

应用临界点干燥法在扫描电镜上观察链霉菌孢子形态

丁 鑑 刘惠敏 张忠泽 张兴达 毕庶春

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

孢子的表面结构是鉴定链霉菌的重要依据。其电镜图片,能真实、准确地反映出这一特征^[1-3]。但在制备扫描电镜生物样品时,细胞常常会在脱水干燥过程中产生凹陷、皱缩,以至不能反映出细胞原有的形态。为了解决这个问题,几年来我们采用了临界点干燥法制备样品,其原理是利用二氧化碳在临界状态时,相界面消失,没有表面张力的情况下,使生物材料达到干燥的目的,并避免了样品产生的变形。我们利用此法观察了链霉菌的孢子形态。现报道如下。

材料与方 法

1. 孢子来源: 均系从东北地区的土样中分出的链霉菌。样品制备前,先将其接入高氏琼脂培养基,恒温 28℃ 培养至形成孢子。

2. 化学试剂: 无水乙醇,醋酸戊酯、戊二醛、磷酸缓冲液 (0.2M Na_2HPO_4 :0.2M KH_2PO_4 =1:4) pH 7.2。1% 锍酸磷酸缓冲液。二氧化碳、碳、金。

3. 自然干燥法样品的制备: 取一支培养好的斜面,在无菌条件下,用取样刀沿基内菌丝轻轻铲下一薄片,移出。用刀片整形(大小约 5 毫米见方)后,置于直径为 1 厘米的铜样品载片上。置载片于文火上方,缓慢往复移动数次,待铜片变热,菌苔下面的琼脂层融化粘牢铜片后,

将样品移走。此时如样品边沿变形,可乘热用细针等工具将其铺平。铺好后的样品先让其自然干燥,然后滴上导电涂料,在喷涂室内,待真空干燥后喷涂。

4. 临界点干燥法样品的制备: 第一步铲片操作同上述方法。但经整形后,样品不直接固定在载片上,而要先固定在一个过渡的薄金属片上(我们采用厚度约 0.5 毫米,边长为 5 毫米见方的薄铝片)。制好后,先浸入 5% 的戊二醛,固定一小时,将液体吸出,用磷酸缓冲液洗涤 2—3 次,残留液用滤纸吸干。然后用 1% 的锍酸固定二小时,弃去固定液,再用磷酸缓冲液洗涤二次,接着用乙醇梯度脱水,其浓度为 30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 每次脱水时间为 15 分钟。最后用醋酸戊酯作中间液置换,其使用的浓度为 70%, 90%, 100%。每次作用的时间为 15 分钟。

样品经上述处理后,需转置于临界点干燥仪内。经清洗、液化气置换、加热、排气处理后,取出连同薄金属片一起放于铜样品载片上,滴加导电涂料,准备喷涂。

5. 测试条件: 样品置于 JEE-4C 喷涂室内,喷涂碳、金。喷金量要适宜。样品用电镜 JEM-100B 扫描附属装置进行观察。测试电压为 20 千伏。

实验结果

1. 用自然干燥法制备的样品成像：我们对各种不同类型的菌株，均作了自然干燥法实验，获得了多种不同类型孢子的电镜图片，部分照片见图 1。

从图 1 可看出，a 和 b 图非光滑型孢子的样品，均有良好的成像，孢子饱满、结构清晰、真实感强。而 c 和 d 图光滑型孢子的样品却显示了较差的成像，孢子皱缩、表面模糊，反映不出实物的本来面貌，经多次重复效果一致。所以自然干燥法用于制备非光滑型孢子样品是可行的，而对光滑型孢子样品制备，需改变方法。

