

文章编号:1000-6281(2013)03-0276-04

制备细菌类单细胞生物扫描电镜样品方法的改进

梁静南,刘一苇*,谢家仪

(中国科学院微生物研究所大型仪器中心,北京 100101)

摘 要:常规扫描电镜生物样品制备过程中要经过多次漂洗和脱水,细菌类样品亦或单细胞样品体积微小,制备的每步环节都需要离心收集。多次离心容易导致样品丢失,尤其是高通量的样品制备时,丢失更为严重。本文实验结果表明:在 3 次漂洗固定液之后用滤纸包收集样品,由于乙醇的渗透速度快,滤纸并不会对乙醇的脱水造成太大的影响。使用改进后的方法,不但能保证观察所需的样品数量,而且也节省了操作时间。

关键词:样品制备;改进;扫描电镜

中图分类号: Q934; Q336 **文献标识码:** A **doi:**10.3969/j.1000-6281.2013.03.016

用于扫描电镜观察的生物样品在制备过程中,需要经过多次漂洗和脱水。细菌类微生物或单细胞生物样品体积微小,在制备的许多环节中都需要离心收集^[1-6]。多次离心可能会导致样品的丢失,也增加了操作的时间;尤其是在样品数量较少或高通量的样品制备时,上述问题更为突出。在前期工作的基础上^[1],作者做了进一步的摸索和实验,结果表明,在细菌样品固定并经 3 次漂洗后,用滤纸包裹,然后进行乙醇的脱水。并为低剂量样品在后期离子溅射时粘黏到样品台的环节提供一种可能的补救方法,保证了样品观察效果。

1 材料和方法

收集大肠杆菌^[1]。大肠杆菌为本研究所常规保存,于 37 ℃ 培养在 LB 培养基中,摇床培养 12 h。样品离心后,收集沉淀的细菌体质量 25 mL 左右。按以下程序进行操作:加入 2.5% 新鲜戊二醛悬浮固定 2 h→重蒸水清洗 3 次(需每步离心弃上清,加重蒸水后用吸管吹打菌块)→制作纸包:取直径为 15 cm 的定量滤纸依次均等对折两次成扇形,剪去弧形部分,展开成正方形后。沿正方形滤纸的一边,以 1 cm 的宽度依次折叠 3 次,形成 1 cm×8 cm 的纸筒,然后再从纸筒的中间剪开成为 2 个 1 cm×4 cm 的小纸包(图 1),用订书钉将纸包的一端订牢,成小口袋状(可根据样品量的多少灵活掌握滤纸包的长度,纸包越长,样品越容易转入纸包内,并减少损失;但滤纸折叠次数建议为 3 次,即纸包是 4 层,

随后将样品放入最里一层,以减少样品流失的可能性。→将离心浓缩后的菌液滴入小纸包,立即用订书器将另一端订牢→放在容器内,梯度乙醇脱水,50%,70%,85%,95%各 1 次,100%乙醇 2 次,15~20 min/次),注意试剂要覆盖住滤纸包→临界点干燥→离子溅射:撤掉订书钉,展开滤纸包,① 将滤纸包内粉末状的样品均匀洒在样品台上,纸片轻轻刮匀,用洗耳球从侧面轻吹多余的样品;② 或将滤纸包展开后,在纸包最内层贴近折叠处的位置,剪裁成 5 mm×5 mm 滤纸块,粘到样品台的双面胶上。喷金后置入 FEI Quanta200 型扫描电镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 直接粘黏到样品台的细菌样品的观察

在镜下取样品分布比较均匀的位置(图 2)放大观察(图 3),可见,经上述改进方法处理后的样品,细胞形貌完好。

但在局部地区,难免会出现一些样品被完全或部分压进导电胶内的现象,这种情况下,需要在电镜下寻找样品疏密合适的区域进行观察,有时甚至必须重新将样品铺撒到样品台上,经喷金后观察。

