

冷冻复型电镜技术

(内部资料)



河北医学院基础医学研究所 编印

1980·7·石家庄

目 录

冷冻复型技术方法.....	应国华 (1)
冷冻复型技术原理.....	李文镇 (8)
冷冻复型法在细胞学与组织学的应用近况.....	王仲涛 (15)
冷冻复型技术在超微结构研究中的作用.....	雷建章等 (2—1)
人类精子的超微结构——冷冻复型法电子显微镜观察.....	雷建章等 (2—6)
胃癌细胞的冷冻蚀刻超微结构变化	河北医学院基础所电镜室 河北医学院第四医院外科 (2—16)
乳癌细胞的超微结构——超薄切片及冷冻蚀刻电镜观察	河北医学院基础所 河北医学院第四医院外科 (2—20)
论文插图及说明.....	(共 8 页)

冷冻复型技术方法

冷冻复型法 (Freeze Replica) 也称冷冻切断 (Freeze Fracture) 或冷冻蚀刻法 (Freeze Etching)。这是一种制做电子显微镜样品的办法。用这种方法能够看到细胞膜、核膜和各种细胞器膜结构的微细变化。因此冷冻复型法成为研究生物膜结构的重要方法之一。自1950年以来,先后有Hall和Meryman提出了有关冷冻复型法的雏形。到1961年Moor开始采用比较成熟的手段方法。后来经过Branton、Bullivant、Dempsey、Mühlethaler、Staehelin、Steere、Weinstein等人的改善或倡导,到1970年以后,这项技术在国外很快发展起来。近些年国外文献中出现了大量以冷冻复型法为研究手段的资料。国内除中国科学院生物物理研究所电镜室自制过冷冻复型装置以外,目前也有一些引进的设备。估计在1980年代里,我国也将有不少单位掌握或希望开展这项技术。为了今后推广和交流,我们首先介绍一下冷冻复型技术的实际操作方法。为了阐明此法的过程步骤请参照图1。

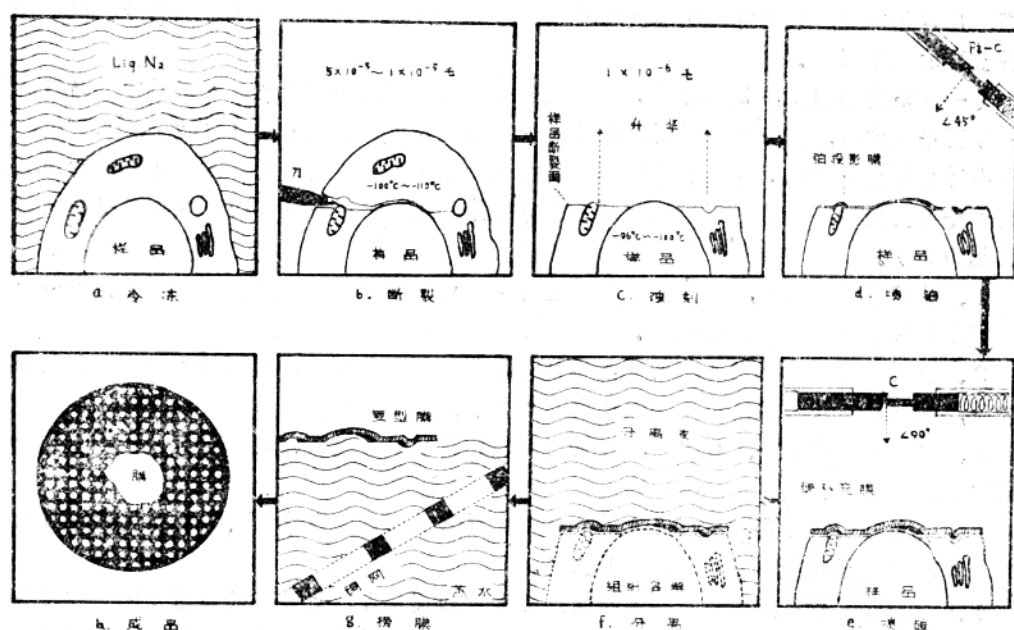


图1 冷冻复型电镜技术操作步骤示意图

冷冻复型法的主要步骤,首先是将样品在液氮中冷冻,然后放到真空喷镀仪中切断(图1, a. b.)。切断后的切面上有细胞器,其间还有冻成冰的水分。再加热使冰升华将水分蒸发,把细胞器的膜核结构暴露出来,这一步骤统称为冷冻蚀刻(图1, c.)。如不进行蚀刻统称为冷冻切断。通过蚀刻这一步骤,把细胞的膜结构暴露出来,使切面凹凸不平,好象“雕刻”的一样。最后向切面上喷镀铂-碳投影,再喷碳来加固,这样就在切断的表面上形成一层复

型膜(图1, d. e.)。在这层复型膜上就印下了细胞切面的立体结构。制成复型膜以后,从真空中取出样品,将复型膜下面的软组织腐蚀掉,再把复型膜捞在铜网上,这样就制成了冷冻复型的电镜样品(图1, f. q. h.)。由于最后主要是在透射电镜下观察复型膜,因此我们采用了“冷冻复型”这一名称。

要把冷冻复型做好,首先要有必需的仪器设备,然后还要有与之适应的一定技术。目前国际上使用的冷冻复型装置已有几种定型的产品。例如Balser Denton的生产型式,虽有不少优越性,但价格昂贵。日本电子公司生产的真空喷镀仪也可装上冷冻切断和冷冻蚀刻附件。我们制作冷冻蚀刻复型样品时使用的仪器是日立制作所生产的,其中包括HUS-5真空喷镀仪、HFZ-1冷冻切断装置和FE-1加温控制器。另外仪器创始人之一的赤堀宏博士还向我们介绍了他行之有效的操作步骤。他的操作步骤和仪器的性能是完全适应的,我们在实践中稍加改变。为了更有利于具体深入地了解冷冻复型法的全过程,愿以我们的实际工作为例,介绍冷冻复型的操作细节。

一、仪器设备

除以上介绍的真空喷镀仪、冷冻切断装置和加温控制器以外,还要有冷冻器具如液氮贮存罐、广口保温瓶,以及捞取复型膜的蒸发皿、双目解剖显微镜和当用的试液等。以下介绍三种重要的仪器设备。

(一)真空喷镀仪:日立HUS-5型真空喷镀仪真空阀门和管道系统路线简单清楚,只有一个离子真空规,因而操作简便,故障极少,价格较低。真空表规定可达 1×10^{-6} 托,一般半小时内可达 5×10^{-7} 托,若要更好的真空度,需在真空系统管道周围的冰阱中加液氮。在进行冷冻复型时,要特别注意使用以下三种部件,这三种部件经常安装在真空喷镀仪器上(详见图2)。

