

译功能过程中, poly(A) 长度逐渐变短形成的。从图 1 的放射自显影谱带, 直接可读出 poly(A) 长度到约 90 个碱基, 再长的 poly(A) 由于凝胶分辨率的限制, 不能用肉眼读出。实验发现, 可辨范围内 poly(A) 长度之对数与其迁移率有线性关系。我们根据这种关系推算出鸡和兔血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 最长者分别为 150—160 个和 170—180 个碱基。

从使用的混和酶专一性降解 3' 端标记的

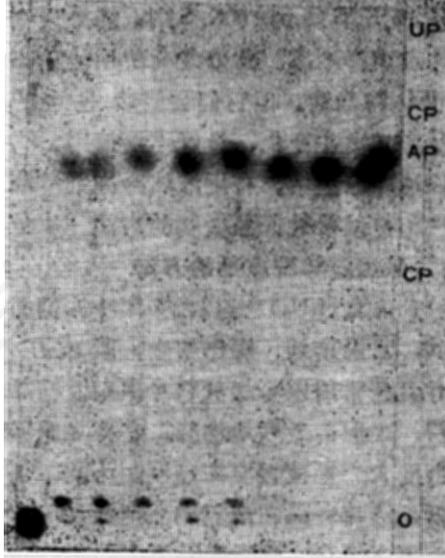


图 2 RNase T<sub>2</sub> 降解 3' 端标记 poly(A) 的层析放射自显影图谱

O——基线 Ap、Gp、Cp、Up 分别为四种单核苷酸层析位置

3' 端标记的 poly(A) 谱带转移到 PEI-纤维素薄层上后, 原位用 RNase T<sub>2</sub> (200 单位/毫升, 0.1 M 醋酸铵 pH 4.5) 降解成 3'-单核苷酸, 在 1.0 M LiCl 中上行层析 6 小时, 于室温放射自显影。

mRNA 和放射自显影谱之间间隔的均匀程度, 可以肯定各带均为 poly(A) 片段。为了进一步证实, 我们又将放射谱带转移到 PEI-纤维素薄层上, 用 RNase T<sub>2</sub> (0.1 M 醋酸铵, pH 4.5) 进行原位酶解, 得到 3' 标记的 Np<sup>32</sup>, 在 1.0 M LiCl 中上行层析(图 2) 所得到的放射自显影图谱上各点均为 Ap<sup>32</sup>, 这就毫无疑问地证明图 1 的各条谱带均为 poly(A)。

从实验结果可见(图 1), poly(A) 片段越大, 放射自显影谱带越弱, 这可能由两种原因造成: 1. 由于 mRNA 代谢过程使含有较长 poly(A) 的 mRNA 越来越少; 2. RNA 连接酶标记小片段比大片段效率高。

本方法可适用于所有 mRNA 3' 端 poly(A) 序列长度及分布的测定。

### 参 考 文 献

- [1] Adesnik, M., et al., 1972. *J. Mol. Biol.*, 71: 21-30.
- [2] Darnell, J. E., et al, 1971. *Science*, 174: 507-510.
- [3] Gorski, J., et al, 1975. *Nature*, 253: 749-751.
- [4] Hunt, J. A., 1973. *Biochem. J.* 131: 327-333.
- [5] Jacobs-Lorena, M., et al, 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: 1425-1428.
- [6] 魏西平等. 1982. 《生物化学与生物物理进展》1 期, 60 页。
- [7] Randerath, E., et al, 1967 *J. Chromatog.*, 31: 485-499.
- [8] Randerath, K., et al, 1964. *J. Chromatog.*, 16: 111-125.

