

组织细胞冷冻复型电镜图谱

李 文 镇 主 编

王 仲 涛 应 国 华 雷 建 章
王 静 懿 李 向 印 李 叔 荣 赵 玉 珍 编 著

人 民 卫 生 出 版 社

责任编辑 南 潮
封面设计 王 士 忠

组织细胞冷冻复型电镜图谱

李 文 镇 主 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
(北京市崇文区天坛西里10号)

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米16开本 3 $\frac{1}{4}$ 印张 50插页 58千字

1981年12月第1版第1次印刷

印数：1—3,200

统一书号：14048·3953 定价：3.55元

前 言

电子显微镜和超薄切片制样技术的问世,不仅开扩了人们的眼界,丰富了人们对超微世界的认识,而且大大推动了医学、生物学中许多学科的发展。近年来,扫描电镜和一些样品制备新技术的应用,又使电子显微镜技术日趋完善,在科学研究中发挥着越来越显著的作用。冷冻复型法,就是这些新技术的一种。

经过冷冻复型法——液氮低温处理后的生物样品,不仅可以使组织结构保持近于生活状态,而且通过冷冻切断、真空喷镀等步骤,得到好像浮雕一样的复型膜,使样品断面的各种微细结构印在复型膜上。在透射电镜下观察这些膜,既可充分显示出各种组织不同层次的结构形象,还能展现出各种生物膜结构的特点,可以给出许多有关细胞超微结构的新信息,并且具有图像清晰、立体感强的特点。因此,冷冻复型技术方法的应用,对于探索组织细胞的超微结构,阐明结构与功能的关系,解释某些病理现象,尤其在分子生物学研究和组织细胞三维结构的重建等方面,都具有独特的作用和意义。

鉴于上述情况,自七十年代以来冷冻复型法已引起国内外学者的广泛注意,并在国外有了较大的发展。国内自1978年以来,亦逐渐开展了这项电镜新技术工作。为了适应国内医学、生物学发展的需要,特将我校近三年来开展此项技术所拍摄的部分电镜照片编集成册,以供参考。

根据冷冻复型法应用历史较短,操作较复杂,图像辨认困难,参考文献较少等情况,在本图谱第一部分,结合我们的实验工作,对冷冻复型的技术原理、操作方法、实际应用及其发展近况等问题,分别作了比较详细的论述。图谱第二部分,则分别以细胞、基础组织和器官组织等三个单元,共选入冷冻复型电镜照片140余幅。每幅照片均附有简要的文字说明,以助读者理解。

本图谱系由河北医学院基础医学研究所电子显微镜室、河北医学院基础部组织胚胎学教研组部分教研人员编写。在冷冻复型实验技术和本图谱的初稿审定工作中,曾得到日本电镜专家赤堀宏博士的热情协助和指导;还得到中国动物学会、中国科学院动物研究所、中国科学院生物物理研究所、中国人民解放军军事医学科学院、中国医学科学院、厦门大学生物系、杭州大学生物系、北京医学院、山东医学院、浙江人民卫生实验院等兄弟单位的大力支持和鼓励,特此致以衷心的感谢。

由于我们经验不足,水平有限,在图谱的照片质量、文字说明及编写工作方面定有许多缺点、不妥甚至错误之处,恳切希望读者批评指正。

编 者

1980年4月于河北医学院(石家庄)

目 录

前言	[3]
第一部分：冷冻复型电镜技术简介	1
I. 冷冻复型技术方法	1
一、仪器设备	2
二、技术准备	6
三、操作步骤	7
II. 冷冻复型技术原理	9
一、冷冻和冷冻前的预处理	9
二、切断和蚀刻	11
三、喷镀铂-碳和捞取复型膜	12
四、冷冻复型技术的现状和前景	14
III. 冷冻复型电镜技术在超微结构研究中的应用	17
一、对生物膜膜内微粒的研究	17
二、对核孔、细胞孔及细胞膜孔的研究	19
三、对细胞间连接装置的研究	20
四、对细胞突起的研究	22
五、对其它细胞结构的研究	22
IV. 冷冻复型法在细胞学与组织学的应用近况	23
一、膜的结构	23
二、冷冻复型标本中膜面的命名	24
三、冷冻复型法在细胞学方面的应用近况	24
四、冷冻复型法在基础组织方面的应用近况	26
五、冷冻复型法在器官组织学方面的应用	32
V. 中英文名词缩写对照	44
第二部分：冷冻复型电镜图谱	47
细胞	47
细胞的一般结构	48
细胞膜结构表面和劈裂面的命名法	49
细胞膜和生物膜分子结构的液态镶嵌模型	50
粗面内质网和线粒体	51
高尔基复合体	52
板层体	54
多泡体	55
细胞核	55
基础组织	57