2.2 附着在滤纸片上的细菌样品观察

在低倍下,先找到在滤纸上样品块比较大的位置(图 4),可观察到密集堆叠而且有层次感的细菌(图 5);在样品量比较少的区域(图 6),可以得到单独分散的细菌的视野图片(图 7)。

利用滤纸包收集样品的环节在 3 次漂洗固定液

收稿日期:2013-01-04;修订日期:2013-03-18

作者简介:梁静南(1980-),女(汉族),硕士,工程师。E-mail:liangjn@im.ac.cn

* 通讯作者:刘一苇(1957-),男(汉族),研究员。E-mail:liuyw@im.ac.cn

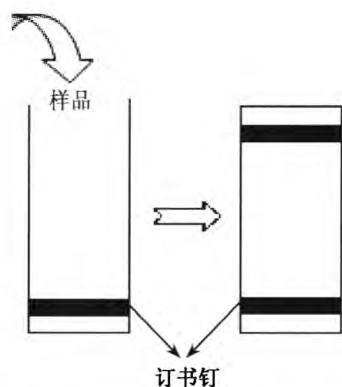


图1 将样品注入滤纸包并装订的过程。

Fig.1 The step of putting samples into the filter paper parcel and making an envelope by stapling nail.

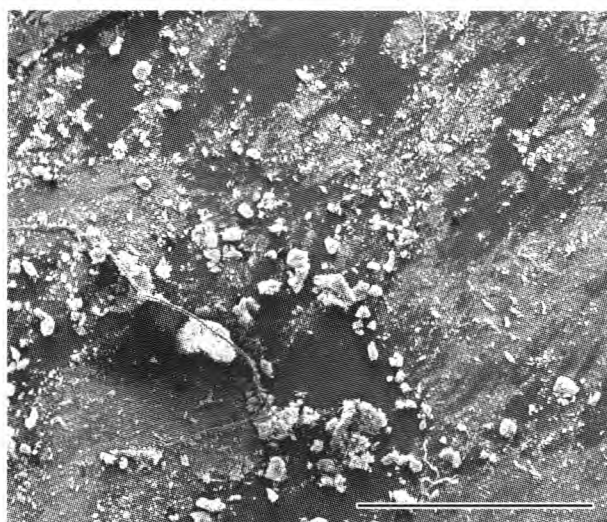


图2 从滤纸包取出样品粘黏在导电胶上,之后在低倍视野下观察。Bar = 1 mm

Fig.2 The picture of samples from the filter paper parcel without the filter paper on the conductive adhesive under the low magnification.

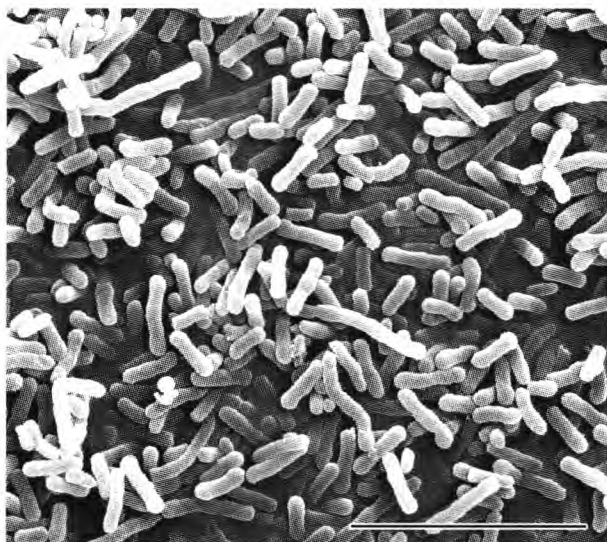


图3 从滤纸包取出样品粘黏在导电胶上,之后在高倍视野下观察。Bar = 10 μ m

Fig.3 The picture of samples from the filter paper parcel without the filter paper on the conductive adhesive under the large magnification.

