

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

钱天乐, 周逸卿, 邹珍友*, 王琰, 孔肖菡, 史永红, 茅冬梅, 谭同和, 丁海东, 郭凯, 赵静

(南京农业大学生命科学实验中心-天美电镜技术有限公司合作示范实验室, 江苏南京 210095)

摘要 以大肠杆菌为代表材料, 用扫描电镜观察比较用 PBS 和蒸馏水清洗再制样的图象效果, 对比固定与不固定, 用自然晾干法、烘干法和用梯度酒精脱水再冷冻干燥法处理的大肠杆菌图像。提出用蒸馏水替代 PBS 清洗微生物样品以避免干燥后被固定液和 PBS 残留物覆盖的方法, 明确具有细胞壁的细菌也需固定, 对单细胞生物用梯度酒精脱水再冷冻干燥要比自然晾干和烘干脱水更彻底。

关键词 扫描电镜; 样品制作; 微生物; 大肠杆菌

中图分类号 O657.3; Q336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)23-10886-03

Improvement of Bathing Method of Microorganism Samples for SEM and Comparison of Their Fixing and Dryness Methods

QIAN Tian-le et al (Cooperative Laboratory of Experimental Center of Life Science College and Techcom Corp., Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract With *Escherichia coli* as representative materials, the image effects of *Escherichia coli* after being bathed with BPS and distilled-water were observed by using SEM. The conformations of the fixed and non-fixed samples were examined. The aired, warm-incubated and freezing-evaporated bacilli were compared. The results indicated that water bathed sample was more clear than that with PBS, for water swept away the residues of fixing solution and PBS which left on and covered the surface of samples when dried. Although the cell wall can maintain the conformation, the bacterium can secrete out its inner substances if do not fix. Dehydrating with the series of concentrate increasing alcohol and then freezingly evaporating were better ways than airing or warm-incubating for dryness.

Key words Scanning electric microscopy; Sample preparing; Microorganism; *Escherichia coli*

用常规方法制作微生物的扫描电镜样品, 一般要经过固定、清洗、脱水、干燥、粘样、镀金等步骤, 最后才能把样品放到电镜下观察^[1]。对于外表有细胞壁的微生物, 如大肠杆菌, 因细胞壁不易变形, 即使不固定也能保持菌体形态, 因而有人主张省略固定步骤^[2-3]。常规清洗方法是用磷酸缓冲液作清洗剂; 对于脱水和干燥, 有人认为大肠杆菌是单细胞, 容易干燥, 因此不必经过繁杂的程序, 只需将细菌悬液滴在样品台上, 在室内晾干即可镀金观察。笔者为消除广大研究者的困惑, 确定一套简洁有效的微生物扫描电镜制样方案, 采用多数实验室常用的大肠杆菌, 用 Hitachi S-3000N 扫描电镜分别观察比较该菌的固定与不固定, 用磷酸缓冲液或蒸馏水清洗, 冷冻干燥、室内晾干和烘箱干燥后的形态和制样处理效果。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠杆菌 JM109; LB 培养基; 酵母提取物、氯化钠、琼脂、胰蛋白胨、酵母粉购自 Oxoid 公司; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 仪器 S-3000N 扫描电子显微镜、ES2030 冷冻干燥机、E-1010 离子溅射仪, 日本 Hitachi 公司; D-1 自动蒸汽灭菌锅, 北京发恩科贸有限公司; SHZ-82A 气浴恒温振荡器, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; AIRTECH 超净工作台, 苏净集团安泰公司; TGL-C 高速台式离心机, 上海医疗器械厂; HPX-9082 MBE 数字电热培养箱, 上海博风实业有限公司医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 大肠杆菌培养。将需用器具和培养基灭菌, 取玻璃试管若干, 注入 5 ml 液体培养基。从平板上挑取新活化的大肠杆菌单菌落, 接种到各试管培养基中, 37 °C 200 r/min 振

