缓冲液,进行捞取,此时需要动作迅速,落点准确最好能沾住切片,一捞而上,如果缓冲液碰上刀表面,则表面上立即结成冰滴,影响部分切片捞取。

干刀法除切片捞取比较困难外,切片重叠和皱曲也比较厉害。

**湿刀法** 湿刀法即使用槽液切片。冷冻超薄切片的槽液要求具有低的熔点,同时在低温时,能满足普通超薄切片时对槽液的一些要求,即相对样品来讲是惰性的,对漂浮切片有合适的粘度,有足够的表面张力以使刀片滑动等,目前使用的槽液有乙二醇,甘油,二甲亚砜(DMSO)和二甲基乙酰胺(DMA)。后者本身是一个抗冷冻剂。使用乙二醇时,可以用乙醇或水根据不同刀温时槽液合适的粘度与乙二醇配比成不同的混合溶液,如在刀温 $-80^{\circ}\text{C}$ 时,

乙醇和乙二醇的比例是1:1,目前使用较为广泛的是二甲亚砜。二甲亚砜溶于水,在刀温 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $-30^{\circ}\text{C}$ 时可使用40%的水溶液,在 $-50^{\circ}\text{C}$ 至 $-80^{\circ}\text{C}$ 时则可配成50%的水溶液。使用槽液后,切片漂浮伸展于液面,不易重叠,捞片时和普通切片一样并无困难,所以切片的质量易于保证。但使用槽液时封刀比较麻烦,要小心避免漏液,如进行细胞化学或免疫化学研究最好能避免使用。

## 6. 染色

由于生物样品本身的限制,所以冷冻超薄切片的染色步骤还是需要的。有些细胞内,由于物质的局部集中,或含有重金属原子的组成,所以不用染色也能粗粗分辨,但对高分辨的形态显微观察终究是不够的。冷冻超薄切片的染色大都采用负染的方法,特别是观察要求分辨率比较高的切片。负染染色剂一般应用2—3% pH 7.0 或 7.2 的磷钨酸水溶液,用0.1当量的NaOH或KOH中和,染色时间为20—30秒,然后用滤纸吸干,也可将切片漂浮于染色剂表面5—10秒钟然后用滤纸吸干,酸性的磷钨酸染色剂对染多糖类物质效果较好。其它的染色剂尚有4%的硅钨酸钠水溶液,切片漂浮于染色剂表面( $37^{\circ}\text{C}$ )10—15秒钟,再用滤纸吸干,此外,还有醋酸铀染色剂。在捞片后,未等切片完全干燥进行负染,效果较好,如用二甲亚砜作为槽液,则切片必须先仔细地进行洗涤。

冷冻切片的正染和普通切片相仿,即用经典的醋酸铀和柠檬酸铅双重染色法,但染色时间缩短。醋酸铀用0.5%的水溶液,室温,染色时间1分钟至5分钟,然后用柠檬酸铅染色,室温,5秒钟至1分钟,再用蒸馏水洗涤。

上面介绍的是冷冻超薄切片技术的基本步骤,由于这一技术尚在不断的改进和发展之中,所以尚缺少如普通超薄切片的规范化,从资料中可以发现各实验室在具体处理方面有很多细节的不同,对实验结果也缺少综合分析和比较,现将具有代表性,作者认为结果较好的几种方法综合于表1,以资比较。

