

# 生物样品的冷冻制样技术及应用

何万中 梁丽荣 关波

(分析测试中心生物电镜组 Tel: 010-82698318 Email: hewanzhong@iccas.ac.cn)

## 一、背景

生物样品通常需要在含水条件才能保持结构稳定，而电镜则要求样品高真空条件下成像而且样品不能太厚（不超过电子平均自由程，通常为 200~500 nm），因此生物电镜制样需要解决样品稳定性及厚度、水分子、高真空等问题。传统生物电镜制样通常采用化学固定技术，化学交联固定含水样品，然后脱水、树脂包埋聚合、超薄切片、重金属染色制作出干燥的电镜样品；对于免疫标记则对化学固定后的生物样品，经 2.3 M 蔗糖（防冻剂）包埋后，缓慢冷冻成固态，然后低温切片，水化免疫标记、最后重金属负染干燥制作出电镜样品。然而，传统制样技术不可避免地会造成生物样品高分辨率结构信息损失和变形。上世纪 70~80 年代以后，科学家们探索出了高保真的物理固定技术，即快速冷冻制样技术将水分子迅速固定为玻璃态固体来解决高分辨率生物分子结构在真空中的稳定性问题，如投入式冷冻技术<sup>[1]</sup>(plunge freezing, Dubochet 博士因发明该技术获得 2017 年诺贝尔化学奖)、镜面冷冻、丙烷喷射冷冻、高冷冻技术<sup>[2,3]</sup> (high pressure freezing, Moore, 1987) 等，这些冷冻制样技术的普及促进了生物冷冻电镜的飞速发展。生物样品冷冻固定之后，与后期冷冻制样技术衔接以满足电镜观察要求，如冷冻替代固定技术、冷冻超薄切片技术、冷冻蚀刻技术、冷冻聚焦离子束减薄技术 (Cryo-FIB 技术) 等。本文将着重介绍着生物电镜常用冷冻固定技术及其应用情况 (图 1)。

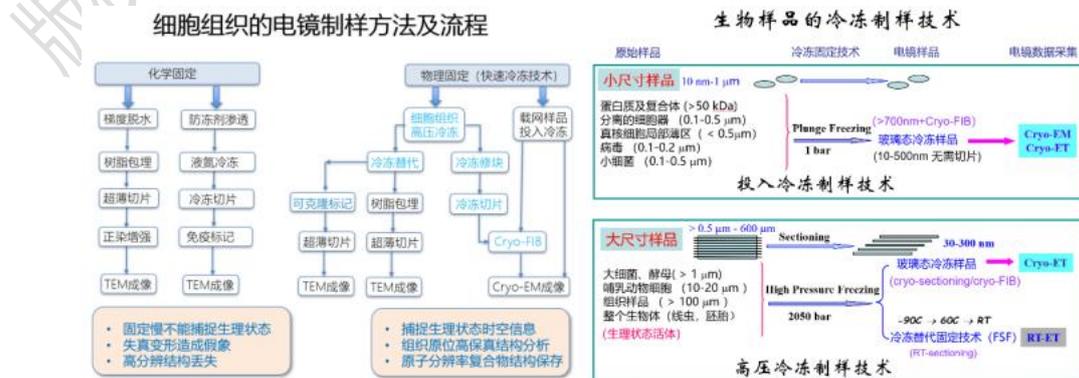


图 1、生物电镜制样技术

## 二、快速冷冻技术原理

快速冷冻技术（如最常用的投入式冷冻、高压冷冻等）是通过快速物理降温方式固定生物样品，让样品中水分子来不及调整位置取向结晶成冰晶体，就被快速凝固成玻璃态水，从而保存生物分子的近生理状态高分辨率结构。冷冻后的生物样品，如果厚度超过了 500 nm，通常需要进一步整合衔接冷冻制作超薄电镜样品的其他制样技术，如冷冻超薄切片技术，Cryo-FIB 技术，冷冻替代固定与树脂超薄切片技术。下面介绍几种常用技术的基本原理。