荡培养 12 h。

1.3.2 固定与不固定处理。用胶头滴管吸取细菌培养液, 注入到不同的离心管中, 两两平衡, 以 3 000 r/min 转速离心 5 min 后, 去除培养基上清。在一组有大肠杆菌沉淀的离心管中注入 40 倍菌体体积的 2.5% 戊二醛, 混匀后静置 2 h 以上固定。另一组大肠杆菌沉淀不固定, 用水清洗 3 遍, 每次 10 min, 清洗完毕用蒸馏水重悬, 滴在样品台的盖玻片上 40 °C 烘干。

1.3.3 用不同方法清洗大肠杆菌。取部分固定后的大肠杆菌分 3 组, 第 1 组先用 3 000 r/min 转速离心 5 min, 将细菌沉积, 弃上清固定液, 将 pH 值调至 7.2 的 0.02 mmol/L PBS 注入离心管混匀, 再以相同转速离心 5 min, 去上清, 重复 3 次, 以(磷酸盐缓冲液) PBS 重悬; 第 2 组以蒸馏水代替 PBS 清洗, 所有操作均相同, 最后以蒸馏水重悬; 第 3 组不清洗, 仍悬浮于原固定液中; 分别用不同滴管吸取各自菌液, 滴在样品台的盖玻片上。另取 3 个粘有盖玻片的样品台, 分别滴加蒸馏水、2.5% 戊二醛和 0.02 mol pH 值为 7.2 的 PBS。将以上各组样品放在干燥箱中 40 °C 烘干。

1.3.4 用不同方法对大肠杆菌脱水、干燥。取部分固定后的大肠杆菌按上述方法用蒸馏水清洗 3 遍, 然后分别用 30%、50%、70%、80%、90% 梯度浓度酒精脱水, 每个梯度中静置 10 min, 脱水完毕, 用纯酒精脱水 3 次, 每次 30 min, 然后用纯叔丁醇置换酒精 3 次, 每次 30 min, 最后吸取混匀的细菌-叔丁醇悬浮液滴在覆有盖玻片的样品台上, 置 -10 °C 预冷的冷冻干燥机内真空干燥, 气压表指示 10 Pa 以下时取出。第 2 组固定后的大肠杆菌则用蒸馏水清洗 3 遍后放在室内自然风干; 第 3 组固定的大肠杆菌用蒸馏水清洗 3 遍, 置烘箱中 40 °C 烘干。

1.3.5 镀金和电镜观察大肠杆菌。将以上各组干燥脱水后的大肠杆菌放在镀膜仪内, 以 10 Pa 的真空气度, 15 mA 的离子电流镀金 160 s。在扫描电镜下取 7.0 mm 的工作距离, 66

基金项目 浙江省测试基金(04165); 南京农业大学生命科学实验中心开放课题基金(680810150)。

作者简介 钱天乐(1988-), 女, 江苏南京人, 本科生, 专业: 生物科学。
* 通讯作者。

收稿日期 2009-04-13

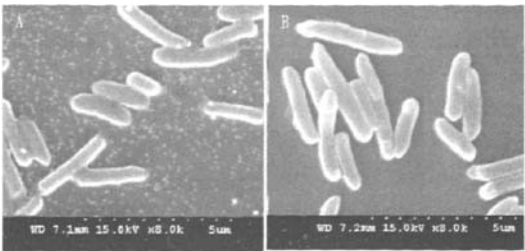
μA 的灯丝电流,15 kV 的加速电压观察大肠杆菌并拍照。

2 结果与分析

2.1 固定对观察效果的影响 由图 1A、B 可知,不固定的细菌周围有分泌物而固定的没有。

2.2 不同清洗方法对观察效果的影响 由图 2A~F 可知,蒸馏水滴在玻片上,干燥后无杂质残留;玻片上的戊二醛溶液干燥后形成了晶体;PBS 滴在玻片上,干燥后留下了颗粒层;用水清洗样品后无杂质覆盖;用戊二醛固定后不清洗,干燥后有一层膜覆盖遮蔽样品;用 PBS 清洗细菌,干燥后可见留下的磷酸盐颗粒将部分样品埋没。