表1 冷冻超薄切片技术的几种代表性方法

| 固 定                                        | 封 装                                                             | 抗冰冻                                                    | 冷冻                         | 切片温度           |               | 槽液                                    | 染 色                                                                     |                                               | 参 考 资 料                                                                       |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|                                            |                                                                 |                                                        |                            | 样品             | 刀             |                                       | 正 染                                                                     | 负 染                                           |                                                                               |
| 2.5% pH7<br>戊二醛<br>1小时/冰浴                  | 2%明胶<br>1小时/37℃                                                 | 50% 甘油/<br>30分钟<br>75% 甘油/<br>75分钟<br>100%甘油/<br>100分钟 | 液氮                         | -110℃          | -40℃          | 60%二甲亚砷                               | 醋酸铀<br>柠檬酸铅                                                             |                                               | Dollhopf, F. L.<br>等: <i>Microskopie</i> ,<br>25, 33, 1969.                   |
| 2.5—3% pH7.4<br>戊二醛<br>15分钟/4℃             |                                                                 |                                                        | 液氮                         | -70℃至<br>-140℃ | -50℃至<br>-70℃ | 60%二甲亚砷                               |                                                                         | 4% 硅酸钠<br>37℃<br>1% 磷钨酸<br>pH7.2,<br>37℃      | Seveirs, L.:<br><i>Proc. 7th. In-<br/>tern. Congr. E.<br/>M.</i> 1,423, 1970. |
| 2.5% pH7.2<br>戊二醛<br>1小时/室温<br>或4℃         | 10—20%明胶<br>5—20分钟/37℃<br>封装后4℃保存<br>3—4天切片                     | 30%甘油<br>5—15分钟                                        | 液氮或<br>液氮致冷<br>的异戊烷或<br>铜块 | -70℃至<br>-90℃  | -40℃至<br>-70℃ | 干刀<br>或50%二甲亚砷或<br>50%甘油              | 醋酸铀1<br>分钟, 柠<br>檬酸铅5<br>秒—1分<br>钟                                      | 1—2%<br>pH7.2<br>磷钨酸<br>10—20秒/<br>40℃        | Bernhard, W.等:<br><i>J. Cell. Biol.</i> ,<br>49, 731, 1971.                   |
| 4%甲醛或<br>1—2.5% pH7.2<br>戊二醛<br>50—60分钟/4℃ | 2.5% 牛血清白<br>蛋白<br>2分钟/4℃, 封<br>装后<br>2.5% 戊二醛固<br>定<br>15—30分钟 | 20%二甲亚<br>砷<br>10—20分<br>钟/室温                          | 液氮                         |                | -50℃或<br>-70℃ | 50%二甲<br>亚砷或<br>50%二甲<br>亚砷加<br>10%甲醇 | 醋酸铀1<br>分钟, 柠<br>檬酸铅5<br>秒—1分<br>钟                                      | 1—2%<br>pH7.2的<br>磷钨酸<br>10—20秒/<br>40℃       | Kuhlman, W. D.<br>等: <i>J. Ultrast.<br/>Res.</i> , 35, 370,<br>1971.          |
| 1—5% pH7.4<br>戊二醛<br>30—120分钟              | 20—30%牛血清<br>白蛋白                                                | 0.6—1.6克<br>分子浓度<br>的蔗糖<br>10—30分<br>钟/冰浴              | 液氮或<br>液氮致冷<br>的铜块         | -50℃至<br>-90℃  | -50℃至<br>-90℃ | 干刀                                    | 2%锇酸5—<br>60分钟或<br>0.5—2%醋<br>酸铀5秒至<br>10分钟,<br>0.5% 柠檬<br>酸铅5秒至<br>1分钟 | 0.2—0.5%<br>pH7的磷<br>钨酸或<br>0.5% 醋酸<br>铀1—15秒 | Tokuyasu, K.<br>T.: <i>J. Cell.<br/>Biol.</i> , 57, 551,<br>1973.             |
| 2.5%<br>戊二醛<br>30—60分钟                     |                                                                 | 30%甘油<br>30—60分钟                                       | 液氮致<br>冷的氟<br>利昂-<br>12或22 | -70℃           |               | 50%二甲亚砷                               |                                                                         | 醋酸铀磷<br>钨酸                                    | Sjöström, M. 等:<br><i>Science Tools</i> ,<br>21, No. 2—3,<br>1974.            |

## 冷冻超薄切片技术的应用和存在的问题

冷冻超薄切片技术发展至今不过十年的时间,但已在一些研究工作中渐露苗头,受到大家越来越多的注意。冷冻超薄切片技术,要求工作人员的熟练程度较普通切片为高,但一经掌握,由于缩短了样品的制备时间,所以一般从取样到获得切片可以不超过半天时间,这就为快速、简便的电镜切片观察开辟了一条新的途径,也许能在临床医学上得到应用,但更主要的是冷冻超薄切片技术比普通切片在某些专门研究方面具有较多的优越性,或能弥补后者的不足。

### 1. 冷冻超薄切片在组织学和细胞学的显微结构方面的应用

从已发表的资料来看,冷冻超薄切片对组织和细胞的显微结构的保存尚为良好,所获得的显微结构和普通超薄切片的结果比较一致,可以互为印证,由于减少了一系列普通超薄切片所必需的化学处理,所以大部分细胞物质,如细胞内的脂蛋白、糖蛋白和核蛋白系统均能很好保存,显微结构较少受到影响,有时还能观察到一些在普通超薄切片中未能看到的结构,例如在细胞或细胞器负染的膜结构部分常能显示一些颗粒性物质,这些类脂性的颗粒在普通超薄切片时,由于受到有机溶剂的处理而不能保

