

因子不存在时,转录就随机地从 DNA 模板上任何一点开始,好象许许多多生理功能缺陷型的“重迭基因”,合成的蛋白质或多肽分子长短参差,丧失正常的生理功能。在生命的早期阶段,可能还没有发展出 σ 因子的辨认机制,因而一个 DNA 链就成为许多的“重迭基因”,这也造成了密码子出现的随机性。现代生物的重迭基因就不再是随机的了。即使是 $\phi x-174$ 、G 4

和 λ 噬菌体以及 SV-40 病毒的重迭基因,也都有固定的起点。

参 考 文 献

- [1] 徐京华:《生物化学与生物物理学报》,1962年,2卷,1期,第31—32页。
- [2] 王身立:《遗传与育种》1978年,第1期,31—32页。

[本文于1978年10月23日收到]

专题 讲 座

冰冻超薄切片法及其在超结构形态学上的应用

徐 伟 门绍杰

(中国科学院生物物理研究所)

为了克服常规超薄切片术中采用的强烈化学固定、有机溶剂脱水 and 塑料包埋等步骤所带来的结构损伤和分子活性丧失等缺点,人们发展了如水溶性树脂包埋法、冰冻干燥法、冰冻刻蚀法、冰冻置换法及冰冻超薄切片法等新制备技术。60年代中期 Bernhard 等首次建立冰冻超薄切片术的基本方法和仪器。后又经 Appleton^[1], Beruhard^[2], Christeusen^[3] 和 Tokuyasu, K. T.^[4] 等人的努力,在技术和应用方面都取得了很大发展。70年代初期,商品冰冻超薄切片装置,如 LKB “Cryokit”, Sorvall “FTS bowl” 及 Reichert “FC-150” 等问世,进一步促进了这一技术的发展。本文对冰冻超薄切片术加以介绍。

生物材料的冰冻

冰冻法固定的优点在于可制备含水样品,使生物结构尽可能保持接近活体的状态;防止了可溶性物质的抽取、流失和移位;保持生物大分子的活性;使样品便于切片。

最理想的是在瞬间使整个细胞中的各部分都迅速冻结。这样不仅使结构形态和大分子活性得到良好的保存,而且细胞中的水分不会冻结成大的结晶体,只出现结构损伤不明显的无定形微晶态,即所谓“玻璃态”。可是生物材料

的热传导率很低,达到这样理想的冰冻状态是很难的。在较慢的冰冻速度(1度/秒)下,细胞外层的溶液中的水分首先冰冻,从而使溶质向未冰冻区域迁移,形成相分离,造成了形态的畸变。同时,溶质的迁移造成溶液中 pH 值的重大变化,进而使蛋白质等分子的构型发生变化。冰晶界面上的表面张力也会使蛋白质变性。较高的冰冻速率(大于 10^4 度/秒)由于热传导快,因而形成玻璃态,也减小了溶质迁移的破坏作用。所以提高冰冻速率是保持形态完好的关键。然而,目前所采用的冰冻方法,即使是很小的样品,也只能使样品块表面以下几微米到几十微米的范围内达到所谓“玻璃态”。

通常的冰冻条件下,事先将生物样品用甘油、蔗糖或二甲亚砜一类溶液浸透,则可抑制冰晶产生。

冰冻超薄切片的制备

制备冰冻超薄切片的程序大体上可分为两类(图1)。

理论上讲,不经固定、包埋和染色等溶液处理制备冰冻切片是最合乎需要的。这正是无溶液制备法追求的目标。它利于生物材料中可溶性物质不致流失,有利于保存生物大分子的活

性和天然构型。这样制备的切片适合于可溶性物质的放射自显影和元素的X射线显微分析研究等。A. K. Christensen, Hodson^[5]等发展的方法均属这一类。然而,要较好的保存细微结构,又使切片适合于高分辨率的研究,需省略样品制备的某些程序,例如戊二醛固定等,但目前还是不可能的。

