

用冷冻复型法制备生物样品

卢宝廉 甘雅玲 周 钢 刘笑燕 李纯义

(中国科学院动物研究所)

冷冻复型法作为电镜的样品制备方法及其研究膜结构的手段目前已经有许多单位在开展,但是,操作进程中许多小问题掌握不好都影响成功率。根据我们的经验,认为有如下几个问题:

(一) 抗冰晶问题 细胞外部或内部有大小冰晶,这主要是预处理不当,细胞内水份结冰,产生冰晶损伤(图 1, 2 见封 2, 下同)。

1. 预处理 一般用甘油作为抗冰晶剂。甘油浓度根据材料而异,含水份多的可用 40% 甚至高浓度的甘油生理盐水处理,一般用 30%, 低于 15% 效果不好;预处理时间由 30 分钟至 24 小时,一般 8 小时左右,时间太长细胞器如线粒体发生肿胀,内质网变成小泡状,质膜周围

出现小泡;时间太短细胞未均质化就易出现冰晶,其它抗冰晶的药物有乙醇、二甲基亚砷、葡萄糖、乙二醇等。

2. 冷冻速度 冷却速度要快,将样品快速投入液氮内,冷到 -196°C ,标本要尽可能小,标本小减少表面和中心温度的梯度差,这样标本不会出现冰晶。标本越大,冷冻越慢越易出现冰晶,有人将样品先放入氟立昂(-160°C)再移入液氮(-272°C)中,这样效果好。

3. 标本固定 许多种膜不能耐受甘油浸泡,如不固定只用甘油预处理,膜会出现肿胀、蛋白质凝聚、空泡等现象,故标本用戊二醛固定是不可少的。

(二) 切断与蚀刻

1. 真空度 切断与蚀刻时真空要求时间短而达到高真空 2×10^{-7} 左右, 如果抽真空时间太长标本温度升高, 则不利于作复型。

2. 温度 蚀刻的温度根据标本而定, 一般 -100°C 效果较好, -80°C 易蚀刻太深, -150°C 蚀刻时间长则表面易水汽凝集, 出现人工假象。液体悬浮标本, 蚀刻 1 分钟或不蚀刻; 组织块 4 分钟, 昆虫 5 分钟左右。

3. 刀温要低 刀要锋利, 不能有缺刻, 不然样品上会出现划痕或刻不着 (图 4)。

(三) 复型膜

1. 无复型膜 铂碳未喷出, 没对准孔洞; 样品座、刀座、铜块温度未回升, 以致孔洞内结霜, 铂碳喷不进去。液体悬浮标本蚀刻的时间长, 温度高, 以致样品断裂面不好。

2. 膜开裂 喷铂以后停留时间长才喷碳, 使二层膜离开; 辐射热引起膜开裂, 铂未喷上 (图 5)。

3. 膜不成片, 绉缩 喷镀厚度不够, 铂碳膜的厚度不足以形成复型, 复型时样品裂开; 塑胶状组织冷冻温度不够低, 切断时易挤压引起变

形; 蚀刻后立即喷铂碳, 表面有水蒸汽凝聚影响复型膜。

4. 反衬度 复型膜太薄反衬度不够; 太厚反差则太强; 加速电压太高使铂再结晶而形成再结晶的膜影; 真空度不够高样品被粗碳粒子盖住; 双影的出现其长影为铂碳, 短影为碳蒸发颗粒未成碳膜; 投影角度, 一般材料大, 可用 $40-50^{\circ}$, 材料小用 $15-25^{\circ}$ 。

(四) 腐蚀 (图 3, 6)

复型膜作好后最重要的是腐蚀漂洗, 掌握不好导致复型膜全碎了、或膜未腐蚀干净, 污物很多。目前使用较多的是次氯酸钠 (或“花王”洗剂)、铬酸等。根据不同标本选用, 一般动物组织用 70% 次氯酸钠, 昆虫几丁质很坚硬用纯次氯酸钠 1 小时或过夜, 液体悬浮样品则只需在重蒸水中加 1—2 滴就行了, 植物组织用 40% 铬酸, 分离的细胞器用稀次氯酸钠, 含酯类多的样品用铬酸或丙酮, 用 1:1 的氯仿、甲醇亦可, 腐蚀完毕要用 30% 丙酮和重蒸水洗 2—3 次, 然后捞在 400 目的铜网上以待观察。

