

优化扫描电镜制样及观察条件

肖媛

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 作者长期冷冻扫描电镜和常规扫描电镜成像方面研究。本文主要介绍利用扫描电镜对水生植物研究时, 在制样条件, 成像效果等方面进行条件探索和优化。

关键词: 扫描电镜; 制样

1 水生植物冷冻扫描电镜和常规扫描电镜成像效果比较

本文比较了三种水生植物(单星藻、芜萍和水蓼衣)的冷冻扫描电镜和常规扫描电镜成像效果, 两种方法观察到的样品表面结构差异明显。冷冻扫描电镜下的样品形态饱满、无塌陷皱缩, 藻细胞表面的脊状凸起和水生植物叶片上的气孔结构清晰、无变形; 而常规扫描电镜冷冻干燥的样品因脱水皱缩变形, 甚至表面部分塌陷。结果表明冷冻扫描电镜可以有效地解决水生植物样品因脱水而皱缩变形的问题, 最大程度地保持样品原本的细微结构特征, 非常适合用于含水量高的水生植物样品的超微结构观察。本文讨论了冷冻扫描电镜在水生植物研究中的优势和重要意义, 有助于推广冷冻扫描电镜技术的应用。

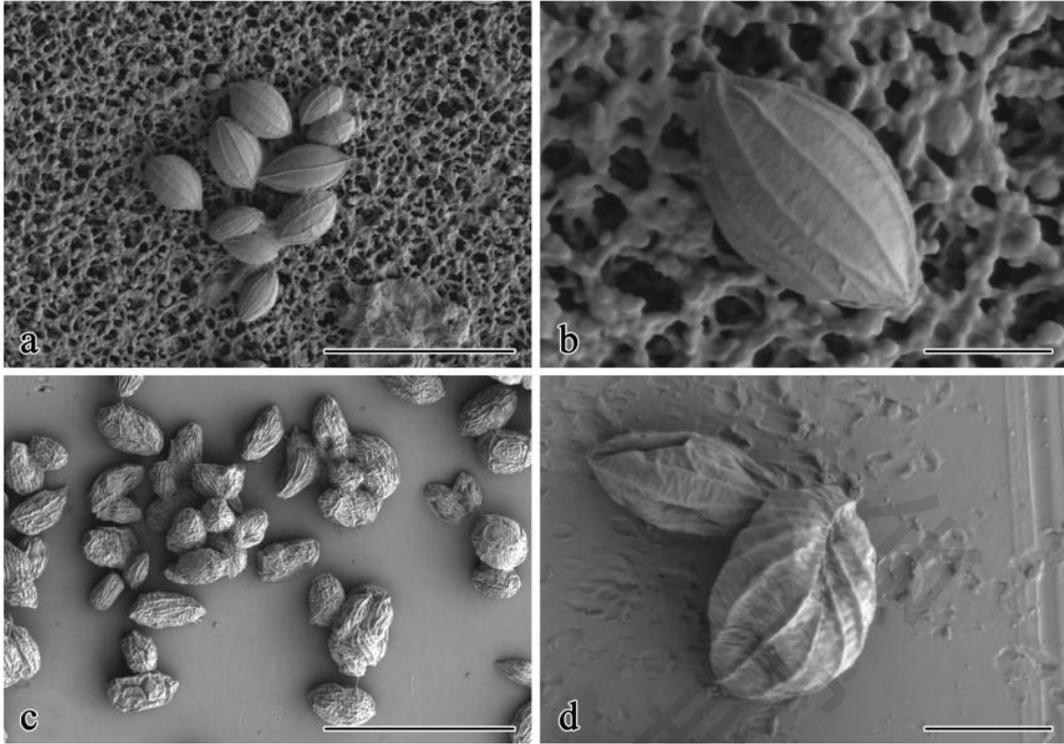


图 1 单星藻的冷冻扫描电镜和常规扫描电镜图像。a,b. 冷冻扫描电镜图像; c,d. 常规电镜图像。
a, c: Bar = 30 μm ; b, d: Bar = 5 μm

Fig. 1 Cryo-SEM and SEM images of *Coelastrella* sp. . a, b. Cryo-SEM images; c, d. SEM images.