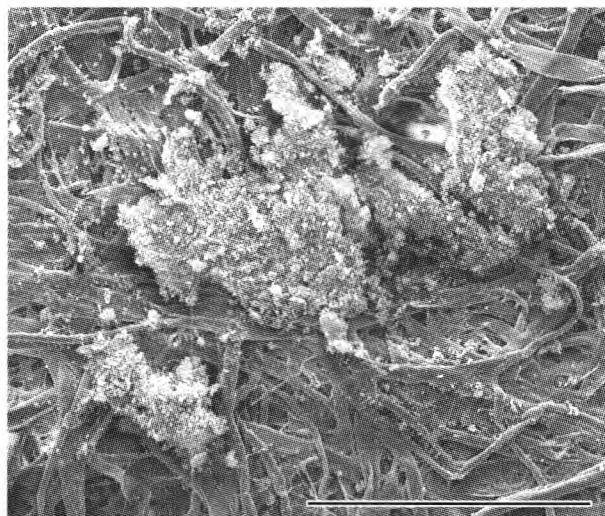


图4 将带有样品的滤纸包剪裁适当大小粘黏在导电胶上,之后在低倍视野下观察其样品密集区域。Bar = 300 μ m

Fig.4 The picture of dense samples on the filter paper under the low magnification.

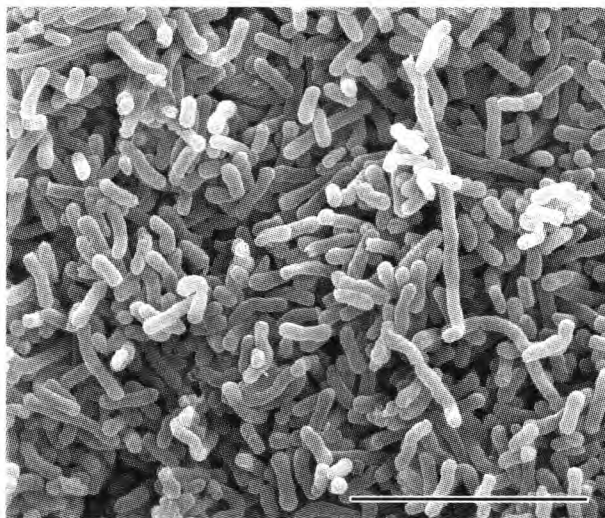


图5 将带有样品的滤纸包剪裁适当大小粘黏在导电胶上,之后在高倍视野下观察其样品密集区域。Bar = 10 μ m

Fig.5 The picture of dense samples on the filter paper under the large magnification.

之后进行,这样保证样品中多余的固定液被彻底漂洗。由于乙醇的渗透速度快,滤纸并不会对后续乙醇的脱水效果造成太大的影响。

在漂洗最后一步完成后,用 50 ~ 80 mL 的漂洗液将 20 mL 左右体积的样品充悬浮起来,然后转入到事先备好的滤纸包最内层的底部,再将纸包的远端用订书器封好,这样可保证样品基本无损失。对于数量很少或稀缺的样品,要尽早转入滤纸包,并视具体情况可以将滤纸包的长度增加,即两端订书器

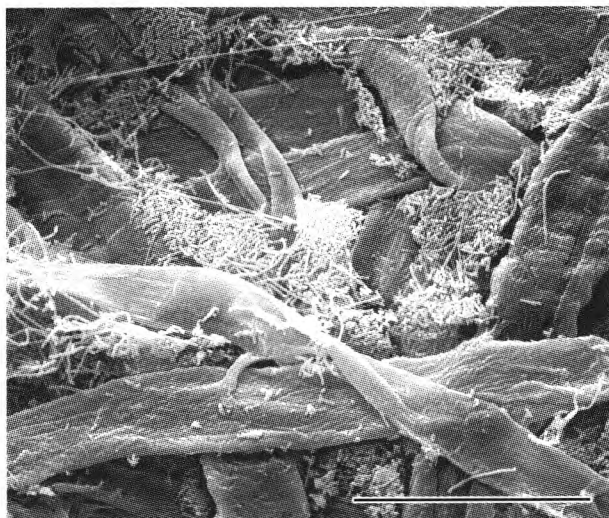


图 6 将带有样品的滤纸包剪裁适当大小粘在导电胶上,之后在低倍视野下观察其样品分布稀疏的区域。Bar = 50 μm

Fig. 6 The picture of scatteredly distributed samples on the filte paper under the low magnification.