## 生物样品制备的冷冻技术

锤慈声 陈桂荣

(上海第一医学院)

在分子水平上探讨生物组成, 用电子显微镜(EM) 与生物化学和 X 线衍射等方法有着根本的差异。采用电子显微镜可以探讨活细胞及活组织是以怎样的形式存在并起作用的。

如何使样品保存得近于活体状态, 并能放

在电镜下进行观察, 是样品制备方法的关键。用醛类和 OsO<sub>4</sub> 固定剂进行处理, 是为了使活细胞体的生命现象在瞬间停止并固定住, 并使在以后的各种处理中尽可能少发生变化。脱水、包埋、薄切、染色则是为了使固定后的样

品能进行超薄切片和用电镜观察。可是,所用的固定剂并不能将组成细胞的一切要素都固定住。可溶性物质在固定液里及脱水过程中,可能溶出、移位。用重金属盐进行染色,从某种意义上来说会导致假象的形成。而且,在固定、脱水、包埋、薄切的过程中,由于收缩、膨胀所致的样品变形也在所难免。为此,创造一种能尽量使活细胞的结构保持原样并可供电镜观察的样品制备方法就成了关键。冷冻技术就是在这样的情况下产生的。80年前,Altmann就利用物理手段——冷冻代替化学药物进行固定。从此,新鲜不经固定的样品冷冻干燥法和冷冻置换法成了光镜水平组织化学不可缺少的手段。用于电镜的尝试亦从很早就开始了。但是,要使微细结构保存得近于活体状态,至今还存在许多问题。下面我们根据日本东京大学解剖学主任山田英智教授1981年10月来上海讲学期间对此问题所作的介绍(结合他在讲学期间所提供的资料),将目前冷冻技术使用的现状以及尚存在的问题归纳介绍如下:

### 一、冷冻法

细胞和组织通常都含有不少水分,其含水量及其它成分的种类和数量根据不同的细胞而有差异。在使用酵母细胞所作的实验中,我们可以看到:将细胞慢慢冷冻( $10^{-2}\text{K/S}$ 以下)时,细胞外液就开始形成冰晶。抽出细胞内水分,细胞就收缩。能耐受这种破坏的细胞,在这种状态下亦可维持生命。要是加快冷冻速度,细胞内外都会形成冰晶,结构就遭到破坏。这样的冷冻法不能用于形态学方面的观察。冷冻速度如达到 $10^4\text{K/S}$ 就不会形成冰晶而产生所谓“玻璃化”(vitrification)。细胞在这种状态下,形态上和机能上都保持了原有的状态。然而,要使细胞玻璃化,就必须有一定的临界冷冻速度。能达到临界冷冻速度的方法又特称“快速冷冻法”。临界冷冻速度根据细胞的种类亦即含水量、溶质成分的种类及数量而有所不同。据Riehle报道,纯水需要 $10^6\text{K/S}$ 以上;

细胞内一般需要 $10^4\text{K/S}$ 左右。可是,组织在冷冻时,热只能经样品表面传导消失,所以快速冷冻只能在样品表面达到。据报道,纯水表面约1微米、组织表面约2—3微米是玻璃样状态的范围。当然,这一数值也因样品种类、冷冻方法、冷冻剂种类和温度而有所不同。此外,确定玻璃样状态范围的方法还存在着问题。样品冷冻时,为避免形成冰晶,有时还使用防冻剂。例如:用20%的甘油使临界冷冻速度从 $10^4\text{K/S}$ 降到 $10^2\text{K/S}$ 时,能形成0.5毫米厚的玻璃样冷冻。此外经常使用的防冻剂还有DMSO和蔗糖。但它们会使活细胞的构成成分及形态发生变化,最好不要使用。

快速冷冻法中,有用液体冷冻剂浸渍样品的方法和样品接触低温金属的方法。

#### 1. 采用液体冷冻剂的方法

(1) 液氮( $\text{LN}_2$ ) 这种液体冷冻剂因为较易得到,且温度低、操作安全,所以广为应用。并且还常用以冷却其它冷冻剂。样品放入液氮后,表面会激烈地沸腾,在样品周围产生气泡层而大大地减慢冷冻速度。为此,可采用边喷射,边将样品在液氮内快速摆动的方法,使样品表面经常接触到新的液氮。Sevéus<sup>[1]</sup>曾将处于融化状态的半固体 $\text{N}_2$ 用于冷冻。把样品置于将融化的 $\text{N}_2$ 内就会在没有气泡形成的状态下快速冷冻。据测定,可得到5—8微米厚的玻璃样冷冻。

