

行排列的线粒体嵴的结构(图3b)。

小 结

以上实验结果表明,常规电镜与整装技术相结合,能部分的观察到在高压电镜下所能看到的细微结构。由于样品是完整细胞,工作者可得到细胞细微结构的整体概念。因此,这个方法可以弥补在常规电镜下观察超薄切片的不足之处。

参 考 文 献

- [1] Buckley, I. K. and K. R. Porter, 1975, *J. Microsc. (Oxf)*, 104:107—120.
- [2] Franke, W. W. et al., 1978, *Cytobiologie*, 17:365—391.
- [3] Wolosewick, J. J. and K. R. Porter, 1976, *Am. J. Anat.*, 147:303—324.
- [4] Wolosewick, J. J. and K. R. Porter, 1979, *J. Cell Biol.*, 82:114—139.
- [5] Macartney, J. C. and E. K. Parkinson, 1981, *Exp Cell Res.*, 132:411—421.
- [6] 潘玉芝等,实验生物学报(待发表)。

离子蚀刻扫描电镜技术在生物样品制备中的应用

蔡继炯

(浙江省测试技术研究所, 杭州)

近年来离子蚀刻技术已成为扫描电镜样品制备中的一种新方法。由于其操作简便,效果显著,应用日趋普遍。国外在生物样品的离子蚀刻方面做了不少工作, Lewis等^[1]1969年用这一方法观察了红细胞、胰脏外分泌细胞的核表面结构,看到了特异的放射状结构和核孔分布的情况。国内不少电镜工作者在化工等样品制备中开始应用该技术,但在生物样品方面的应用,目前未见文章报道。

众所周知,生物样品的细胞表面一般都覆盖着一层脂蛋白和糖脂等物质,不同程度地掩盖了细胞的表面结构,电镜下很难看清微绒毛等微细结构形貌,影响分析研究。作者采用离子蚀刻方法,对大白鼠肺、肾上腺,进行离子蚀刻和未经蚀刻的比较。结果证明,离子蚀刻法具有净化未充分清洗组织表面的效果。它可使肺泡和肾上腺的细胞表面所被覆的一层糖蛋白、糖脂及基底膜等物质剥离,暴露出细胞表面的微细结构,在扫描电镜下清晰可见。现将实验结果报道如下。

材 料 和 方 法

将活体大白鼠处死后解剖,用锋利的双面刀片割

取肺和肾上腺组织块(5×5 mm),用生理盐水洗去表面血污,立即于2.5%戊二醛溶液中前固定4小时,1%锇酸后固定2小时(置4℃冰箱中),酒精梯度脱水到100%后,用50%、100%醋酸异戊脂过渡置换(每次15分钟),CO₂临界点干燥。样品经干燥后分成两份:一份经表面喷镀Pt膜后直接送扫描电镜进行观察;另一份用银胶固定在样品铜台中央(离子蚀刻时,离子束流中心部能量大),然后放入EiKO IB-5型离子溅射仪中样品座上(靶电极正下方),样品座高度钮调到DOWN位置,靶和样品间隔为9 cm,COAT(溅射)/ETCH(蚀刻)转换开关放到ETCH处。真空抽气到0.05 托以下,电压调到900—1200伏,离子电流3—6毫安(调节针形阀,真空度保持在0.1 托左右,辉光放电颜色呈紫红色为宜)。蚀刻时间30—60分钟(每蚀刻15分钟,间歇3分钟,以防止热损伤)。蚀刻的条件要视不同样品调节电压、电流、蚀刻时间。原则上,软组织电压低,电流小,时间短,反之亦然。蚀刻中为了防止样品热损伤而变形,样品座下方要通入冷却水或间歇蚀刻。蚀刻完毕立刻将蚀刻表面喷镀上Pt膜达200 Å厚,用日立S-450型扫描电镜观察,加速电压20 KV,样品倾斜角15°。

结 果 和 讨 论

大白鼠的肺组织因有许多肺泡而成海绵状,肺泡是一边开口的小袋,似蜂房状。肺泡间

隔由胶原纤维和弹性纤维所支持,能防止过度的膨胀。通常肺泡间隔有一层薄而连续的外皮,而肺泡细胞表面也被覆着一层脂蛋白、中性粘多糖等物质。在常规样品制备情况下,尽管扫描电镜分辨率相当高,但也不能清晰地观察到肺泡细胞表面的微绒毛、肺泡孔、毛细血管腔等微细结构形态(图版图1,3)。我们在电压为900伏,离子电流为3毫安条件下,蚀刻50分钟后,结果肺泡表面的一层脂蛋白等覆盖物被蚀刻清洗掉,清晰地暴露出肺泡孔腔、毛细血管、肺泡间隔的形貌。图中可见,每个肺泡壁是由双层上皮及其间毛细血管构成,其薄层间壁为相邻两个肺泡上共有,肺泡间隔的宽度约1.5—3微米(图2)。在保持电压、电流不变情况下,对肺泡Ⅱ型上皮细胞蚀刻30分钟,就能呈现出圆形的立方体外形的Ⅱ型肺泡形态,而细胞游离面上分布着浓密的微绒毛也清晰可见(图4)。

大白鼠的肾上腺用常规电镜方法观察时,因外表面有一层胶原结缔组织被膜,很难清晰

地观察到血管腔的形态结构(图5)。由于肾上腺胶原结缔组织被膜较厚,必须加大电压和电流,提高离子轰击速率,使其蚀刻掉。当电压为1200伏,电流为5毫安,把蚀刻时间延长到60分钟后,表面覆盖的一层糖蛋白、血污等物质被剥离清洗掉,使肾上腺中的血管腔及腔中红细胞结构形态清晰地显示出来,并且有很强的立体感(图6)。

用离子蚀刻技术暴露生物组织内部结构形态,方法简便,效果明显。但是,关于离子蚀刻的各种条件(电压、电流、蚀刻时间、真空度、放电气体种类等)和生物组织的材料与性质的关系等,有待进一步摸索和试验。

参 考 文 献

- [1] Lewis, S. M., et al, 1969, Scanning Electron Microscopy, 241—242.
- [2] 沈宝镕译, 1982, 基础组织学, 407—415, 山东科学出版社。
- [3] 李文镇等译, 1984, 图解扫描电子显微镜, 125—126, 科学出版社。

M 期细胞选择性电镜取材与观察

周宁新 朱光明 侯 宁

(北京 解放军总医院)

从细胞形态学的角度观察,整个细胞的增殖周期唯有分裂期(M期)细胞的变化显著,便于从形态上区别与鉴定,因此M期细胞的变化是细胞形态学研究中极受重视的观察目标。然而,由于其在整个细胞周期中历时最短,在细胞群体中往往只占百分之几的比例,所以要想大量观察M期细胞的变化,按过去常规取材的方法是可能的,尤其是电镜水平的观察,就更难在狭小的观察范围内寻找到M期细胞。

为了能对M期细胞进行有选择地电镜观察,作者在M期细胞同步培养法的启发下,加以改进、简化,建立了单层培养细胞的M期细

胞选择性电镜取材新方法,收效良好,基本达到了电镜下大量观察M期细胞的目的,现将具体方法介绍如下:

材 料 和 方 法

培养细胞

必须是贴壁率高,细胞分散良好的单层培养细胞,传代时掌握好细胞密度,最好到第三、四天时细胞均匀覆盖满瓶壁。此时在倒置镜下可见许多M期细胞浮贴在间期细胞表面,这是取材的最好时机。为满足取材细胞的数量,一般25 ml瓶需要10~15瓶,100 ml瓶2~4瓶取一次电镜样品(约 1×10^7 个细胞)。