细胞膜的内吸和外排·····	58
紧密连接·····	59
紧密连接和间隙连接·····	61
微绒毛·····	62
红细胞和淋巴细胞·····	63
颗粒性白细胞和白血病细胞·····	64
癌细胞（小鼠艾氏腹水癌细胞）·····	64
成纤维细胞·····	69
胶原纤维·····	70
平滑肌·····	71
心肌·····	74
骨骼肌·····	78
神经纤维·····	80
器官组织·····	85
毛囊·····	86
毛细血管·····	87
脾窦·····	89
胃·····	90
胃底腺之壁细胞·····	92
十二指肠·····	94
胃癌细胞·····	95
小肠·····	96
胃内分泌细胞·····	98
直肠（人直肠癌细胞）·····	99
肝·····	100
胰·····	106
肺·····	107
肾·····	111
输尿管·····	117
甲状腺·····	118
垂体前叶·····	124
垂体后叶·····	125
精子·····	126
附睾·····	128
卵巢·····	131
乳腺·····	136
眼·····	137

第一部分 冷冻复型电镜技术简介

I. 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)。这是一种制作电子显微镜样品的方 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, 冷冻复型法已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方法。后来经过 Branton、Bullivant、Dempsey、Müllethaler、Staehelin、Steere、Weinstein 等人的改善或倡导, 到 1970 年以后, 这项技术很快发展起来。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。为了今后推广和交流, 首先介绍冷冻复型技术的实际操作方法 (图 1-1)。

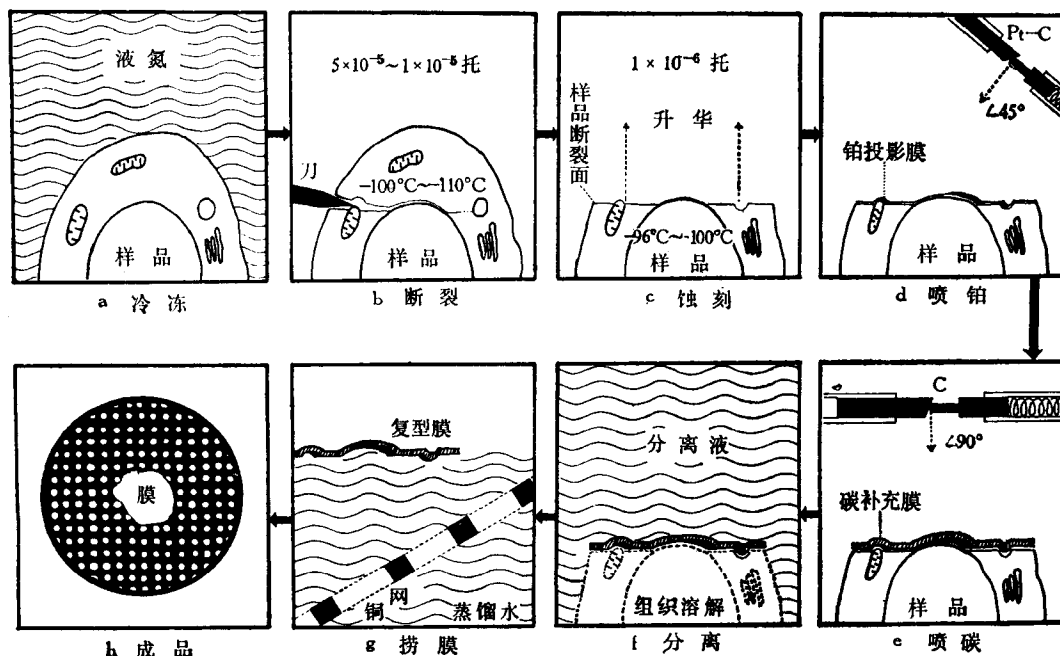


图 1-1 冷冻复型电镜技术操作步骤示意图

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 1-1, 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, 把细胞器的膜结构暴露出来, 这一步骤就称为冷冻蚀刻(图 1-1, c)。如不进行蚀刻就称为冷冻切断。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, 这样就在切断的样品表面形成一层复型膜(图 1-1, d、e)。在此复型膜上则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, 把复型膜下面的组织腐蚀掉, 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 1-1, f、g、h)。由于主要是在透射电镜下观察复型膜, 因此采用冷冻复型这一名称。

