

生物样品的扫描电镜制样干燥方法

肖媛, 刘伟, 汪艳, 左艳霞, 胡锐, 李婷婷, 崔宗斌

(中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072)

摘要:为获得良好的生物样品干燥和扫描电镜观察效果,应根据生物样品的特点、观察要求和设备条件来选择合适的干燥方法。通过查阅维普期刊和中国知网等数据库中自2001年以来的122篇文献,重点比较了自然干燥法、烘干干燥法、临界点干燥法、叔丁醇真空干燥法和冷冻干燥法在扫描电镜生物样品制备过程中的应用、优缺点和效果,归纳总结了微生物、植物和动物样品干燥方法的一般性选择原则。微生物样品可选用较为简单的自然干燥法或烘干干燥法;植物样品多选择临界点干燥法或叔丁醇真空干燥法;而动物样品的首选干燥方法是临界点干燥法,但仍需根据具体情况进行选择。因此,按样品种类列出了可供参考的文献,以期为研究人员选择生物样品的扫描电镜制样方法提供帮助。

关键词:扫描电镜;生物样品;干燥方法

中图分类号:Q 336

文献标志码:A

文章编号:1006-7167(2013)05-0045-09

Drying Methods of Biological Sample Preparation for Scanning Electron Microscope

XIAO Yuan, LIU Wei, WANG Yan, ZUO Yan-xia, HU Rui, LI Ting-ting, CUI Zong-bin

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: To preserve important biological structures and obtain satisfying images, it is important to select an appropriate method for the drying of biological samples. The drying method can be selected according to the characteristics of biological samples, the requirements of scanning electron microscopic observation and the equipment condition. To acquire the general principles for the selection of drying methods, the related Chinese literature in the VIP Chinese journal database, the China Knowledge Network and other well-known Chinese core periodical databases were search. A total of 122 related papers since 2001 were classified according to the types of biological samples and the drying methods. Five of the most commonly used drying methods are the natural drying method, the bake-drying method, the critical point drying method, the tert-butyl alcohol vacuum-drying method and the freeze-drying method. The applications, effects, advantages and disadvantages of these drying methods in biological sample preparation process for scanning electron microscopic observation were analyzed and the appropriate drying methods for samples of different microorganisms, plants and animals were summarized.

Key words: scanning electron microscope(SEM); biological samples; drying method

0 引言

应用扫描电镜观察生物样品表面的微小形态特征,以获得较光学显微镜观察结果更为详尽、细微的结构特征,是生物学研究的重要手段之一。而能否获得

真实、清晰、理想的扫描电镜观察结果,样品的制备过程是关键。

对于常规的扫描电镜(Scanning Electron Microscope, SEM)而言,用于观察的样品必须是经过彻底干燥处理的。含水量高的样品在扫描电镜真空的镜筒中将造成诸多不良后果^[1]:①样品受电子束轰击后蒸发的水蒸气遭遇高能电子流,产生电离而放电,引起束流大幅度波动,使图像模糊,出现雾状,或者根本不能成像;②大多数样品在高真空中容易发生形态损

收稿日期:2012-08-10

作者简介:肖媛(1983-),女,湖北天门人,博士,实验师,主要研究方向为电子显微成像技术。

Tel.: 027-68780321; E-mail: xiaoyuan@ihb.ac.cn

伤,使研究特征皱缩、变形;③造成物镜、镜头、光阑等的污染;④灯丝碰到水蒸气而氧化变质乃至熔断。虽然近年来出现了环境扫描电镜(Environment Scanning Electron Microscope, ESEM)和冷冻扫描电镜(Cryo-Scanning Electron Microscope, Cryo-SEM)等可观察含水样品的扫描电镜,但上述观察方法的分辨率较低,因此目前使用较多的还是只能观察不含水样品的SEM。

生物样品的含水量一般为70%~80%,仅有少数样品如毛发、牙齿、角质以及含水量极低的昆虫等可以直接喷镀观察,绝大多数的生物样品均要求经过干燥处理才能镀金和进行扫描电镜观察^[2]。干燥是扫描电镜生物样品制备中的关键环节,如果处理不好,会直接影响到观察的清晰度与准确度,甚至直接导致试验失败^[3]。要想制备出好的扫描电镜生物样品,要求在干燥过程中尽可能减少由于水分蒸发而引起的样品表面形貌的变形(体积变化、结构皱缩或干裂等),且必须确保干燥彻底^[1]。大多数动植物,特别是柔软的细胞和组织,在干燥时由于体积应力和表面张力的作用,容易发生明显的塌陷和变形^[2]。因此,需要针对不同的生物样品来选择合适的干燥方法,在样品不受或少受表面张力等因素的影响下,不变地将液体溶剂去掉,达到干燥的目的。

