

# 一种冰冻刻蚀装置的设计及应用

乔 宝 义\*

(中国科学院微生物研究所,北京)

冰冻刻蚀(或断裂)技术与其他常规电镜技术相比具有许多优点。样品的快速冰冻可起到物理固定的作用这不仅减少了化学固定引起的人为改变,而且也省去了固定和脱水等步骤;对生物标本进行不同时期的冰冻可以得到不同阶段的细胞复型;在膜的研究方面;它可与生物化学方法相辅,同样起到生物化学方法所起的弱化膜疏水键的作用,从而使两层疏水性面的任何侧面的三维结构暴露出来<sup>[1]</sup>, 远比超薄切片所得到的二维片层结构要丰富。

早在 1950 年, Hall 和 Meryman 分别制作

了能在真空中刻蚀和复型冰冻液体悬液表面的仪器,后者还能在复型之前使冰冻标本破裂。其后, Later, Meryman 和 Kafig (1955) 用一个能在真空中进行断裂的设备观察生物标本的冰冻断裂和刻蚀; Haggis (1961) 断裂了冰冻红细胞,其复型显示出了它们的横断面结构; Steere (1977) 制得了植物病毒晶体的冰冻蚀刻复型。以上工作为广泛利用这一技术奠定了基础<sup>[2]</sup>。

作者参考 Moor 和 Bullivant 的冰冻断裂仪

---

\* 冰冻刻蚀装置由本所工厂加工,特此致谢。

器的设计原理,在国产 DM-300 型镀膜机上设计安装了冰冻刻蚀的附件,并摸索了微生物标本制备技术。现将该仪器的设计和对棒杆菌细胞结构的观察报告如下。

## 冰冻刻蚀装置

刀块、基块和标本杯均用紫铜加工(图 1)。刀块(图 1a 和 c)上分别有垂直和倾斜(45°)的孔道(直径 4mm)在底部交于一点,在交点一侧

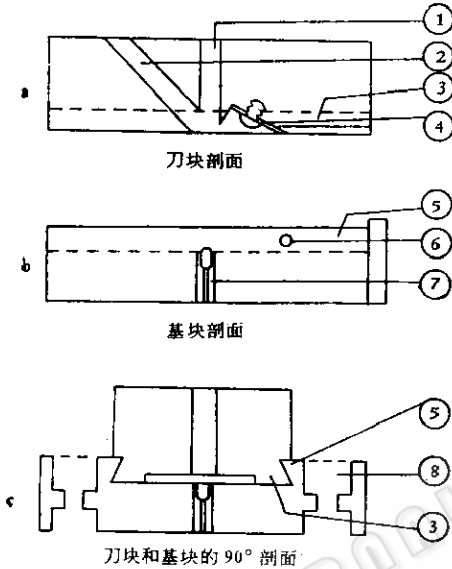


图 1 刀块和基块剖面图

- ① 喷碳孔, ② 投影孔, ③ 阳鸽尾,
- ④ 钢刀, ⑤ 鸽尾槽, ⑥ 销钉孔,
- ⑦ 样品杯, ⑧ 垂直固定孔。

装有一把钢刀。块底部为阳鸽尾。在基块(图 1b 和 c)上有放置样品杯的孔(直径为 3mm)和阳鸽尾槽供刀块在上面滑动,在阳鸽尾槽一侧有销钉孔,其两边垂直方向有固定用螺丝孔,用来固定基块于冷台上。标本杯外径 3 mm,内有直径 2mm 的标本槽,并有细孔与底部相连,以防因槽内有气泡,冰冻时样品表面收缩到杯内。

冷台由不锈钢制作(图 2),固定在镀膜机绝热盘架上,圆柱中空,顶部有测温 and 加热装置,一侧连有“L”字型导管,表面平滑,外径稍小于镀膜机外接孔的直径,用橡皮圈密封。导管内有一条内径 5mm 的细管,比外导管稍长便于连接漏斗导管,作为液氮入口。外管为氮气

