

文章编号:1674-7054(2016)01-0124-04

基于滤纸包裹法的细菌扫描电镜 样品制备方法改良

徐先栋^{1,3}, 张国庆¹, 谢珍玉^{1,2}, 王世锋^{1,2}, 周永灿^{1,2}

(1. 海南大学 海洋学院; 海口 570228; 2. 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海口 570228;

3. 江西省水产科学研究所, 南昌 330039)

摘要: 滤纸包裹法制备细菌类单细胞生物扫描电镜样品具有耗时短和样品损耗少等优点, 不过, 样品量较少时, 用该方法制样因干燥后难以分辨滤纸上样品位置而造成取样困难, 且电镜观察时常常存在较严重的滤纸背景干扰, 难以分辨细菌等样品表面的细微结构。为此, 笔者对细菌类单细胞样品制备的滤纸包裹法进行了改良, 在滤纸包裹的内层衬上1层锡纸, 样品涂布于锡纸上再进行脱水等操作。改良后的方法不仅易于分辨样品在锡纸上的分布, 方便取样, 而且可有效克服原滤纸包裹法制样时产生的背景干扰, 能清晰观察细菌样品的表面细微结构, 提高了观察效果。

关键词: 扫描电镜; 滤纸包裹法; 细菌样品制备; 方法改良

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.01.021

应用扫描电镜, 可以较清晰地观察到细菌表面的细微形态结构^[1-4], 但要获得清晰度好、分辨率高、无背景干扰的电镜照片, 样品的制备十分关键。细菌类单细胞生物扫描电镜样品的常规制备方法中的固定、漂洗、多级脱水等过程均需通过离心来收集样品, 使得制样时间长, 样品损耗率也很高^[5-9]。为避免上述缺陷, 梁静南等^[10]以滤纸包裹法对细菌等单细胞生物的扫描电镜样品制作方法进行了改良, 该方法由于省去了脱水过程的离心操作, 不仅节约了制样时间, 而且减少了样品的损耗, 有效克服了传统制样方法的缺陷。不过, 以梁静南等^[10]的方法制备细菌等单细胞生物扫描电镜样品时, 如果将样品用导电胶直接固定于样品台上, 样品容易陷入导电胶内而影响观察效果; 若剪取带有样品的滤纸块粘贴于样品台上, 电镜观察时常常存在较严重的滤纸背景干扰, 特别在样品量较少时干扰更显著, 影响细菌表面细微结构的观察。另外, 在样品量较少时, 真空冷冻干燥后肉眼较难分辨样品在滤纸上的分布位置, 造成取样困难。为此, 笔者对细菌类单细胞生物扫描电镜样品制备的滤纸包裹法进行了进一步改良, 改良后的滤纸包裹法既保留了原有方法制样快捷、样品散失少等优点, 还显著提高了冷冻干燥后样品在附着基质上的分辨效果, 易于取样; 有效避免滤纸背景对样品观察的干扰, 提高了观察效果。

1 材料与方法

哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)等均取自本实验室-80℃甘油保存的菌种。细菌收集及前处理参照谢家仪等方法^[8]并稍做改进, 具体方法: 哈氏弧菌、美人鱼发光杆菌经Zobell 2216E平板划线复活后, 挑选生长良好的单菌落接种于2216E液体培养基, 30℃ 200 r·min⁻¹摇床培养12 h。藤黄微球菌经LB平板复活后于LB液体培养基37℃ 200 r·min⁻¹摇床培养12 h。

收稿日期: 2015-09-10

基金项目: 国家海洋公益性项目(201205025, 201405020); 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005)。