1、快门拉手(图2, a.):上面挂在冷冻切断装置的支撑块上,搬动拉手,拉掉支撑块,样品即被切断(图3, c. d.)。

2、加温控制插肖(图2, b.):本来是加温控制器的部件,可以插入冷冻切断装置的插座上,把样品座和加温控制器联通起来(图4)。

3、电极柱(图2)、共四根,可供安装碳棒进行喷镀之用。其位置与HFZ-1型冷冻切断装置完全适应。

(二)冷冻切断装置:日立HFZ-1冷冻切断装置由很多部件组成,例如放置样品座塑料基盘等,但重要的有以下几种,详见图3。

1、刀座和样品座:都是黄铜制作的,分开放如图3 A,组装起来如图3 B。在刀座上安装切断用的刀片,在刀座中还有喷镀孔,以备喷镀的铂碳粒子通过。在样品座的孔穴中放入样品杯。将刀座反过来,使其斜面与样品座的斜面对(如图3 D),刀座的喷镀正好对准样品,而样品又被包围在铜块之中,以防止喷镀时辐射热的影响。

2、支撑块:将刀座和样品座组装起来,下面用支撑块支住,支撑块的拉绳挂在真空喷镀仪的快门拉手(图2, a.)上,这样就做好切断样品的准备(图3, c.)。搬动快门拉手,拉出支撑块,刀座突然下滑,刀片即将样品切断(图3, D)。

3、加温控制插座:是加温控制器的部件,经常装在样品座上(图3, c.),里面有热

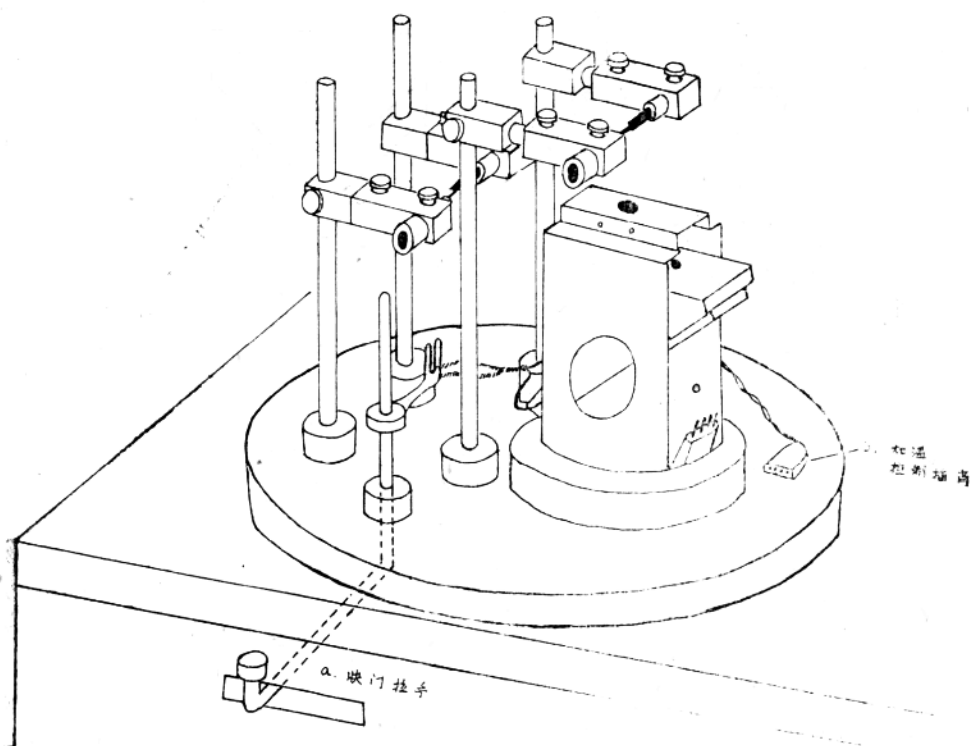


图 2 冷冻复型用真空喷镀仪



图 3, a

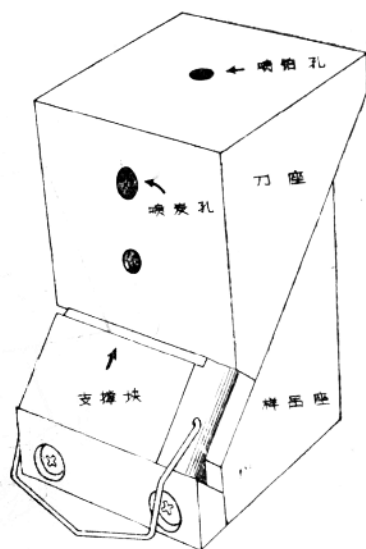


图 3, b

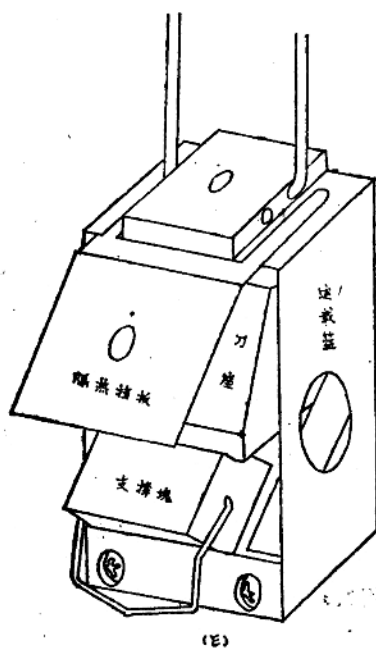
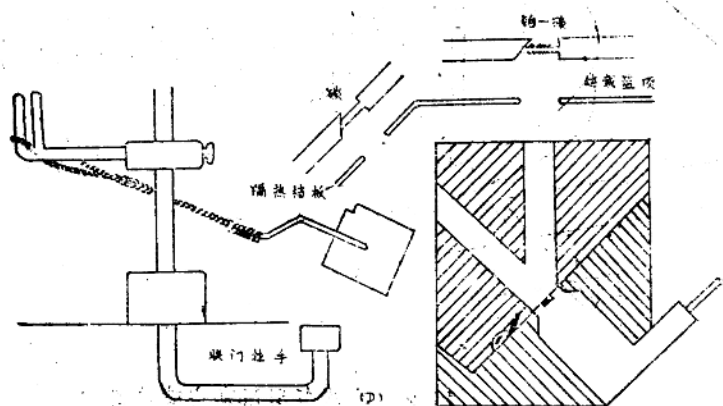
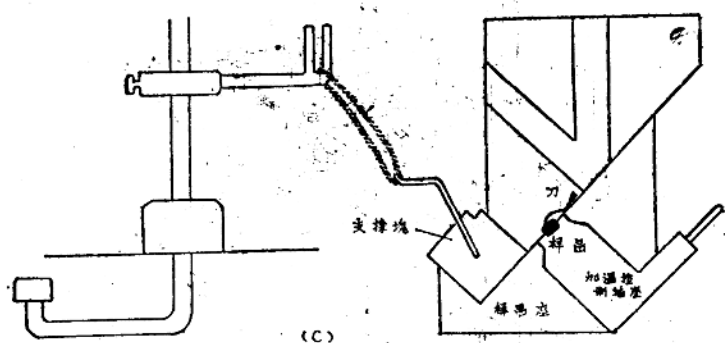