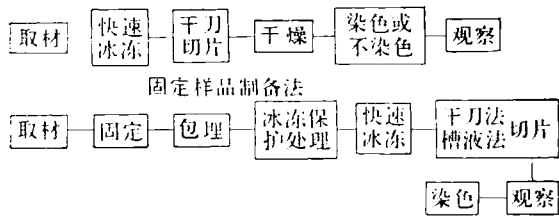


图1 冰冻超薄切片的基本制备程序

第二类制备方法是采用温和固定剂,如戊二醛等,并进行冰冻保护处理等步骤。由于戊二醛对蛋白质的交联作用,不仅较好地保存了样品的细微结构和生物大分子的部分活性,而且使样品强度增大,利于切片和切片的后处理。

1. 固定 通常用戊二醛作固定剂,也有使用甲醛、锇酸蒸气、丙烯醛蒸气等的,但效果均不如戊二醛好。

由于实验目的和材料的不同,固定方法差异颇多。对于一般形态学或细胞化学而言,用0.1 M 二甲砷酸钠缓冲(pH 7.2)的2.5%戊二醛溶液,在4℃或室温下固定1小时,可作为一种标准的方法。对于特定的目的和材料要依具体情况而定。例如Tokuyasu^[6]等发展了若干种更加温和的固定方法以产生均匀的和较低程度的样品交联,大大提高了免疫铁蛋白标记细胞内抗原的特异染色的程度。如采用0.2%戊二醛在4℃下固定15分钟,使红血球结构保持完整,而特异铁蛋白标记量增加10倍。

F. S. Sjöstrand等详细探讨了戊二醛交联对于保存生物膜中蛋白质分子构型的作用。用高浓度戊二醛长时间固定会造成蛋白质变性。他们使用1%戊二醛对鼠心肌组织进行5分钟短暂固定,很好地保存了线粒体的内膜结构。

此外,Werner等对于精子和酵母一类单细胞材料,使用5%戊二醛固定10分钟,并在固

定液中添加7.5%的聚乙烯吡咯烷酮作为冰冻保护剂。也获得良好的结果。

2. 包埋 W. Bernhard^[2]认为获得大面积的平整切片最好对样品进行包埋。常用的包埋剂有明胶、甲基纤维素、醛交联的牛血清蛋白等。此外,Iglesias等使用了Cryoform,永山使用了蔗糖与一种聚合物Ficoll的混合物,Melcan等则建议对蛋白质不易渗透的组织使用短杆菌肽等多肽物质做包埋剂。这些包埋剂分子量都较大,它们并不渗入细胞中,只到达细胞间隙,以增强样品块的硬度便于切片。

我们对于一般的组织,不用包埋。事实证明,完全可以获得大面积平整切片。(见封二图2、3、4)。

3. 冰冻保护处理 我们的经验证明:在一般的冰冻条件下,保护处理对于防止冰晶产生,保存优良的形态学结构是非常有效的。对于一般的动物组织,我们通常采用30%甘油溶液处理10—20分钟,效果较好。但可根据组织的软硬,适当改变甘油浓度和处理时间。但过高的浓度或过长的处理时间则会影响切割性能。除甘油外,有些作者还使用20%二甲基亚砷,5%的聚乙烯醇或1%阿拉伯树胶等。

K. T. Tokuyasu把组织片放在化学惰性的蔗糖等溶液中,冰浴中浸10—30分钟,使组织部分脱水后进行冰冻。这不仅防止了冰晶产生,而且能够调节组织块的塑性,有利于切片。最佳的蔗糖浓度为0.6—1.6 M,浸渍时间则由蔗糖浓度,组织块大小来定。为了获得平整切片,则应把蔗糖浓度选择和切片温度选择结合起来。

我们对蔗糖和甘油溶液的处理效果进行了比较,发现用甘油溶液处理的效果比蔗糖好。在同样的冰冻条件下,甘油溶液的防冰晶效果更显著。此外,甘油有助于负染色剂的铺展,负反差染色均匀,而蔗糖不易从切片上洗掉,造成切片的污染。