存；由 20% 类脂质和 80% 蛋白质组成的线粒体结构的冷冻超薄切片可以观察到 50—100 埃的颗粒<sup>[4]</sup>；内质网膜上的核蛋白体呈现出一种扁平的结构。脊椎动物的横纹肌中，A 带粗丝的主要物质是肌球蛋白，虽然早在 1967 年 Huxley 等根据 X 光衍射结果，提出了肌球蛋白

分子在 A 带粗丝排列的模型：即每一肌球蛋白分子的球蛋白头部每隔 14.3 毫微米围绕粗丝长轴旋转 120 度伸出粗丝之外，但是电镜的普通超薄切片工作中都始终未能证实，尽管横纹肌的电子显微镜研究为解决肌肉的结构与功能问题，即结构模型和收缩机制之间的关系远在



图 1 大白鼠大腿横纹肌冷冻超薄切片

2.5%，pH 7.2 戊二醛固定 60 分钟，0.1M，pH 7.2 磷酸缓冲液洗涤二次，冰箱过夜。30% 甘油处理 30 分钟，液氮快速冷冻，湿刀法切片。槽液 50% 二甲亚砜。切片时样品温度  $-70^{\circ}\text{C}$ ，刀温  $-50^{\circ}\text{C}$ ；2%、pH 7.2 磷钨酸负染 1 分钟 15,000 $\times$

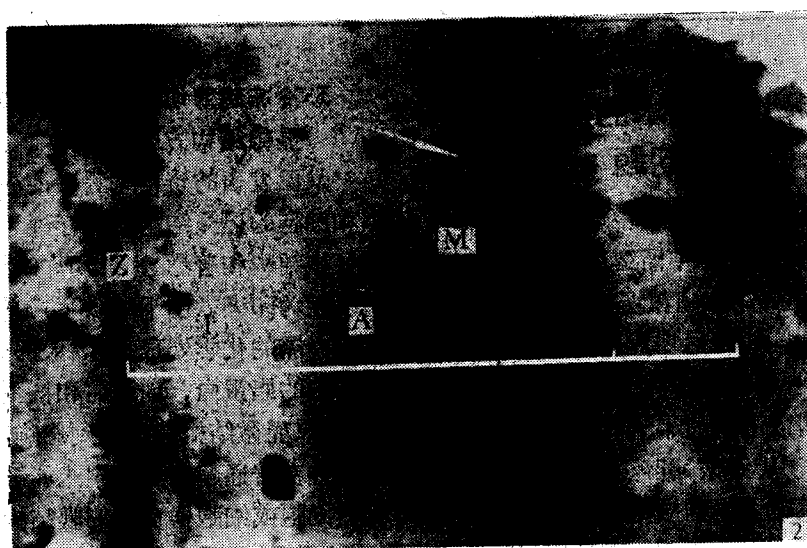


图 2 大白鼠大腿横纹肌冷冻超薄切片

条件同图 1，箭头所示可以看到清晰的 A 带粗丝及横纹结构

33,000 $\times$

其它组织之上。Sjöström<sup>[5]</sup>等在横纹肌的冷冻超薄切片研究中首次发现,A带粗丝具有43毫微米的周期,每一周期中尚有3条细线,完全证实了X光衍射的结果。同时在A带中M区的观察结果发现,M区中共有5条间隔为21—22毫

微米的带,也是第一次从电镜工作方面证实粗丝的M区是由肌球蛋白分子的长尾——轻酶解肌球蛋白构成。我们从小白鼠大腿横纹肌的冷冻超薄切片中看出,由于用磷钨酸负染,所以图象和正染不同,但粗看起来,结构仍然和正染的



