



冰冻断裂器的设制及其在扫描电镜样品制备中的应用

——二甲亚砷断裂和 O-T-O 导电染色法 组织断裂面的扫描电镜观察

张铁峰 宋秀娥

(中国科学院上海生理研究所)

王翔羽 韩玉昇 朱建国 陈玉英

(上海第二医学院)

扫描电子显微镜(下称扫描电镜),自从被应用到医学、生物学领域之后,一般仅限于用来观察组织和细胞的表面结构。近年来,随着各种组织和细胞断裂方法^[1]的发展,它也越来越广泛的被应用于研究组织和细胞内部的结构。为了观察组织和细胞的内部结构,重要的是需要一种能够较好的显示组织和细胞内部结构的样品制备装置。为此目的,我们参照有关文献^[2],设制了一种冰冻断裂器。它的基本原理是利用液氮冷却来固化放在包埋剂中的组织和细胞,用小锤轻击放在包埋块上的刃具,借助于包埋剂的破断之力,将包埋块在希望的部位劈裂(注意不是切断),使样品观察面剖出于外。

本文利用这台冰冻断裂器,以二甲亚砷断裂和钨酸—丹宁酸—钨酸(O-T-O)导电染色法制备了兔的胰腺、肾脏组织断裂面的扫描电镜样品。实验表明,这仪器结构简单,性能可靠。这种染色方法,图像清晰,很适宜于组织和组胞内部的扫描电镜超微结构的研究。现将冰冻断裂器的设制及其应用介绍如下:

材 料 和 方 法

(一) 冰冻断裂器的设制及其说明如下:

冰冻断裂器的外壳如图 1a 所示,可用直径为 220 毫米的铝锅,剪去锅的上缘,将高度加接到 180 毫米。冰冻断裂器的内胆示于图 1b,可用直径为 180 毫米

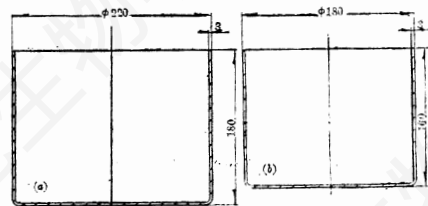


图 1 (a) 外壳 (b) 内胆

的铝锅,剪去锅的上缘,将高度加接到 160 毫米。在外壳与内胆之间填满玻璃棉隔热。图 2a 是直径为 174 毫米,厚为 5 毫米的纤维层压板。板上有直径为 66 毫米孔一个,直径为 36 毫米孔二个,直径为 3 毫米孔一个。四周还有相互对应的直径为 3.5 毫米孔四个,作为固定支撑纤维层压板的不锈钢柱(图 2b)之用。钢柱的直径为 6 毫米,长为 105 毫米,一端攻 3 毫米内螺孔,另一端车成圆头。把带支架的纤维层压板放于内胆中。图 2c 为冰冻断裂器的平面断裂台,供作二甲亚砷断裂之用。此台安装于图 2a 的直径为 66 毫米孔内,材料用铜或铝合金。图 2d 为冰冻断裂器的沟槽断裂台,安放于平面断裂台上。作酒精、醋酸戊酯等有机溶剂断裂之用,材料为铜或铝合金。图 2e 为装液氮的入口,材料为四氟乙烯(塑料王)。放入图 2a 的直径 36 毫米的孔内。图 2f 为冷却罐,供氟里昂断裂之用。当注入氟里昂气体时,通过液氮冷却后则气态氟里昂变为液态,达到将样品冷冻固化的目的。将冷却灌放于图 2a 的另一直径 36 毫米的孔内。材料用铝合金或铜。图 2a 中央部 3 毫米小孔,为插入浮标之用,可显示液氮量。图 3a、b、c、d 为在氟里昂冷却罐内放胶束的支持架。材料用铝合金或铜。图 4a 为外壳和内胆上面的圆形封闭圈,把玻璃棉封于其中,此即为冷却桶上的盖圈。材料为塑料。图 4b 为冰冻断裂器之盖,盖于盖圈上。图 4c 为盖的手柄。图 4b 和 4c 的材料均为有机玻璃。图 5 为冰冻断裂器。