图 3 冷冻复型切断装置示意图

电耦以备检测样品温度，里面还有微型加热器供加热蚀刻用。加温控制插座和真空喷镀仪上的加热控制插肖（图2，b.）插在一起（图3，D.），就把样品台和加温控制器联通（图4，c.）。

4、运载篮：刀座和样品座都放在运载篮中，以利于放入液氮中冷冻和取出放入真空喷镀仪之用。在运载篮顶部和隔热挡板上都有孔与刀座上的喷镀孔相通，在喷镀铂碳时也起到防止辐射热之用（图3，E.）。

（三）加温控制器：日立FE-1加温控制器有三部分组成，组装在一起如图4。

1、保温瓶：图4 A为剖面，其中放冰块并插入玻璃电极，相当于零度参考装置，联线一端与真空喷镀仪中的加温控制插肖（图2，b.）相连，实际上是连在样品座上，另一端与加温控制器连在一起。

2、加温控制器：见图4 B，控制器上有显示温度的仪表(a)，上面的刻度是参考数值，兰线指示在 -180°C 以上，红线指示相当于 -140°C 。另有一加热旋钮（b）和显示加热电流的仪表（c）。

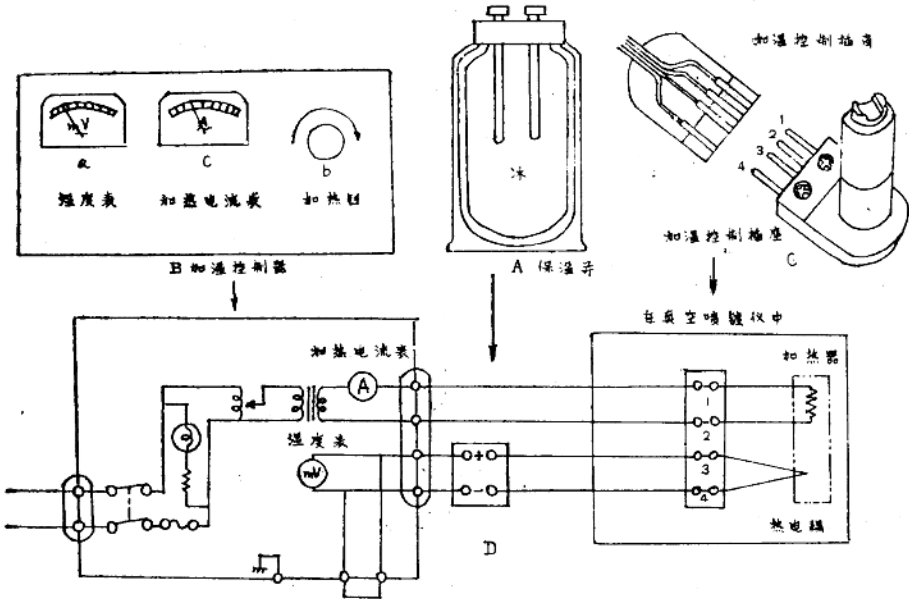


图4 冷冻复型用加热控制器示意图

3、加温控制插肖和插座：见图4 C，前者经常放在真空喷镀上如图2 b,后者经常放在样品座上如图3 D。

把以上三部分联在一起，就能形成一个既能加热蚀刻，又能检测样品温度的线路如图4 D。

以上是我们使用的冷冻复型装置，以此为例进行介绍，更利于加强了解。其他如日本电子公司的冷冻蚀刻装置就与此不同，它的样品台和刀台都固定于装置之上，通过冷带用液氮冷冻样品台和刀台。加温检测装置也固定于真空喷镀仪之上。

二、技术准备

(一) 冷冻复型装置的准备: 为了保证冷冻切断装置的导热、滑动和切断性能, 每次使用前应认真擦拭, 以去除油污、水分及氧化层, 必要时可用抛光膏和丙酮进行表面清洗。加温控制器的保温瓶中加好冰水, 再接好加温控制器联接线, 检测加温控制线路是否通畅。另外真空喷镀仪也要打开备用。

(二) 碳棒与铂丝的准备:

1、碳棒: 直径为5 mm, 一侧固定在真空喷镀仪的电极柱上, 其内侧端磨成30°角的斜面; 另一侧为滑动碳棒, 可被电极柱夹持器金属套管中的弹簧所推动, 滑动碳棒的前端制成长约5 mm, 直径1.5~2.0 mm的细条状(图1, d.e.)。

2、铂丝: 取直径0.1 mm、长6~8 cm的铂丝, 在金属棒上绕成直径1.5~2.0 mm的螺旋圈, 再紧套在滑动碳棒细条状的尖端之上备用(图5)。

3、组装: 铂碳发射点与样品表面呈45°角(图1-d), 碳的喷发点与样品表面呈直角(图1-e), 二点到样品表面的距离均为10~11 cm。注意: (1) 碳棒斜面必须面向并分别对准切断装置的孔道, 以保证定向喷镀; (2) 碳棒滑动侧弹簧粗细、弹力大小要适当。

4、烧制铂珠: 为提高喷铂效果, 要在喷铂前先将绕在碳棒上的铂丝, 在低真空状态下溶化呈珠状(图5), 并将其对准孔道。

(三) 样品取材与处理:

样品取材与处理是否及时、得当, 是冷冻蚀刻法的关键步骤之一, 应予重视。

1、取材: 为保证样品结构清晰, 避免出现一些人工假象, 要做到取材迅速、动作轻柔, 避免挤压和钳夹。用保险刀片, 将滴有2~2.5%戊二醛固定液的样品, 切成高3 mm、横径1~1.5 mm的组织块, 并放入在冰箱中予冷的固定液中。

2、固定: 样品块经15分钟固定稍硬以后, 即可取出修整。修好后的样品块继续放进固定液内, 约1~3小时。一般每毫升固定液, 可存放3~4块样品, 最好间断轻摇, 以提高固定效果。

3、甘油浸渍: 将固定好的样品块, 用1/10M磷酸缓冲液(pH7.2~7.4)反复洗涤0.5~1小时, 再放入30%甘油生理盐水(pH7.4)中浸渍, 约8~24小时。