作者简介: 徐先栋(1982-), 男, 海南大学海洋学院2013级, 博士研究生。E-mail: xuxd2009@163.com

通信作者: 周永灿(1968-), 男, 教授, 研究方向: 水生生物病害防治。E-mail: zychnu@163.com

取1 mL菌液于1.5 mL离心管中 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min收集细菌沉淀。细菌固定和洗涤参照文献[10]的方法,滤纸包制作和脱水等步骤参照文献[10]的方法再适当改良,具体方法: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。将正方形的滤纸对折后剪成2个规格约为 $4\text{ cm}\times 8\text{ cm}$ 的长方形;剪1片 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 的正方形锡纸片,一角与长方形滤纸的一角对齐平铺于滤纸一端(图1),沿长方形滤纸的宽边,以1 cm的宽度从有锡纸的一侧开始依次折叠3次(图1),剪去多余的滤纸,形成1个 $1\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ 的小滤纸包,用订书钉将铺有锡纸的滤纸包一端订牢,形成1个下半部内层衬有锡纸的小滤纸包。随后将经固定和洗涤并离心收集的细菌沉淀,加约0.1 mL磷酸缓冲液制成菌浓缩液,将滤纸包(连同锡纸)的口张开,用移液器将经浓缩菌液样品涂布于锡纸片的内面,于超净工作台内晾干约10 min,以使样品能较好粘附于锡纸表面,减少后续脱水等操作时样品流失。此后,再在锡纸片之间塞入并斜放1段长约2 cm的无菌牙签棒,轻捏两侧衬有锡纸的滤纸片以固定牙签棒,并通过牙签使锡纸片之间形成空隙,最后用订书机将另一端订牢,制作成1个带有样品的滤纸包(图2)。将滤纸包的锡纸端朝下垂直放入装有乙醇的容器内,梯度乙醇脱水^[10]。滤纸包在不同浓度乙醇间转换时操作应缓慢,避免液体冲力过大而使样品从锡纸片上脱落。脱水后的样品连同滤纸包一起真空冷冻干燥,再撤掉订书钉,展开滤纸袋和锡纸片,小心取下锡纸片,肉眼分辨样品在滤纸片上的分布位置,将粘有样品的锡纸片剪成约 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 锡纸块,样品侧朝上以双面胶粘于样品台上。喷金后于扫描电镜(Hitachi S-4800)下观察。

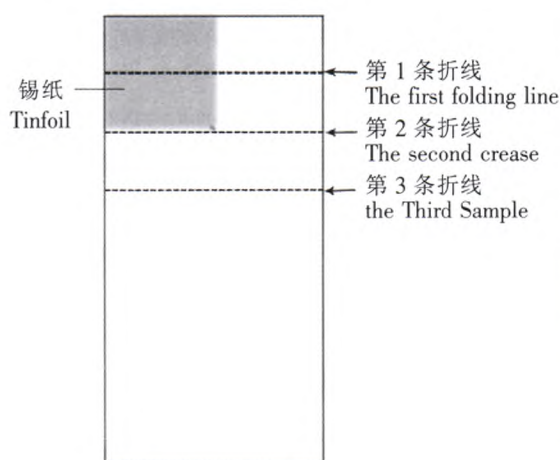


图1 锡纸平铺于滤纸位置及制备滤纸包的折叠方式示意图

Fig.1 The diagram of the tinfoil on the filter paper and the folding method of preparing filter paper pack

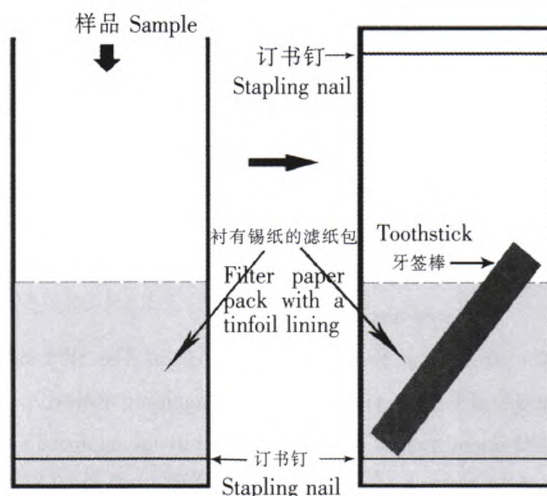


图2 将样品装入滤纸袋及装订过程

Fig.2 The steps of putting samples into filter paper pack and making an envelope by stapling nail