4. 冰冻 快速冰冻是获得优良冰冻超薄切片的前提。要获得10⁴度/秒的快速冰冻是不容易的。首先,样品块必须小于1厘米³。样品

支持物也应尽可能小,且热导性要好。我们的比较实验证明,采用小的金属钉(银制或铜制的)做支架比凹槽形的效果要好。

常用冰冻方法有三种:(1)用液氮做冷媒,将样品块放在样品架上,一起投入液氮。这种方法简便。但当样品块投入液氮后,在样品块周围的液氮迅速汽化而形成绝热的汽泡层,从而大大降低了冷却速度。因此效果往往不佳。但如果使用金属钉样品支架和较小的样品块,对一般组织仍可获得较好的冰冻;(2)为克服上述缺点,利用某些低熔点高沸点的液体作为中间冷媒,以防在其冰点附近的温度下产生汽泡绝热层。常用的中间冷媒有丙烷、异戊烷、氟里昂 12 和氟里昂 22 等。操作方法是先将一金属容器放入液氮浴中,将中间冷媒通入该金属容器内,待冷媒凝固后,将容器从液氮中取出,待冷媒开始融为液态时,立即将样品投入,经 1—2 分钟后即可完成冰冻,然后将样品转移至液氮中,可长时间保存。这是目前最常用的方法;(3)金属接触法。最先用于冰冻置换法中。将一个铜块放在液氮中,待温度平衡后,将样品与金属块接触而迅速冰冻。此法简便,效果良好,特别适合于无溶液制备法中。缺点是接触压力不易控制,压力过大会使样品变形。酒井^[7]改用一块铜板,立于液氮中,样品从侧面接触铜板 0.3—0.5 秒,然后投入液氮。我们自制了厚度为 7 毫米,面积 30 × 40 毫米的紫铜板,使用效果较好。Dempsey 曾用冰冻置换法对不经冰冻保护的样品同时采用氟里昂 12 和铜块接触法冰冻。比较证明,铜块接触法效率更高。无冰晶损伤区域可达样品表面以下 12 微米。此外 Seve'us 等还研制了一套辅助工具。其中冰冻铸型工具可在冰冻样品的同时,使样品铸成金字塔形,省略了修块的步骤。

5. 切片 冰冻后的组织块连同样品架,应尽快地从液氮中转移到达温度平衡的样品头上,然后将冷室的盖子盖好,以防在样品和刀上结霜。切片过程中应尽量减少打开盖子的次数。

和树脂包埋切片一样,为获得良好的切片带,需要修整组织块。一般均采用在解剖镜下,

用预冷的长柄刀片在液氮液面下修块或用切片机修块。这些方法都不易操作。如前所述,最好的冰冻固定只产生于样品块表面下几微米至几十微米的范围内。修块时的粗鲁操作会使最好的结构保存部位丢失,其结果是获得满目冰晶损伤的图像。我们发展了一种预修块法。在取材时,把组织切成厚度小于 1 毫米的片。在戊二醛中固定一段时间,由于蛋白质的交联而使组织块变得较硬。再用刀片仔细切成小于 1 毫米³的边缘整齐的方形或梯形小块。将这样小块按一定方位放在样品架上,再调整样品架和样品头,使样品块的前平面平行于刀刃。切片时,只需将块的前平面稍加切修即可开始切片。样品放在样品架上时,应加适量的甘油或蔗糖等溶液,使样品牢固地冻在架上,但加得过多会造成切片时的困难。

切片方法分为液槽法和干刀法两类:

(1)液槽法 用槽液来支持和展平切片。槽液须是在低温下不冻结的液体。已被采用的有二甲基亚砜(DMSO),甘油,异戊烷,以及氟里昂,液氮等。最常用的是 DMSO 溶液,50% 的 DMSO 溶液在 -50℃ 时不冻,60% 的在 -60℃ 下不冻。但 DMSO 不适用于某些细胞化学和免疫化学的工作。用槽液法易于获得大面积平展的切片。各种最佳切片参数的选择方法和常规切片基本相同。冰冻切片一般使用 5 毫米/秒以下的切速为宜。温度的选择受到槽液冰点的限制。使用 DMSO 槽液时,通常选用的样品温度为 -60℃—-70℃,刀温 -50—-60℃。两者相差 10—20℃ 为宜。过高的温度有使样品发生再结晶的危险。切片厚度无法准确判断和测量,因为切片没有树脂切片时的干涉色。一般用切片机的厚度标尺来估计,但这极不准确。当平整的切片较薄时,可以看到切片有如极薄的透明玻璃纸一般。