### A. 投入式冷冻技术（Plunge freezing）

溶液中的生物样品，如蛋白质、大型蛋白质复合物、分离的亚细胞器、病毒、细菌、细胞等，如果样品厚度在 10  $\mu\text{m}$  以下，一般采用投入式冷冻技术进行物理固定。关于纯水的冷冻，因水和冰的导热系数都非常低，需要非常高的降温速率（ $-10^6 \text{ K/s}$ ）条件才能在常压下避免水分子结晶制作出大约 200 nm 厚度的玻璃态冰，超快的冷却速度让水分子来不及结晶就被凝固下来。Dubochet 等人在上世纪 80 年代初（Dubochet & McDowell, 1981），系统探索了含水样品的快速冷冻技术，发明了投入式冷冻技术<sup>[1]</sup>，即将大约 4~5  $\mu\text{L}$  含水生物样品悬液加载到铺有多孔碳膜的电镜载网上，然后用滤纸吸走多余液体，载碳膜微米级小孔中因水的表面张力形成大约 100~200 nm 厚度的含样品水层，快速插入液氮（ $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ）预冷的液态乙烷（ $-183 \text{ }^\circ\text{C}$ ），或者丙烷（ $-188 \text{ }^\circ\text{C}$ ），或者 1:1 乙烷/丙烷（ $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ）液体中，快速冷冻制作出玻璃态的含水生物样品，实现样品原始状态下原子分辨率结构冻存。该技术简单有效，目前冷冻电镜得到了广泛的应用，在此基础上也派生出了其他改进型的各种制样技术方案。需要指出的是，投入冷冻技术只适合制作厚度小于 10  $\mu\text{m}$  的样品，因为水的导热差，厚样品中的热量无法及时移走而导致结冰样品损坏。单层细胞冷冻后，可以配合后面介绍的 Cryo-FIB 减薄技术制作出适合电镜观察的样品。

### B. 高压冷冻技术（High pressure freezing）

电镜制样技术发展早期，大块组织样品的冷冻需要加入防冻剂（如二甲基亚砜，甘油，乙二醇，蔗糖等），抑制溶液中水分子在降温过程中结晶形成冰晶体，但这种方法不仅会改变生物分子结构，还会严重影响电镜成像质量。1968 年 Moor 和 Riehl 在罗马电镜会议上提出不要防冻剂的高压冷冻制样的新概念<sup>[3]</sup>（1968），