2 结果与分析

以改良前的滤纸包裹法制备的样品进行扫描电镜观察时,滤纸背景干扰较严重,难以分辨鞭毛等细菌细微结构(图3a);并且,因滤纸表面不平整,造成样品附着基质高低不一,影响拍照时聚焦,使照片景深增大,影响有些区域图像的清晰度(图3c)。以改良后的滤纸包裹法制备样品进行扫描电镜观察时,因样品的附着基质(锡纸)表面光滑,结构致密,电镜观察时无背景干扰(图3b-d),因而可清晰地观察细菌表面细微结构,如哈氏弧菌的鞭毛和无乳链球菌的双球和链状形态等(图3b、图4)。此外,改良后的方法还有以下优点:1. 可清晰判断样品位置,易于取样。细菌冻干后有些自身颜色为白色的菌落在滤纸上的分布肉眼很难分辨,不易剪取有效滤纸块,也无法将样品洒在样品台上,且细菌量少还容易丢失样品。改良后方法,细菌分布在锡纸上,显现明显的痕迹,易于分辨取样观察,少量细菌就可以得到理想的效果(图3b)。2. 照相景深小,易于对焦,可获得整体都较清晰的图像(图3d),还避免原方法将样品用导电胶直接固定于样品台时因样品压入导电胶而无法全面观察样品结构,提高观察效果。

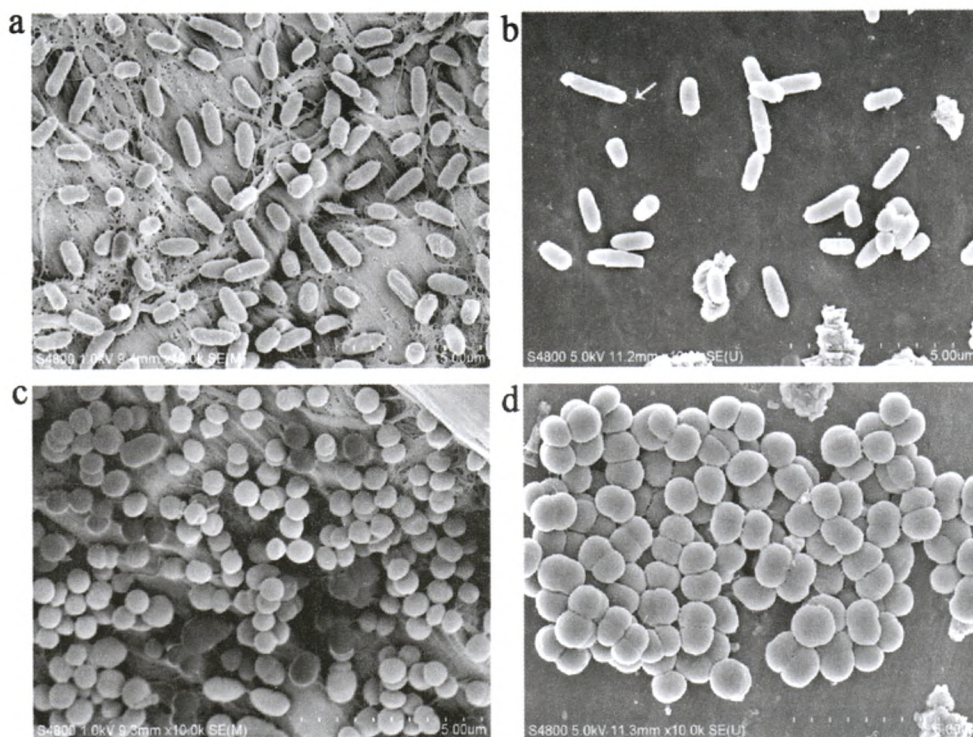


图3 改良前后细菌扫描电镜观察效果对比

箭头指示哈氏弧菌鞭毛;a. 改良前滤纸包裹法制备的哈氏弧菌样品扫描电镜照片;b. 改良后滤纸包裹法制备的哈氏弧菌样品扫描电镜照片;c. 改良前滤纸包裹法制备的藤黄微球菌样品扫描电镜照片;d. 改良后滤纸包裹法制备的藤黄微球菌样品扫描电镜照片

Fig. 3 The comparison of the effect of scanning electron micrographs between the former filter paper pack method and the improved one

The arrow shows flagella of *V. harveyi*. ; a: The SEM micrograph of *V. harveyi* obtained by the former method; b: The SEM micrograph of *V. harveyi* obtained by the improved method; c: The SEM micrograph of *M. luteus* obtained by the former method; d: The SEM micrograph of *M. luteus* obtained by the improved method