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。我们在实践中对他的操作步骤曾稍加改变。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

除以上提到的真空喷镀仪、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线路简单清楚, 只有一个离子真空规, 因而操作简便, 故障较少, 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^{-5} 托, 若要更好的真空度, 需在真空系统管道周围的冷阱中加液氮。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(图 1-2)。

1. 快门拉手(图 1-2) 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 1-3 C、D)。

2. 加温控制插销(图 1-2) 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(图 1-3 C)。

3. 电极柱(图 1-2) 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。

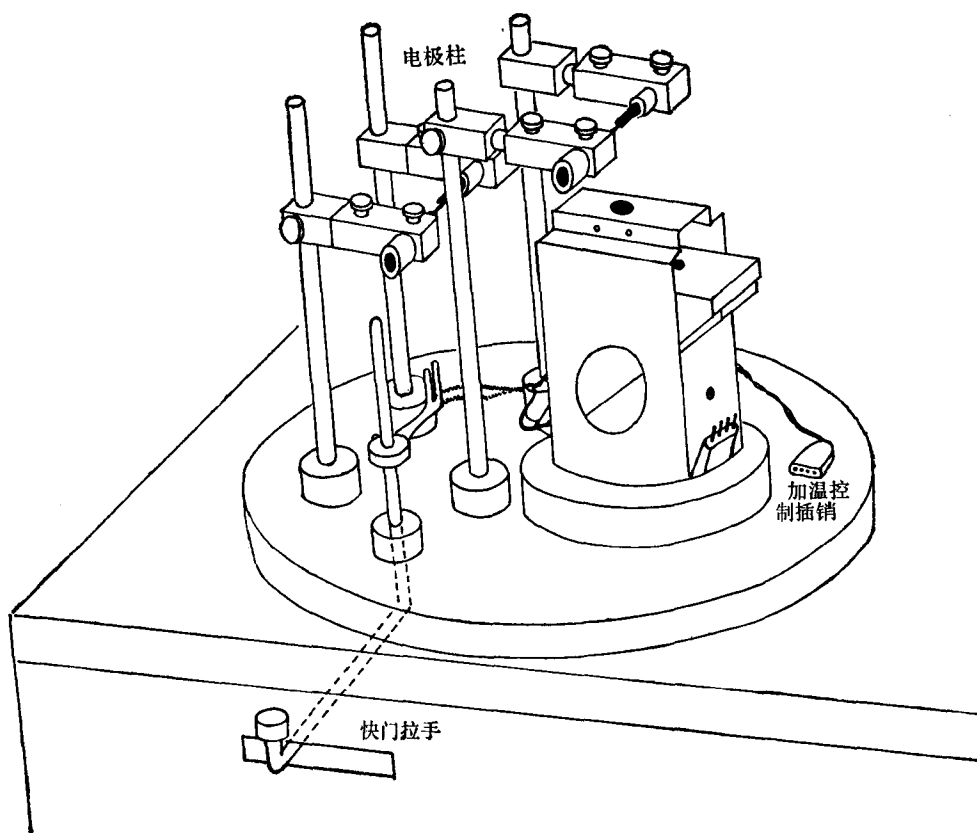


图 1-2 冷冻复型用真空喷镀仪

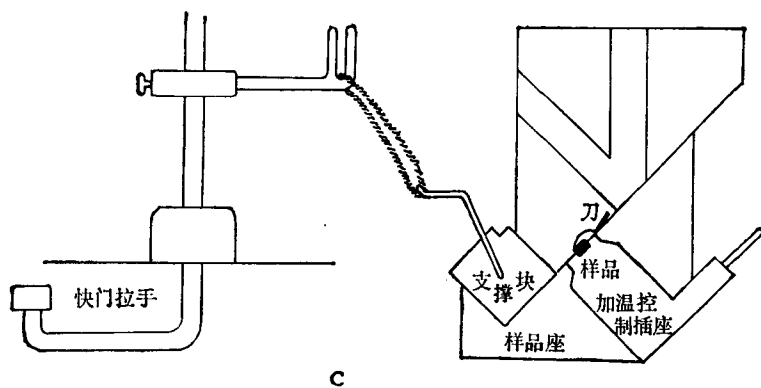
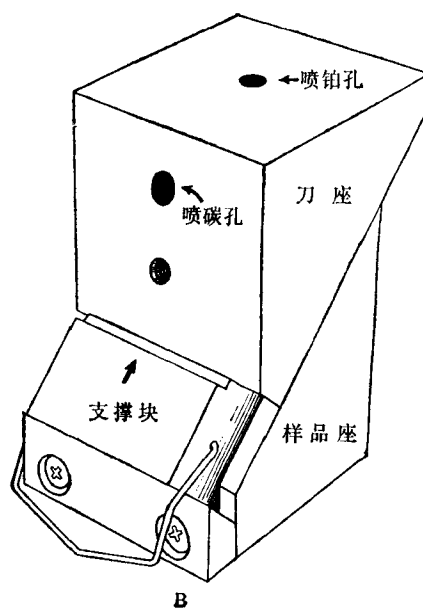
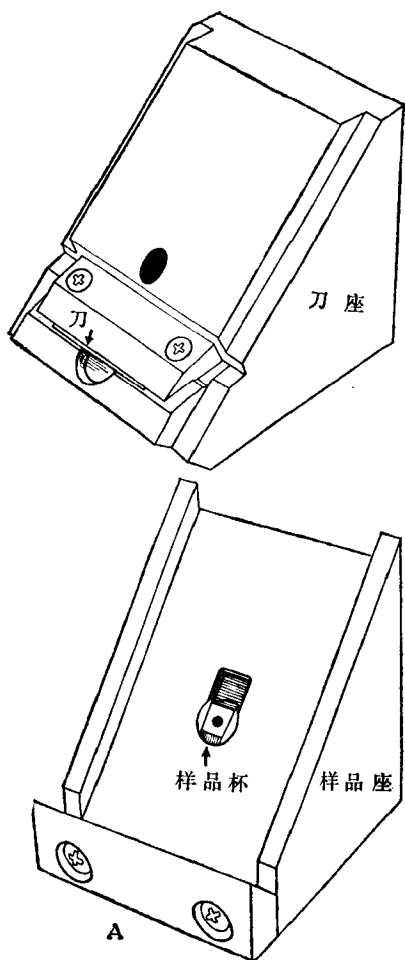
(二) 冷冻切断装置

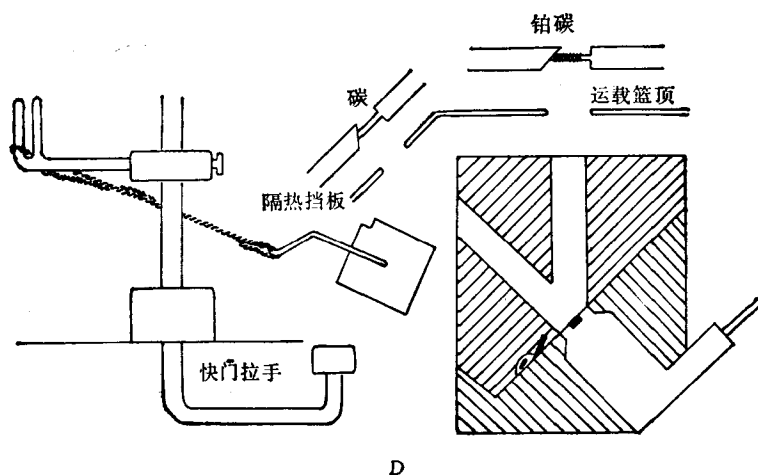
日立 HFZ-1 冷冻切断装置由很多部件组成，例如放置样品座的塑料基盘等，但重要的有以下几种（图 1-3）。

1. 刀座和样品座 都是黄铜制成，分开放如图 1-3 A，组装起来如图 1-3 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相对（图 1-3 C），刀座的喷镀孔正好对准样品，而样品又被包围在铜块之中，以防止喷镀对辐射热的影响。