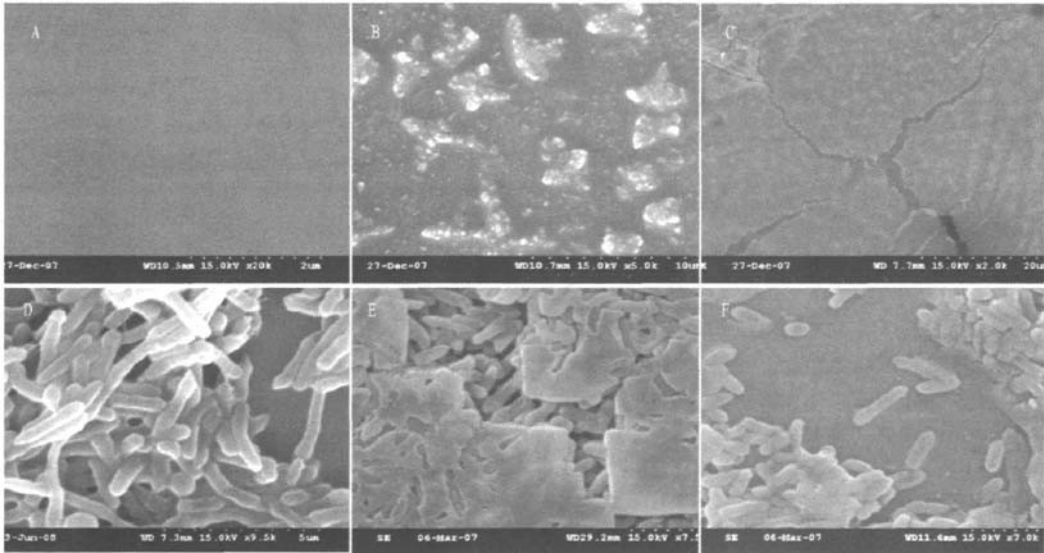
2.3 不同干燥方法对观察效果的影响 图 3A~C 是用不同干燥方法处理样品后的图像,其中 A 是滴在玻片上自然风干的样品;B 是 40℃ 烘 2 d 的样品;C 是固定后以蒸馏水清洗,酒精脱水,叔丁醇置换酒精冷冻干燥的样品。可见,干燥越



注: A 为制样时不固定,清洗后,细菌周围有分泌物; B 为固定并清洗后,细菌周围无分泌。

Note: A, Secretions are around the non-fixed bacillus; B, The background of fixed samples is clear.

图 1 固定与不固定的对比
Fig. 1 Fore-and-aft fixed *Escherichia coli*



注: A 为蒸馏水滴在空盖玻片上干燥后; B 为戊二醛滴在空盖玻片上干燥后; C 为 PBS 滴在空盖玻片上干燥后; D 为大肠杆菌固定后用蒸馏水清洗; E 为大肠杆菌固定后不清洗; F 为大肠杆菌固定后用 PBS 清洗。

Note: A, Distilled water washed glass; B, Glutaraldehyde solution washed glass; C, PBS washed glass; D, Distilled water washed *Escherichia coli*; E, Glutaraldehyde solution washed sample; F, PBS washed sample.

图 2 不同清洗方法对观察效果的影响
Fig. 2 Influences of different bathing methods on the observation effect