在本改良方法中,为了避免滤纸包内的锡纸紧贴在了一起,在锡纸之间还放置了1段经灭菌的牙签棒,使锡纸片之间形成1个空隙,既有利于提高后续酒精脱水及真空冷冻干燥过程中的脱水效果,也可避免真空冷冻干燥时因负压造成锡纸片挤压而破坏或损伤细菌的表面结构。为了避免样品散失,样品涂布于锡纸片后经约10 min 静置晾干,使样品可较好附着于锡纸片上。同时,在酒精脱水等操作时,为避免样品从锡纸片上脱落,应使有样品的锡纸端朝下放入脱水剂中,并且将滤纸包浸入或取出脱水剂时动作要轻缓。若需要制作大批量样品,可以把多个含样品的滤纸包同时放在同一容器中进行梯度脱水。另外,本改良方法所需样品量较少,每个滤纸包只需约1 mL 的菌液样品,有利于大批量样品制备时节约样品、时间和试剂等,减少样品制备成本,提高样品制备效率。

3 结 论

改良后的滤纸包裹法既保留了原有方法制样快捷、样品散失少等优点,还显著提高了冷冻干燥后样品在附着基质上的分辨效果,易于取样;有效避免滤纸背景对样品观察的干扰,提高了观察效果。

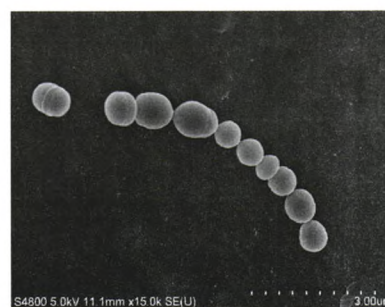


图4 无乳链球菌双球和链状形态
Fig.4 Cocci in pairs or in chains of *Streptococcus agalactiae*

参考文献:

- [1] 米琴,安燕,郝微,等. 青海湖发光细菌的分离鉴定及电镜观察[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2008(4): 58-65.
- [2] 韩善华. 豌豆根瘤中细菌的扫描电镜观察[J]. 西北植物学报,2009,29(11): 2238-2242.
- [3] Matthew J M, Alice C D, Bruce W A, et al. Visualization of hydrated bacterial structures by complementary electron microscopy techniques[EB/OL]. [2010-04-13]. www.pnl.gov/biology/sfa/pdf/marshall_poster_visualization.pdf.
- [4] Schadler S, Burkhardt C, Kappler A. Evaluation of electron microscopic sample preparation methods and imaging techniques for characterization of cell-mineral aggregates[J]. Geomicrobiol J, 2008(25): 228-239.
- [5] 徐柏森,冯汀,刘刚. 扫描电镜生物样品的快速制备方法研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6): 47-51.
- [6] 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.
- [7] 浦卫琼,林丽飞,胡先奇. 灯盏花病原锈菌扫描电镜制样方法初探[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 31-33.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 梁静南,刘一苇,谢家仪. 制备细菌类单细胞生物扫描电镜样品方法的改进[J]. 电子显微学报,2013,32(3): 276-278.

Improvement of Filter Paper Pack for Bacteria Sample Preparation for Scanning Electron Microscope Observation

XU Xiandong^{1,3}, ZHANG Guoqing¹, XIE Zhenyu^{1,2}, WANG Shifeng^{1,2}, ZHOU Yongcan^{1,2}

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Hainan Key Laboratory for Tropical Hydrobiology and Biotechnology, Haikou, Hainan 570228; 3. Jiangxi Fisheries Research Institute, Nanchang, Jiangxi 330039, China)

Abstract: The filter paper pack method is generally used to prepare SEM sample for observation of bacteria and other mono-cell creatures, and it saves time and samples as compared to the traditional method. However, with this method some samples can't be distinguished by naked eye in the filter paper after freeze drying. Moreover, the electron micrograph obtained by this method has interference of filter paper background, and it is thus difficult to observe the subtle structure of bacteria on the micrograph. In this context, the filter paper pack was improved by adding a layer of tinfoil onto the filter paper pack as lining, and the samples were dropped on the tinfoil before ethanol dehydration operations. With the improved method the distribution of sample on the foil can be easily distinguished by naked eye without interference of filter paper background, and the subtle structure of bacteria surface can be clearly observed.

Keywords: SEM; filter paper pack method; bacterial sample preparation; improved method