出口,其末端用粗塑料管连接导入漏斗上口,使之成为氮循环回路。

加热装置用 0.5—1mm 直径的“V”字型钨丝,套上小绝缘瓷环,插入加热孔里。钨丝一端

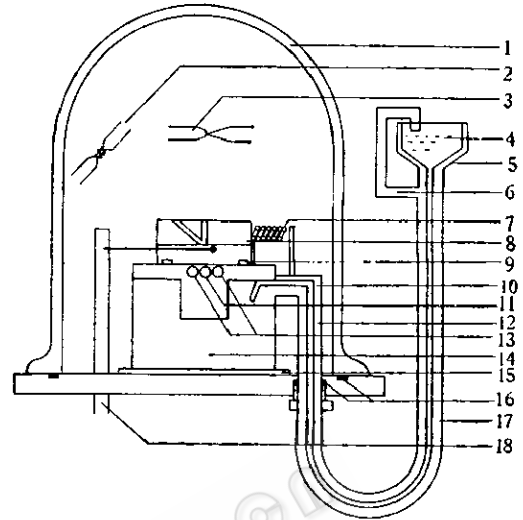


图 2 冷台液氮循环示意图

- 1.镀膜机钟罩, 2.钨碳电弧, 3.碳电弧, 4.液氮,
- 5.漏斗, 6.氮气进管, 7.弹簧, 8.刀块, 9.基块,
- 10.液氮进管, 11.测温计, 12.氮气进管, 13.加热器,
- 14.冷台空腔, 15.绝缘板, 16.封闭环, 17.液氮导管, 18.镀膜机外接手柄。

接地,另一端接镀膜机电极。

测温装置可用北京玻璃研究所试验厂生产的 WZB ( $R_0 = 46\Omega$ ) 的玻璃铂电极温度计,但用  $R_0 = 100\Omega$  的温度计更好。安装时一定要使电阻与冷台孔密切接触,导线绕“L”型导管数圈,通过镀膜机接线柱导出,连接到能准确测定阻值的仪器,如自动平衡显示记录仪、电子管电压表或精密万用表。通过铂热电阻温度和阻值换算表(图 3)将电阻值换算成温度值。

## 样品处理和操作过程

### 一、样品处理:

由于生物样品导热性能较低,其表层和深层导热性能也有差异,所以不适当的冰冻处理会造成组织损伤。例如以 0.01—1℃/S 的缓慢速度冷却细胞悬浮液,则细胞周围溶液首先冰冷成纯冰晶并逐渐增大,而尚未冻结区域溶液浓度增加,渗透压出现不平衡,水从细胞内外

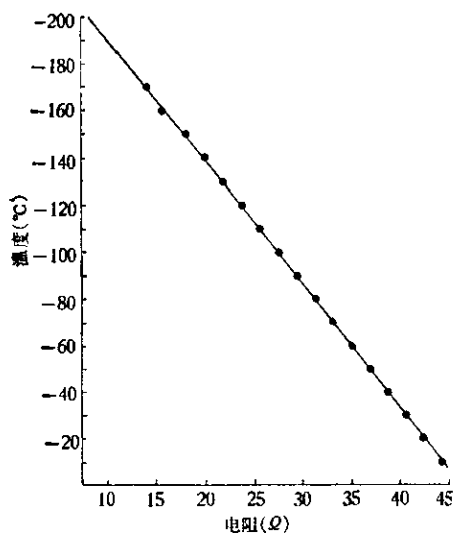


图3 铂热电阻温度和阻值换算表  
(分度号  $B A_1$ ,  $R_0=46\Omega$ )

流,呈无游离水状态。虽然细胞内不会形成冰晶,但会引起细胞收缩和破坏。此时,细胞周围溶液形成两相,一相为纯冰晶,另一相为含有细胞成分的共晶所包围着的网。如果以很快的冷却速度(如  $1000^\circ\text{C}/\text{S}$ )使细胞骤冷,则细胞内和细胞外溶液产生很小的冰晶不足影响电镜观察。要达到这个目的,应注意以下几个步骤<sup>[2]</sup>。

1. 样品足够小,以使整个样品在很短时间内骤冷。

2. 选择适合的淬火剂。常用的淬火剂见表1。它们具有冰点低,沸点较高的特点。其中以氟里昂最常使用,它在大气压下,  $-30^\circ\text{C}$  时呈液态,使用前按图4-1装置使之预冷。在杜瓦瓶中注入液氮,使连有小杯的带孔铝管冷却,将氟里昂注入杯内,维持  $-150^\circ\text{C}$  以下。在此条

表1 淬火剂的熔点和沸点

淬火剂	熔点( $^\circ\text{C}$ )	沸点( $^\circ\text{C}$ )
丙 烷	-189	-44.5
氟里昂22	-146	-39
氟里昂12	-155	-29
异戊烷	-160	+28
液 氮	-209.86	-195.8

件下能使样品得到骤冷。应指出:液氮虽然熔点比其他淬火剂低,但其沸点非常接近熔点。当与样品接触时液氮蒸气立刻在样品周围形成绝

热层从而降低了冷却速度,所以不能直接作为淬火剂。也可将样品紧密附着在铝钉或紫铜管内,一起投入液氮中通过金属导热间接得到骤冷。

3. 使用防止冰晶形成的药剂: 水饱和氯仿、明胶、甘油、二甲基亚砷、乙撑二醇和蔗糖等都是优良防冻剂。例如  $3\times 1\text{ mm}$  小块组织在25%甘油等渗磷酸缓冲液中  $4^\circ\text{C}$  浸泡二十分钟,效果良好。也可以先用戊二醛固定后再用防冻剂处理。