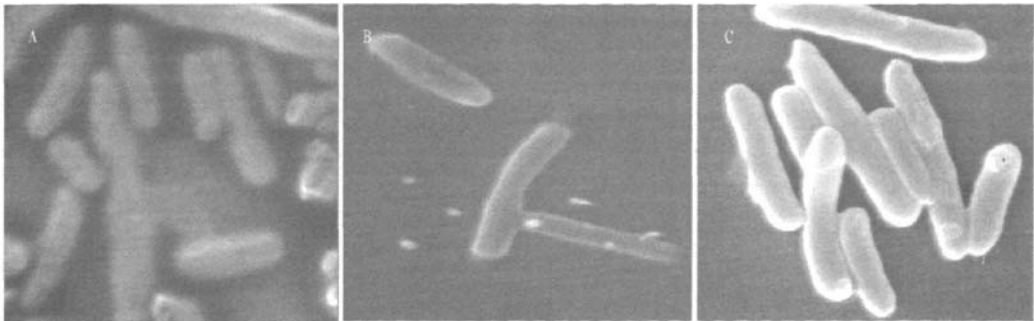


图 3 干燥程度对观察效果的影响
Fig. 3 Influences of drying degree on the observation effect

充分图像越清晰。

3 讨论

(1) 细菌和其他生物样品必须脱水干燥才能在扫描电镜下观察。细菌等生物样品在脱水死亡过程中, 细胞内各种成分会变性和酶解, 受脱水和不利溶液的刺激, 细菌会分泌内含物。固定剂可抑制这些变化。戊二醛分子上有 2 个对称的醛基, 能分别与蛋白质分子中游离的氨基、酚基等共价结合, 将蛋白质分子上不同氨基酸残基上的氨基、酚基交联而起固定作用。除脂质外, 戊二醛还能固定糖原、核酸、微管、内质网。不过浓度要适宜, 浓度过高会造成组织收缩, 过低则不能及时的固定组织^[4]。大肠杆菌外层的细胞壁具有一定硬度和刚性, 不易变形, 能使细胞保持一定形状和在不同渗透压下生长, 在不利环境下还能防止溶胞^[5]。因此不固定也可保持细菌较完好的外观形态。但干燥过程的刺激可能诱使细菌分泌内部物质到外周, 导致图像背景不洁。

(2) 为显露样品被观察的部位, 清洗是必要的。戊二醛在水溶液中多为环状水合物, 干燥后会形成有形晶体; PBS 由 NaCl、KCl、Na₂HPO₄ 和 KH₂PO₄ 加水配成^[6], 干燥后也会留下细微的颗粒覆盖在样品表面遮蔽样品。因此, 作者建议样品在固定后, 要用水或乙醇、丙酮等干燥后无残留的试剂清洗。乙醇、丙酮会使样品收缩, 用蒸馏水清洗经济又方便; 清洗样品还可减少对电镜内腔的污染, 延缓灯丝熔断。

(3) 室内晾干法受不同季节和气候的温度、湿度变化影响, 不易脱去组织内的水分。烘箱干燥法利用高温加快水分

蒸发而使样品脱水。因为水具有较大的内聚力和电极性, 可与样品中的极性成分瞬间结合, 在挥发干燥时会牵动样品组分而造成样品变形或微小断裂。用酒精脱水是利用样品内外水和乙醇的浓度差形成的渗透压差将样品中的游离水置换出来, 酒精则渗入到样品内。酒精极性小, 易从样品中挥发而使样品脱水。冷冻干燥是先用叔丁醇在熔点以上充分渗入样品替换酒精, 然后降温到熔点以下凝固, 叔丁醇是非极性分子, 很容易挥发, 样品变形小。抽气机不断排出从样品内挥发到周边空气中的叔丁醇分子, 样品中的叔丁醇挥发完毕。冷冻干燥对样品脱水充分, 且破坏和变形小。因此建议采用梯度浓度酒精脱水再冷冻干燥以获得清晰完整的样品图像。