图3 大白鼠肌腱结缔组织冷冻超薄切片  
干刀法切片其余条件同图1 33,000×

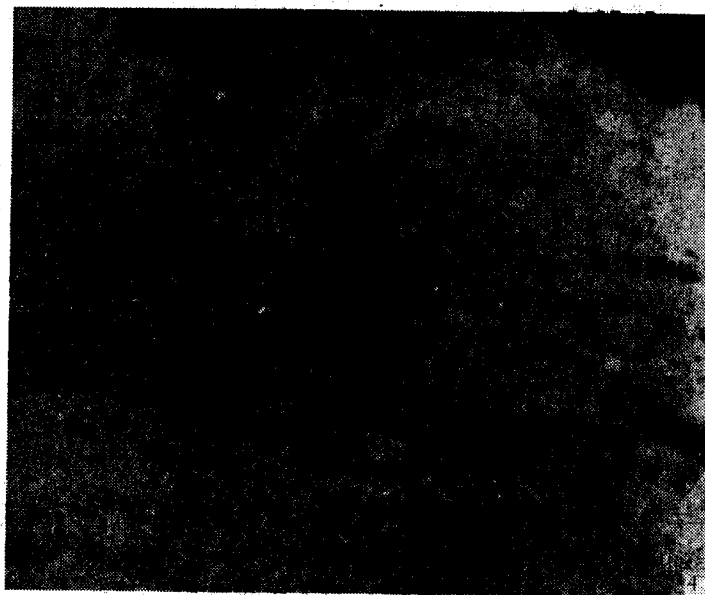


图4 大白鼠肌腱结缔组织冷冻超薄切片  
横纹结构清晰 66,000×

普通切片一样，A带，I带，Z线和M区相当清楚，肌小节长度约3微米(图1)，有些图中粗丝清晰可辨，粗丝宽度约35毫微米，尚能看到似有约22—24毫微米横纹间距(图2)。

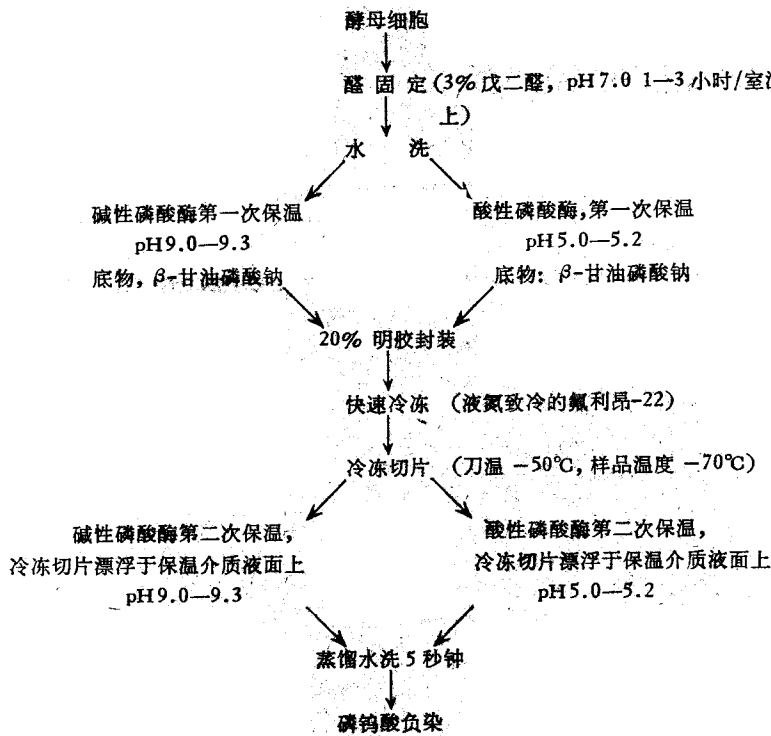
对小鼠肌腱结缔组织的冷冻切片观察，可以看到成束的胶原纤维并列，胶原纤维的特征——横纹间距也清晰可见，间距周期约680埃，和普通超薄切片以及离体聚合的胶原纤维600—625埃相似，说明冷冻超薄切片处理时对组织收缩影响较小(图3，图4)。

2. 冷冻超薄切片在细胞化学和免疫化学研究方面的应用

电子显微镜的酶定位和标记抗体(铁蛋白标记和酶标记)的研究虽然已有不少的报道，但方法问题还没有根本解决。这主要受到两个因素的限制，即酶活力或抗原性被破坏或抑制和

蛋白质标记的抗体分子或其它物质(如酶的底物)难于渗入到细胞内部所致。冷冻超薄切片原则上能解决上述两方面的问题，并且使反应时间缩短，方法简单化，所以有人认为，冷冻超薄切片为开展细胞化学和免疫化学研究所提供的广阔的可能性是这一技术的最大价值。Leduc首先指出了在冷冻超薄切片上进行专一酶反应的可能性(酸性和碱性磷酸酶，酯酶，三磷酸腺苷酶等)。Iglesias报道，在冷冻切片进行酶反应20分钟后，就能看到碱性磷酸酶和底物反应的沉淀物。Leung报道了，在大白鼠肾脏的冷冻切片上对5'-核苷酸酶定位的研究，发现在微绒毛膜的二边都有酶反应产物的沉淀。Bauer等应用二次保温的方法对酵母细胞的酸性和碱性磷酸酶的研究可以作为一个比较简单的方法予以介绍(表2)。