2. 临界点干燥法与样品成像：根据图 1 结果，我们对同一光滑型孢子样品改用临界点干燥法进行试验，拍摄了有关图片，其部分结果见图 2。

从图 2 可以看出：光滑型孢子的样品成像比自然干燥法有明显改善，孢子饱满、表面光滑、均称，其细微结构亦清晰可辨，充分反映出了孢子表面结构的全部特征。

综上所述我们认为：临界点干燥法是制备链霉菌孢子样品的好方法。特别是对制备光滑型链霉菌孢子样品，尤为适用。

3. 链霉菌菌龄与样品成像：欲制备一理想的样品，除要考虑选择合适的制片方法外，还必

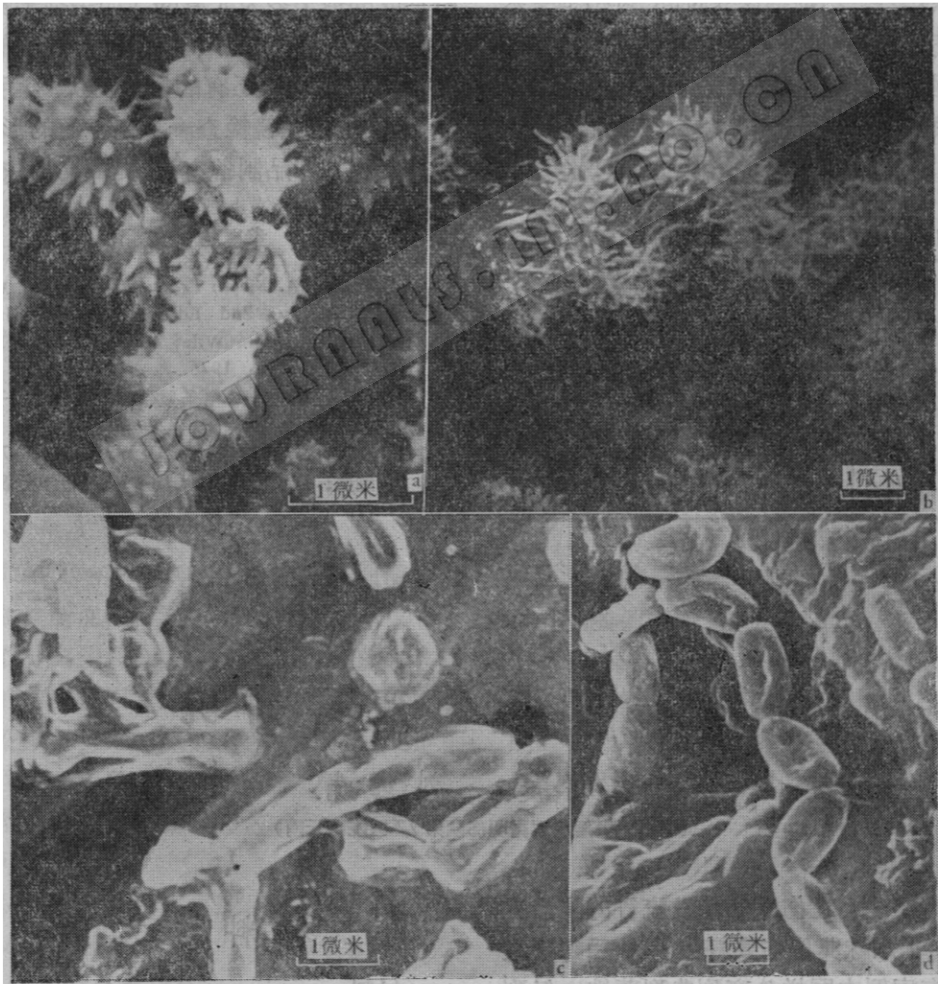


图 1 用自然干燥法制备样品所拍摄的孢子电镜图片*

* 图中 a 为 *S. viridochromogenes* 32-10; b 为 *S. prunispiralis* 43-20;
c 为 *Streptomyces* sp. 600 B; d 为 *S. violochromogenes* 20-12

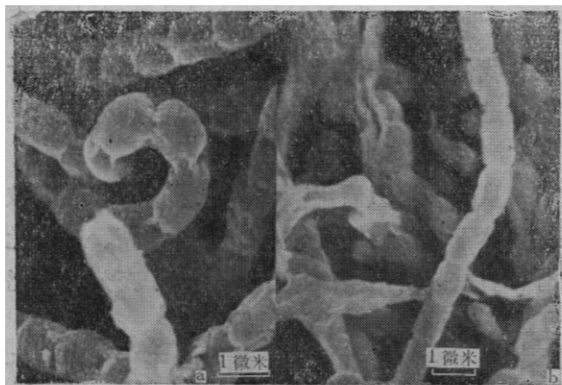


图2 用临界点干燥法制备样品拍摄的孢子电镜图片*

* 图中 a 为 *Streptomyces* sp. 600 B;
b 为 *S. violachromogenes* 20-12

须考虑菌种培养的条件,即培养基、培养条件、培养时间等因素,特别是培养时间,过短孢子不成熟,过长孢子丝断裂,成像后结构模糊。为制得较好的图片,我们对不同培养时间的菌作了制备样品的实验,其成像成功率结果见表1。

从表1可看出:菌种培养8天,孢子分化不

好,拍不出一张图片。培养28天,虽有个别菌的孢子链发生断裂,但均能拍出理想照片,所以在制备链霉菌生物样品时,一般要以培养2周至20天左右为宜。

讨 论

自然干燥法和临界点干燥法是制备链霉菌样品的二种可行的方法。前者操作简单,便于掌握,省时间,适用于制备非光滑型孢子样品。而后者却适于制备任何类型的孢子样品,但操作步骤繁琐,要求的材料和设备也较多,故在实际应用中可根据具体情况选用。

一般当菌的孢子丝是直的或波曲的时候,所形成的孢子多为光滑的,如果孢子丝是螺旋形的,则孢子的表面结构因种而异,有的种为光滑,也有的带刺,还有的呈毛发状^[4]。所以在制片前,先用显微镜检查一下孢子丝的形态,可为选择合理的样品制备方法,提供初步依据。

表1 菌的培养时间,孢子分化程度与制片成功率的关系

结果 项目 序号	培养天数	制备样品 总 数	孢子分化 完好数	孢子分化 不好或完 全不分化	制片成功 率(%)
1	8	8	0	8	0
2	18	8	5	3	60
3	28	8	8	0	100

参 考 文 献

- [1] Geoffrey, A. Meek: *Practical Electron Microscopy for Biologists*, 2nd Edition, A Wiley-Interscience publication, John Wiley & Sons, London New York, Sydney Toronto, 1976.
- [2] 阮继生、蒋宁寿: 电子显微镜下放线菌孢子的初步研究, *微生物学报* 10(1): 72—83, 1964。
- [3] 乔宝义: *微生物学报* 19(3): 337—338, 1979。
- [4] 阮继生: *放线菌分类基础*, 第一版, 科学出版社, 北京, 1977。