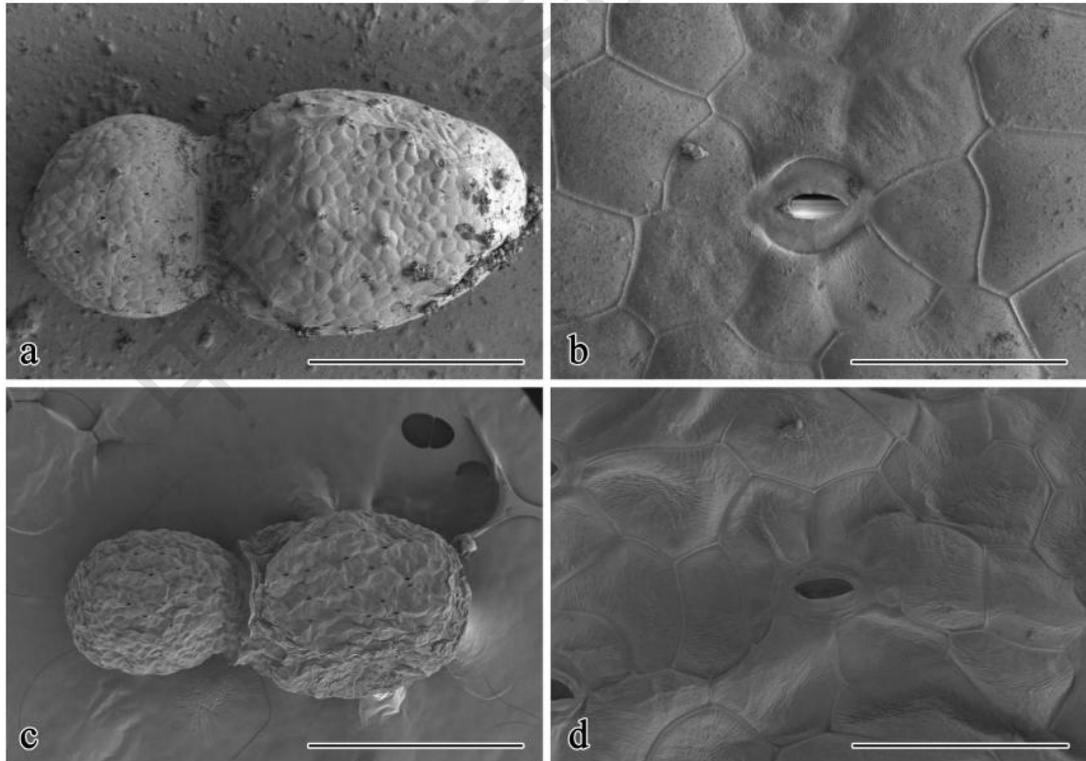


图 2 芜萍的冷冻扫描电镜和常规扫描电镜图像。a,b. 冷冻扫描电镜图像; c,d. 常规电镜图像。
a, c: Bar = 500 μm ; b, d: Bar = 50 μm

Fig. 2 Cryo-SEM and SEM images of *Wolffia*. a, b. Cryo-SEM images; c, d. SEM images.