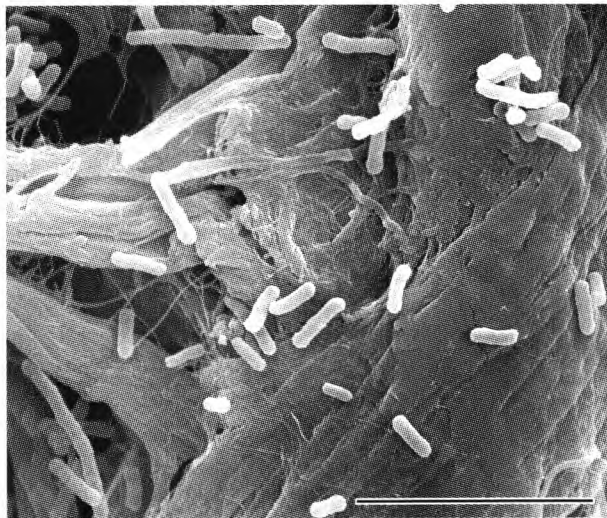


图 7 将带有样品的滤纸包剪裁适当大小粘在导电胶上,之后在高倍视野下观察其样品分布稀疏的区域。Bar = 10 μm

Fig. 7 The picture of scatteredly distributed samples on the filte paper under the large magnification.

封口的距离增加,并增加滤纸包的折叠层数,以最大程度减少样品的损耗。

在较大通量样品制备时,可将多个滤纸包放在同一个培养皿里,进行梯度脱水。这样,避免了多次离心,简化了制备的工序,更加节约时间。

对滤纸折叠处可能夹裹在滤纸纤维中的细胞观察,可作为样品量不大或者制备环节中出现样品损失后的一种补救方法。建议将附有样品的滤纸粘连到样品台后,也还要用洗耳球从侧面轻吹数次,最大程度降低对电镜的污染。

致谢:作者感谢中国科学院动物研究所甘雅玲研究员对本文的思路和文章构成所给予的指导。

参考文献:

- [1] 谢家仪,董光军,刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报,2005,24(4):440-440.
- [2] 李向党. 游离细胞超快扫描电镜样品制备法[J]. 电子显微学报,2001,20(4):537-538.
- [3] 曲淑贤,高船舟. 悬浮细胞扫描电镜快速制样方法[J]. 医学信息,2008,21(7):1162-1163.
- [4] 路菊,陶忠芬. 悬浮状物质的样品制备及扫描电镜观察[J]. 第三军医大学学报,2007,29(4):368-369.
- [5] 李培京. 扫描电镜生物样品制备与观察[J]. 现代科学仪器,2008,(3):124-125.
- [6] 梁静南,刘一苇. 对扫描电镜观察微生物样品出现磷酸盐结晶现象的改良[J]. 电子显微学报,2012,31(2):194-195.

The improvement of bacteria sample preparation method for scanning electron microscope observation

LIANG Jiang-nan, LIU Yi-wei*, XIE Jia-yi

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The conventional SEM sample preparation needs multiple steps including fixing, rinsing, and dehydrating. Because the volume of microbiology sample or unicellular sample is so small, so each step of preparation needs centrifugal collection. However, multiple centrifuging may cause loss of the sample. In this study, filter paper pack is used to collect sample. This method significantly improves the efficacy of the sample preparation and enhances the observing effect of the sample.

Keywords: sample preparation; improvement; SEM

* Corresponding author