



HFZ-1 型冰冻断裂装置和 FE-1 型 冰冻蚀刻单元使用经验介绍*

张铁峰 曲富金

(中国科学院上海生理研究所)

自 Hall^[1] 和 Meryman^[2] 1950 年最早设计出冰冻蚀刻装置以来, 20 多年中这一技术有了长足进步, 在生物组织亚微结构的研究中得到广泛应用。今天, 它已成为一种常规技术, 特别是在生物膜结构的研究中更为有用。把这方面的研究结果与用其他物理, 化学方法获得的结果相关考虑时, 这一方法将更显示出它在解决有关结构问题中所具有的巨大潜力。

继 Hall 和 Meryman 后对冰冻蚀刻技术发展贡献较大的是 Steere^[3], Moor 等^[4], 以及 Bullivant 和 Ames^[5] 等人。目前所有各种不同的冰冻蚀刻和冰冻断裂装置均可视为或是 Moor 装置或是 Bullivant 装置的变异。

冰冻蚀刻(或断裂)技术包括在冰冻细胞的断面上做一层铂-碳复型。然后将它在电镜下观察。此法的优点是无需固定和脱水, 避免了许多样品损伤, 因而有可能看到基本上接近活细胞状态的细胞亚微结构; 也许更重要的优点在于断裂常沿着冰冻膜的结构上弱的通路(疏水区)进行, 从而可得到膜和细胞内部的三维图像, 这是大有别于超薄切片的二维图像的。

虽然冰冻蚀刻技术在国外已得到广泛应用, 国内只看到用自制简易装置建立技术的报告^[6], 还未见到有利用此技术进行研究报告的报道。

本文主要介绍日立 HFZ-1 型冰冻断裂复型装置和 FE-1 型冰冻蚀刻单元的构造、实验装置和方法以及建立技术的一些体会。

一、实验装置

上述冰冻断裂和冰冻蚀刻装置都与日立 HUS-5 型真空蒸发器结合使用。

HEZ-1 型冰冻断裂装置为一台由两块三棱铜块组成的冰冻台, 二者接触面为光洁平滑的斜面, 上冰冻台为刀台(图 I-A), 装有一把单面刀片, 下冰冻台为样品台(图 I-B), 中央嵌入一梯型铜块样品座, 它带有一放置样品的 1.6 毫米小圆孔。冰冻和抽真空时, 刀台由一枕石撑垫(I-C); 切割(断裂)是由扳动真空罩外的摇控杆拖去枕石, 使刀台借助重力滑下而实现的(图 I-D)。刀台上方和靠枕石一侧各有一圆形孔道, 它们在铜块的斜面外会合, 当二铜块完全密合时, 此会合口正好对着样品台上的样品。两圆形孔道即铂-碳蒸发孔道(I-E)。顶孔道与样品表面成 45° 角, 蒸发铂用; 侧孔道与样品表面成 90° 角, 蒸发碳用。

FE-1 型冰冻蚀刻单元包括: 与加热器和热电偶相连的样品支座(图 I-F), 电流控制箱和保温瓶。样品支座的一端可嵌入上述带小孔的梯形铜块, 电流控制箱用以调节样品温度, 保温瓶是在当测样品温度时作为热电堆温度零度接点参考用, 用时灌满冰、水参半的冰水。

二、实验步骤

1. 预处理 新鲜组织按常规取出后用 2.5% 戊二醛(4°C, pH7.4) 固定 2 小时, 再将

* 本工作承范世藩、黄世楷两同志支持与指导, 谨致谢意。

组织块切成 $1\times 1\times 3$ 毫米小条,然后在甘油—生理盐水混合液(25%甘油)中浸泡12—14小时。(甘油浓度过低冰晶会变大,浓度过高影响冰冻速度)。

2. 冷冻 把经预处理的样品插入梯形铜块的小孔中,露出1—1.5毫米高,用甘油—生理盐水混合液灌满小孔,然后将样品台与刀台迅速放入盛液氮的保温瓶中冷却。待样品温度与液氮温度平衡(液氮停止起泡)后从液氮中取出。在液面处用镊子小心将一L型盖板置放刀台上,正好盖住两个蒸发孔道,这可防止在孔道内结霜(图I-G)。

3. 断裂 把从液氮中取出的装在运载器上的刀台和样品台立即放入经预抽的真空罩内抽真空,当真空达到 1×10^{-5} 托时(样品温度在 -130°C 以下),扳动摇控杆迅速从样品台上拖去枕石,刀台滑下切割样品,盖住两个孔道的盖板也因刀台滑下产生的震动而落下。

4. 蚀刻 断裂后提高样品温度,在 -100°C 维持约1分钟,在真空度为 1×10^{-5} 托的条件下,切面冰晶升华约 100Å 深,从而在样品的表面刻出精细结构。

5. 复型 在 1×10^{-5} 托的真空条件下,先以 45° 角对样品蒸发一层铂膜,继以 90° 角蒸发一层碳膜,蒸发膜厚度应为 200Å 左右。蒸发时小心注意真空计,不让真空显著变坏,蒸发碳应迅速,并做到每次只蒸发少许,以免样品表面因辐射热而熔化。

6. 复型的剥落与清洗 复型做好后,从真空中取出样品座,在室温下放置15—20分钟,再用针把组织块连同复型膜挑出并放入蒸馏水中。然后在解剖镜下一边观察,一边缓慢滴入10%次氯酸钠溶液以溶解组织,直至复型膜完全剥落,再用蒸馏水洗涤干净。