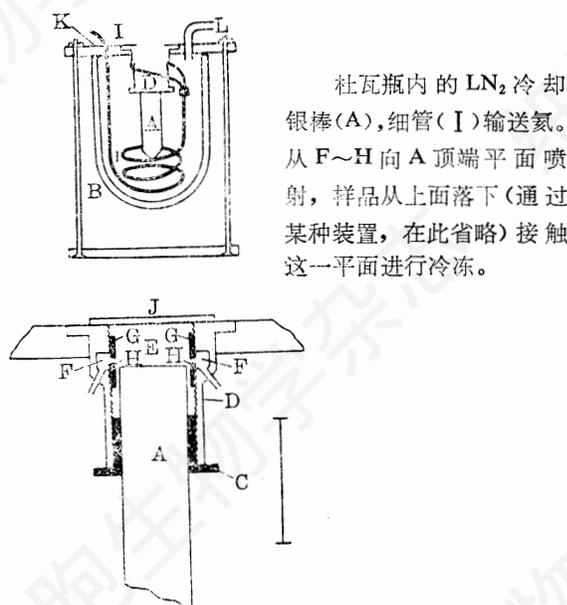
(2) 丙烷 融点低、难以气化、热传导性能好,是一种早就广为应用的冷冻剂。由于是可燃性液体,所以操作时要注意。

(3) 氟里昂 冷冻速度不及丙烷,但操作简便。据Costello等<sup>[2]</sup>测定的结果,氟里昂13似乎最好。但是样品较大时,还是氟里昂12、22的冷冻曲线好。Somlyo, Shuman, Somlyo<sup>[3]</sup>用磁性搅拌器搅伴用 $\text{LN}_2$ 冷却的氟里昂22,使之达到 $-164^\circ\text{C}$ ,再用汽枪以60厘米/秒的速度将装在不锈钢制小样品台上的样品射入氟里昂22中进行冷冻。如此能重复得到冷冻良好的样品。

(4) 液体氦 II 氦在临界温度 5.2K 以下时成为氦 I, 温度再下降达到  $\lambda$  点即 2.19K 时变成氦 I, 其比热、热传导、粘性等物理性质发生骤变。氦 II 的热传导性可达到氦 I 的 100 万倍。称此为“超传导、超流动”性质。一般认为, 在这种极低温度下具有的超热传导性作为生物样品的冷冻剂是理想的。但技术上有一定困难。

## 2. 接触低温金属的冷冻法

使用液体冷冻剂的缺点是液体气化会导致组织表面的热传导受阻, 减低冷冻速度。而且, 除了氦 II 之外, 其它液体冷冻剂的热传导性都不高。采用接触低温金属的冷冻方法可以克服这些不足之处。Van Harreveld 和 Crowell<sup>[4,5]</sup> 最先报道了这种用于电镜的样品制备方法。以后, 又由他们的小组进一步发展。他们的快速冷冻装置如图 1 所示。将长 13 厘



杜瓦瓶内的  $\text{LN}_2$  冷却银棒(A), 细管(I)输送氮。从 F~H 向 A 顶端平面喷射, 样品从上面落下(通过某种装置, 在此省略)接触这一平面进行冷冻。

图 1 Van Harreveld 等制作的冷冻台

米、直径 2.7 厘米的银棒直立在盛有  $\text{LN}_2$  的杜瓦瓶中, 露出的表面要磨得象镜面一样光滑。从侧面通过一根细管子向表面喷射干燥氮气。杜瓦瓶口密闭, 通过减压降低  $\text{LN}_2$  的温度。粘附在一根细棒顶端的样品通过活塞, 迅速、垂直地压在银棒表面上, 靠弹簧使细棒停

止。他们用此装置以琼脂块为样品测定了冷冻速度。结果得到 5 微米及 10 微米深度的冷冻。时间分别是 4.1 和 8.3 毫秒。0.3 毫秒冷冻的表层幅度是 0.36 微米。他们估计, 用此方法可达到 10—15 微米深度的玻璃样冷冻。