从槽液表面捞取切片,最好采用 Marinozzi 的塑料环套法。我们使用自制的内径约为 2 毫米的塑料小环,套住槽液表面的切片带,然后将携带有一滴槽液及切片的小环用镊子夹起,并迅速转移至蒸馏水表面上,使切片融化并洗去

槽液。再将环移至染色液表面染色。此后将环夹起套在一片带膜的格网上,下面衬以滤纸,染色液很快被吸干,切片平整地落在格网上。在细胞化学工作中,亦可用环携带切片放在反应介质表面上进行孵育。这种捞片法比用格网直接在槽液上捞取好。

(2) 干刀法 不使用槽液,直接在干刀上切片适合于必须避免使样品与槽液接触的工作中。由于没有槽液的支持和展平,切片往往粘附在刀刃上不能形成切片带,切片也易皱褶。Appleton 设计了一种真空装置,可吸拖切片带。我们采用大角度玻璃刀,夹在 LKB 冰冻切片刀架上,并在刀架上附加一片折断的刮脸刀片,刀片的刀刃放在靠近玻璃刀刃稍低一些的位置。切下的切片落在刀片上,并可由后续的切片推向前走。细心操作可形成近十张切片的切片带。为防止玻璃刀刃上结霜,可在切片前用一塑料片将刀刃部分盖起。干刀切片时选好切片参数是很重要的。通常使用较慢的切速。切片温度的选择差别很大。有低至 -100°C 以下的,亦有高达 -50°C — -60°C 。我们使用蔗糖和甘油浸渍样品后,选择样品温度 -70°C — -80°C ,刀温为 -50°C — -60°C ,效果较好。

在干刀上收集和展平切片有两种方法。一是用冷却的眉毛针把切片收集在预冷的格网上,然后用一根一端抛光的铜棒,在液氮中预冷后,抛光面平行于格网轻压切片使其展平。此法不易操作,效果也不好。酒井^[7]用两片格网把切片夹在中间,用冷却的金属杆轻压格网使切片展平。

二为液滴法。K. T. Tokuyasu 使用一眉针携带一饱和或接近饱和的蔗糖溶液滴。先在冷室中将液滴冷却 5—15 秒钟,使其凝固。然后用凝固的液滴粘取切片,待液滴移至室温融化后,靠液滴的表面张力展平切片。将液滴滴在一片格网上,然后洗去蔗糖即可。也有作者使用 DMSO 溶液滴。我们用一小注射器吸取 30% 的甘油溶液,在针尖上形成小的液滴,在冷室中凝固后粘取切片。此后,使小滴在室温融化并滴入液槽法中所使用的塑料环的孔中,将塑料

环翻转 180° ,再按前述方法依次进行水洗、染色和载物等。此方法简便,而且甘油较之蔗糖有不易污染切片,易于得到均匀的负染色等优点。

在非溶液制备法中,切片应进行人工干燥。空气干燥会使切片造成严重的结构损伤。酒井介绍了干燥氮气法、真空干燥法和小型干燥器干燥法等。Werner^[8] 等使用了胶囊干燥法。

6. 染色 冰冻切片大多采用负染色法。它简单、快速、还有利于保存细微结构以及分辨率高。不经包埋的冰冻切片对于干燥作用和冗长的正染色等强烈的化学处理的损伤效应更为敏感。负染色法减小了这种损伤效应。F. S. Sjöstrand 等指出,当冰冻切片干燥时,负染色剂减少了表面张力对蛋白质构型的破坏作用。