干燥的方法很多,比如临界点干燥法、自然干燥法、冷冻干燥法、叔丁醇真空干燥法、六甲基二硅胺烷干燥法、乙腈干燥法、烘干干燥法、氮气干燥法和微波干燥法等^[1]。这些方法各有利弊,且适用样品种类不同。因此,根据生物样品的特性选择一种适宜的干燥方法十分重要。孙京田等也认为干燥方法的选择是生物医学扫描样品制备中难度最大的一关,他们比较了4种干燥方法,并分析了各种方法适合的样品类型^[4]。还有一些研究使用某一种或某一类生物材料进行了几种干燥方法的比较,并指出应根据样品的性质选择相应的干燥方法^[3,5-7]。但近年来,没有任何文献针对不同种类生物样品的扫描电镜样品干燥方法的选择进行系统的归纳总结。本文使用维普期刊和中国知网等数据库,搜索了生物样品扫描电镜制样和观察的相关文章,共计找到了2001年以来的122篇中文文献,重点比较分析了不同生物样品所采用的不同干燥方法,并对微生物、植物或动物样品干燥方法的一般性选择原则进行归纳和总结,以期为研究人员选择扫描电镜制样方法提供帮助。

1 扫描电镜生物样品制备常用干燥方法

1.1 自然干燥法

自然干燥法是指样品中的水分在大气中自然蒸发,或样品经脱水处理后脱水剂自然挥发而干燥的方法。样品从含脱水剂状态下进行自然干燥与样品从含万方数据

水状态下进行自然干燥相比,由于脱水剂的表面张力系数小于水,所以前者样品变形较小^[1]。自然干燥法对于含水量较多的动植物组织、游离细胞等的干燥是不适用的,因为干燥过程中表面张力将使样品变形。自然干燥法对干种子、果壳、某些干花粉、长期保存的昆虫针插标本和70%乙醇浸泡的昆虫标本以及蛋壳和蛋膜等样品是一个简易实用有效的方法,虽然在自然干燥过程中,样品体积有所收缩,但却保留了样品的基本形态^[1]。

1.2 烘干干燥法

此方法将要研究的样品用烘干箱烘干,一般温度控制在80℃以下,烘干程度以含水量在5%以下为好。此方法的干燥速度较快,但水分蒸发时可能造成样品变形或微小断裂。适用于不易变形且耐热的样品,比如淀粉粒、孢子粉等^[1]。

1.3 临界点干燥法

此方法是根据物质处在临界点时的特殊物理状态设计的一种干燥方法。在临界状态下,液体和气体的密度相等,气液界面完全消失,液体的表面张力系数为零^[1]。临界点干燥法之所以一直被视为制作生物医学扫描样品最可靠的干燥方法,是因为此法能消除液体表面张力的作用,干燥出的样品能最大程度地保存其自然形态^[4]。临界点干燥法适合多种生物样品的干燥。

1.4 冷冻干燥法

冷冻干燥法是利用低温和真空,使样品中的水分直接由冰升华,或经过某种升华介质由固相升华,以达到干燥样品的目的^[1]。冷冻干燥过程使水分从固态直接转化为气态,不经过液态阶段,因而避免了气相和液相之间表面张力对样品的损伤^[2]。根据选用的冷冻介质的不同,冷冻干燥法又可以分为从水中直接冷冻干燥和从有机溶剂中干燥。与水相比,有机溶剂在冰冻后形成非晶体固态,不会产生冰晶损伤样品,且能以最快的速度从固态升华,大为缩短了干燥时间^[2]。

1.5 真空干燥法

真空干燥法指的是将经脱水的样品置于真空容器中进行干燥的方法。真空干燥法选用高熔点的有机材料(叔丁醇、乙腈、六甲基二硅胺烷、正丁醇等)作升华介质,既保留了冷冻干燥法的优点,又不用对样品进行冷冻处理,无冷冻损伤,且操作简单^[1]。最常用的真空干燥法是以叔丁醇为升华介质的叔丁醇干燥法,乙腈干燥法、六甲基二硅胺烷干燥法、正丁醇干燥法等用的相对较少(下文将叔丁醇真空干燥简称为叔丁醇干燥)。

总之,如表1所示,上述5种干燥方法各有优缺点,且适合于不同的生物样品种类。一般认为目前在用的最好的干燥方法是临界点干燥法;其次是冷冻干

燥法、真空干燥法和自然干燥法^[2]。虽然干燥方法在不断改进,但还是只能把由干燥引起的样品变形控制在一定的范围内。临界点干燥法被认为是一种最理想的干燥方法,但仍存在大约5%的变形^[1]。有研究结果表明,叔丁醇干燥法对有些材料来说可与临界点干燥相媲美,而且前者具有操作简便,叔丁醇可代替酒精做脱水剂,可同时干燥较大的样品,样品不易被污染、安全可靠、所需仪器常规实验室均有配备等优点

点^[8]。孙京田等发现采用叔丁醇干燥法干燥的各种动、植物样品各项指标均较理想,与临界点干燥法的效果基本相同,因此认为叔丁醇干燥法也是制作生物、医学扫描样品时首选的干燥方法^[4]。郭素枝等考虑到叔丁醇干燥法的诸多优点,建议在没有临界点干燥仪的情况下采用叔丁醇干燥法^[8]。在实际应用中,应该根据不同的样品和实验目的来选择不同的干燥方法,最好参照文献选择针对特异样品的干燥方法。