山田和白仓在讲学中介绍了他们实验室中应用的简易装置。他们在一个铜圆柱体上装了一个直径 6 厘米的纯铜(99.99 $\pm$ %)圆盘, 表面磨得象镜面一样光滑, 放在一个用泡沫塑料制成的容器内。容器内盛液氮, 容器盖距圆盘 2 厘米, 盖中央有一个 6 厘米直径的圆窗, 气化的  $\text{LN}_2$  通过盖上的圆窗向上顶, 外界潮湿的空气就不至于在镜面上结霜。此时, 将样品快速压在镜面上, 冷冻后的样品再放入  $\text{LN}_2$  中。注意在样品下降所经的管道内要有加热装置, 使管中温度保持在室温, 不使样品在接触镜面前产生缓慢降温。用这样的方法可达到 5—10 微米厚的快速冷冻层。如用液氮代替液氮, 由于氦 I 的温度为  $-269^\circ\text{C}$ , 可使铜的热传导性提高 100 倍以上, 所以用此装置就可达到 20—30 微米厚的良好冷冻层。使用此方法时, 由于样品下降速度快、压力大, 易使样品出现机械变形, 所以不能用力过猛, 同时, 接触镜面后的几秒至十几秒钟内样品不可移动。日本日立公司的赤堀宏先生根据山田教授的要求, 已试制成功 RF<sub>1-2</sub> 快速冷冻仪, 使用液氮作冷冻剂。在讲学期间作了示范表演。

## 3. 冷冻法小结

如上所述, 接触低温金属的快速冷冻法目前来讲是一种重复性好、深度大、效果良好的方法。可是, 不管哪种方法, 冷冻时都应注意 1) 样品要尽量小; 切样品时尽量避免机械损伤。2) 样品的切下到冷冻要在最短时间内完成; 冷冻前不要使样品表面干燥, 为此可在湿室内进行。3) 在接触冷冻剂的过程中, 样品温度下降, 注意不要产生冰晶。4) 即使进行了玻璃样冷冻, 其后, 为了做后处理, 在移动样品的过程中, 如果温度上升还会重新产生冰晶, 也就是再结晶。再结晶的温度随样品的种

类不同而不同。一般认为是在  $-80$ — $-130^{\circ}\text{C}$  左右。总之,要知道冷冻得是否好,必须用下述方法作电镜观察。特别是,由于冷冻深度不同,在冷冻置换包埋以后,最好制作样品全层的切片进行观察。

## 二、冷冻样品的进一步处理

方法归纳如下:

- 冷冻干燥法 → 扫描电镜术 (SEM)  
 → 包埋、薄切 → 透射电镜术 (TEM)  
 X射线显微分析 (XMA)
- 冷冻置换法 → SEM  
 → 包埋、薄切 → TEM、XMA
- 冷冻切片法 → 正染色、负染色 → TEM  
 → 冷冻干燥 → TEM、XMA  
 → 临界点干燥 (CPD) → TEM
- 冷冻复型法 → 冷冻表面复型、冷冻断裂复型、  
 冷冻蚀刻复型
- 冷冻 TEM 和冷冻 SEM

### 1. 冷冻干燥法 (FD)

样品经快速冷冻后,呈玻璃样。当水分子升华后,样品就会干燥,除水以外的物质都会保存在原来的位置上,甚至连生物学的活性也可被保存下来。可是,实际上与常规的方法相比,细微结构的保存难以十分满意。并且,由于装置和操作都较复杂而没能得到普及。只是妹尾等人<sup>[6]</sup>在较早时期用此方法取得了较满意的结果,他们在狭窄的表层观察到了无冰晶形成、结构保持良好的区域,并观察到粗面内质网保持了有规则的排列及核糖核酸酶处理后核糖体消失等现象。他们的方法启示人们可在切

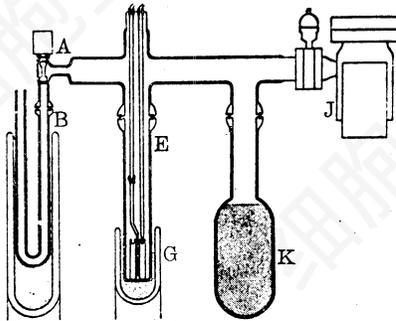


图 2 Coulter 等的冷冻干燥装置(说明参照本文)