常用的负染色剂有 1% 磷钨酸 ($\text{pH } 6.5-8.5$), 2%—4% 硅钨酸 ($\text{pH } 6.0-8.0$), 0.5%—3% 醋酸铀 ($\text{pH } 4.5-5.2$), 钼酸铵等。染色时间一般为 5—60 秒。磷钨酸染色的结构较为粗糙,也不均匀。醋酸铀染色反差较低。硅钨酸染色结构细致,染色均匀。染色液浓度 2%—4%,染色时间 20—40 秒。

冰冻超薄切片亦可用正染色法。和树脂包埋切片染色方法相似。常用钨酸、柠檬酸铅和醋酸铀等。K. T. Tokuyasu^[9] 认为正染色对于细胞化学和免疫化学工作更为适宜。为克服正染色法的困难,该作者还发展了新的染色方法。

在超结构形态学研究中的应用

尽管冰冻超薄切片法还不十分完善,但在组织和细胞超结构形态学、细胞化学、免疫化学及 X 射线显微分析等方面都已获得一些成功的应用,而且可以期待在可溶性物质放射自显影,低温含水切片样品的观察,不使用高压电镜研究较厚的切片 (2—3 微米) 等方面获得广泛应用^[10]。现结合我们的一些工作做一简单介绍。

冰冻超薄切片已对很多的组织和细胞得到了能与常规树脂切片相比较的超结构形态。如图 2、3、4 所示的鼠肝、心肌、胰等。此外,还发现了在常规树脂切片中未曾观察到的结构。例如

G. Werner 等报道了在血小板存在于泡状结构里的电子浓密物质；在常规树脂包埋切片中各自独立的空泡，在冰冻切片中则连在一起，并通向细胞外空间。

很多作者发现在冰冻固定的细胞中，颗粒内质网膜上的核糖体颗粒难于观察到，或是被弄平在内质网膜上。用冰冻干燥法和冰冻置换法获得的结果也是如此。有人推测，在常规固定包埋切片中所见到的核糖体颗粒可能是假像。但也有相反的观点。山高^[1]报道，使用铀铅双重染色法首次在冰冻切片中染色核糖体成功。我们在负染色的鼠胰脏分泌细胞的冰冻切片中的某些区域也观察到了核糖体颗粒。

用冰冻超薄切片法研究肌原纤维的超结构已获得大量有意义的信息。M. Sjöström 等研究了横纹肌的肌原纤维，发现在 A 带粗丝上有平行于 M 线的间隔 430 埃的横线。每个周期包含三根平行线。在 M 区中有五条平行的线，线宽 90 埃，间隔 210—220 埃，其间夹有宽 40 埃间隔 50—70 埃的弱线。作者认为，这证实了由 X 衍射的结果所提出的粗丝结构模型。A. V. Somlyo 等也在鼠心肌上观察到 420 埃间隔的横线。这些结果都是在树脂包埋切片中所未曾观察到的。我们在大鼠心肌原纤维 A 带上也证实了存在间隔约 400 埃的横线，和 M 区上的五条间隔约 250 埃的亮线(见封二图 4 A 和 B)。

E. Puvion 等用特异染色方法研究了大鼠肝细胞核中 DNA 和核糖核蛋白质 RNP 等的微细构造，表明冰冻超薄切片法可获得超过经典方法所获得的信息，可以用做探索有丝分裂间期细胞核的一种新手段。

Tokuyasu 研究了大鼠心肌线粒体膜、菠菜叶绿体膜和大鼠坐骨神经的髓磷脂鞘的结构，发现在线粒体嵴膜中充满着 50—100 埃的颗粒即为球状蛋白质颗粒。作者并根据所观察到的

线粒体内膜和外膜的厚度差异，推测这可能反映了两种膜在蛋白质组成上的定性和定量的差别。作者在叶绿体的类囊体膜里也发现了颗粒状结构。生化资料表明，髓磷脂包含约 30% 蛋白质。然而，迄今用冰冻断裂技术没能证明其中的颗粒结构。该作者在大鼠坐骨神经的冰冻超薄切片中确实观察到有约 20—30 埃的颗粒状结构，指出这或许表明目前的冰冻断裂技术不能揭示所有的膜结合蛋白质。