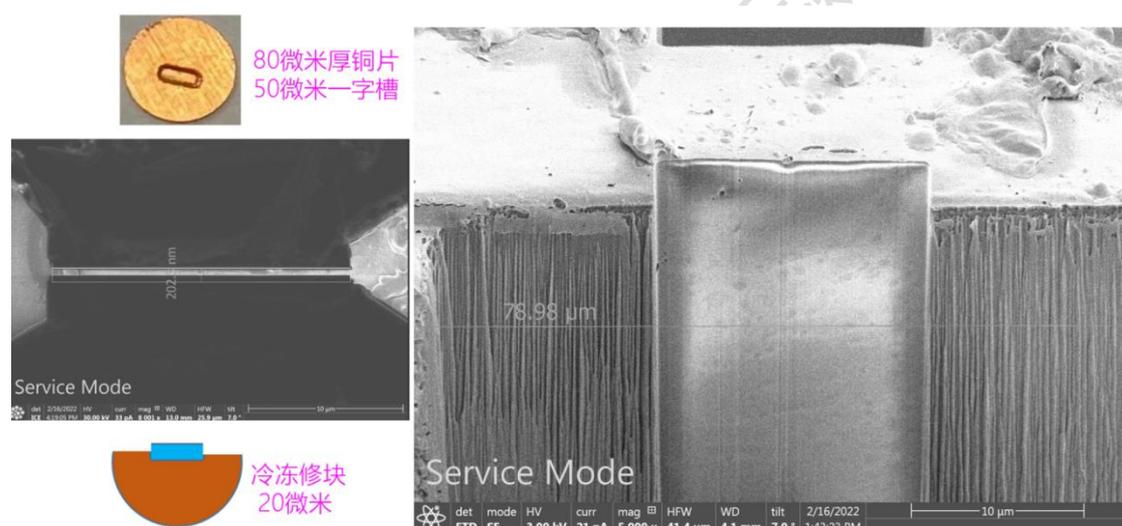
并于 1987 年推出首款商业化高压冷冻机 BalTec HPM-100 (Moor, 1987) [2]。高压冷冻是基于勒夏特列原理 (Le Chatelier): 若热动态平衡系统中某个物理量的改变, 会导致平衡会朝减小这种变化的方向移动。常压下, 水分子之间在 0 °C 时会以正六边形方式形成氢键 (能量最低) 而结晶, 但冰的体积比相应液态水的体积增大 1/9, 因此会严重破坏样品结构。对于高压冷冻情形, 当对溶液施加 2045 bar 冷冻时, 高压会促使系统朝减少体积方向移动, 会抑制溶液形成常压下的体积增大的结晶方式避免形成低密度冰晶。2045 bar 高压会导致水的冰点降低至 -22°C, 同时改变水的黏度, 大大抑制了冰晶生长速率 (比常压下低~1500 倍), 从而在低导热系数的水或冰中, 以较低降温速率 ( $10^3\sim 10^4$  K/s) 情况下避免较厚样品中水分子的结晶, 最佳条件下高压冷冻可以制作 200  $\mu\text{m}$  厚度玻璃态的生物组织样品。因为高压冷冻技术不用防冻剂同时抑制了低密度六方冰晶的形成, 从而避免了因体积增大导致的细胞组织结构损伤, 因此可以用来固定高分辨率的大块组织样品 (100~200  $\mu\text{m}$ ), 是目前用来捕捉近生理状态原位精细结构的利器。除了外源施加高压外, 最近也有研究人员探索了自增压快速冷冻技术 (SPRF) [4], 就是将含水生物样品封装在密闭空间内 (如 0.65 mm 直径铜管), 放入液氮或液态乙烷中冷冻, 随着外层六方冰晶形成, 因六方冰晶密度低于水会导致管内自增压到 2000 bar, 最后管中心样品无法形成冰晶而以玻璃态凝固。

### C. 冷冻超薄切片技术 (Cryo-sectioning, CEMOVIS)

快速冷冻 (投入式冷冻和高压冷冻) 固定的玻璃态生物样品, 如果厚度超过 500-1000 nm, 尤其是大块组织样品 (100~200  $\mu\text{m}$ ), 通常不适合直接电镜成像, 需要后期冷冻超薄切片处理。冷冻超薄切片技术就是维持玻璃态的冰包埋条件进行超薄切片, 常压下玻璃态冰重结晶温度为 -135°C, 因此冷冻超薄切片需要在 -140 ~ -160 °C 范围的冷冻腔内进行, 避免重结晶破坏样品结构。冷冻超薄切片技术面临很多问题, 样品的褶皱压缩、裂纹、划痕、卷曲等变形, 还有静电影响, 因此一般很难得到好的切片, 而且电镜下导电导热差, 因此目前基本上无法推广使用 [5]。但冷冻超薄切片技术可用来修剪较厚的组织样品 (50~200  $\mu\text{m}$ ), 得到 20  $\mu\text{m}$  厚度的样品用于后面介绍的 Cryo-FIB 技术进一步加工制作 100~300 nm 超薄冷冻电镜样品。

### D. 冷冻聚焦离子束切割技术 (Cryo-FIB技术)

聚焦离子束切割技术已经广泛应用于材料科学中的电镜制样，其基本原理就是将  $\text{Ga}^+$  离子（或者其他离子）加速通过电磁透镜聚焦到纳米级离子束，轰击样品实现样品的精确切割。2007 年 Marko 等人发展了在低温条件下对冰冻含水样品的 FI 切割技术<sup>[6]</sup>，冷冻聚焦离子束切割需要引入专门的冷冻传输装置和冷台机温控系统保证整个过程样品温度维持在  $-140\text{ }^\circ\text{C}$  以下，还需要在样品表面喷镀一层有机铂保护样品免受辐照损伤，离子束的束流需要精确控制。冷冻样品可以是直接冷冻在电镜载网上，也可以是经冷冻超薄切片机修块至  $20\text{ }\mu\text{m}$  厚度的大块样品。Cryo-FIB 目前已有细胞和组织样品的详细具体操作流程<sup>[7-9]</sup>。我们最近设计了一种带“一字型”槽的  $80\text{ }\mu\text{m}$  厚度铜片用于制作小鼠皮肤组织的高压冷冻样品，经冷冻切片粗修至  $20\text{ }\mu\text{m}$  厚，然后进行 Cryo-FIB 减薄成功制作出  $200\text{ nm}$  厚度的冷冻电镜样品（图 2）。