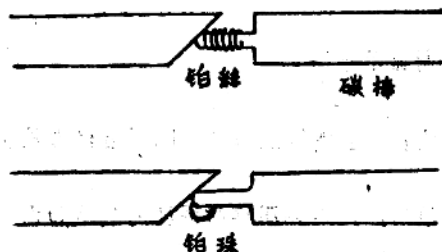


图5 烧制铂珠

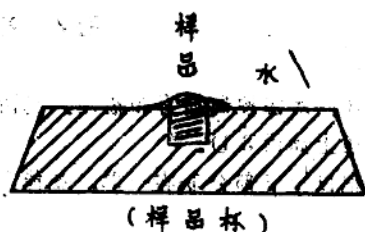


图6 组装样品

4、样品的装入: 在样品杯小孔内, 预先加入少许甘油生理盐水, 再把浸渍好的样品切

成小块，按选定的方位装入样品杯孔内。样品表面以高出杯口1 mm左右为宜，并用滤纸吸去其周围多余的液体（图6），用玻璃平皿盖好备用。

三、操作步骤

（一）冷冻：

在开动真空喷镀仪并完成上述准备工作后，即可开始冷冻步骤。首先，将液氮自储存罐缓缓注入大口保温瓶内（其量以保持淹没切断装置为准），把切断装置放入运载篮并迅速放入液氮内，液氮立即沸腾。另将装好样品的样品杯，放在自制的铝质提勺内，亦尽速放入液氮中，以快速冷冻。当液氮停止沸腾以后，从液氮中提出切断装置，以最快的动作把样品杯准确地嵌入样品座的杯槽内，将刀座放在样品座上，使二者的斜面吻合（图3,b）。插好隔热挡板，将切断装置再次放入液氮中冷却，待沸腾终止，即刻把切断装置提出放到真空喷镀台上，挂好支撑块的拉绳，接通温度控制器，盖好真空罩抽低真空。同时往真空喷镀仪的冷阱内加满液氮。

（二）断裂：

当真空度达到 3×10^{-4} Torr以上，样品的温度在 $100^{\circ}\text{C} \sim 110^{\circ}\text{C}$ 之间，是进行样品断裂的最佳时机。若此时样品温度过低，可打开加热器，在2~3分钟的时间内缓慢升温，使样品温度达到标准要求。随后猛拉快门拉手，使支撑块迅速脱落，刀座则顺势沿斜面滑下，（图3,C,D），并将样品劈断，在样品表面留下一劈裂后的横断面（图1,b）。

（三）蚀刻：

蚀刻是指样品断面冷冻凝固的水升华的过程。其结果，可使样品表面以及细胞器的各种膜结构，更加清晰的暴露出来。冷冻蚀刻法，要求样品断裂以后，对样品继续升温至 $90^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ ，时间约1分左右，并在 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-6}$ Torr的高真空状态下完成（图1,C）。

（四）喷镀复型：

采用与样品断面呈 45° 角的投影方位喷铂，以增强复型膜的立体感。操作时应先将碳棒予热，再加大电流，使铂在2~3秒钟内溶化、气化，当刚刚出现炭花时则立即终止通电（图1,d）。

在喷铂的基础上，与样品表面呈垂直方向喷碳，以加固复型膜。一般采用间断喷镀法，每次喷碳时间约1秒，间隔3~4秒以后再喷第二次，共喷镀4~5次。

在喷镀过程中，应注意保持良好的高真空状态，否则铂、碳颗粒过粗，影响复型质量。

（五）分离、清洗复型膜：

喷镀结束以后，打开真空罩，取出切断装置，把样品杯夹出放进双重蒸馏水内。在放大镜下用细针轻轻拨出样品，用吸管将其移入另一装有双重蒸馏水的白色小坩锅里，向样品周围滴加少量组织腐蚀液（次亚氯酸钠液或70%次氯酸钠，商品名Antiformin），10毫升水中约加0.5毫升。待样品周围渐冒气泡，复型膜亦逐渐与样品分离，选用细吸管，将飘于水中的复型膜吸出，放进新的蒸馏水内，反复进行两次，以便除去杂质，洗净复型膜（图1,f）。

虽然一般认为，如何把复型膜比较完整的剥离下来，是一难度较大的问题，但据实验观察，采用上述方法大都是行之有效的。

（六）捞膜与观察：

将400目不加支持膜的铜网，放到丙酮内待用。用细吸管把复型膜吸至30%±的丙酮液内，再将此膜吸出轻轻滴在蒸馏水的表面。由于表面张力的作用，复型膜可在水面飘浮展开。拿备用的400目铜网，捞取复型膜，使其贴于铜网的中心部位，将载有复型膜的铜网置于滤纸上干燥，放到平皿内防尘，送透射式电子显微镜观察分析（图1,9）。在观察时，如样品反差太强可采用大光阑孔或提高加速电压，最高可用125KV，这样就能使图象更为优美。

（应国华）

冷冻复型技术原理

在分子生物学领域中，用电子显微镜研究生物膜结构时，使用最多的是冷冻复型法。根据我们的工作和前人的经验，可见此法有以下优越性：（一）冷冻能保持细胞原来的结构，使之更接近于生活状态。（二）通过冷冻切断和冷冻蚀刻，不但能看到细胞膜、核膜与细胞器膜的断面，而且还能看到细胞表面的联结装置，细胞表面内吸外排的孔，细胞核膜孔和各种细胞器的膜结构，直到膜内微粒都清晰可见，而且立体感鲜明。这在超薄切片中是难于看到的。（三）用透射电镜观察复型膜上印下来的膜结构，其分辨力远优于一般的扫描电镜。（四）从细胞表面和切面印制下来的复型膜是由铂碳粒子组成的，可以长期保存而不受电子束照射的影响。（1-3）

由于具有以上种种优越性，冷冻复型技术在当前已成为研究生物膜结构的主要方法之一。但是就目前的仪器设备和技术水平来说，要想做出优良的冷冻复型样品，充分发挥这种技术方法的优越性还是有一定困难的。为了提高样品质量，人们正在设法进行各种改进。但是，根据我们的经验，最根本的是充分掌握冷冻复型法中的各种有关理论，例如低温生物学，超高真空问题以及金属镀膜技术等方面的理论，由于篇幅所限，本章只能简单介绍在进行冷冻复型操作时，必须知道的一些基本原理知识。下面根据冷冻复型法的几个基本步骤：前处理、冷冻、切断、蚀刻、复型、清洗捞膜等，总结几点并介绍一些基本理论知识。