一直致力于建立新的膜结构模型的 F. S. Sjöstrand 和对发展冰冻超薄切片法做出了重要贡献的 W. Bernhard 教授，二人合作研究线粒体嵴膜结构，并探讨了冰冻超薄切片的制备程序对膜结构保存的影响。他们观察到大鼠心肌线粒体嵴膜平均厚度为 260 埃，没有明显的嵴内空间，内膜显示了颗粒状亚结构，最小颗粒 30 埃，较大亮区为 100 埃，呈随机排列。

我们在基本相同条件下制备的鼠心肌线粒体内膜的结构形态(见封二图 5)。显示出明确的颗粒状亚结构，没有明显嵴内空间，颗粒在 30—100 埃左右。

参 考 文 献

- [1] Appleton, R. C.: *J. Microscopy*, **109**, 49, 1974.
- [2] Bernhard, W. et al.: *J. Cell Biol.*, **49**, 731, 1971.
- [3] Christensen, A. K.: *J. Cell Biol.*, **51**, 772, 1971.
- [4] Tokuyasu, K. T.: *J. Cell Biol.*, **57**, 551, 1973.
- [5] Hodson, S. and Williams, L.: *J. Cell Sci.*, **29**, 687, 1976.
- [6] Tokuyasu, K. T. and Singer, S. T.: *J. Cell Biol.*, **71**, 894, 1976.
- [7] 酒井俊男: 细胞, 9, 21, 1977。
- [8] Werner, G. et al.: In "Electron Microscopy and Cytochemistry", (Ed. by E. Wisse et al.), 1973.
- [9] Tokuyasu, K. T.: *J. Ultrastr. Res.*, **63**, 287, 1978.
- [10] Bernhard, W.: *Electron Microscopy*, II 1974.
- [11] 山高里盛: 细胞, 4, 40, 1972.

[本文于 1979 年 5 月 29 日收到]