## 二、操作过程(见图4)

1. 电极调正和附件抛光: 将冰冻刻蚀附件按图2的位置安装在镀膜机上,借助笔直的棍分别插入刀块上的  $45^\circ\text{C}$  和  $90^\circ\text{C}$  的孔中,调整电极蒸发点使之分别准确地对准刀块上的  $45^\circ\text{C}$  和  $90^\circ\text{C}$  孔道,确保蒸发材料通过孔道落到样品刻蚀表面上。调节完毕将刀块和基块取下,仔细抛光,洗净。使刀块、基块和冷台充分接触以使导热性能良好。随后将刀块和基块放进液氮中预冷,见图4-2。

2. 冷台冷却: 降下镀膜机钟罩,用机械泵抽真空,通过漏斗灌注(或压入)液氮,20分钟后冷台温度降至  $-180^\circ\text{C}$ 。

3. 刀块和基块预冷,样品杯放入: 用预冷的镊子将骤冷的样品杯很快转入盛有刀块和基块的液氮罐中,并插入基块中心孔内,使杯口与基块上平面在同一水平面,样品高出基块上平面。随后插上刀块,销上销钉(防止刀口接触样品)见图4-3。

4. 固定冰刻附件(图2): 镀膜机放气,提升钟罩,用线绳将基块和刀块一起放在冷台上,迅速用预冷的改锥将基块固定在冷台上。拉上弹簧,并将销钉外端系在镀膜机手柄转动杠杆上,降下钟罩,抽真空。全过程3-5分钟完成见图2和图4-3。此时温度稍有回升( $-160^\circ\text{C}$ )

5. 刻蚀和复型: 6分钟左右,温度又降到  $-170^\circ\text{C}$ ,真空度达到  $1.4\times 10^{-1}\text{ Torr}$ ,通过加热器升温,4分钟左右到达  $-110^\circ\text{C}$  时停止加热,温度还在上升,当恒定在  $-100$ — $-90^\circ\text{C}$  时,真

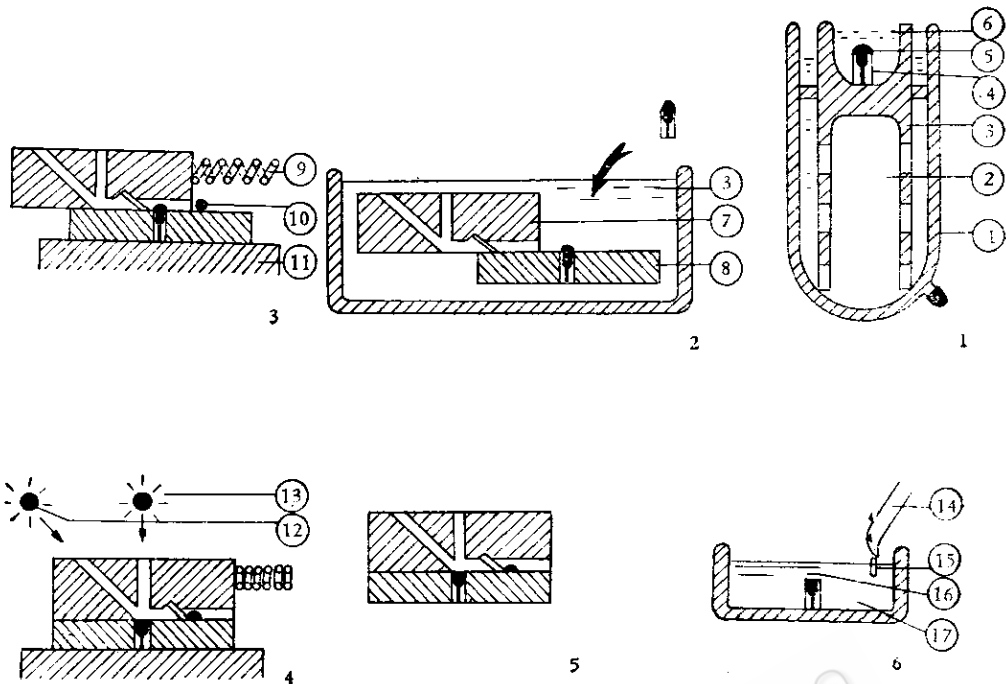


图4 操作过程示意图

1. 样品骤冷处理; 2. 刀块和基块预冷, 样品杯插入样品孔内; 3. 刀块和基块固定于冷台上 ( $-180^{\circ}\text{C}$ ); 4. 刻蚀复形 ( $2 \times 10^{-5}$  Torr,  $-100^{\circ}\text{C} - -90^{\circ}\text{C}$ ); 5. 取出刀块和基块, 拔出样品杯; 6. 剥离复型