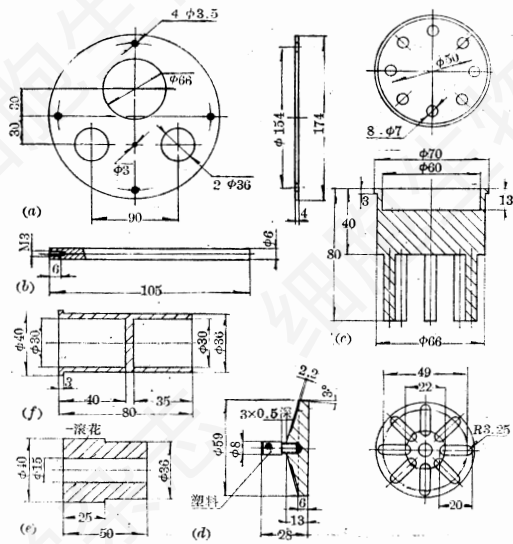


图2 (a) 胶合板 (b) 不锈钢柱×4
(c) 平面断裂台 (d) 沟槽断裂台
(e) 液氮入口 (f) 冷却罐

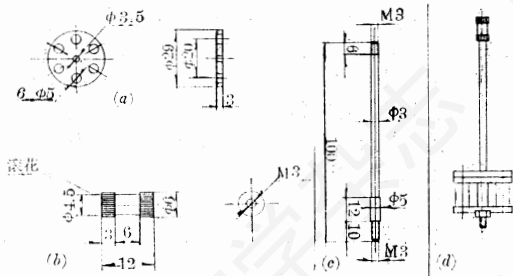


图3 (a)(b)(c)(d) 胶囊支架
注 (a) 共制作三片, 其中一片无 6-φ5 孔

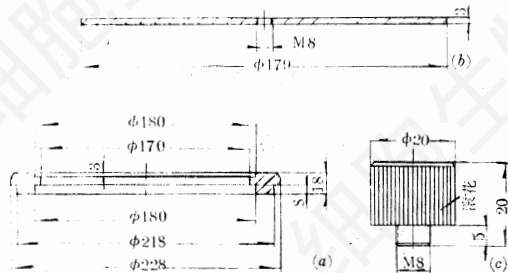


图4 (a) 封闭圈 (b) 盖 (c) 手柄



图5 冰冻断裂器

(二) 应用二甲亚砷断裂法断裂家兔的胰腺, 肾脏组织, 并用O-T-O导电染色法处理被断裂的组织, 制备成样品供扫描电镜观察, 其操作如下:

用10%氨基甲酸乙酯(10毫升/公斤体重)注入家兔的耳静脉内, 作全身麻醉。在腹主动脉内缓慢灌注生理盐水(总量1000毫升, 时间1小时。)和肠系膜小静脉缓慢放血的情况下, 切取胰腺和肾脏组织的新鲜标本, 切成适于断裂的细长棒(1×1×5毫米)。将组织块放于1%锍酸(用0.1M、pH7.2—7.4的磷酸缓冲液配制)内固定1小时, 作为前固定。水洗10分钟, 更换2次, 然后分别浸入25%和50%的二甲亚砷水溶液各30分钟。再用50%的二甲亚砷水溶液在冰冻断裂器的平面断裂台上进行标本断裂。其操作步骤: 将液氮注入冰冻断裂器, 浮标指示到蓝色时, 说明液氮已满。预先将断裂台冷却。用滴管(或镊子)将50%的二甲亚砷水溶液滴于已预冷的断裂平台上, 二甲亚砷液立即冷却固化成豆状, 再进一步加入二甲亚砷液滴, 在没有全部固化之前, 用镊子把组织块插入其中, 当二甲亚砷液滴和组织固化时, 形状很似“猫眼”。待固化后, 用大的止血钳夹持单面刮脸刀片(使用前放液氮内预冷)用金属锤扣击劈开, 将断裂的组织块投入50%的二甲亚砷水溶液中, 融去包埋于组织外的二甲亚砷。用蒸馏水充分洗净, (如洗得不充分, 在作锍酸固定时, 液体会变成黑色) 更换3—5次, 每次10分钟。再浸入0.1%的锍酸磷酸缓冲液中24小时。投入1%的锍酸磷酸缓冲液中作后固定1小时。蒸馏水洗1小时。再浸入2%的丹宁酸水溶液中30分钟, 水洗1小时, 再放入1%的锍酸水溶液30分钟, 蒸馏水洗1小时。用酒精逐级脱水各30分钟, 将组织块移入醋酸戊酯中30分钟以上。做临界点干燥, 喷碳和金, 扫描电镜观察样品。

结 果

组织和细胞经过二甲亚砷断裂和O-T-O法处理以后, 在扫描电镜下很易见到组织和细