一、冷冻和冷冻前的予处理

近些年来低温生物学有了很大的发展，低温生物学方面的成就给冷冻复型法提供了有利的理论基础。例如在进行冷冻复型的过程中，最严重的障害是在生物组织细胞中有冰晶形成。为了阐明冰晶形成的原理，不断改进防止冰晶的方法，始终要靠低温生物学方面的发展。一般认为冷冻速度缓慢，易使细胞外的水分形成块状的冰晶。在细胞外形成冰晶可以导致细胞脱水，细胞收缩，甚至使细胞内的水分也形成冰晶，结果影响细胞器的分布，造成细胞内微细结构紊乱（2,4）。因此在冷冻复型过程中最首要的是防止冰晶形成，以保持细胞的微细结构。在我们的实际工作中，也发现冰晶形成与冷冻速度缓慢有关。反之，冷冻复型膜中不出冰晶现象而结果最好时，冷冻速度往往较快。一般认为，冷冻快时，细胞内的水分均匀凝固，可以形成玻璃样（5），这是最理想的冷冻状态，这样就不会有冰晶形成。因此，在实际操作中，尽可能加快冷冻速度是非常必要的，但从理论上讲还有不少需要注意的环节。

1、使用防冻剂从细胞内部防止冰晶形成的问题

在我们的工作中发现,细胞内部水分少而且水分分布均匀的红细胞往往不容易有冰晶形成。细胞中水分多而且成为液泡的植物细胞内形成冰晶的机会就比较多。在冷冻的情况下,当细胞内液开始凝固时,这种温度称为冷冻点,这时细胞内部结构尚未受损。进一步冷冻就可以发展到再结晶点。在这两点之间,细胞内液慢慢形成冰的结晶,而且冰晶逐渐增大⁽¹⁾。例如植物种子细胞中含糖类很多,冷冻点和再结晶点差不多都是 25°C ;一般糖元较多的细胞,冷冻点为 15°C ,而再结晶点为 25°C ;含有液泡较多的植物细胞内,液泡中水分的冷冻点为 2°C 到 5°C ,而再结晶点可达 55°C ⁽²⁾。从以上几种情况看,冷冻点与再结晶点之间的温度差越小,就易于在短时间内由冷冻点超越再结晶点而避免冰晶形成,植物的种子细胞就是这种情况。反之,根叶等植物细胞中液泡内冷冻点与再结晶点的温度差很大,逐渐形成冰晶的机会就必然增多。

为了防止冰晶形成,常常使用甘油、葡萄糖、乙二醇、二甲基亚砷等防冻剂,其目的主要就是为缩小细胞内冷冻点与再结晶点之间的温度差。例如使用20%的甘油浸泡以防止冰晶形成时,一般情况下可使细胞内的冷冻点降低 4.8°C ⁽³⁾。如果某些细胞内冷冻点与再结晶点之间的温度差太大,则所用甘油的浓度也需要加大。由于很多种生物膜不能耐受甘油的浸泡,所以生物样品都需要在事前用戊二醛固定⁽⁴⁾。

2、改进外部环境条件加快冷冻速度问题:

在冷冻前准备好一切条件,在1~2秒内用液氮将样品冷却到 -196°C ⁽¹⁾,这样就可能避免冰晶形成。根据我们在实际工作中的经验认为使用铜制的冷冻切断装置,直接进行液氮冷冻,效果很好。这是由于它们的热传导快,热容量大和沸点高的原故。沸点高就易于避免液氮冷冻剂因沸腾产气而与样品台隔离绝缘,避免由于绝缘而冷冻速度减慢。另外,在进行操作时必须保证样品、样品台和样品座等处之间的密切接触,也是为了避免绝缘,影响传导⁽²⁾。有关部件的污染或附有水分都会妨害接触,引起一定程度的绝缘,所以冷冻切断装置的有关部件用过以后必须彻底清洗干燥。标本要尽可能地小,以减少表面和中心的温度梯度变化⁽³⁾。掌握以上原则就会加快冷冻速度。

冷冻剂一般都用液氮,冷冻速度最理想,不少专家还介绍结合予冷处理以加快冷冻速度。例如先用弗立昂将小滴的酵母菌混悬液予冷到 -160°C ,以后酵母菌的冷冻速度可达每秒钟下降 10°C ,即 $-10^{\circ}\text{C}/\text{秒}$,由 -160°C 到达 -196°C 的液氮温度只需3秒。如用丙烷,则丙烷本身也可冷却到 -190°C ⁽⁴⁾。但是根据我们的经验,不用弗立昂等予冷,也可取得满意结果。用 -272°C 的液体氮效果自然更好,冷冻速度可达 $-1000^{\circ}\text{C}/\text{秒}$,甚至 $-10000^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ ⁽⁵⁾,这是更为理想的冷冻剂,虽然目前尚难付诸实用,但将来可能会有所发展。

总之,在冷冻过程中最重要的问题是防止冰晶形成。为了防止冰晶形成,加快冷冻速度,必需操作敏捷和安排有序。但是,如果能够深刻地了解冰晶形成的原理,就会更大程度地减少冰晶形成,做出更好的样品。

二、切断和蚀刻

切断是在真空冷冻下进行的,由于样品冷冻脆硬,在切断过程中主要是撕裂和凿铲作用⁽⁶⁾。因此,在撕裂面上即可有细胞、细胞核与细胞器的表面,也有不同水平的切面,以及内容

物被铲除的细胞、胞核与细胞器的内面。既然主要是为了剥蚀和磨光，所以切断冷冻样品的刀刃不需要极端锐利，但是也不能有缺口，而且一定要保持清洁⁽¹⁾，以防污染切面。有一些冷冻蚀刻装置需要在大气中切断液氮冷冻的样品^(2,3)，也就是用-196℃的刀切断-196℃的样品。但大多数装置是在优于 1×10^{-5} 托的真空中，将样品由-196℃加热到-100℃左右，用低于-100℃的刀进行切断，以避免切断面的融化。由于蚀刻和喷镀的适宜温度也是100℃左右，那么在-100℃切断之后不久即可进行蚀刻和喷镀，中间经过时间较短，样品切面发生意外变化的机会较少。如果是在大气中切断用液氮冷冻到-196℃的样品，等温度回升到-100℃再蚀刻喷镀，中间经过时间较长，样品切面发生意外变化的机会必然增多。

蚀刻就是把样品切面上水分结成的冰升华掉，将组织细胞超微结构充分暴露出来的过程。将固体的硫黄加热可以升华成为气体，结成冰的水也可以由固体直接升华成为水蒸气，但是这个过程要在真空中进行。样品切面上一定厚度的冰升华为水蒸气，这个厚度就是蚀刻深度；每秒钟的蚀刻深度就是蚀刻速度。蚀刻速度与蚀刻时的温度和真空度有密切关系。对下一步喷镀复型膜来说，最常用的真空度是 1×10^{-5} 到 1×10^{-6} 托，所以真空度是相对限定的。蚀刻速度与真空度的关系为：蚀刻速度 = $1.4 \times 10^{-2} \times$ 真空度，当温度为-100℃，真空度为 1×10^{-5} 托时，蚀刻速度为 $14 \text{ \AA}/\text{秒}$ ⁽⁴⁾。