片上进行组织化学反应。

许多研究者制成了种种 FD 装置,但基本上与 Gersh 最初制成的相似。将冷冻后的样品放在低温下减压,达到比这个温度下的水蒸气压更低的真空度,使水分子升华。为了防止再结晶,最好使样品保持在  $-80^{\circ}\text{C}$  以下,真空度越高干燥越快。以 Coulter 和 Terracio<sup>[7]</sup> 的装置为例示于图 2。样品台是组装有加热器和热电偶的铜块 (G),上面有几个放样品的小窝,置于用  $\text{LN}_2$  冷却的玻璃管 (E) 的底部,在 (K) 内灌满经加热干燥的  $5 \text{ \AA}$  的分子筛 (Molecular sieve)。首先打开 (A) 阀,通过 U 形管 (B) 用机械泵抽真空。用  $\text{LN}_2$  慢慢冷却 (B)。这时, (K) 内等处的水分在 U 形管壁上结冰,关闭 (A) 阀,切断 (B)。用  $\text{LN}_2$  从外部冷却 (K),装置内压降到  $1 \times 10^{-7}$ , 水分压升到  $6 \times 10^{-9}$  Torr。将样品台的温度每小时上升  $10^{\circ}\text{C}$ ,用分压计 (J) 测量此期间的水分压,结果如图 3。

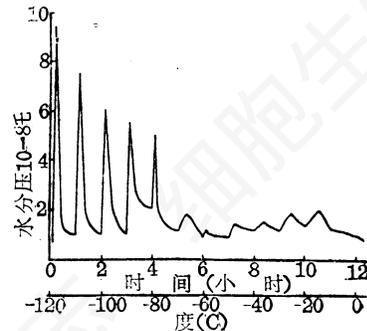


图 3 冷冻干燥器内的水分压的测定  
( $1/4\text{mm}$  大小的肾脏组织)

每次温度上升,分压也就急剧上升,接着再下降。这种现象达到  $-80^{\circ}\text{C}$  时突然停止。据此可以判断出样品是在温度上升到  $-70^{\circ}\text{C}$  时(5小时)干燥的。

最近制成的冷冻断裂 (Freeze-fracture) 装置可以调节样品台的温度,作为 FD 装置使用也很方便。

干燥后的样口原封不动,或用  $\text{OsO}_4$  蒸气等作化学固定后进行树脂包埋、薄切,就可供电镜观察。当进行 XMA 时,用无水槽的刀进行切片,然后将干切片机械地贴在载网上。切

片如漂浮在液面上(湿切片),钾等元素很容易从组织内丢失。未经固定、染色的经冷冻干燥的包埋组织,电子束照射时无反差,识别细微结构有一定困难。

冷冻干燥以后进行离子溅射喷镀金属,就可用于SEM观察。关于SEM的临界点干燥(CPD)和FD的优缺点,最近是有争论的。从样品收缩大小这一点上来看,多数意见认为FD要比CPD好。

冷冻干燥法可使组织、细胞内的物质,除水分以外都保存下来。处于游离状态的物质,干燥时附着在某些结构上。但此时物质可能移位,某些即使是有支持物的结构,由于纤细,也容易毁坏、变形。这点与CPD相同。而且,可溶于树脂的物质在干燥后进行的树脂包埋过程中,亦可能移位。因此,可以说冷冻阶段活细胞能原封不动地固定下来,但在最终的电镜图像上却很难避免有结构的变化。变化发生在某一水平上,就会影响某一种研究目的。当然,对一般的研究目的来说,这种方法是足够的。

## 2. 冷冻置换法(FS)

Simpson<sup>[8]</sup>是在了解FD时,首先尝试此方法的。他将冷冻后的样品放入-40—-78℃的甲基溶纤剂(methyl cellulose)、酒精、乙醚、氯仿中脱水,包埋后进行观察。他指出,此法是将冷冻后的样品用置换液脱水,并同时接受化学固定的。用此方法可得到与FD相同的像。这样,由于FS不象FD那样需要复杂的装置、技术和时间,所以代替FD而广泛应用。