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 1-2）上，这样就做好切断样品的准备（图 1-3 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 1-3 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 1-3 C），里面有热电偶，以备检测样品的温度，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销（图 1-2）插在一起，就把样品台和加温控制器联通（图 1-4 C）。





4. 运载篮 刀座和样品座都放在运载篮中以便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的作用（图 1-3 E）。

（三）加温控制器

日立 FE-1 加温控制器由三部分组成，组装在一起如图 1-4。

1. 保温瓶 图 1-4 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，连线一端与真空喷镀仪中的加温控制插销（图 1-2）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 1-4，B，控制器上有显示温度的仪表（a），上面的刻度是参考数值，蓝线指示在 -180°C 左右，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）。

3. 加温控制插销和插座 见图 1-4，C，前者经常放在真空喷镀仪上如图 1-2，后者经常放在样品座上如图 1-3 C。

把以上三部分联在一起，就形成一个既能加热蚀刻，又能检测样品温度的线路，如图 1-4，D。

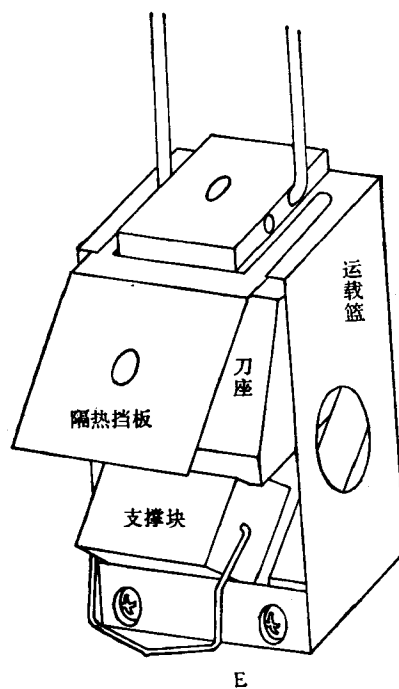


图 1-3 冷冻切断装置

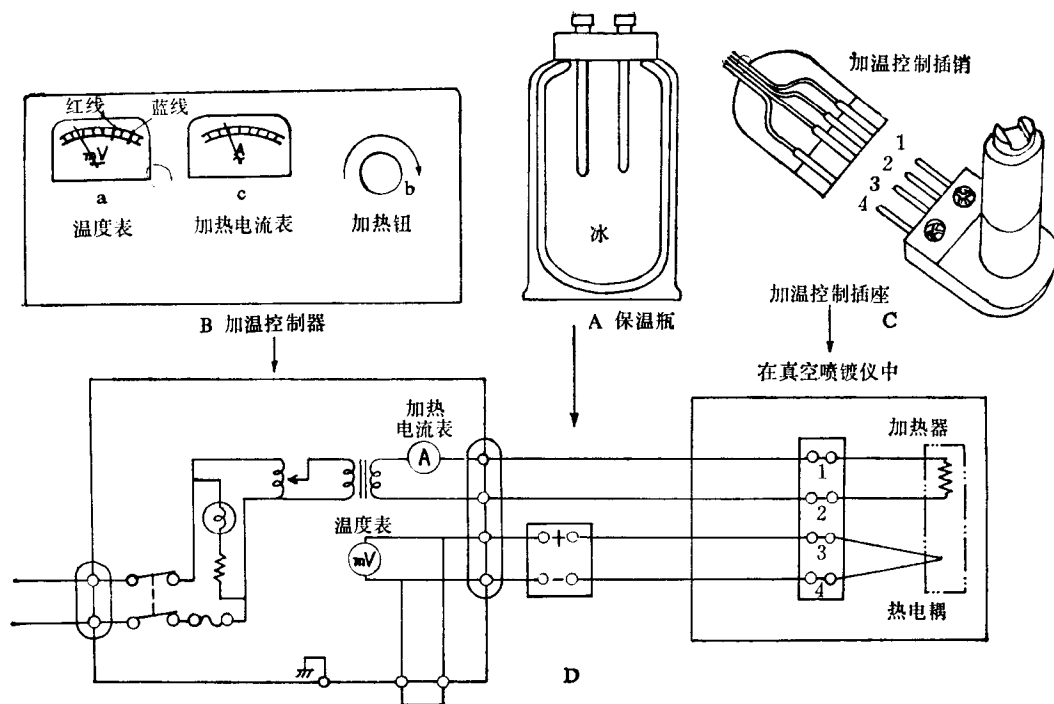


图 1-4 冷冻复型用加温控制器

以上是我们使用的冷冻复型装置，以此为例进行介绍，更便于了解。其他如日本电子公司的冷冻蚀刻装置与此不同，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，再接好加温控制器连接线，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) 碳棒与铂丝的制备

