



电子显微镜在细菌学研究中的应用技术

孙纪申

(中国医学科学院四川分院, 简阳)

近年来, 由于电子显微镜和相差显微镜的结合使用, 由于超薄切片和阴性反差染色技术的改进, 利用超高压电子显微镜及冰冻蚀刻法观察“活”标本, 利用扫描电子显微镜观察细菌的表面结构, 加上电镜放射自显影及免疫电镜的使用, 从而对细菌微细结构的观察获得了良好的进展, 这对细菌学的研究很有助益。本文介绍电子显微镜在细菌学研究中的一般应用技术。

超薄切片技术

细菌的超薄切片技术与制备一般组织的超薄切片方法相似, 只是取材、固定方法有些不同。现介绍用环氧树脂 618 和环氧树脂 600 包埋细菌样品的方法。

一、包埋液的配制

(一) 环氧树脂 618 包埋液

由环氧树脂 618 3 毫升, 十二烷基琥珀酸酐 (DDSA) 2 毫升, 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 0.1—0.25 毫升, 2, 4, 6-三(二甲氨基苯酚) (DMP-30) 0.05 毫升配成。

(二) 环氧树脂 600 包埋液

由环氧树脂 600 和环氧树脂 618 (重量比为 8:2) 混合物 10 毫升, 甲基内次甲基四氢邻苯二甲酸酐 (MNA) 15 毫升, DMP-30 0.5 毫升配成。

二、包埋操作

(一) 用环氧树脂 618 包埋

从固体培养基上刮下菌体使成菌块, 立即固定于 3.8%—5% (pH 7.2—7.4) 戊二醛磷酸缓冲液 (或二甲砷酸钠缓冲液) 中 30 分钟至 1

小时 (4℃), 然后用磷酸盐等缓冲液 (pH 7.2—7.4) 充分冲洗。用 1% 锇酸缓冲固定液 (pH 7.2—7.4) 固定 1—2 小时 (4℃)。再用缓冲液洗涤 15 分钟 (4℃)。用 30、70、90、100% 丙酮各洗 15 分钟 (4℃), 再用 100% 丙酮洗 15 分钟 (室温) 1—2 次。用配好的环氧树脂 618 包埋液与 100% 丙酮 (1:1) 混合液浸透 3 小时, 纯环氧树脂 618 包埋液 37℃ 浸透 2 小时, 再在胶囊中用同上包埋液浸透 16 小时, 最后将纯 618 包埋液 60℃ 聚合 24—36 小时 (于胶囊中)。

(二) 用环氧树脂 600 包埋^[1]

固定、水洗、脱水等步骤与 (一) 相同, 把脱水后的小块放入“包埋液”中浸 1—1.5 小时, 然后装入胶囊中 60℃ 烤 2 小时, 80℃ 烤 24 小时或 60℃ 烤 36 小时。

用 (一) 法操作, 保存超微结构较好, 观察时反差亦好。如果切片稍皱, 可用滤纸条蘸一些二甲苯在刀槽上薰一下。用 (二) 法操作, 除超微结构保存好, 切片较容易。由于包埋液粘度小, 可用磁力搅拌器搅拌均匀; 浸透过程可在振荡器中进行。使用过的容器只要放在洗衣粉液中煮沸几分钟, 再用蒸馏水洗净即可。有人会在操作过程中患过过敏性皮炎, 操作时最好带橡皮手套。

(三) 注意事项

1. 如果样品是细菌悬液, 须用低速离心法收集菌体。

2. 如果样品是致病菌, 可先放入 1.5% 的 KMnO_4 溶液中固定 30 分钟 (室温), 水洗 2 次, 再放 1% 锇酸溶液中固定 2 小时 (冰箱)^[2]。

阴性反差染色法 (负染法)

将细菌材料制成每毫升约 30 亿菌的溶液,

用毛细滴管滴于铜网膜上,经 3—5 分钟后用滤纸吸干。再用毛细滴管吸取 1—2% 磷钨酸溶液 (pH 6.4—7.2) 或 1—2% 硅钨酸溶液 (pH 6.4—7.2) 滴一滴于铜网膜上,1—2 分钟后用滤纸吸干即可。

冰冻蚀刻法^[3,4]

为了看到近于生活状态的细菌,可以采用冰冻蚀刻法。(图 1)

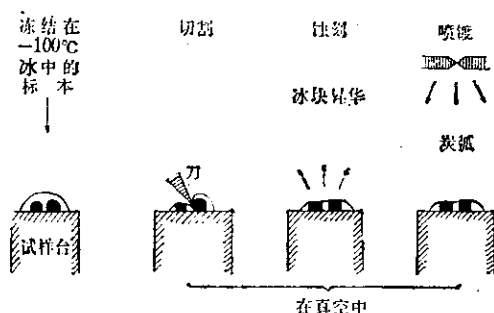


图 1 冰冻蚀刻法示意图

冰冻蚀刻法的操作方法如下:

一、冻结

取少量细菌悬液(约 2 微升)放到标本支持架或铜块上(铜块预先用尖针划许多刻痕,以利冰块附着),将它们立即用氟里昂、液氮冷却,这时标本将以每秒 -100°C 的速度快速冰冻,这样可以保持标本的生物活性和结构。为了防止在细菌内形成冰晶,有人加入抗冻剂作预处理,就能减少对细菌的损伤。Moor 等报告,用 20% 甘油水溶液浸透,而后再行冰冻固定,细菌的生