表1 5种常用生物样品干燥方法的比较

干燥方法	基本原理	优点	缺点	适用生物样品
自然干燥法	样品中的水分或脱水剂自然挥发干燥	简单易行,节省时间,不需专用设备	干燥过程中组织可能因脱水而收缩变形,易受温度、湿度变化的影响	外表坚硬的样品,如骨、壳、几丁质覆盖的昆虫、有硬膜的生物体、木材、花粉、种子等
烘干干燥法	用烘箱烘干,一般温度控制在80℃	干燥速度较快,操作简单,所需设备容易获得	水分蒸发时可能造成样品变形或微小断裂	不易变形且耐热的样品,如淀粉粒、孢子粉等
临界点干燥法	利用了物质的临界状态特性	被认为是目前生物学扫描电镜样品制备中最可靠、最理想的干燥方法	操作复杂,耗时长;需要专用的临界点干燥器和液体CO ₂ ;样品有可能被金属锈、油及其他杂质(混入液态CO ₂ 中)污染;干燥后的样品很脆易碎	所有生物样品
冷冻干燥法	利用低温使样品冰冻硬化,然后在高真空中通过升华去除水分	避免了气相和液相之间表面张力对样品的损害;可干燥大量的样品	需要专门的冷冻设备或专用试剂;可能有冷冻损伤	所有生物样品
真空干燥法	经有机溶剂脱水置换的样品置于高真空中进行干燥,最常用的叔丁醇真空干燥法	既有冷冻干燥的优点,又无冷冻损伤,还简化操作;无需专用设备,可借用真空喷镀仪来抽真空;可干燥大量的样品	对有些样品的干燥效果略差于临界点干燥法	所有生物样品,特别是细菌、细胞等微小样品

2 微生物、植物和动物的 SEM 样品干燥方法

2.1 微生物

如表2、3所示,在数据库中共搜索到2005年以来的11篇相关文献。对于微生物样品,使用各种干燥方法均取得过满意的观察结果,各方法的选择没有明显的偏向性。总的来说临界点干燥法和叔丁醇干燥法应用得较多,但细菌、霉菌和真菌都可以选用操作较为简单的自然干燥法或烘干干燥法。孔祥林等在制备贵阳腐霉的扫描电镜样品时,采用了自然干燥的方法,同时他们也指出低温天气时可用鼓风干燥箱30℃干燥,即使用烘干干燥法^[9]。表明对于贵阳腐霉来说,自然干燥和烘干干燥的效果没有明显区别。钱天乐等比较了经室内晾干、烘箱干燥和叔丁醇真空干燥处理后的大肠杆菌的形态和制样处理效果,发现叔丁醇真空干燥对样品脱水最充分、造成的破坏和变形最小,而且干燥越充分样品的扫描电镜图像越清晰,由此认为对单细胞生物采用叔丁醇干燥法要比自然晾干和烘干脱水更

彻底、成像更理想^[7]。对于细菌、细胞一类微小的样品,采用临界点和冷冻干燥法较难操作,但若采用固定、脱水之后将样品点于盖玻片上再真空干燥的方法,效果还是比较理想的,而且方便操作^[1]。总之,对于微生物等微小的生物样品,如果想要操作简便,可以选用自然干燥法或烘干干燥法;如果想要获得较好的效果,建议选用临界点干燥法或真空干燥法。

表2 微生物样品的扫描电镜制样干燥方法与研究时间的关系

年份	文献数	未干燥	干燥方法					
			自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他
2005	1	0	0	0	1	0	0	0
2006	1	0	0	0	1	0	0	0
2008	2	0	1	0	0	1	0	0
2009	2	0	1	1	0	1	0	1
2010	1	0	0	0	0	1	0	0
2011	4	0	0	1	1	1	1	0
合计	11	0	2	2	3	4	1	1

表 3 不同种类微生物样品的扫描电镜制样干燥方法

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
灯盏花病原锈菌				▲				2005	灯盏花病原锈菌扫描电镜制样方法初探
大肠杆菌		▲	▲		▲			2009	微生物扫描电镜样品清洗方法的改进与固定干燥方法比较
细菌				▲				2011	模拟微重力环境对大肠杆菌形态与表面超微结构的影响研究
大肠杆菌					▲			2011	用扫描电镜观察不镀导电膜对大肠杆菌损伤和图像的影响
霉菌		▲						2008	贵阳腐霉菌丝体及无性繁殖阶段的扫描电镜形态学观察
链霉菌						▲		2011	链霉菌 b221 降解角蛋白的扫描电镜观察
姬松茸					▲			2008	添加外源镧条件下姬松茸子实体形态的电镜观察
姬松茸							干燥剂 干燥	2009	姬松茸新菌株 J3 的细胞生物学鉴定与菌盖不同部位微量元素含量分析
真菌					▲			2010	不同 pH 值条件下金福菇菌丝体形态的电镜观察
金福菇								2010	不同 pH 值条件下金福菇菌丝体形态的电镜观察
低等真菌			▲					2011	用扫描电镜观察 dfkn-1 分离物菌体的方法研究
其他	颗粒污泥、絮状污泥、微生物膜中的微生物			▲				2006	用于污水处理的微生物制样方法和扫描电镜观察
总计		0	2	2	3	4	1	1	11