7. 捞膜 将洗净的复型膜小心地捞在铜网上,干燥后即可在电镜下观察。

三、操作注意

1. 刀台、样品台每次用后都应彻底烘干,

擦亮,以免再用时因结霜和不光滑影响刀台滑下。

2. 应特别注意实验室温度(一般最好维持在 $20^{\circ}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 以下),这和结霜关系很大。

3. 预抽真空很重要。

4. 样品不宜过大,这样冷冻快而均匀,复型膜剥落后也应尽量用靠外周部分。

5. 甘油—生理盐水混合液中,甘油浓度应适当;过低冰晶会变大,过高影响冰冻速度。

6. 切割样品时为确保盖板从刀台落下,扳动钩住枕石的摇控杆的动作要迅速。

7. 次氯酸钠的浓度和溶解组织块的时间因组织而异,一般以看到小泡从组织块缓慢逸出,即可停止加次氯酸钠,溶解时间大约为半小时。

8. 复型膜有时会沉到水底。遇到这种情况在水中加入几滴30%丙酮,然后再把复型膜吸入另一盛干净蒸馏水的小池中,即很易浮起。

四、样品座的改进

制备冰冻蚀刻样品很费时间,HFZ-1型装置的缺点是样品座上只有一个(放样品的)小孔,每次仅能做一个样品,加之有些工作对组织定位要求高(如突触,神经—肌肉接头等)而断裂是否正好通过所要观察的部分乃是一个很无把握,基本上靠碰巧的问题,且每块样品只可利用一次,这样就使效率问题显得很突出。目前,不少装置都可以同时做几个冰冻蚀刻样品。这样,遇到特殊部位的几率也提高了几倍。我们尝试在HFZ-1型冰冻蚀刻装置样品座上钻三个小孔,排成倒“品”字形,孔径为1.5毫米,孔距2毫米,经试验效果完全与单孔样品座一样,(图I-H)这样就把效率提高了两倍。

五、观察结果

我们共观察了大白鼠,小白鼠的肾、肝、膈肌、心肌等几种组织。细胞核核膜的断裂面

可见核膜小孔(图Ⅱ-A), 细胞核剖面可见双层核膜与核膜小孔(图Ⅱ-B)。线粒体的断裂面与剖面可见内、外限膜与嵴(图Ⅲ-A)。肾细胞的刷状缘清晰可见(图Ⅲ-A)。心肌(图Ⅲ-B), 骨骼肌(图Ⅲ-C)横断面, 可见肌丝呈六角点阵排列。肝细胞的胆小管及微绒毛亦清晰可见(图Ⅲ-D、E)。

参 考 文 献

- [1] Hall, C. E.: A low temperature replica method for electron microscopy. *J. appl. physics*, 21, 61—62 (1950).
 [2] Meryman, H. T.: Replication of frozen liquids by vacuum evaporation. *J.*

appl. Physics, 21, 68 (1950).

- [3] Steere, R. L.: Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 45—60 (1957).
 [4] Moor, H., Mühlenthaler, K., Waldner, H., Fry-Wyssling, A.: A new freezing ultramicrotome. *J. biophys. biochem. Cytol.* 10, 1—13. (1961).
 [5] Bullivant, S., Ames, A.: A simple freeze-fracture replication method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 29, 435—447 (1966).
 [6] 吴玉薇、鲁崎唔、傅广礼: 一种简易冰冻断裂装置及其实验方法 《生物化学与生物物理进展》, 第1期, 46—48, (1979).

重建型“B”小鼠模型及其鉴定*

李绍康 顾 琪

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

“B”小鼠指的是体内缺乏成熟的胸腺依赖性淋巴细胞即T细胞的小鼠。这种小鼠无法产生细胞免疫反应及其它与T细胞有关的反应, 因而得到广泛的应用。新生去胸腺小鼠与天然无胸腺裸鼠(Nude mice)都可以称为“B”小鼠。若把断奶小鼠的胸腺摘除后, 以致死剂量X—射线全身照射, 同时用正常小鼠骨髓重建其造血系统, 就产生了另一类“B”小鼠模型, 可称重建型小鼠^[1,2]。鉴定“B”小鼠有多种手段, 如检查在胸腺依赖性抗原刺激下不产生抗体现象, 同种或异种皮肤移植, 以及抗淋巴细胞表面标志的抗血清的膜荧光反应和细胞毒反应等^[1,3]。由于“B”小鼠对肿瘤移植缺乏排斥能力, 往往用于研究肿瘤^[4,5]。此外, “B”小鼠还经常用来研究淋巴细胞亚群之间的协作关系和淋巴细胞分化等免疫学基础课题^[6,7,8]。本文报道我们建立的重建型“B”小鼠模型, 几种鉴定手段, 以及在肿瘤和免疫学研究中的初步应用。

材 料 和 方 法

(一) 实验动物

C57BL小鼠和津白小鼠。本所动物房供应。

(二) 动物肿瘤

1. 大鼠肿瘤 BERH-2。系由二乙基亚硝酸诱发的大鼠原发性肝细胞肝癌的移植型大鼠实体瘤^[9]。

2. 大鼠肿瘤 Walker-256。中国科学院上海药物所提供。

(三) 抗 Thyl 血清及抗体

1. 抗Thyl血清: 参照 Golub 的方法^[10], 用小鼠脑组织免疫家兔获得。在有补体存在时, 抗血清 0.1 毫升可杀伤 2×10^7 胸腺细胞, 但不杀伤骨髓细胞。

* 李秀兰同志参加部分工作。张宗梁和王珏同志协助测定淋巴细胞转化。王球达和林国妹同志协助重建造血系统。特此感谢。