① 杜瓦瓶, ② 液氮, ③ 带孔冷却杯, ④ 样品杯, ⑤ 样品, ⑥ 氟里昂, ⑦ 刀块, ⑧ 基块, ⑨ 弹簧, ⑩ 销钉 ⑪ 冷台, ⑫ 钨钨投影, ⑬ 喷碳, ⑭ 滴管, ⑮ 次氯酸钠溶液, ⑯ 复型膜, ⑰ 水。

表2 样品表面温度与蒸汽压、真空度和凹陷比率的关系

表面温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	蒸汽压 ( $\text{dyn} \cdot \text{cm}^2$ )	真空度 ( $\text{mmHg}$ )	凹陷比率 ( $\text{\AA}/\text{S}$ )
$-90$	$9.3 \times 10^{-3}$	$6.7 \times 10^{-3}$	140
$-100$	$1.4 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	23
$-110$	$1.6 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	2.6
$-120$	$1.3 \times 10^{-4}$	$9.4 \times 10^{-3}$	0.2
$-130$	$7.7 \times 10^{-6}$	$5.6 \times 10^{-3}$	0.01

表3 操作流程表

时间 (分)	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	真空度 (Torr)	处 理
0	20	$5 \times 10^{-2}$	加液氮, 机械泵抽气
11	$-110$	$5 \times 10^{-2}$	加液氮, 机械泵抽气
23.5	$-180$	$5 \times 10^{-1}$	加液氮, 放气, 放入样品
28.5	$-160$	—	降罩, 抽气成高真空
34	$-170$	$1.8 \times 10^{-4}$	加热
38	$-110$	$4 \times 10^{-4}$	停止加热
43	$-100 - -90$	$2 \times 10^{-1}$	切断
44	$-100 - -90$	$2 \times 10^{-5}$	投影, 喷碳

空度正好达到  $1-2 \times 10^{-5}$  Torr, 通过转柄拉开

销钉, 刀块借助弹簧拉力, 刀口通过样品使之形成断面 (图 4-4)。经过 1 分钟昇华马上蒸发钨碳, 随后喷碳 (此时温度继续下降)。昇华效果与样品表面温度和蒸汽压有着密切关系 (见表 2)。样品表面温度越低蒸汽压越低, 也就是要求更高的真空度才能达到昇华的目的, 而凹陷比率也随着温度的下降而降低 (表 2)。例如,  $-100^{\circ}\text{C}$  时, 真空度要求  $1 \times 10^{-3}$  Torr, 其样品凹陷比率为  $23 \text{ \AA}/\text{S}$ 。全部操作流程见表 3。

6. 复型的剥离和清洗: 破坏真空, 取出刀块和基块 (图 4-5), 小心取出样品杯放在称量皿中央 (见图 4-6), 徐徐注入蒸馏水使之浸没样品杯并滴 5 滴左右 (次氯酸钠溶液)。复型膜漂移下来后放置数小时或过夜, 充分漂洗微生物残余物, 水洗多次。最后捞到火棉胶膜网上或直接捞到 200 目以上的无膜铜网上。清洗液的选择决定于组织的种类。通常多用次氯酸钠, 或加上 40% 的盐酸。微生物样品可用 10% 的次氯酸钠处理后再用 70% 硫酸处理, 效果较

好。

应用上述改进设备和方法,我们制备了棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.563) 的冰冻刻蚀复型。很容易地观察到棒杆菌属的多细胞状态<sup>[4]</sup>和三维的核区和核糖体。与超薄切片技术相配合,基本上能了解到棒杆菌包被层次和其片层的部分表面特征。见图版 I 说明。

### 参 考 文 献

- [1] Branton, D. and D. W. Deamer: *Membrane Structure* 汪安琦等译:《生物膜结构》,科学出版社,北京,1973。

- [2] Koehler, J. K.: *The Technique and Application of Freeze-etching in Ultrastructure Research, Advances in Biological and Medical Physics*, Vol. 12 (ed. by Lawrence John H. and John W. Gofman), Academic Press, New York and London, 1968, pp. 1—81.
- [3] Boyde, A. and E. Patrick: *Freezing and Freeze-Drying A Preparative Technique for Scanning Electron Microscopy, SEM/1973* (ed. by Johari, Om and I. Corvin), IIT Research Institute Chicago, Illinois's 1973, pp. 760—765.
- [4] Skerman, V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 蔡妙英等译:《细菌属的鉴定指导》,科学出版社,北京,1978,第219—220页。