2.2 植物

综合 2004 年以来的数据,在对植物样品进行干燥时,研究者选用最多的方法是临界点干燥法,然后是自然干燥法和叔丁醇干燥法(见表 4)。从文献的时间来看,自然干燥法和临界点干燥法是两种比较传统的干燥方法,应用最为广泛,自 2004 年起基本每年都有文献;叔丁醇干燥法和冷冻干燥法作为较新的干燥方法,近年来才开始获得广泛的应用。有 8 篇文献未对植物样品进行任何干燥就放入扫描电镜观察,其中 5 篇关于花粉使用的是常规电镜,2 篇关于叶片使用的是环境扫描电镜,1 篇关于全株使用的是冷冻扫描电镜。需要特别指出的是,只有花粉的文献是真正意义上的未干燥,其余 3 篇文献则是由于使用了特殊类型的扫描电镜。

共有 15 篇文献是关于花粉的研究,其中 5 篇未干燥,4 篇采用自然干燥法,6 篇采用临界点干燥法(见表 5)。一般来说,花粉本身含水量较少且外表不易变形,多采用自然干燥法。蔡秀珍等认为虽然花粉有坚硬的外壁,但如果直接通过野外日晒或室内烘箱烘干来干燥,脱水过程过于剧烈,不利于花粉表面微观结构

的保存,而用酒精系列梯度脱水后再自然干燥则可得较为理想的制样效果^[10]。也有些植物的花粉组织幼嫩,本身含水量较多,在自然干燥处理过程中容易因为表面张力的作用,使得其表面结构发生皱缩、塌陷、变形。陈新芳等的研究就表明自然干燥法不适合用于五指毛桃花粉的扫描电镜样品制备,而临界点干燥法制备的花粉表面干净、形态清晰饱满、基本无变形,立体感强^[11]。

表 4 植物样品的扫描电镜制样干燥方法与研究时间的关系

年份	文献数	未干燥	干燥方法					
			自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他
2004	1	0	1	0	1	0	0	0
2006	5	1	1	0	2	0	1	0
2007	1	0	1	1	0	0	0	0
2008	2	0	1	0	0	1	0	0
2009	10	2	2	0	5	2	0	0
2010	8	2	1	0	1	2	3	1
2011	14	3	4	0	3	2	0	2
合计	41	8	11	1	12	7	4	3

表 5 不同种类植物样品的扫描电镜制样干燥方法

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
孢子	卷柏	▲						2006	海南产 2 种卷柏科植物孢子的形态观察
	藻苔	▲						2010	藻苔生殖器官的形态观察
	北细辛						未说明	2011	药用植物北细辛小孢子发生及雄配子体发育的研究
花蕾	枸杞				▲	▲	微波干燥、液氮干燥	2010	枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨
花芽	大豆				▲			2009	大豆花芽分化和发育的扫描电子显微镜观察
花粉	五指毛桃	▲		▲				2004	五指毛桃花粉扫描电镜样品的制备
	小麦	▲						2006	小麦花粉萌发孔与雄性不育关系初探
	琼花			▲				2006	运用 X 射线能谱分析方法研究城市污染物在琼花花粉内的富集
	凤仙花	▲	▲					2007	凤仙花属两种植物花粉的扫描电镜制样研究
	三裂叶豚草			▲				2009	三裂叶豚草花粉形态及雄配子体发育的研究
	银杏			▲				2009	银杏花粉萌发生长与分枝式花粉管形成的观察
	榆叶梅	▲						2010	榆叶梅种内花粉的扫描电镜观察
	樟、浙江楠、月桂、山胡椒和香叶树	▲						2010	几种常见樟科植物花粉的扫描电镜观察
	早熟禾				▲			2011	37 个早熟禾品种的花粉形态及其分类学意义
	芸香科吴茱萸及其变种石虎	▲						2011	江西野生吴茱萸与石虎的花粉形态比较研究
	十字花科 8 属 12 种植物	▲						2011	12 种十字花科植物花粉形态研究
	普通油茶长林 4 号、10 号、53 号			▲				2011	普通油茶花粉形态及花粉管活体萌发的研究
	欧李	▲						2011	燕山山脉野生欧李花粉的形态特征
	高山翠菊			▲				2011	长白山区高山翠菊花粉的形态研析
	百合属	▲						2011	百合属植物花粉亚显微形态研究
银杏			▲				2009	银杏中种皮形态建成及结构特征	
种子	大叶秦艽、粗茎秦艽、麻花秦艽、达乌里秦艽、黄管秦艽和管花秦艽	▲						2011	秦艽组 6 种植物种子的比较和扫描电镜观察
	喜马拉雅嵩草、大花嵩草、藏北嵩草、短轴嵩草、线叶嵩草、矮生嵩草和高山嵩草			▲				2011	利用扫描电镜研究嵩草属牧草种子形态和解剖学特征
原球茎	盾叶薯蓣			▲				2009	盾叶薯蓣类原球茎的细胞结构及薯蓣皂苷的组织化学定位