表2 酵母细胞酸性和碱性磷酸酶定位的冷冻切片制备方法



迄今为止，用电子显微镜观察铁蛋白标记抗体的研究仅对确定细胞外抗原有效，而对细胞内的抗原定位则比较困难。用二次切片(第一步厚切片)或超薄切片表面反应虽能减少标

记抗体通透的困难，但因抗原性减弱，有机包埋剂的非专一性的吸附又相当强，所以影响效果。蛋白质包埋方法对克服上述困难虽有一定好处，但也有一些自身的问题。应用冷冻超薄切

片,结合铁蛋白标记抗体技术能克服上述困难,结果令人满意。例如 Painter 等应用核糖核酸酶的铁蛋白标记抗体(兔)对牛胰的冷冻切片定位的研究,发现铁蛋白标记集中于细胞内酶原和粗糙内织网膜结构的周围,在细胞核,线粒体及一般胞质区无大量的标记。如切片先用没有标记的抗体保温反应,再用标记抗体反应,则在切片上也不能看到铁蛋白标记,说明后者已不能再和抗原反应。在兔胰脏的冷冻切片上也看不到标记抗体,说明牛与兔的核糖核酸酶在抗原性上没有交错反应,这一点用奥氏扩散法也得到证实。Scott 等也报道过使用碱性磷酸酶标记抗体来确定碱性磷酸酶本身在冷冻切片上的定位。

### 3. 冷冻超薄切片在一些特殊样品方面的应用

有些生物样品在一定程度上不太适合普通超薄切片的制备方法。一种情况是有些样品经过制样处理后,组织结构将会受到很大破坏和损伤,例如某些含类脂质特别丰富的分离的细胞器,病毒等样品,虽然它们在电镜下能看到一定的结构,但是由于类脂质的抽提,导入了系统的结构变化和假象。另一种情况是按照普通超薄切片制备方法不易得到质量较高的切片,例如酵母细胞的样品制备就属于这一情况,酵母细胞具有较厚的纤维素细胞壁,所以包埋剂等物质很难渗进细胞内部,由于细胞质和细胞壁的塑性相差很大,所以切片比较困难,不易获得高质量的平整的超薄切片。有时,只好剥离细胞壁,直接制备原生质体的超薄切片样品。在这种情况下,冷冻超薄切片就可以发挥其固有的长处,获得较为理想的结果。

### 4. 冷冻超薄切片在无机离子的微区分析,放射自显影和其它方面的应用

无机离子(电解质)由于在普通超薄切片制样时经受了处理,所以不能在组织内保存,这样的样品就无法进一步用来对细胞的微区进行无机离子的定量或定性分析,而无机离子在一系列生命活动中起着极为重要的作用。用未经固定的,不经封装的,干刀和没有染色的冷冻切片

结合分析电子显微镜的X光微区分析仪测定,可以在能分辨的显微结构内测出可溶性电解质的含量,例如 Appleton<sup>[7]</sup>测定了鼠胰脏外分泌细胞冷冻切片的钾、钠、磷、钙四种元素,发现在细胞核、粗糙内织网膜、细胞质、分泌泡等不同细胞器区域内,四种电解质的含量各不相同。

电子显微镜的放射自显影技术也在逐步的提高和发展,这一技术对一些大的、不溶性的分子定位还是有效的,但对小的、易扩散的分子或离子目前尚不能确定,原因和上述相同。因此原则上,用干刀进行的未经固定和染色的冷冻切片应有助于这一技术的提高,但目前要获得大量的平整的冷冻切片尚有困难,所以虽然在国际会议上曾不断提出过报告和设想,但完整的工作报道尚未见到。

不少电镜工作者曾多方设法企图在电镜下观察“活”的完整细胞或处于含水状态的自然的生物组织,以利于更好地建立结构和功能之间的联系。使用高压或超高压电子显微镜来观察处于隔离样品室中的“活”细胞或“潮”组织,是一条途径,但由于有机物质在任何气体中,特别在水蒸气中(样品周围的水及组织和细胞内部含有的水)易在较强的电子束照射下,发生放射性的化学反应,导致显微结构的破坏和损伤。应用冷冻超薄切片结合电子显微镜的低温样品室部件,在低温时,进行电镜观察,可以避免上述的放射性化学反应并达到观察含水的自然的生物组织的目的。