●图 2、高压冷冻的小鼠皮肤组织制作 Cryo-FIB 减薄的冷冻电镜样品（姜招弟、梁丽荣协助 Cryo-FIB 制样）。

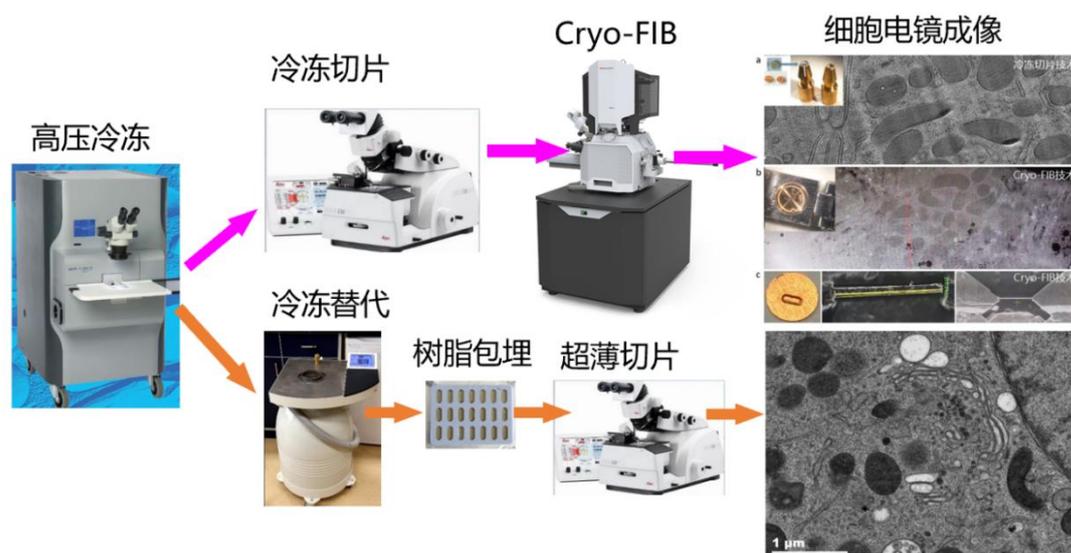
#### E. 冷冻替代固定技术（Freeze-substitution fixation）

快速冷冻的生物样品，除了前面提及的冷冻切片或者Cryo-FIB切割外，还有一种广泛使用的后期制样技术，就是冷冻替代固定技术<sup>[10]</sup>。含水生物样品中通常含有蛋白质、电解质和其他可溶物，因此跟纯水的重结晶温度（ $-135\text{ }^\circ\text{C}$ ）有所不同，通常温度升高至  $-90\text{ }^\circ\text{C}$  也不会发生明显的重结晶。冷冻替代固定技术，就是将冷冻样品放入含有化学固定剂（如 1~2% 四氧化锇、0.1% 醋酸铀、0.01% 揉