蚀刻速度随着温度的变化也有很大差异。在进行蚀刻时，温度每升高10℃，蚀刻速度可以增加5~20倍。例如真空度为 1×10^{-5} 托的条件下，蚀刻时的温度为-130℃，蚀刻速度很低为 $0.01 \text{ \AA}/\text{秒}$ 。温度为-120℃时，蚀刻速度增长20倍为 $0.2 \text{ \AA}/\text{秒}$ ，仍然不高。-110℃时为 $2.5 \text{ \AA}/\text{秒}$ 。-100℃时为 $20 \text{ \AA}/\text{秒}$ 。90℃时高达 $140 \text{ \AA}/\text{秒}$ ⁽⁵⁾。由此可见在-110℃时，蚀刻太浅，变化太小。在-90℃时蚀刻太深，变化太大。所以最合适的蚀刻温度是-100℃左右。特别可以看到温度由-130℃升高到-90℃，变化40℃，而蚀刻速度由 $0.01 \text{ \AA}/\text{秒}$ 上升到 $140 \text{ \AA}/\text{秒}$ ，增长14,000倍。

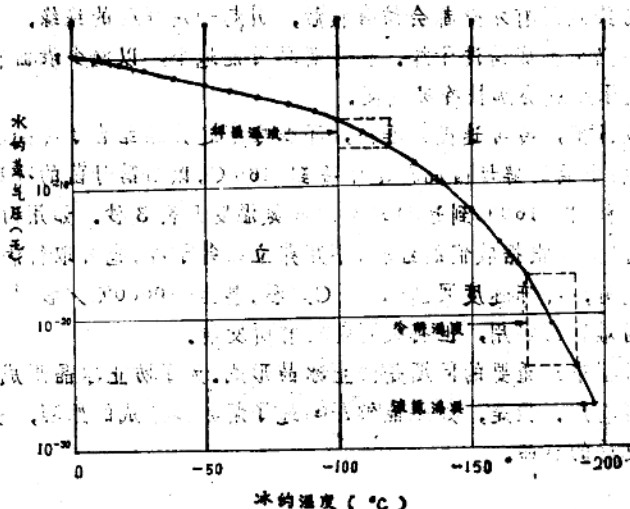


图1 冰的温度和水蒸气压的关系

蚀刻主要是将冰变成水蒸气的过程，这时必然要受到冰的蒸气压的影响。在-100℃时水的蒸气压是 1×10^{-5} 托（见图1），而真空度也要达到 1×10^{-5} 托时才能进行喷镀。所以

-100℃时对蚀刻和喷镀都是适宜的温度。从图1也可以看出,假如是在-150℃时蚀刻,水的蒸汽压为 1×10^{-1} 托,真空度也要到达 1×10^{-1} 托,这样优越的真空度绝不是一般真空喷镀仪能够达到的。反之如果是在-50℃时蚀刻,水的蒸汽压为 1×10^{-3} 托左右,此时若将真空度改为 1×10^{-3} 托,就会不利于喷镀,若真空度仍为 1×10^{-3} 托,必然导致蒸发太快和蚀刻深度增加。

蚀刻深度与蚀刻的时间显然有密切的关系。若蚀刻速度为 $20 \text{ \AA}/\text{秒}$,则至少需要15秒,蚀刻深度才能达到 $300 \text{ \AA}$ 。若蚀刻速度为 $2.5 \text{ \AA}/\text{秒}$,则需要2分钟蚀刻深度才能达到 $300 \text{ \AA}$ 。因此当真空度在 1×10^{-5} 到 1×10^{-6} 托之间,温度在-100℃到-110℃时,蚀刻的时间约为15~19秒^(2,6)。蚀刻实际上是把细胞切面的水分蒸发掉,只残余细胞膜结构的过程,如果蚀刻的深度太大,残余的膜结构太高,周围失去水分支持,势必造成膜结构的倒坍,而破坏细胞的微细形态。因此,在进行切断蚀刻时必须充分了解和掌握当时的真空度和温度,以及真空度和温度的变化速度。

三、喷镀铂碳和捞取复型膜

喷镀铂的角度为 45° ,主要用于斜向投影,造成反差,显示切面的立体形象。如果蚀刻太深,凹凸相差悬殊,必然会造成断面上某些部位喷铂太厚,某些部位喷铂太少,甚至某些部位完全没有铂而无法显示结构。这种反差过强的图像是很不理想的。喷铂以后在断面上形成的膜薄而且不均匀,这样就需要用喷碳使膜增厚加固。喷镀碳膜的目的就是为了在断面上形成一层坚固的复型膜,喷碳的角度为 90° 。由于喷镀铂碳时,要加热到使金属蒸发,这种辐射热对样品必然要有所影响,因此铂碳喷镀源与样品的距离不能太近,而且还必须非常精确地调好喷镀源的方位角度,以便尽可能地减少辐射热,并在短时间内制成复型膜。

目前使用的冷冻蚀刻装置,有的是让样品直接暴露于辐射热之下。有的是把样品装在很厚的铜块之中,铂碳经由细孔道喷到样品上。即令使用后一种装置,喷镀源与样品的距离也要在10厘米以上,一般15~20厘米最好。如果距离太近,样品受到的辐射热太大,就会影响结冰的状态,起到进一步蚀刻的作用。因为处于 1×10^{-5} 托的真空中,在-100℃的条件下,温度每升高一度,蚀刻甚至可增加25%⁽¹⁾。可见防避辐射热是很重要的问题。在喷镀过程中反复多次地短时间烧热铂碳进行喷镀,这也是为了尽可能地减少辐射热的影响。在只进行冷冻切断而不进行蚀刻的样品上,有时也能看到一定的蚀刻现象,这就是由于辐射热造成的。在冷冻蚀刻装置的发展早期,样品的蚀刻升华就是靠辐射热作用于切面来完成的⁽⁹⁾。

喷铂投影时由于铂丝绕在碳棒电极上,实际上是铂碳同时投影,投影喷镀时的真空度越高越好,真空度一定要优于 5×10^{-5} 托,否则铂碳颗粒过于粗大,势必影响样品质量。在喷镀过程中,可见真空度暂时劣化现象,这可能是由于碳棒烧热后放出气体,因此在喷镀最好把新碳棒予热备用。喷镀铂碳的加热电压和电流因所用仪器装置不同而异,随碳棒种类不同也有各种变化。为避免辐射热,电流不能过强,但电压太低时,喷铂多,喷碳少,甚至喷碳颗粒过于粗大而影响质量。一般是喷铂时间较短,喷碳时间较长,铂膜厚度 $30 \text{ \AA}$ 即可,碳膜应更厚。厚薄适当制作良好的复型膜分辨力可达 $25 \text{ \AA}$ ^(1,6)。