从上述可知,冷冻超薄切片技术具有一定的优点,至少可以弥补目前广泛使用的普通超薄切片的一些不足方面。但冷冻超薄切片自身也有一些不足。例如,这一技术虽然避免了一系列普通超薄切片需要的化学处理,因而减少了对组织结构的影响,消除了不少形态学方面的畸变,但冷冻本身也给组织带来很大的影响,导入一些结构的假象,其中以细胞或组织内微冰粒的形成最为主要。由于冰粒的形成,使某些含水丰富或空泡较多的组织(例如一些植物组织,嫩叶或芽等),在冷冻后,显微结构较难保存好,所以虽然对植物组织的冷冻切片也有尝

试,但数量甚少,也未见有系统的形态学方面的研究报道。同时这一类组织要获得高质量的,冷冻连续切片也比较困难,因为切片的平滑和连续性在很大程度上决定于组织块的塑性。一般讲,如果样品内蛋白质成分多,则塑性好,切片也比较容易,切片的质量也高。相反,如果水分多,则在冷冻切片的情况下,就是一个不利的因素,切片连续性差,易碎,不易切好,虽然用蔗糖等对组织块进行浸透可以有所调整。冷冻切片技术由于发展历史短,所以从方法上讲,尚未很好定型,要获得大量的高质量切片不太容易。这也可从已发表的资料中看出,绝大部分照片所取的区域都比较小,说明薄的、质量高的切片区不多或者不大,这主要是因为冷冻切片比较厚,一般在800—1000埃左右,最薄也在500埃左右。所以观察时,在可能条件下,电镜的高压要比观察普通切片稍高,但即使这样,似

乎还存在有部分“盲片”,即电子束不能通过的厚切片。冷冻超薄切片技术在切片操作时比较麻烦,要求熟练程度也高一些。由于这一技术发展历史较短,目前尚在不断改进和提高之中,所以有些问题相信在实践中可以不断予以解决。

## 参 考 文 献

- [1] Bernhard, W. J. et al.: *J. Cell. Biol.*, **49**, p. 731, 1971.
- [2] Tokuyasu, K. T.: *J. Cell. Biol.*, **57**, 551, 1973.
- [3] Tokio, Nei: *J. Microscopy*, **99**, Pt. 2, 1973.
- [4] Tokuyasu, K. T.: *8th Intern. Congr. on EM.*, **2**, 34, 1974.
- [5] Sjöström, M. et al.: *Science Tools.*, **22**, No. 1, 1975.
- [6] Painter, R. G. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, No. 6, 1973.
- [7] Appleton, T. C.: *J. Microscopy*, **100**, Pt. 1, 1974.

[本文于1977年6月3日收到]

# 荧光量子产率的测定

郭 尧 君      雷 克 健

(中国科学院生物物理研究所)

荧光量子产率(亦可称量子效率)是表示一个物质荧光特性的重要参数。它表示物质发射荧光的本领。通常用 $\phi$ 表示。其定义为物质发射荧光的总能量与吸收能量之比,也就是处在电子激发态的分子发射荧光的几率。根据这个定义,量子产率只能小于或等于1。

$$\phi = \frac{\text{发射量子数}}{\text{吸收量子数}}$$

量子产率的测定方法大致有相对法和绝对法两种,在50年代前后,大多用绝对法来测定量子产率<sup>[1]</sup>。绝对法是将待测样品与一个不损失激发光的全反射或全漫射的标准进行比较。标准可采用一个涂以氧化镁的平面屏。但是以荧光溶液代替漫射屏测量时,辐射的空间分布有差异,所以测定有很大的不可靠性。以后利用肝糖元溶液的单色光的偶极散射强度作为单位

量子产率的标准,与在激发波长具有同样表现光密度的溶液的荧光进行比较。如果散射和荧光是纯的偶极发射,在与激发方向成直角辐射的线偏振光就可以确定辐射的空间分布。这种空间分布与两个溶液在同一方向的发射强度的比较可以用于确定两者的总的发射,由此就可以求得试样的量子产率。

绝对量子产率测定法由于方法繁琐,容易引入误差,所以现在很少采用,而大多采用相对量子产率测定法<sup>[2]</sup>。

溶液稀时,荧光强度与激发光强度以及荧光量子产率之间有如下的关系:

$$F = KI_0 c l \phi \quad (1)$$

这里  $F$ ——荧光强度;  $K$ ——仪器常数;  $I_0$ ——激发光强度;  $c$ ——样品浓度;  $l$ ——吸