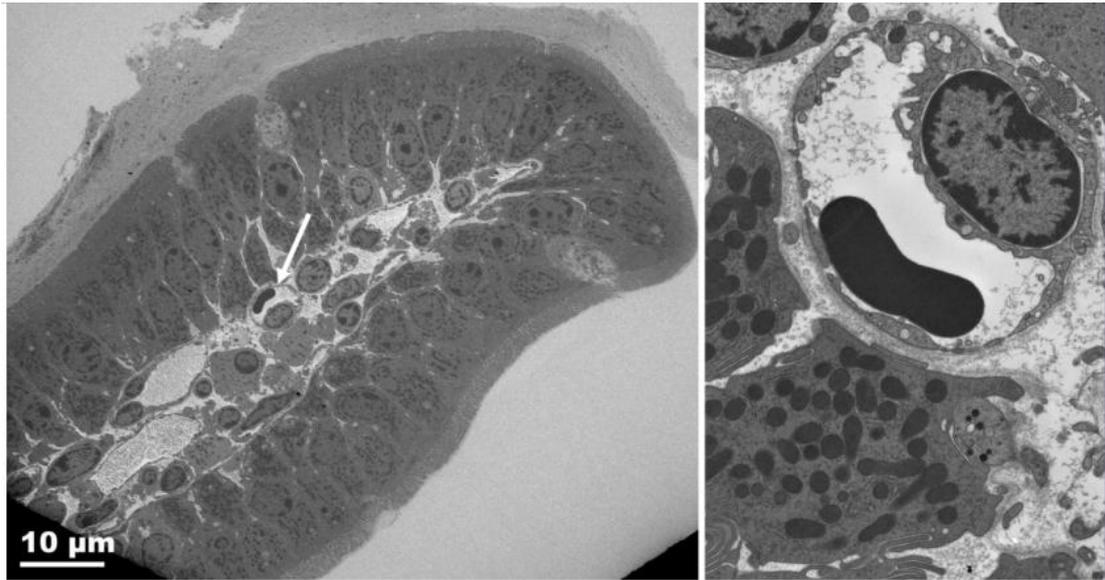
酸、0.5%戊二醛等)的预冷丙酮(或者其他有机溶剂如乙醚、甲醇等)中,样品从-196℃升温至-90℃停留8~24小时,丙酮分子会缓慢溶解替代样品中的水分子,让化学固定剂逐步渗入并交联样品中的蛋白质分子,而大的生物分子在-90℃低温下运动幅度很小基本保持原位不动被交联固定下来,然后逐步升温到-60℃、-30℃、4℃实现完全脱水固定,最后在室温用树脂渗透包埋聚合。聚合后的冷冻替代样品经室温超薄切片重金属染色后,进行电镜观察。冷冻替代可以很好地保存3~5 nm分辨率的细胞精细结构,样品分辨率和保真度都远比传统化学固定技术的样品好,而且可以连续切片(50~300 nm)大规模观察(可弥补Cryo-FIB及冷冻切片等有损制样的不足)。

### 三、应用实例

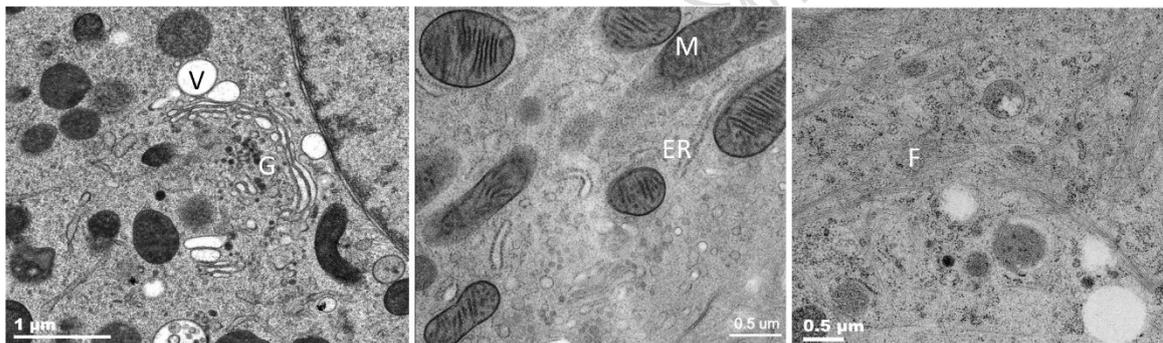
以生物组织样品制作流程为例(图3),经过高压冷冻固定制作含水生物组织玻璃态固定样品,可以经过冷冻切片及Cryo-FIB制作出适合冷冻电镜成像的200 nm薄片电镜冰冻样品,或者经过冷冻替代固定脱水,然后树脂包埋聚合,超薄切片制作出70~120 nm厚度电镜薄片样品。优化的高压冷冻技术可以制作出完全不结冰的玻璃态固定样品,经过冷冻替代脱水,可以得到高保真的组织原位精细结构(图4),室温电镜下可以得到精细的各种细胞器超微结构(图5)。