续表 5

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
大豆					▲			2008	草甘膦对大豆超微结构及光合指标影响的研究
满江红	▲							2009	满江红叶片形态特征的环境扫描电子显微镜活体观察
大豆东农 47					▲			2009	大豆子叶发育过程中的显微结构变化
叶	赤松、雪松、白皮松、 华山松和白扦			▲				2009	松科植物气孔器形态特征的扫描电镜观察
	糜子			▲				2010	糜子叶表面抗旱结构的扫描电镜观察
	肉豆蔻科				▲			2010	肉豆蔻科 3 属国产种类的叶表皮形态观察
	大豆				▲			2011	喷施草甘膦后叶肉细胞的扫描电镜观察
	云烟	▲						2011	烤烟品种云烟 85 腺毛形态结构的环境扫描电镜观察
地椒							未说明	2011	地椒叶腺毛发育的扫描电镜观察
木质部	茉莉	▲						2008	茉莉 3 品种次生木质部的比较解剖学研究
根	薇甘菊					▲		2006	入侵杂草薇甘菊根形态结构的比较研究
	木薯					▲		2010	木薯块根膨大初期淀粉体形态及发育的扫描电镜观察
全株	红豆杉和曼地亚			▲				2006	中国红豆杉和曼地亚叶茎储存结构性状的比较
	玫瑰	▲	▲					2009	利用扫描电镜冷台对植物样品观察初探
	鹅绒藤		▲					2011	蒙药鹅绒藤扫描电镜的观察研究
代谢产物	绿茶		▲					2009	绿茶多糖的扫描电镜制样新方法 & 原子力显微镜观察
	香菇					▲		2010	香菇多糖的纯化及电镜分析
总计	8	11	1	12	7	4	3	41	

也许是因为植物样品的扫描电镜制样较为简单,关于其干燥方法的比较研究的文献较少。本文总结的文献中,仅有曹君迈等比较了微波干燥、液氮干燥、真空冷冻干燥、叔丁醇干燥 4 种方法处理植物花蕾的效果,结果表明叔丁醇干燥法效果最好^[3]。一般来说,含水量较少、细胞壁和蜡质层较厚的植物组织多采用自然干燥法,而幼嫩、含水分较多的组织则需要选择其他方法。临界点干燥法和叔丁醇干燥法几乎适用于各类型的植物样品,但是考虑到操作的复杂性,能使用更简便的干燥方法时一般不选用它们。

2.3 动物

对于动物样品来说,临界点干燥法是首选的干燥方法,约 60% 的查阅文献使用了该方法,其次是自然干燥法和真空干燥法(见表 6)。文献主要集中于线虫动物门、节肢动物门和脊索动物门,且不同动物门的生物样品的干燥方法的选择略有区别(见表 7)。

表 6 动物样品的扫描电镜制样干燥方法与研究时间的关系

年份	文献数	未干燥	干燥方法					
			自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他
2001	4	0	1	0	4	1	0	1
2003	2	0	1	0	2	0	0	0
2004	2	0	0	0	1	0	0	1
2005	10	0	0	0	6	4	0	1
2006	15	1	1	1	8	2	0	2
2007	2	0	0	0	1	0	1	0
2008	4	0	0	1	2	2	0	0
2009	5	0	0	0	5	0	0	0
2010	10	0	4	0	6	0	0	0
2011	16	0	6	0	7	2	0	1
合计	70	1	13	2	42	11	1	6

表7 不同种类动物样品的扫描电镜制样干燥方法

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
原生动物门	异养性鞭毛虫			▲				2005	鞭毛虫的扫描电镜样品制备
	纤毛虫			▲				2010	原生动物的扫描电镜制样干燥方法
黏体动物门	黏孢子虫			▲				2009	黏孢子虫孢子期扫描电镜制样干燥方法的比较
线虫动物门	柑桔寄生线虫	▲		▲				2003	柑桔寄生线虫扫描电镜制样技术比较研究
	伞滑刃线虫			▲				2003	云南松树上三种伞滑刃线虫扫描电镜制样技术研究
	甘薯茎线虫			▲	▲			2005	甘薯茎线虫的扫描电镜制样方法
	昆虫线虫小杆属、三等齿属、植物根结线虫			▲	▲			2008	线虫扫描电镜制样技术的比较
棘皮动物门	体腔细胞 刺参						未说明	2005	刺参体腔细胞的电镜制样技术研究
环节动物门	体腔细胞 磷微蠕蚓			▲				2008	一种发光蚯蚓——磷微蠕蚓体腔细胞的超微结构
触角感器	光肩星天牛			▲				2010	光肩星天牛触角感受器的环境扫描电镜观察
	笋秀夜蛾	▲						2010	笋秀夜蛾触角感受器的扫描电镜观察
	脐腹小蠹虫			▲				2011	脐腹小蠹成虫触角结构与感受器扫描电镜观察
	香蕉假茎象甲	▲						2011	香蕉假茎象甲触角感受器的扫描电镜观察
	蝗虫	▲						2011	沼泽蝗属2种蝗虫触角感受器的扫描电镜观察
	曲纹紫灰蝶			▲				2011	曲纹紫灰蝶触角感受器的扫描电镜研究
	塔六点蓟马	▲						2011	塔六点蓟马触角感受器的扫描电镜观察
	节肢动物门	下颚须感受器 蝗虫	▲						2010
前翅感受器	东亚飞蝗					干燥器	2006	东亚飞蝗前翅感受器的扫描电镜观察	
刺体	大青叶蝉	▲						2011	大青叶蝉刺体的扫描电镜观察
爪垫	优雅蝻螽	▲						2006	优雅蝻螽爪垫微观结构的电镜分析
虫体	茧蜂、蚜虫	▲		▲	▲		微波、氮气、乙醇干燥法	2001	昆虫扫描电镜制样干燥法
	螭			▲				2010	三种中华螭的扫描电镜观察
	温室粉虱			▲				2011	温室粉虱成虫体形特征的扫描电镜观察
精子	人			▲				2006	人精子2种扫描电镜制样方法的比较
	银鲱	▲						2010	银鲱精子的超微结构
卵母细胞	猪			▲				2010	卵母细胞扫描电镜和透射电镜制样的制作
卵壳	岩鹭		▲					2006	岩鹭卵壳的超微结构及其元素组成
脊索动物门	小鼠			▲				2005	螺旋藻及其复方对游泳训练小鼠红细胞形态、血红蛋白含量的影响
	红细胞	大鼠				▲		2005	叔丁醇脱水干燥法在游离细胞扫描电镜制样中的应用
	人			▲				2006	遗传性红细胞增多症的细胞超微结构观察
	锦鸡					▲		2007	红腹锦鸡血细胞的光镜和扫描电镜观察