《用冷冻复型法制备生物样品》一文之附图 (正文见第30页)

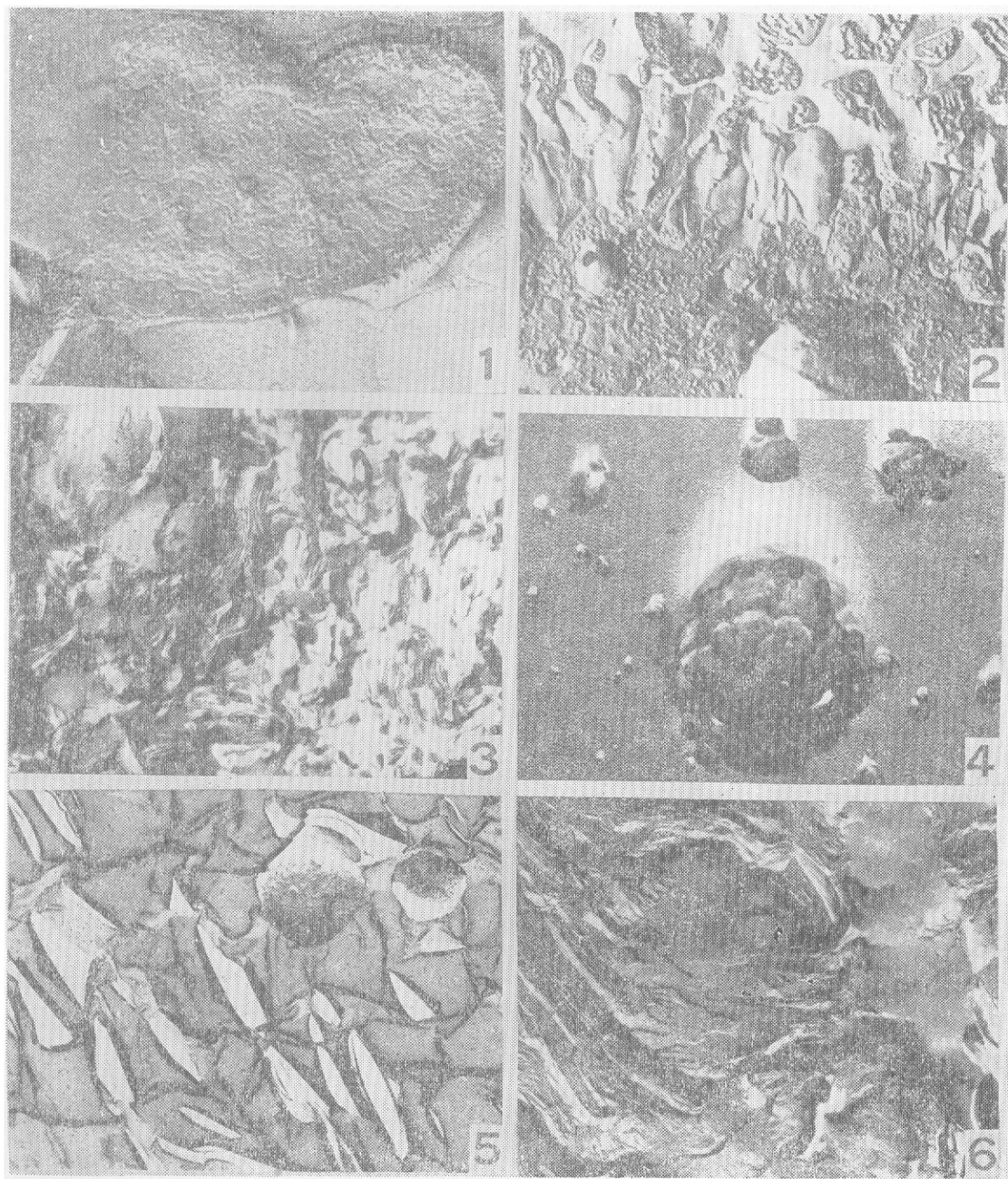


图 1. 细胞内的冰晶 $\times 40000$; 图 2. 细胞外的冰晶 $\times 20000$; 图 3、6. 腐蚀不干净 $\times 40000$;
图 4. 样品没有蚀刻 $\times 40000$; 图 5. 真空不高碳粒子粗及辐射热引起膜破裂 $\times 10000$ 。