1. 碳棒 直径为 5mm，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 5mm，直径 1.5~2.0mm 的细条状（图 1-1，d、e）。

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

3. 组装 铂碳发射点与样品表面呈 45° 角 (图 1-1, d), 碳的喷发点与样品面呈直角 (图 1-1, e), 二点到样品表面的距离均为 10~11cm。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, 要在喷铂前预先将绕在碳棒上的铂丝, 在低真空状态下溶化呈珠状 (图 1-5), 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, 应予以重视。

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 (组织块), 切成高 3mm、横径 1~1.5mm 大小, 并放入在冰箱中预冷的固定液中。

2. 固定 样品块经 15 分钟固定稍硬后, 即可取出修整。修好后的样品块仍继续放在固定液内, 约 1~3 小时。一般每 ml 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 $\frac{1}{10}$ M 磷酸缓冲液 (pH 7.2~7.4) 反复洗涤 0.5~1 小时, 再放入 30% 甘油生理盐水 (pH 7.4) 中浸渍, 约 8~24 小时。

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 1mm 左右为宜, 并用滤纸吸去其周围多余的液体 (图 1-6), 用玻璃平皿盖好备用。

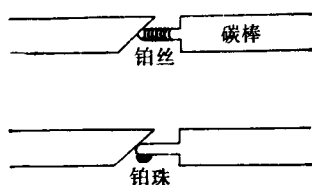


图 1-5 烧制铂珠

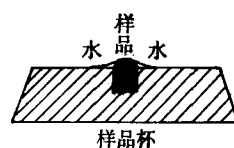


图 1-6 装样品

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以后, 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 1-3 C)。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^{-5} 托以上,样品温度在 $-100 \sim -110^{\circ}\text{C}$ 之间,是进行样品断裂的最佳时机。若此时样品温度过低,可打开加温器,在 2~3 分钟内缓慢升温,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 1-4, C、D),并将样品劈断,在样品表面留下一劈裂后的横断面(图 1-1)。

(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,更加清晰地暴露出来。冷冻蚀刻法要求样品断裂以后,对样品继续升温至 $-96 \sim -100^{\circ}\text{C}$,时间约 1 分钟左右。并在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-6}$ 托的高真空状态下完成(图 1-1, 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。操作时应先将碳棒预热,再加大电流,使铂在 2~3 秒钟内溶化、气化,当刚刚出现碳花时则立即终止通电(图 1-1, 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。待样品周围渐渐出现气泡,复型膜亦逐渐与样品分离。选用细吸管,将漂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 1-1, f)。

虽然一般认为如何把复型膜比较完整地剥离下来是一难度较大的问题,但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% 左右的丙酮液内,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

面漂浮展开。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，用透射式电子显微镜观察分析（图 1-1, g）。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 125 KV，这样就能使图象更为清晰。

（应国华）

II. 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。此法有以下优越性：①冷冻能保持细胞原来的结构，使之更接近于生活状态。②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。③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。④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，正在设法进行各种改进。本章只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。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，总结介绍一些基本理论知识。

一、冷冻和冷冻前的预处理

近年来低温生物学有了很大发展，低温生物学方面的成就给冷冻复型法提供了有力的理论基础。例如在进行冷冻复型的过程中，最严重的问题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，以保持细胞微细结构的完整。我们在实际工作中，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良好时，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 我们在工作中发现，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，形成冰晶的机会就较多。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^[5,6]。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 ；一般糖原较多的细胞，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 $-2\sim-5^{\circ}\text{C}$ ，而再结晶点可达 -55°C ^[5]。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、二甲基亚砜等防冻剂，其目的主要就是为了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 ^[6]。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首先用戊二醛固定^[6]。

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秒钟内用液氮将样品冷却到 -196°C ^[5]，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缘故。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^[6]。有关部件的污染或附有水分，都会妨碍接触，引起一定程度的绝缘，所以冷冻切断装置的有关部件在用过以后必须彻底清洗干燥。样品要尽可能地小，以减少表面和中心的温度梯度变化^[1,6]。掌握以上原则，就会加快冷冻速度。