Fernández-Morán<sup>[9]</sup>首先有效地将此方法作为电镜样品制备法。山田和白仓在报告中介绍了他们使用的方法。将经接触低温金属快速冷冻的样品置于含2%OsO<sub>4</sub>结晶的纯丙酮液中,于-80℃低温下两昼夜,在样品中玻璃化的冰被丙酮逐渐置换的同时,锇酸使样品得到固定。然后,样品置于-20℃一小时再进入室温。倒去置换液,用100%的丙酮清洗2~3次,每次15分钟,接着用常规方法进行浸透和包埋。他们用此法对视细胞外节膜盘作了电

镜观察<sup>[10]</sup>,发现膜盘囊间隙宽度恒定,囊腔很小,只在两端稍宽。他们认为这些表现接近活体时的状态。另外,在置换液中,除加入OsO<sub>4</sub>以外,还常使用单宁酸和KMnO<sub>4</sub>等。

最近,这种方法作为XMA的样品制备法也受到人们的重视。越来越多的研究者用此方法观察了细微结构。Heuser和Reese<sup>[11]</sup>将快速冷冻后的运动终板放在含10%OsO<sub>4</sub>的-90℃丙酮中置换,然后包埋、切片,观察。结果表明,突触小泡、突触膜、微管、细丝等细微结构均保存良好。证明了此方法的优越性。

冷冻置换法用作SEM的样品制备亦很好。快速冷冻可运动的纤毛,用FS脱水以后,非常缓慢地升至室温,再作CPD干燥,进行SEM观察。Barlow和Sleigh报道,就纤毛的细微结构保存来说,下述置换液最为理想,即CaCl<sub>2</sub>饱和的甲醇和HgCl<sub>2</sub>饱和的甲醇等量混合,再以此混合液50份加上纯乙醇40份、丙稀醛10份。用FS法可使脱水过程中的变形减少到最低限,同时进行化学固定,所以,对易损坏的结构来说,较一般的固定脱水效果要好。

## 3. 冷冻切片法

用此方法可以不包埋就进行薄切,避免因脱水、包埋处理所致的物质丢失、移位、变性等。用光镜观察节省时间,可用于临床诊断。未经固定的新鲜材料作冷冻超薄切片,切片放在冷冻样品台上,在冷冻状态下经负染或组织化学反应后作电镜观察。用德安<sup>[12]</sup>提出的蔗糖液法制作固定后样品的冷冻切片较容易,重复性亦很好。此方法是用0.6—1M的蔗糖液充分浸渍样品,然后用LN<sub>2</sub>冷冻、薄切。再用沾附在毛束上的蔗糖液小滴回收切片,移至载网上,用铀盐及磷钨酸(PTA)作负染;或用甲基纤维素(Methylcellulose)(亲水性)以及低氮硝化纤维素(pyroxylin)(疏水性)包埋作正染,进行观察<sup>[13]</sup>。后者尤其是用于铁蛋白抗体法的对照染色。德安等<sup>[14]</sup>用此法在切片上作铁蛋白抗体反应,证明了肌细胞上的肌球蛋白、红细胞上的血影素(spectrin)、胰腺细胞

上的淀粉酶所存在的部位。

未经固定样品的冷冻超薄切片法也是进行 XMA 生物样品元素分析时理想的样品制备法。许多研究者正在作这方面的努力，方法有两种：1) 将冷冻切片放在冷冻样品台上进行分析；2) 冷冻干燥后进行分析。