续表 7

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
鸡	▲							2011	马马克氏病鸡红细胞天然免疫黏附功能及超微结构研究
白血病培养细胞	人			▲				2006	体外培养细胞扫描电镜制样技术的改进
干细胞	人				▲			2006	Cytodex-3 微载体负载人骨髓间充质干细胞的培养及扫描电镜样品的制备与观察
杯状细胞	人				▲			2008	杯状细胞扫描电镜的观察
成骨细胞	人			▲				2007	细胞与生物材料共培养的样品扫描电镜制备法
	人			▲				2010	流体切应力下不同形貌钛表面成骨细胞的扫描电镜观察
鳃	南方大口鲶	▲						2006	南方大口鲶鳃小片微结构的冷冻扫描电镜观察
	驼背鲈			▲				2009	驼背鲈鳃丝的光镜、扫描和透射电镜观察
	茴鱼			▲				2011	鸭绿江茴鱼鳃的扫描电镜观察
肝	小鼠			▲				2001	细胞核凋亡过程中核基质的变化
	小鼠			▲				2001	小鼠肝细胞核凋亡的超微结构观察
肺	小鼠			▲				2009	紫外线致弱日本血吸虫尾蚴感染小鼠引起的肺组织细胞反应及虫体扫描电镜观察
舌、胃、肠	大鼠				▲			2005	叔丁醇干燥微波超快扫描电镜样品的制备方法
	小鼠			▲				2001	不同浓度酒精对小鼠胃肠道粘膜的影响
肠黏膜	小鼠				▲			2005	人芽囊原虫感染小鼠肠黏膜超微病理变化观察
	小鼠			▲				2006	人芽囊原虫对实验感染昆明小鼠肠黏膜超微结构的影响
	小鼠				▲			2011	糖尿病小鼠小肠黏膜扫描电镜的观察
血管内膜	小鼠						未说明	2004	扫描电镜观察脂欣康胶囊对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化主动脉内膜超微结构的影响
	大鼠						未说明	2006	扫描电镜血管内皮细胞硝酸银染色方法的改良
	大鼠			▲				2011	蛋氨酸负荷后大鼠主动脉血管内皮细胞早期形态扫描电镜观察
脑室室管膜	小鼠			▲				2004	血管性痴呆小鼠第三脑室室管膜扫描电镜特征观察
	小鼠			▲				2005	杂色曲霉素灌胃对小鼠外侧隐窝超微结构的影响
	小鼠			▲				2006	杂色曲霉素灌胃后小鼠脉络丛细胞超微结构和 $\text{tnf-}\alpha$ 表达的改变
	大鼠			▲				2006	大鼠第三脑室室管膜上巨噬细胞迁移过程的电镜观察
	小鼠			▲				2006	Smad5 基因敲除小鼠耳蜗扫描电镜观察
耳蜗	豚鼠			▲				2006	豚鼠耳蜗毛细胞静纤毛变异的扫描电镜观察
	鼯鼠			▲				2011	甘肃鼯鼠耳蜗扫描电镜研究