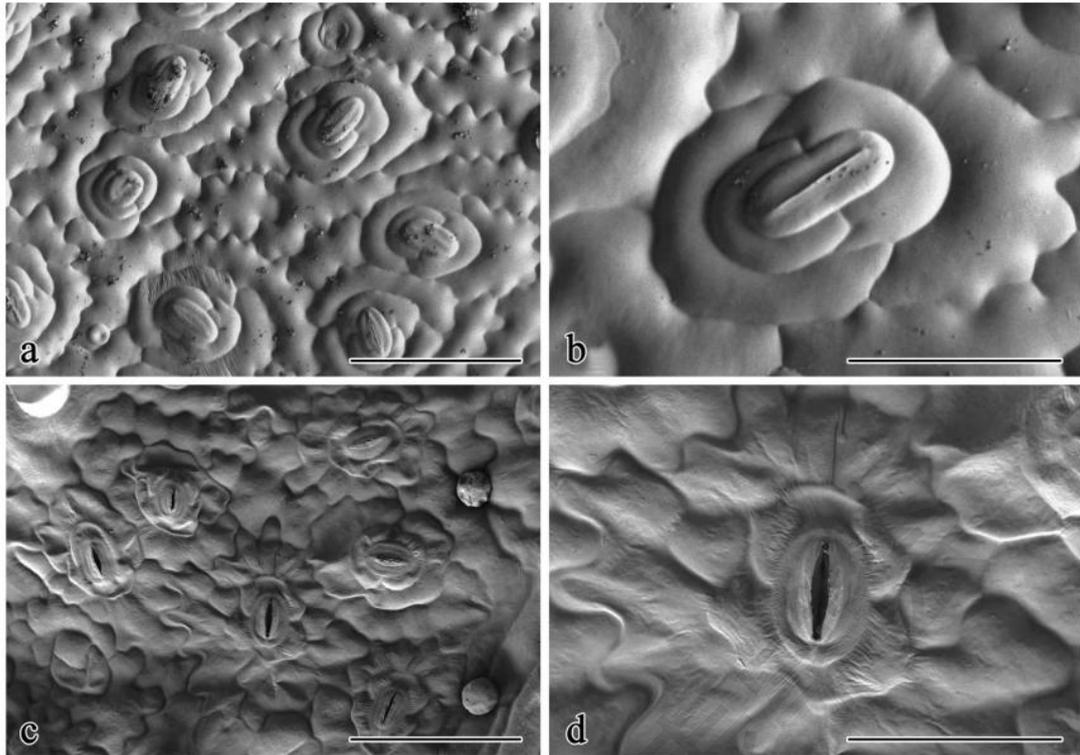


图3 水蓼衣的冷冻扫描电镜和常规扫描电镜图像。a,b. 冷冻扫描电镜图像;c,d. 常规电镜图像。
a, c: Bar = 100 μm ; b, d: Bar = 50 μm

Fig. 3 Cryo-SEM and SEM images of *Hygrophila*. a, b. Cryo-SEM images; c, d. SEM images.

2 混合纤维素微孔滤膜用于液体藻类的冷冻扫描电镜样品制备

为了优化针对液体培养藻类细胞的冷冻扫描电镜制样条件,以铜绿微囊藻和蛋白核小球藻为材料,比较了混合纤维素微孔滤膜(混合膜)和滤纸对藻细胞的富集作用和对冷冻扫描电镜观察效果的影响,结果表明:混合膜的孔隙较小且孔径分布均匀,正反两面均能有效吸附藻细胞;与滤纸相比,混合膜上吸附的藻细胞数量较多,细胞形态饱满,无皱缩变形,成像效果好;混合膜比滤纸更适合于微小藻类液体样品的冷冻扫描电镜样品制备。本研究优化了针对液体培养的单细胞藻类的冷冻扫描电镜制样条件。