山田教授<sup>[15]</sup>用冷冻薄切片进行生物样品自然状态的元素分析。将新鲜组织切成小块后，立即放入液氮中或由液氮冷却的氟里昂 22 中，也可采用接触金属快速冷冻法，用 Sorvall MT-2 带有冷冻装置的超薄切片机将组织块进行干切，切成 100—200 微米厚的切片，切片置于覆有火棉胶—碳膜的铜网上，进行空气干燥或真空冷冻干燥，然后进行能谱分析。分析了骨骼肌、心肌、视细胞色素上皮等处细胞内多种成分的元素分布。初步获得较满意的效果。由于收集的切片在载网上铺展还存在着许多困难，因此在技术上还有待进一步提高。此外，对细胞内水溶性元素的 X 射线显微分析也必须采用冷冻切片的方法。

山田还将冷冻切片用于其它方面。用 CPD 干燥的无包埋切片在超高压电镜 (HVEM) 下拍摄立体照片<sup>[16]</sup>。分析细胞内的各种结构。将通常用醛类固定过的样品充分浸渍蔗糖液后，用 LN<sub>2</sub> 冷冻进行冷冻切片，用德安法将切片移至载网上，再用递增浓度的酒精脱水（注意途中不能干燥），经醋酸戊酯、作液体二氧化碳 (LCO<sub>2</sub>) 干燥，然后在超高压电镜下观察。结果，虽然未经染色，但细微结构的反差很好，可以看到肌原纤维之间的微小榫结构。

#### 4. 冷冻复型法

冷冻复型法大致可分为 3 种：1) 冷冻表面复型法；2) 冷冻断裂复型法；3) 冷冻断裂蚀刻复型法。这三种方法基本类似，复型膜的制作过程也相同。

观察表面立体结构通常用 SEM，但复型法是在 TEM 下进行表面观察的，所以分辨率很高。例如，Severs 和 Hicks<sup>[17]</sup>用复型法观察了膀胱上皮细胞表面，在表面上皮细胞膜上

看到了由 6 个亚单位组成的颗粒呈点阵排列的斑块状结构。

冷冻断裂可暴露膜内粒子，这是其它方法所做不到的。为了避免断裂和复型膜制作过程中产生蚀刻，样品温度越低越好，低温还可防止断裂时由于样品变形引起的细微结构变化。为了防止样品污染，真空度要越高越好。目前的冷冻断裂复型法正朝着超低温、高真空的方向发展。

山田教授在报告中强调，经快速冷冻的样品，置于  $2 \times 10^{-7}$  毫米 Hg 的真空下进行割断，组织在高真空下停留 20—30 分钟，此时样品温度升至  $-100$ — $-90^\circ\text{C}$ ，使冰升华，这样才能明显地暴露出细胞内部结构，获得深度蚀刻的样品。而一般的冷冻蚀刻样品是与冷冻割断相近似的，不能真正区别开。此外，经过深蚀刻的样品，也能更好地暴露出膜的外表面和质膜的胞质面以及各种细胞内膜的内外面。这种方法是研究膜内外表面必须样品制备方法。白仓与山田<sup>[18,19]</sup>用此方法对蛙视细胞外节进行了研究，经深度蚀刻后，盘膜 P 面上显出许多 40—120 Å 的颗粒，与此相对应，盘膜 E 面上显出很多小凹。盘膜的胞质表面上也暴露出许多颗粒，而盘膜的腔面则是光滑的。这种深蚀刻方法还可显示出细胞器间的立体关系，即在上述样品上观察到的膜盘与质膜间有细丝样结构相连，在质膜的外表面也有细丝附着。

就喷镀而言，在分析膜内粒子等细微结构时，多方向作相同程度的喷镀要比以往一直用的单方向喷镀好。其原因未完全清楚。山田等在现有的装置上，试装了旋转样品台进行旋转喷镀。结果，找到了显示嗜盐菌紫膜的细菌视紫红质分子的膜内粒子亚单位。

冷冻复型法一般在醛类固定后进行，用新鲜无固定样品更好。断裂一定要在 5—20 微米范围（根据冷冻法有所不同）内进行。游离细胞较容易做。Heuser<sup>[20]</sup>等用快速冷冻后的冷冻断裂复型法抓住了运动终板膜结构的快速变化。