投影喷镀以后,就在样品切面上形成复型膜。剥离和捞取复型膜时,需要极为细致的操作。从真空中取出带膜的样品放在水中,有时可以看到复型膜很快就漂浮上来,但有时经过

长时间处理,复型膜也难于剥离。将带膜样品直接放入水中,由于表面张力的作用会使易碎的复型膜破坏,此时可以预先放入10~15%的甘油中将膜漂起。但大多数情况下,需要把样品中的软组织腐蚀掉。酯类较多的组织不容易腐蚀掉,可以先用酯酶或蛋白酶处理⁽¹⁾。腐蚀剂多用漂白剂次亚氯酸钠等。有时也需要用浓的氢氧化钠和强硫酸⁽⁵⁾,甚至要用热硝酸,特别是对于植物细胞就可以用强酸处理⁽⁶⁾。经过这些处理就可以把样品表面上的复型膜剥离下来,然后再捞到铜网上。捞取复型膜的铜网可以用带有火棉胶膜的,也可以用不带膜的铜网,铜网事先经过亲水化处理会更好一些⁽⁶⁾。

喷镀铂碳制作复型膜是冷冻复型法最后的重要步骤。喷镀复型和冷冻切断以及蚀刻等都有密切关系。除去金属喷镀技术以外,也涉及高真空技术和低温生物学等很多理论问题。由于本书主要内容是冷冻复型法的技术和应用,所以以上三节主要介绍在应用中发生问题时必须了解的基本原理知识。至于仪器装置的结构和操作详见第一章。本章将从技术发展方面介绍仪器装置的改进问题。

四、冷冻复型技术的目前现状和发展前景

在超微结构特别是在生物膜的研究工作中,用冷冻复型法进行的课题越来越多,将来还要有无数工作等待使用这项技术来开展。但是目前的冷冻复型仪器设备和技术方法都比较繁难,而且还存在一定缺点,所以现在冷冻复型法的技术设备仍然处于不断改进和发展的阶段。

冷冻复型法优点很多,但有时也存在一定问题,下面只介绍用二次复型法⁽¹⁰⁾发现的问题。二次复型法也称为双面复型法^(3,11)。这种方法是将冷冻的组织切断以后,向相对的断面同时进行喷镀,做出两个互辅复型膜(见图2)。观察结果发现,一个互辅复型膜的某一

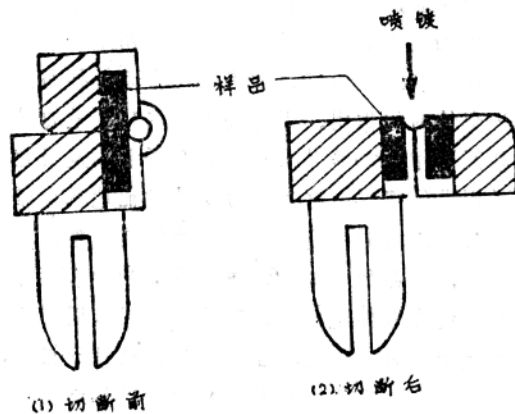


图2 双面复型法示意图

部位若有凸起的颗粒,则对面互辅复型膜的相应部位也要有同样的凹陷。但是在某些情况下,两个互辅复型膜的表面结构并不是完全对应的。例如一个互辅复型膜的某一部位有颗粒而对面的互辅复型膜并没有相应的凹陷,这种情况就是缺乏互辅性或称为塑型不良。这种颗粒在互辅面上没有相应的凹陷,显然是喷镀后出现的人为假象。这种颗粒的来源很可能是水蒸气。

聚集，或者再与甘油等混合而成。另外这种颗粒也可能是由生物膜组分中分离出来的。当然这也很可能是由于喷镀物中的颗粒性物质沾染所致^(12、13)。由于切断时刀刃不洁，沾上油类引起污染等造成以上种种情况，在技术上是可以避免的⁽³⁾。喷镀源质量不良有时也可设法改善，但是以上各种情况也可能由于真空度过低，或由于喷镀时的辐射热所引起，这就涉及到仪器本身的改进问题。

过去常用的冷冻蚀刻装置基本上分为两种类型，一种是开放式的，另一种是关闭式的。例如日本电子公司的产品就是开放式的，好象滑动的冰冷切片机一样，用冷刀横断冷冻样品台上的冷却样品，然后向断面上进行喷镀制成复型膜。日立制作所的冷冻蚀刻装置是关闭式的，样品被包围在铜块中进行切断，喷镀是通过铜块中的孔道将铂碳投射在样品切面上。一般认为关闭式的比开放式的好。但是无论开放式的或关闭式的，都需要在真空喷镀仪中进行蚀刻和复型，因而提高真空度自然成为大家共同注意的问题。

一般情况下在 1×10^{-5} 托的真空中也能制出较好的冷冻复型样品，但是要想进一步提高样品的质量，首先就必须提高真空度。为了提高真空度，采用离子真空泵等进行抽气，近年来已研制出真空度为 1×10^{-7} 托的冷冻蚀刻装置。除了加强抽气动力以外，对全部真空系统也进行了各种改革，例如在设计中尽量缩小高真空的容积，降低抽气负载以提高抽气效能。日立产业赤堀宏博士设计的FD-2A冷冻干燥装置可以在 1×10^{-7} 托的条件下进行冷冻复型（见图3）。使用这种装置可以先将样品放在予抽室中进行冷冻切断，然后送入高真空