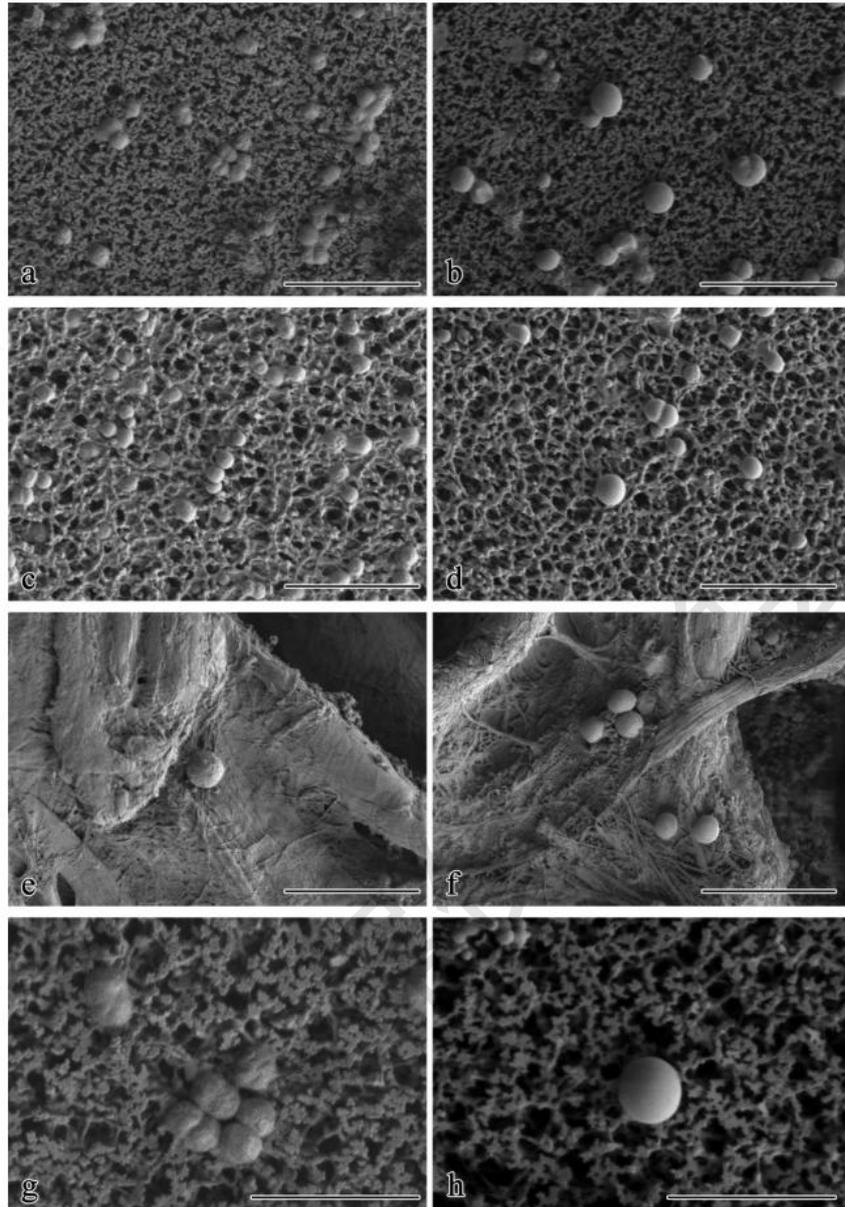


图3 混合膜和滤纸上的微囊藻和小球藻的冷冻扫描电镜形态观察。a~f: Bar = 20 μm ; g, h: Bar = 10 μm
a, g. 混合膜正面的微囊藻细胞; c. 混合膜反面的微囊藻细胞; e. 滤纸上的微囊藻细胞; b, h. 混合膜正面的小球藻细胞; d. 混合膜反面的小球藻细胞; f. 滤纸上的小球藻细胞。

Fig.3 Cryo-SEM figures of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella* on MCEM and filter paper respectively. a, g. *Microcystis aeruginosa* on the front surfaces of MCEM; c. *Microcystis aeruginosa* on the back surfaces of MCEM; e. *Microcystis aeruginosa* on filter paper; b, h. *Chlorella* on the front surfaces of MCEM; d. *Chlorella* on the back surfaces of MCEM; f. *Chlorella* on filter paper.

3 雨生红球藻的冷冻扫描电镜制样条件初探

为了探索针对雨生红球藻的冷冻扫描电镜制样条件,以固体琼脂和液体培养的藻细胞为材料,比较了琼脂培养基直接粘台和藻液滴于预先粘台的滤纸两种粘台方式和 -90°C 下分别升华2 min、10 min、20 min和30 min四种升华时间对成像效果的影响。结果表明:上述两种粘台方式均可获得满意的观察效果,比较而言滤纸法效果更好; -90°C 升华2 min即可将

藻细胞表面完全暴露，获得满意的观察效果，而长达 30 min 的升华时间也不会对细胞表面结构造成损伤。该研究既能优化针对雨生红球藻的制样条件，又有助于实验人员据此选择类似样品的前处理条件，有利于冷冻扫描电镜技术的发展。