●图3、生物组织样品的高压冷冻、冷冻切片、冷冻替代,超薄切片、Cryo-FIB电镜制样流程图(姜招弟、许淑曼、梁丽荣协助Cryo-FIB制样)。



●图 4、高压冷冻-冷冻替代固定制作的小鼠小肠绒毛组织样品电镜图像，箭头所指部分为毛细血管，右图为箭头所指的放大图，整个绒毛完全避免了冰晶损伤。



●图 5、高压冷冻-冷冻替代固定制作的细胞组织样品电镜图像，展示保存结构完好的膜泡（V），高尔基体（G），线粒体（M），内质网（ER）和微丝（F）等精细结构。

#### 四、展望与讨论

目前冷冻电镜领域，纯化的蛋白质及大型复合物的原子分辨率结构的冷冻电镜单颗粒解析方法已经常规化，但生物组织原位结构的冷冻电镜研究正逐步称为蓬勃发展的新热门方向。生物组织的冷冻电镜样品制作，目前制样难度大、成功率低、通量低，比较依赖制样人员的技术经验。动物组织样品对生理状态变化十分敏感，因此对制样技术有极高的要求，我们大量的高压冷冻制样技术经验表明，捕捉生理状态原位结构，对实验人员的制样技能要求极高。我们今后会在生物样品生理状态快速取样、高压冷冻机高压样品腔、样品盘的导热设计以及低毒防冻等进行改进设计，以降低制样技术经验的依赖度，实现高可靠、高成功率、高通

量的冷冻电镜制样。目前单细胞的 Cryo-FIB 制样技术已经较为成熟，但组织原位结构的 Cryo-FIB 制样方法尚处于初步探索阶段，需要很多方面的开拓，如生理状态捕捉、高成功率的冷冻制样、精准的修块及目标定位的 Cryo-FIB 减薄技术（如三维荧光关联定位<sup>[9]</sup>）。

#### 参考文献:

- 1、Dubochet, J. & McDowell, A.W. , Vitrification of pure water for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **1981**, 124, RP3.
- 2、Moor H., Theory and practice of the high pressure freezing, *Cryotechniques in biological electron microscopy* (Ed. Steinbrecht R.A, Zierold K.), Berlin : Springer-Verlag, **1987**,175.
- 3、Moor H, Riehle U, Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze-etching. In: Steve Bocciarelli D (ed) *Electron microscopy* **1968**, 2, Proc 4th Eur Reg Conf Electron Microsc, Rome, 33.
- 4、LEUNISSEN J.L.M. & YI H. , Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy, *Journal of Microscopy*, **2009**, 235, 1, 25.
- 5、Al-Amoudi A., Cryo-electron microscopy of vitreous sections, *The EMBO Journal*, **2004**, 23, 3583.
- 6、Marko M, Hsieh C, Schalek R, Frank J, Mannella C. , Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nature Methods*, **2007**,4(3),215.
- 7、Wagner, F.R., Watanabe, R., Schampers, R. *et al.* Preparing samples from whole cells using focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Nature Protocol*, **2020**, 15, 2041.
- 8、Zhang J. et al., VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography, *Journal of Structural Biology*,

2021,213, 107763.

9、 Li W et al., Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. *Nature Methods*, **2023**, doi: 10.1038/s41592-022-01749-z.

10、 He W., He Y., Electron Tomography for Organelles, Cells, and Tissues, *Methods in Molecular Biology* (Ed. John Kuo) **2014**, Humana Press, 1117, 445.

#### 致谢:

高压冷冻制样、冷冻替代固定及冷冻切片制样技术得到了北京生命科学研究  
所姜招弟博士的大力支持; Cryo-FIB制样技术得到南方科大许淑曼的大力支持。  
感谢科技部973项目(2011CB812502, 2014CB849902)和中科院化学所启动项  
目(E28003BZ3)的经费支持。感谢分析测试中心丁丽萍的审核编辑。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有