续表7

研究对象	未干燥	干燥方法						年份	文献
		自然	烘干	临界点	叔丁醇	冷冻	其他		
骨	羊				▲			2006	羊同种庆大霉素抗菌骨的制备及抗感染和成骨效果的扫描电镜观察
	大鼠			▲				2011	雷奈酸锶对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠骨超微结构和骨生物力学特性的影响
鳞	穿山甲		▲					2008	穿山甲鳞片表面的几何形态特征及其性能
	茴鱼			▲				2009	鸭绿江茴鱼鳞片表面结构扫描电镜观察
毛	朱鹮	▲						2010	朱鹮羽毛的扫描电镜观察
	绵羊、与山羊				▲			2011	绵羊毛与山羊绒的鉴别
	山羊						未说明	2011	山羊绒扫描电镜非典型结构形态特征分析
	鹿科、牛科、猫科7种动物	▲						2011	新疆部分野生哺乳动物被毛的扫描电镜分析
皮肤	小鼠			▲				2005	无毛同类系小鼠皮肤形态及扫描电镜观察
瘤	鼠			▲				2005	升主动脉缩窄鼠升主动脉瘤的扫描电镜观察
腭胚突	小鼠			▲				2009	地塞米松和维生素 b12 交互作用对小鼠腭胚突超微结构影响的观察
泪液	人			▲				2010	单纯疱疹性角膜炎患者泪液的扫描电镜观察
总计		1	13	2	42	11	1	6	70

线虫最常被用作作为研究扫描电镜制样干燥方法的材料。浦卫琼等比较了自然干燥法和临界点干燥法对柑桔寄生线虫的干燥效果,经比较认为用临界点干燥法制样效果较好,虫体表面环纹、侧线、阴门、肛门、交合刺等明显易见,清晰度好^[12]。郭素枝等以甘薯茎线虫为材料进行的研究表明,临界点干燥法的可观察率略高于叔丁醇干燥法,但两种方法的制样效果都较好,能获得良好的微形态结构,侧线数目清晰,虫体不皱缩、不变形^[8]。李蕾等认为对线虫而言,叔丁醇干燥法的效果比临界点干燥法好^[6]。

郭素枝等以节肢动物门生物茧蜂和蚜虫为材料,比较了6种干燥方法分别对含水量低(酒精浸泡标本、针插标本及蚜虫前胸背板)和含水量高(蚜虫腹部)的昆虫样品的制样效果^[5]。结果表明,相同试样采用不同的干燥法,其效果大不相同:①对含水量高的蚜虫腹部,叔丁醇干燥法可与临界点干燥法相媲美,且前者操作更简便,而其他干燥方法会引起虫体变形,只是变形程度有所差异;②对含水量低的蚜虫前胸背板等样品,几种干燥方法均不见变形,建议采用最经济省时的自然干燥法。因此,对于节肢动物门生物来说,含水量低且观察部位相对较硬的样品多采用自然干燥法,而含水量高且较柔软的样品多采用临界点干燥或真空干燥法。

脊索动物门样品采用最多的是临界点干燥法,少数含水量极低且较硬的样品如鳞片、毛发可使用简单的自然干燥法。未找到以脊索动物门样品为材料进行

不同干燥法制样效果研究的文献,因此不知道叔丁醇干燥法与临界点干燥法效果的异同。但叔丁醇干燥法在对鼠红细胞^[13]、人干细胞^[14]、人杯状细胞^[15]、鼠肠粘膜^[16-17]等的研究中取得了满意的观察效果。

3 结 语

在进行扫描电镜生物样品制备时,应根据生物样品的特性、观察要求和设备条件来选择采用何种干燥方法。通过以上分析,我们提出以下扫描电镜生物样品干燥方法选择的一般性原则:

(1) 对于微生物等微小的生物样品,如果想要操作简便,可以选用自然干燥法或烘干干燥法;如果想要获得较好的效果,建议选用临界点干燥法或真空干燥法。

(2) 一般来说,含水量较少、细胞壁和蜡质层较厚的植物组织多采用自然干燥法,而幼嫩、含水量较多的组织则需要选择其他方法。临界点干燥法和叔丁醇真空干燥法几乎适用于各类型的植物样品,但是考虑到操作的复杂性,能使用更简便的干燥方法时一般不选用它们。

(3) 临界点干燥法是动物样品的首选干燥方法。考虑到操作的简便性,对于含水量低且观察部位相对较硬的动物样品也可以采用自然干燥法,但是含水量高且较柔软的样品推荐采用临界点干燥或叔丁醇真空干燥法。

(下转第172页)

- [J]. 计算机教育, 2010(2): 119-121.
- [2] 袁春风, 陈贵海. “计算机组织与系统结构”课程的教学现状和改革思路[J]. 计算机教育, 2009(16): 153-156.
- [3] 郑存陆. “计算机组成原理”课程教学改革的思路和目标[J]. 计算机教育, 2006(10): 86-88.
- [4] 孟 瑾. 关于高校实验教学模式的探索[J]. 实验室研究与探索, 1995, 18(5): 23-25.
- [5] 方恺晴. 关于提升“计算机组成原理实验”课程教学质量的探讨[J]. 实验室研究与探索, 2008(3): 97-100.
- [6] 郑容跃, 林安珍. 改革传统的实践教学, 加强全面素质教育[J]. 实验室研究与探索, 2004, 23(3): 69-71.
- [7] 王 诚, 刘卫东. 计算机组成与设计实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [8] 李 涛. 计算机组成原理实验教程[M]. 北京: 中国电力出版社, 2009.
- [9] 王兴菊. 深化实验教学改革, 培养综合素质人才[J]. 实验技术与管理, 2002, 19(4): 79-81.
- [10] 方恺晴, 张洪杰. 计算机组成原理实验课程教学新方法的探讨[J]. 计算机教育, 2007(2): 52-59.
- [11] 秦磊华, 王小兰, 张 园. 计算机组成原理设计性实践教学模式研究[J]. 电气电子教学学报, 2009, 31(2): 68-70.
- [12] 宋万杰, 罗 丰. CPLD 技术及其应用[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1999.
- [13] 张 亮. 应用 EDA 技术改革“计算机组成原理”课程设计[J]. 计算机教育, 2009(19): 40-42.
- [14] 方恺晴. 基于 EDA 技术的教学型 CPU 的设计与实现[J]. 实验技术与管理, 2005, 9(22): 41-43.
- [15] 方恺晴, 石 琳. EDA 技术在计算机组成原理实验中的应用[J]. 实验技术与管理, 2001, 18(3): 45-47.