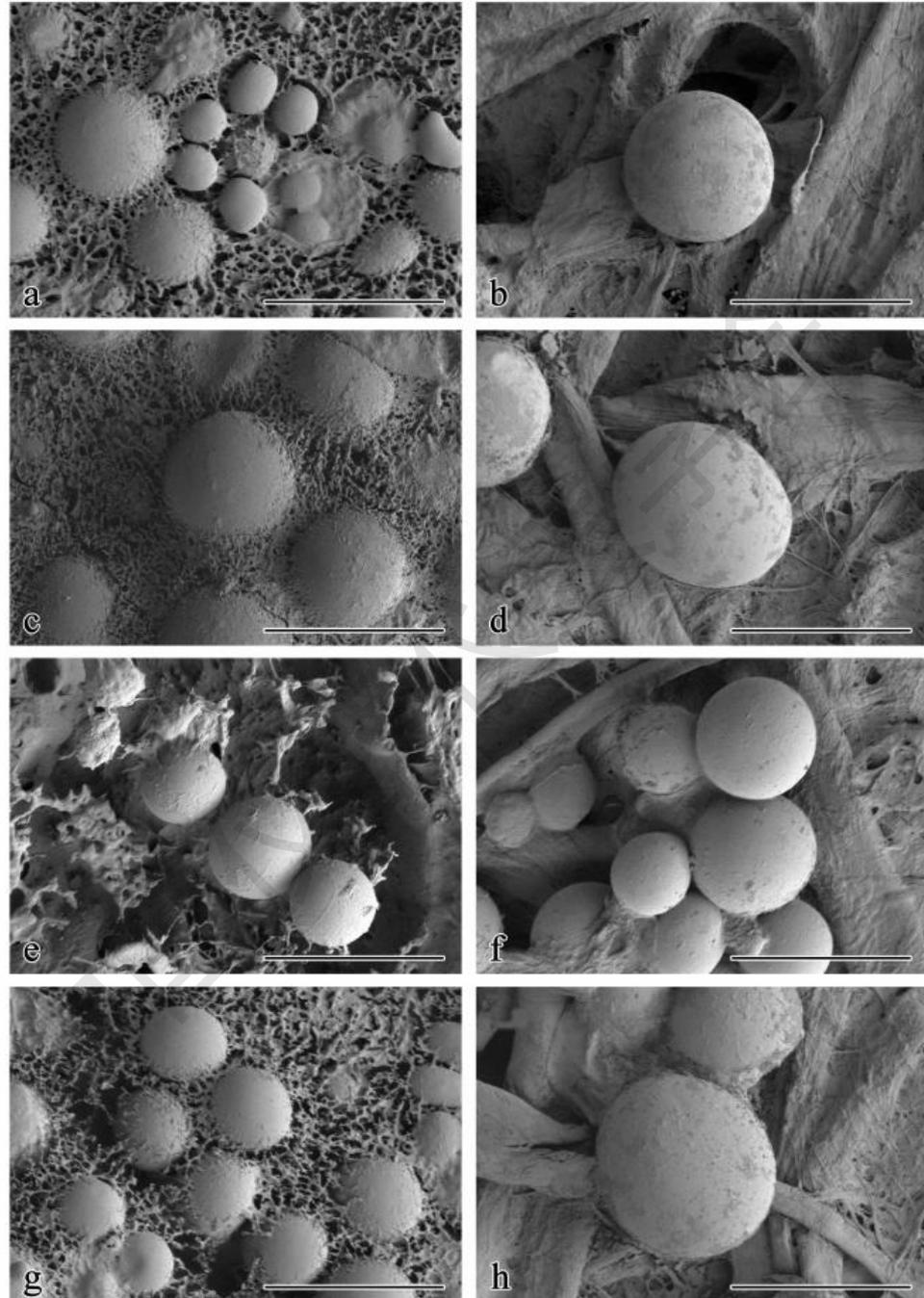


图1 雨生红球藻的冷冻扫描电镜形态观察(a~h; Bar = 50 μm)。a, c, e, g. 琼脂培养, $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别升华 2 min、10 min、20 min 和 30 min; b, d, f, h. 滤纸吸附, $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别升华 2 min、10 min、20 min 和 30 min。

Fig. 1 Cryo-SEM figures of *Haematococcus pluvialis*. a, c, e, g. Agar cultured, be sublimated at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 10 min, 20 min and 30 min respectively; b, d, f, h. Filter paper absorbed, be sublimated at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 10 min, 20 min and 30 min respectively.

4 冷冻扫描电镜及其在生命科学研究中的应用

冷冻扫描电镜基于扫描电镜的超低温冷冻制样及传输技术发展而来,具有能在高真空状态下观察含水样品、分辨率高、制样简单快速、可对样品进行断裂刻蚀等优点,尤其适合柔软样品的成像和监测冰冻环境对组织和细胞的影响,是生命科学研究的有力工具。能否获得高质量的冷冻扫描电镜图像取决于样品制备和观察条件是否合理和优化,要求操作人员能够快速高效地根据样品选择操作条件、捕捉快速变化的样品表面信息。本文探讨了这种新的电子成像方法,为今后开展相关服务奠定了基础。