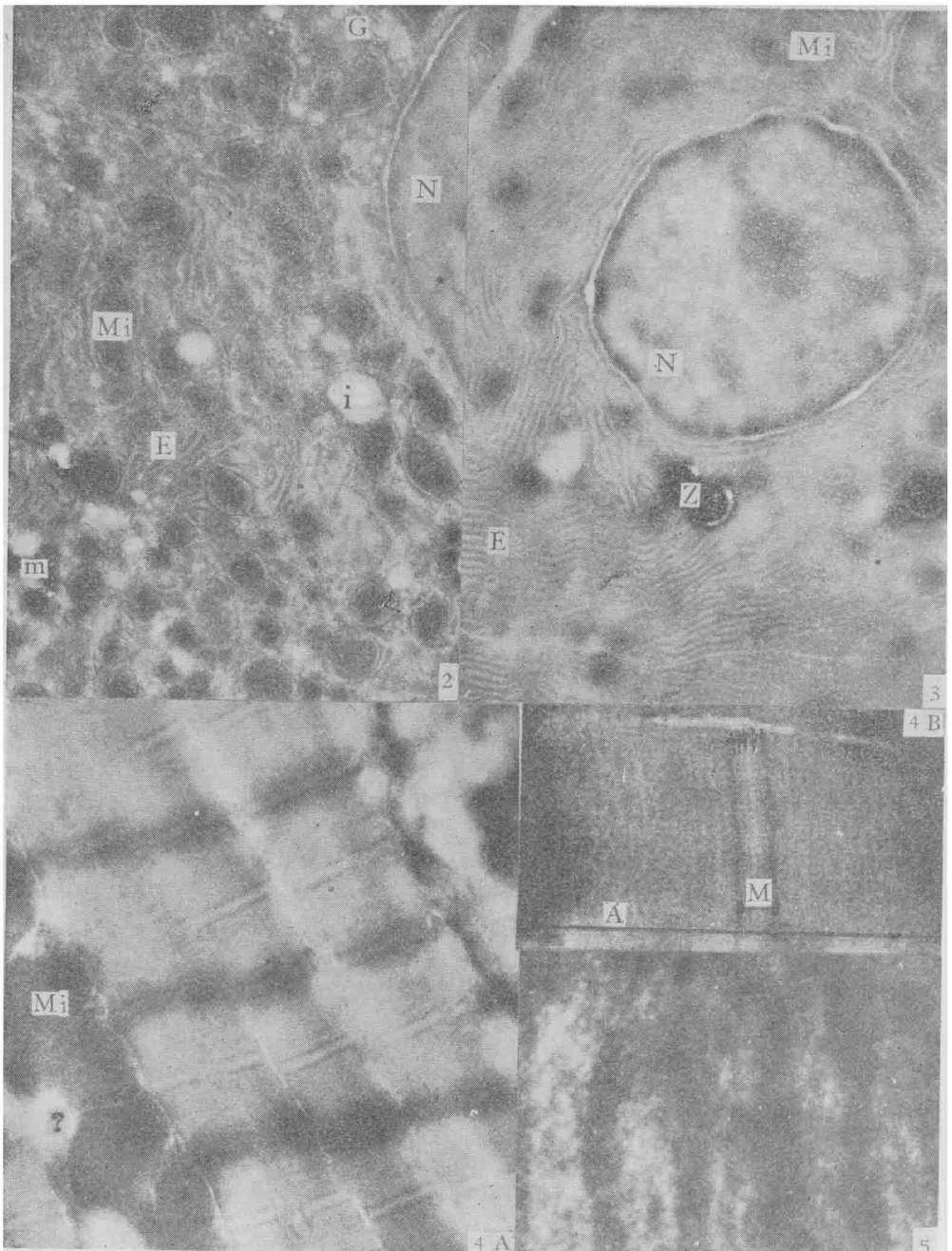


图2 小鼠正常肝细胞

2.5% 戊二醛室温下固定 1 小时, 30% 甘油溶液中浸渍 10 分钟。用金属钉支架, 液氮直接冰冻, 干刀切片温度 $T_{\text{切}} = -80^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{刀}} = -70^{\circ}\text{C}$, 甘油滴捞片 2% ST (硅钨酸) 染 15 秒。

N: 核, Mi: 线粒体, m: 微粒体, G: 高尔基器 i: 冰晶 E: 内质网 10,000 $\times$

图3 小鼠胰脏外分泌细胞

2.5% 戊二醛室温下固定 0.5 小时, 30% 甘油浸渍 10 分钟, 液氮冰冻。槽液法切片 $T_{\text{切}} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{刀}} = -40^{\circ}\text{C}$ 50% DMSO 2% ST 染 50 秒 10000 $\times$

N: 核, Mi: 线粒体, E: 内质网, Z: 酶原颗粒。

图4 大鼠心肌

2.5% 戊二醛室温下固定 1 小时, 30% 甘油浸 10 分钟, 金属钉样品架液氮直接冰冻。槽液法切片, $T_{\text{切}} = -70^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{刀}} = -55^{\circ}\text{C}$, 60% DMSO, 4% ST 染色 40 秒。

(A) N: 核, Mi: 线粒体 ? : 可能是线粒体外膜, 冰冻断裂后的内表面, 20000 $\times$

(B) A 带的放大图, A: A 带, M: M 区, 可以见到平行于 M 区的间隔约 400 埃的线以及 M 区内 5 条平行的间隔约为 250 埃的平行线, 50000 $\times$

图5 大鼠心肌线粒体嵴膜

2.5% 戊二醛室温下固定 0.5 小时, 1 M 蔗糖浸渍 10 分钟。液氮冰冻。干刀切片, $T_{\text{切}} = -80^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{刀}} = -55^{\circ}\text{C}$, 4% ST 染色 15 秒。145,000 $\times$ 可见 30-100 埃的颗粒状亚结构。