(上接第 53 页)

参考文献 (References):

- [1] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2006: 74-84.
- [2] 徐柏森, 杨 静. 实用电镜技术[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 67-71, 93-96.
- [3] 曹君迈, 贝鑫临, 江 涌, 等. 枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨[J]. 北方园艺, 2010, 2010(3): 30-32.
- [4] 孙京田, 谢英渤. 生物医学扫描样品制备中几种干燥方法的比较[J]. 实验室研究与探索, 1999, 18(3): 52-55.
- [5] 郭素枝, 李清娥. 昆虫扫描电镜样品干燥法[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(2): 262-265.
- [6] 李 蕾, 刘奇志, 王玉柱, 等. 线虫扫描电镜样品制备技术的比较[J]. 电子显微学报, 2008, 27(3): 255-260.
- [7] 钱天乐, 周逸卿, 邹珍友, 等. 微生物扫描电镜样品清洗方法的改进与固定干燥方法比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23): 10886-10888.
- [8] 郭素枝, 章淑玲, 陈玉芬, 等. 甘薯茎线虫的扫描电镜制样方法[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(1): 43-45.
- [9] 孔祥林, 骆 荣, 刘鲜林, 等. 贵阳腐霉菌菌体及无性繁殖阶段的扫描电镜形态学观察[J]. 电子显微学报, 2008, 27(4): 331-335.
- [10] 蔡秀珍, 刘克明, 刘锦辉, 等. 凤仙花属两种植物花粉的扫描电镜制样研究[J]. 激光生物学报, 2007, 16(1): 109-111.
- [11] 陈新芳, 刘春玲, 杨秉耀. 五指毛桃花粉扫描电镜样品的制备[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2004, 17(4): 55-58.
- [12] 浦卫琼, 王 扬, 喻盛甫, 等. 柑桔寄生线虫扫描电镜制样技术比较研究[J]. 电子显微学报, 2003, 22(6): 664-664.
- [13] 王响英, 吴淑燕, 李苏安, 等. 叔丁醇脱水干燥法在游离细胞扫描电镜样品制备中的应用[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005, 25(5): 834-835.
- [14] 路 菊, 陶忠芬, 黄文琪, 等. Cytodex-3 微载体负载人骨髓间充质干细胞的培养及扫描电镜样品的制备与观察[J]. 电子显微学报, 2006, 25(8): 243-244.
- [15] 王 丽, 闫 静, 张连威, 等. 杯状细胞扫描电镜的观察[J]. 电子显微学报, 2008, 27(4): 319-321.
- [16] 王响英, 吴淑燕, 李苏安, 等. 叔丁醇干燥微波超快扫描电镜样品的制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 443-443.
- [17] 张献彩, 张 雷. 糖尿病小鼠小肠黏膜扫描电镜的观察[J]. 重庆医学, 2011, 40(28): 2815-2816.

(上接第 157 页)

- [7] 苏州万象条码. bartender 教程[EB/OL]. <http://www.docin.com/p-60365382.html#>, /2012-6-26.
- [8] 胡吉斌. BarTender 教程[EB/OL]. <http://www.93576.com/read/f540d8d480de02ad5543a104.html>, /2012-6-26.
- [9] 哈尔滨条码网. BarTender 使用手册[EB/OL]. <http://symbol.sinaapp.com/?p=1627>, 2010-6-13/2012-6-26.
- [10] GB/T 17172 - 1997, 四一七条码[S].
- [11] Okofnishnikova L V. Polynomial algorithm for recognition of bar codes[J]. Pattern Recognition and image analysis. 2001, 11(2): 361-364.
- [12] 米志强. 基于二维条码的服装防伪系统的研究[J]. 湘潭师范学院学报(自然科学版), 2009(2): 121-122.
- [13] 于 洋. 基于防伪手机摄像模组的 PDF417 二维条码识别系统的研究[J]. 中国高新技术企业, 2008(23): 132-133.
- [14] 陈敏之, 何 瑛. 基于二维码技术的服装批量定制业务流程再造[J]. 纺织学报, 2009, 30(9): 136-140.
- [15] 余建潮, 张瑞林. 二维条码技术在服装吊牌中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(5): 19-21.
- [16] 谢金龙, 武献宇. PDF417 二维条码的设计与实现[J]. 物流工程与管理, 2011, 33(4): 88-89.