参考文献

- [1] 胡水. 生物电子显微镜技术[M]. 南京: 南京农业大学出版社, 2004: 99-101.
 - [2] 李卓隼, 胡正嘉. 微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 9-15.
 - [3] ABBOTT SHARON L, JENNIFER O'CONNOR, TOM ROBIN, et al. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*[J]. Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, 2003, 41(1): 4852-4854.
 - [4] DELMO WALTER E M, ALKXI MESKISHVILI V, ABDUL KHALIQ H, et al. Aneurysmal dilatation of the Congrea bovine jugular vein conduit after reconstruction of the right ventricular outflow tract [J]. Ann Thorac Surg, 2007, 83(2): 6822-6841.
 - [5] HOLMGREN A, SOBERBERG B O, EKLUND H, et al. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 angstrom resolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 2305-2309.
 - [6] 刘世新. 实用生物组织学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 252-253.
-
- (上接第 10877 页)
- [38] LIU C M, XU Z H, CHUA N H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis[J]. Plant Cell, 1993, 5(6): 621-630.
 - [39] 许智宏. 生长素极性运输及其在植物发育调节中的作用[J]. 生命科学, 1998, 10(2): 50-54.
 - [40] NEHLIN L, MÖLLERS C, GLIMEIUS K. Induction of secondary embryogenesis in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. [J]. Plant Science, 1995, 111(2): 219-227.
 - [41] TE-CHATO S, RUNGNOI O U. Induction of somatic embryogenesis from leaves of *Sadua Chang* [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs] [J]. Scientia Horticulturae, 2000, 86(4): 311-321.
 - [42] 伍成厚, 梁承邨, 叶秀麟. 五唇兰未受精胚珠离体培养及雌配子体发育的研究[J]. 植物学报, 2004, 46(7): 839-845.
 - [43] CHRISTIANE F, GUNTHER N. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots[J]. Plant Journal, 1996, 9(5): 659-669.
 - [44] GREENWOOD M S, GOLDSMITH M H M. Polar transport and accumulation of indole-3-acetic acid during root regeneration by *Pinus lambertiana* embryo[J]. Planta, 1970, 95: 297-313.
 - [45] CHOI Y E, KATSUMI M, SANO H. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Elettrococcus senticosus* [J]. Plant Science, 2001, 160(6): 1183-1190.
 - [46] QUATRANO R S, SHAW S L. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2: 15-21.
 - [47] HABLE W E, KROPP D L. Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes [J]. Development, 2000, 127: 493-501.
 - [48] MANSFIELD S G, BRIARTY L G. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo [J]. Canadian Journal of Botany, 1991, 69: 461-476.
 - [49] HAIGUO S, SWATI B, SHARI R B, et al. Interactions between auxin transport and the actin cytoskeleton in developmental polarity of fucus distichus embryos in response to light [J]. Plant Physiology, 2004, 135: 266-278.
 - [50] 宾金华, 潘瑞焱. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病与过氧化物酶活性和木质素含量的关系[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(2): 160-164.
 - [51] 宾金华, 姜胜, 黄胜琴, 等. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗炭疽病与 PAL 活性及细胞壁物质的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 1-6.
 - [52] 黄新, 邱德有, 黄璐琦. 茉莉酸甲酯对中国红杉细胞基因表达的 mRNA 差异显示研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 627-632.
 - [53] AN Y, SHEN Y B, WU L J, et al. A change of phenolic acids content in poplar leaves induced by methyl salicylate and methyl jasmonate [J]. Journal of Forestry Research, 2006, 17(2): 107-110.
 - [54] 张进杰, 徐茂军. NO 和茉莉酸甲酯对黄芩悬浮细胞生长及黄芩苷合成的影响[J]. 植物学通报, 2006, 23(4): 374-379.
 - [55] 李会霞, 王玉文, 田岗, 等. 茉莉酸甲酯对谷子颖花开放的诱导效应[J]. 中国农学通报, 2006, 22(7): 298-301.
 - [56] 甘立军, 曾晓春, 夏凯, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸在诱导黑麦草颖花开放中的拮抗效应[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(1): 9-11.
 - [57] 刘世家, 夏凯, 曾晓春, 等. 茉莉酸甲酯对小麦颖花开放的诱导效应及其水杨酸的抑制[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 123-126.
 - [58] 蔡昆争, 董桃杏, 徐涛. 茉莉酸类物质 (JAs) 的生理特性及其在逆境胁迫中的抗性作用[J]. 生态环境, 2006, 15(2): 397-404.
 - [59] YUKIMUNE Y, TABATA H, HIGASHI Y, et al. Methyl jasmonate induced overproduction of pacitaxel and baccatin III in taxus cell suspension cultures [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 1129-1132.
 - [60] 徐亮胜, 薛晓峰, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 402-406.
 - [61] 华志明, 杨先慈, 郭小玲. 从种子到种子——胚胎发生的基因调控 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 337-344.
 - [62] 杨弘远, 周端, 孙蒙祥, 等. 植物性细胞、受精及胚胎发生离体操作系统的创建与实验生物学研究[J]. 中国科学基金, 2005(5): 295-297.