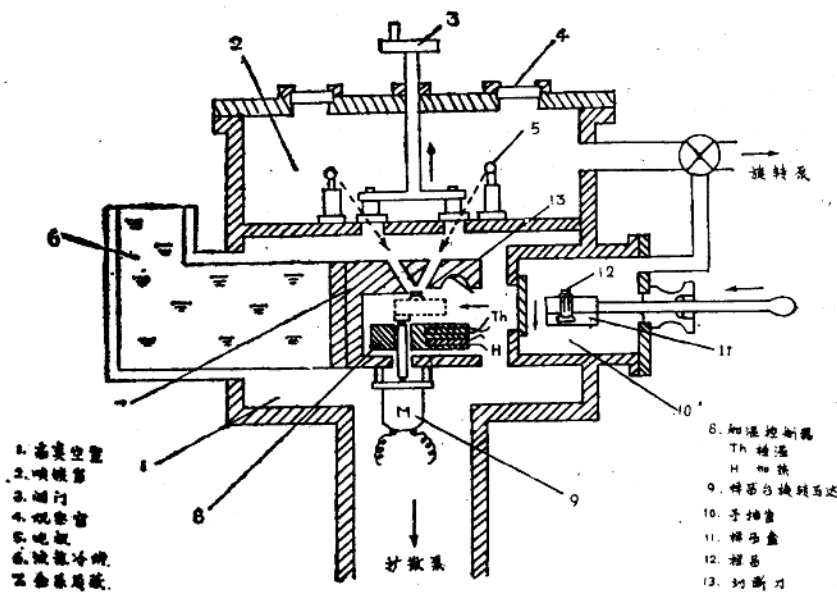


图3 FD-2A 样品处理室结构图

室喷镀铂碳，这样显然可以加速抽气而有利于提高真空度。样品台可被马达带动接受旋转喷镀。放置铂碳电极的喷镀源室和高真空室之间的通道可以根据需要而开放或关闭。在喷镀时样品始终包围在冷却的金属屏蔽之中，大大地减轻了辐射热的损害。特别是用电子束发射枪做为喷镀源，可以喷镀铂钛钨钼，更有利于提高复型膜的分辨力⁽¹⁴⁾。以上就FD-2A冷

事于爆装置介绍冷冻蚀刻仪器技术的改进趋势。其他类型的装置基本上也是围绕以上几个方面加以改进。

关于复型膜的厚度,对进行冷冻蚀刻的技术人员来说,都想事先有所了解,而且还希望能够更准确地自动掌握。就这一方面,有些冷冻蚀刻装置对复型膜的厚度进行了自动调节的设计。例如有的冷冻蚀刻装置定出,在喷镀铂碳时真空度 2×10^{-5} 托,喷射速度 $1.5-2 \text{ \AA}/\text{秒}$,喷射10秒复型膜厚度可达 $20 \text{ \AA}$,喷射碳时真空度为 1×10^{-5} 托,喷射速度 $18-20 \text{ \AA}/\text{秒}$,喷射10秒复型膜厚度可达 $200 \text{ \AA}$ 。虽然不会极为精确,但至少有利于估计复型膜的厚度。这类装置在设计中还注意到减少污染,以防止人为假象^(12,13)。例如用这类装置研究酵母菌,发现付结晶排列一致形态规则,并且可用X线衍射法得出相应的清晰衍射花样。另外冈村和米原还试用钨丝篮喷镀铂碳,代替铂炭投影,也取得良好的效果⁽¹⁴⁾。

在分子生物学领域中,冷冻复型法是研究生物膜内微粒数量大小和分布的重要方法之一。为了进行动态研究,把冷冻复型法和放射自显影技术结合起来的方法也在试行。将放射性同位素标记的样品进行冷冻蚀刻以后,在 -130°C 时涂上核乳胶,在 -80°C 条件下曝光,最后做出的复型膜上就会带有银颗粒⁽¹⁵⁾。这样就可以研究膜内微粒如酶蛋白、抗原和受体等的动态变化。总之冷冻复型法目前虽然使用已很广泛,但是随着装置和技术的改进,必将得到更大的发展。

(李文镇)

参 考 文 献

1. Kohler, J.K.: Advances in Biological and Medical Physics vol 12, 1-84 1968.
2. 松本明: 医学 おけ 电子显微镜の应用—オートラ グラフィー, 免疫电显法, フリーズ・エッチング法および走査电显观察法 つ 临床免疫 6(12): 1031-1038 1974.
3. Southworth, D., et al. Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology. vol . 1976.
4. Kohler, J. K(ed). Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy 67-1121. 1974 Springer Verlag.
5. Moor, H.: Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie Ztschr. Zellforsch., 62(4): 546-580, 1964.
6. Fischer, K., et al. Method in Enzymology vol 32 part B 35-44, 1974.
7. Sleyter, UB., et al. Freeze-fracturing, A review of methods and results. Jour Microsc. 111(1): 77-108. 1977.
8. Builivant, S., et al. Simple freeze fracture replication method for electron microscopy Jour. Cell Biol. 29(3): 435-447. 1966.
9. Costello, M.J., et al. The direct measurement of temperature

- changes within freeze-fracture specimens during rapid quenching in liquid coolants *Jour. Microsc.* 112(1): 17-37, 1978
10. Someda, K., et al: Study of complementarity by the preliminary impression replica. *Jour. Kansai Med. Univ.* 28(2): 263-276. 1976.
 11. 森岡宏行: Complementary Double Replica法 その将来性 *Hitachi Sci. Instrum. News* 16(5): 11-13 1973.
 12. Gross, H., et al: Decoration of specific sites on freeze-fractured membranes *Jour. Cell Biol.* 79(3): 646-656. 1978.
 13. Gross, H., et al: Freeze-fracturing in ultrahigh vacuum at -196°C *Jour. Cell Biol.* 76(3): 712-728. 1978.
 14. 赤堀宏: 冻结试料处理装置の開発(回转蒸着试料ステージの開発) 日本电子显微镜学会第35回学术讲演会讲演予稿集 174頁 1979年.
 15. 村定彦、米原 久: フリーズ・レプ カ法の改良 検討 日本电子显微镜学会第31回学术讲演会讲演予稿集 D-26-1 1975年.
 16. Fischer, K.A., et al: Freeze-fracture autoradiography. Feasibility *Jour. Cell Biol.* 70: 453-458. 1976

冷冻复型法在细胞学与组织学的应用近况

科学的进展往往取决于技术方法的发现和更新。自从发明电子显微镜和超薄切片技术后,使细胞学和组织学进入了一个崭新的阶段。许多过去悬而未决的问题得到了解决。近来扫描电镜和冷冻复型法的应用又弥补了透射电镜的局限性和缺乏立体感的不足,使我们在对细胞超微结构有所了解的基础上,进一步对细胞表面形象和细胞的各种膜结构的特点有了更深刻的知识。因此近来在国外应用冷冻复型法对各种细胞的研究与日而增,在国内也已受到不少学者的重视而正在开展这方面的工作^(1,2)。本文拟就采用冷冻复型技术后在细胞学和组织学领域内的一些进展加以综述。至于冷冻复型法的原理、操作步骤及其优缺点,已有专文论述^(3,4),本文不再重复。

一、膜的结构

冷冻复型法所显示的内容主要是细胞内由膜所形成的各种结构,而细胞的各种膜结构又都是由单位膜形成。所谓单位膜即在透射电镜下所见的二层电子密度大和中间一层电子密度小的三层膜。按其分子组成而言,现在较为公认的是液态镶嵌模型学说,亦即在双层类脂膜中镶嵌着由各种蛋白质形成的微粒^(5,6,7)。其中每一类脂分子的亲水极位于膜的表面,疏水极则朝向膜的中央部。在冷冻复型后其劈裂面均在膜的疏水极,而镶嵌在膜内的蛋白质微