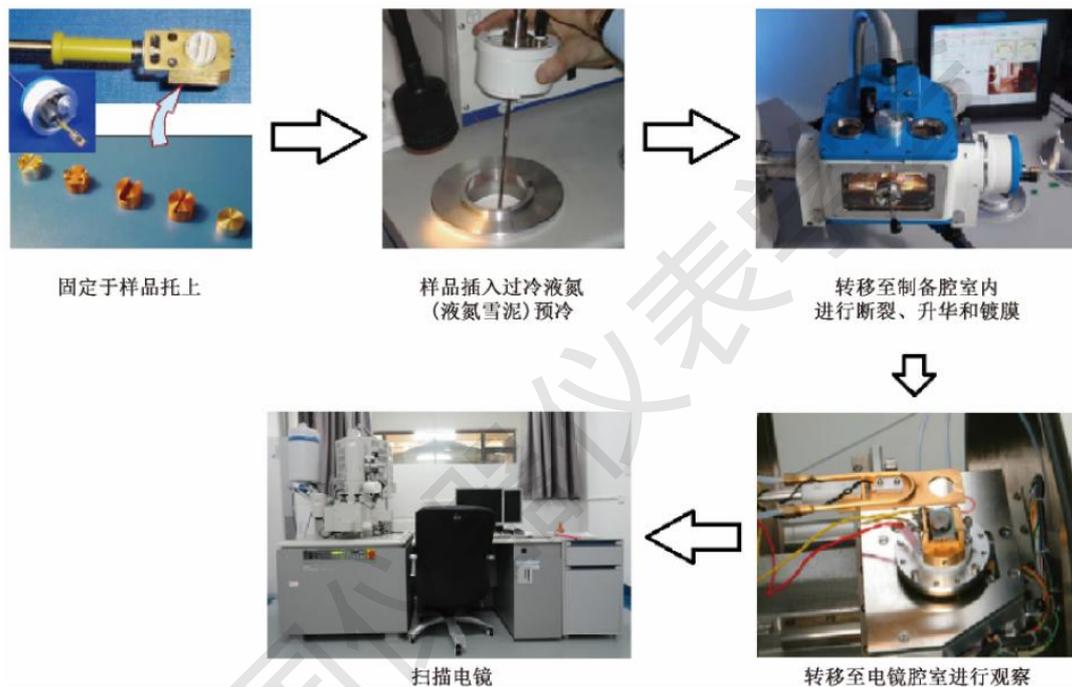


图1 冷冻扫描电镜的工作流程。
Fig.1 Working process of Cryo-SEM.

表 2 常规扫描电镜、环境扫描电镜和冷冻扫描电镜的比较

Table 2 Comparison of SEM, ESEM and Cryo-SEM

	常规扫描电镜(SEM)	环境扫描电镜(ESEM)	冷冻扫描电镜(Cryo-SEM)
样品是否必须固定	是	否	否
样品是否必须干燥	是	否	否
能否观察液体样品	否	是	是
是否使用有毒试剂(如钨酸)	是	否	否
能否观察样品内部结构	需在制样时采用特殊方法 断裂样品,以暴露内部结构	需在制样时采用特殊方法 断裂样品,以暴露内部结构	样品制备腔室的冷冻台上带有 冷刀和加热器,可简单快速地对预冷过 的样品进行断裂,暴露其内部结构
能否重复利用样品	否	否	是
制样步骤	固定 - 脱水 - 干燥 - 粘台 - 镀膜	粘台 - 镀膜(也可不镀膜)	粘台 - 快速冷冻 - 断裂 - 升华 - 镀膜
制样耗时	数小时	数分钟(最快 5 min 内即可观察)	数分钟(最快 5 min 内即可观察)
样品室真空状态	高真空	低真空	高真空
分辨率	1 nm	环境真空模式 3 nm	1 nm
样品台温度	常温	± 20 °C	低至 -185 °C

5 生物样品的扫描电镜制样干燥方法

为获得良好的样品制备和扫描电镜观察效果,应根据生物样品的特点性质、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知名中文核心期刊数据库中自 2001 年以来的 122 篇中文文献,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这 5 种干燥方法在扫描电镜生物样品制备过程中的应用、优缺点和效果,归纳总结了用于微生物、植物或动物样品干燥方法的一般性选择原则,并按样品种类详细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。

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 °C	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,最常用的方法是叔丁醇真空干燥法	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,可借用真空镀膜仪来抽真空;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