### 5. 冷冻 TEM 与冷冻 SEM

这种方法是用冷冻样品台,将冷冻样品及冷冻切片置于冷冻状态下进行 TEM 及 SEM 观察分析。在此从略。

#### 参 考 文 献

- [1] Sevéus, L.: 1977 *J. Microscopy*, 112:269.
- [2] Costello, M. J. and Corless, J. M.: 1978 *J. Microscopy*, 112: 17.
- [3] Somlyo, A. V., Shuman, H. and Somlyo, A. P.: 1977 *J. Cell Biol.*, 74: 828.
- [4] Van Harreveld, A., Crowell, J. and Malhotra, S. K.: 1965 *J. Cell Biol.*, 25: 117.
- [5] Van Harreveld, A., Trubatch, J. and Steiner, J.: 1974 *J. Microscopy*, 100: 189.
- [6] Seno, S. and Yoshizawa, K.: 1960 *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 8: 617.
- [7] Coulter, H. D. and Terracio, L.: 1977 *Anat. Rec.*, 187: 477.
- [8] Simpson, W. L.: 1941 *Anat. Rec.*, 80: 173.
- [9] Fernández-Morán, H.: 1960 *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85: 689.
- [10] Yamada E. 1979 *J. Electron Microsc.* 28: Suppl.
- [11] Heuser, J. E. and Reese, T. S.: 1976 *J. Cell Biol.*, 70: 357a.
- [12] Tokuyasu, K. T.: 1973 *J. Cell Biol.*, 57: 551.
- [13] Tokuyasu, K. T.: 1978 *J. Ultrastr. Res.*, 63: 287.
- [14] Tokuyasu, K. T. and Singer, S. J.: 1976 *J. Cell Biol.*, 71: 894.
- [15] Yamada E and Ishikawa H. 1977 *Acta Histochem. Cytochem.*, 10: 260.
- [16] Yamada E and Watanabe H. 1977 *Proc Fifth Int. Conf. on High Voltage Electron Microscopy*.
- [17] Severs, N. J. and Hicks, R. W.: 1977 *J. Microscopy*, 111: 125.
- [18] Usukura J and Yamada E. 1980 *J Electron Microsc.* 29: 376.
- [19] Usukura J and Yamada E. 1981 *Biomedical Research* 2: 177.
- [20] Heuser, J. E.: 1978 *J. Cell Biol.*, 79: 224a.

\* 此文根据山田英智教授、白仓治郎博士在上海期间的讲学内容,以及山田教授的论文《生物样品制备的冷冻技术》(发表于《电子显微镜》(日)Vol. 14, No 21(1980))整理而成。

## 经验交流

### 将电子显微镜所拍摄的负片制成 24毫米×36毫米幻灯片的简易快速方法\*

赵 京

(中国科学院植物研究所)

在做学术报告和技术交流时,大都将不同规格的电镜底片制作成24毫米×36毫米的幻灯片。通常把电镜所拍摄的负片制成幻灯片时,先要把负片印成相片,用相机把相片用色盲片翻拍下来,再用色盲片拷贝成幻灯片。这些过程不但时间长,手续繁杂,而且经常多次翻拍,每次很难保证不丢失细节,有的还要借助于体积较大,结构较为复杂的翻拍机进行。

为了达到上述目的并克服常规方法中的某些缺点,我们采用一种快速简便方法,即利用一般电镜室所具备的条件,只要经稍许加工,就可达到目的。

把一个35毫米照相机通过一个自制的金

属环,装到放大机的透镜台上,利用放大机做照明光源,用放大机上的粗调和细调聚焦旋钮聚焦,调节好光圈和快门速度。相机内装好底片,按动快门便可把电镜底片上的细微结构拍照下来,把负像变为正像。经冲洗、凉干、剪裁,装入幻灯片夹,便制成了幻灯片。

举一个具体的例子,以便举一反三。我们使用的是珠江牌69-1型放大机,182/180聚光镜,200瓦乳白灯泡做照明光源。为了便于观察和拍照,松开放大机体左侧的锁紧螺丝,将机体旋转成水平方向。用天津产金光牌镜头,其焦距为180毫米,相对孔径1:4.5。日

\*本文曾在1982年全国电镜学会(广州)上报告过。