冷冻剂一般都用液氮，其冷冻速度最理想，不少专家还介绍结合预冷处理以加快冷冻速度。例如先用氟利昂将小滴的酵母菌混悬液预冷到 -160°C ，以后酵母菌的冷冻速度可达每秒下降 100°C ，即 $-100^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ ，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 ^[5]。但是，根据我们的经验，不用氟利昂等预冷，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 $-1,000^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ ，甚至 $-10,000^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ ^[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掰裂和凿铲作用^[6]。因此，在掰裂面上即可有细胞、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。既然主要是为了掰裂和凿铲，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^[7,8]，也就是用 -196°C 的刀切断 -196°C 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°C 加热到 -100°C 左右，用低于 -100°C 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°C 左右，那么在 -100°C 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率较少。如果是在大气中切断用液氮冷冻到 -196°C 的样品，等温度回升到 -100°C 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°C ，真空度为 1×10^{-5} 托时，蚀刻速度为 $14\text{ \AA}/\text{秒}$ ^[2]。

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°C ，蚀刻速度可以增加5~20倍。例如真空度为 1×10^{-6} 托的条件下，蚀刻时的温度为 -130°C ，蚀刻速度很低为 $0.01\text{ \AA}/\text{秒}$ 。温度为 -120°C 时，蚀刻速度增长20倍为 $0.2\text{ \AA}/\text{秒}$ ，仍然不高。 -110°C 时为 $2.5\text{ \AA}/\text{秒}$ 。 -100°C 时为 $20\text{ \AA}/\text{秒}$ 。 -90°C 时高达 $140\text{ \AA}/\text{秒}$ ^[1]。由此可见，在 -110°C 时，蚀刻太浅，变化太小；在 -90°C 时，蚀刻太深，变化太大，所以，最合适的蚀刻温度是 -100°C 左右。特别可以看到，温度由 -130°C 升高到 -90°C ，变化 40°C ，而蚀刻速度由 $0.01\text{ \AA}/\text{秒}$ 上升到 $140\text{ \AA}/\text{秒}$ ，增快14,000倍。

蚀刻主要是将冰变成水蒸气的过程，这时必然要受到水的蒸气压的影响。在 -100°C 时水的蒸气压是 1×10^{-5} 托^[2]（图7），而真空度要达到 1×10^{-5} 托时才能进行喷镀，所

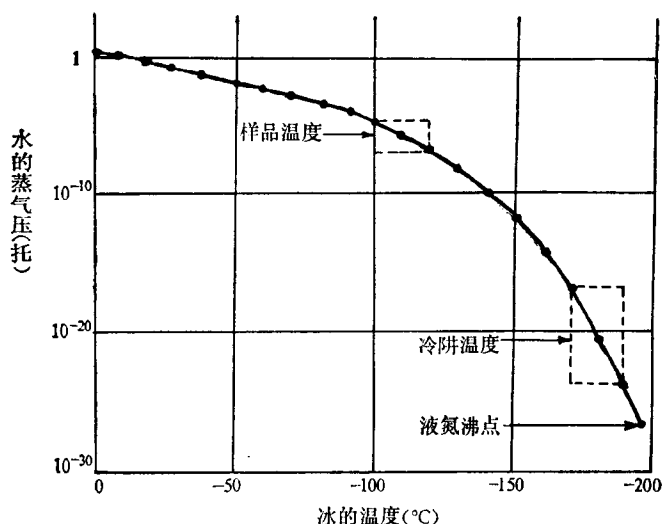


图 1-7 冰的温度和水蒸汽压的关系

以 -100°C 对蚀刻和喷镀都是适宜的温度。从图 1-7 也可以看出，假如是在 -150°C 时蚀刻，水的蒸汽压为 1×10^{-10} 托，真空度也要到达 1×10^{-10} 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°C 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^{-5} 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^{-8} 托之间，温度在 -100°C 到 -110°C 时，蚀刻的时间约为 $15 \sim 90$ 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，而破坏细胞的微细结构。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。这种反差过强的图象是很不理想的。喷铂以后，在断面上形成的膜薄而且不均匀，这样就需要再喷碳使膜增厚加固。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