存率可接近 100%。McAlear 等人提出用 20% ethylglycol 处理,认为比用甘油的方法要好。但是这种处理能把标本成份溶出来,因此细菌要用醛类固定液稍加固定(3% 戊二醛室温 1 小时),然后用抗冻剂处理,再用氟里昂、液氮快速冷冻。(可以用一种双层的冷冻容器(图 2),内层放氟里昂,外层放液氮,用外层的液氮来冷却内层的氟里昂,然后将标本放在氟里昂中冰冻)。

二、切割

把冻结的材料放到真空喷镀仪内。迅速抽真空并保持低温,此时用冷却 (-100°C 以下) 的刀在真空中进行快速切割,使标本表面暴露于真空中。

三、蚀刻

在 1×10^{-5} 毫米汞柱的真空度时,水的蒸汽压为 -107°C 。冰的表面在 -150°C 时是不会升华的,因此有必要将标本的温度上升到 -100°C 左右,在这样的温度时,冰才会升华,大约需要蒸发 5 分钟。

四、喷镀

当冰升华到适当程度时,在切割面上喷镀上一层铂和碳。这样就造成了切割后升华蚀刻的表面复型。

喷镀的方式有两种,一种是用钨丝篮,篮内放置 4—5 厘米长,0.1 毫米直径的铂丝,先喷铂,然后再喷碳。另一种是在端面磨细的碳棒上绕上铂丝,一起蒸发。

五、剥离复型

把标本从真空中取出,化冻后使复型漂浮在水面上 ($35-40^{\circ}\text{C}$)。为了清除复型表面的有机颗粒的沾污,可把标本放到 70% 硫酸溶液中数小时至一夜,使标本溶解(也可分别放到氢氧化钠饱和液、商品漂白剂、硝酸、次氯酸钠中)。也有人将复型用 70% 硫酸处理 18 小时,用 40% 铬酸处理 18 小时,用漂白剂处理 1—2

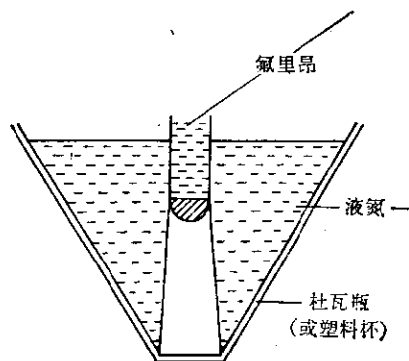


图 2 一种冷冻容器

小时,再用70%硫酸处理6小时,最后用漂白剂处理1—2小时^[4]。用蒸馏水漂洗几次,打捞在有支持膜的电镜铜网上,即可进行电镜观察。

冰冻蚀刻法的优点是可以减少标本的收缩,细菌损伤少。有利于对膜结构的立体观察,并可从不同方向观察。也存在一些缺点,如喷镀的金属颗粒较粗,限制了分辨率的进一步提高。必须使用防冻剂。一个“组织块”只能制作一个试样(有人在标本冷冻后,把它掰断,从而得到凹凸相应的两个标本,此称为双复型)。

活标本观察法

为了观察活标本,可以把少量细菌悬液放入“气室”(压力室)内,然后把它放入超高压电镜中进行观察。

使用超高压电镜可以增加穿透力和分辨率。当穿透力增加时,由于电子束和标本之间的作用减少了,因此减少了标本的损伤,从而为观察活细菌的活动情况提供了可能性(如观察细菌鞭毛的活动情况)。目前已制造出3,000 KV的超高压电镜。为了使未经染色的标本反差好些,可以用“反差屏”的暗视野法来观察。

免疫电镜标本制备^[5,6]

最广泛应用的是铁蛋白抗体法。

铁蛋白性质随动物种类不同而有所不同,最常用的是马脾铁蛋白,在电镜下可见直径约100 Å的蛋白壳,壳内有直径为55埃的铁核心。使用市售铁蛋白前要经过提纯。具体方法如下:

一、重结晶

1. 以2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液(pH 5.85)将浓缩的粗铁蛋白稀释至1—2%。

2. 加入20% CdSO_4 溶液,至其最终浓度为5%。

3. 上液放于4—6℃中2小时或更长时间,使完全结晶。

4. 2,000转/分钟,离心1小时,棕色上清为非结晶铁蛋白液,应弃去。

5. 以同体积的2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶解棕褐色结晶。离心后吸出上清,将沉淀弃去。

6. 重复②—⑤步骤。一般需要5—7次重结晶。

二、硫酸铵盐析

以饱和硫酸铵反复沉淀,除去与 NH_4^+ 复合形成的游离 Cd^{2+} ,使铁蛋白处于稳定状态。

1. 第一步所得纯结晶加入等体积饱和硫酸铵。4°—6℃,1小时。

2. 2000转/分钟,离心1小时。

3. 弃上清,加入适量蒸馏水溶解沉淀。

4. 重复沉淀3次。

操作中硫酸铵应饱和(每100毫升蒸馏水至少溶80克硫酸铵),否则不出现沉淀。如不出现沉淀,可用自来水透析去盐,回收铁蛋白再次沉淀。

5. 以上所得最后一次沉淀,加少量蒸馏水使之悬浮。

6. 吸入透析囊中,自来水(14°—16℃)透析过夜,后转入0.05M (pH 7.5)磷酸缓冲液中透析过夜(同时不断搅拌)。

7. 低速离心后过滤除菌。

结合铁蛋白和抗体球蛋白的交联剂有几种,其中以XC(苯二甲基二异氰酸盐)、TC(甲苯2,4-二异氰酸盐)、FNPS(二氟二硝基二酚)、戊二醛等应用最广。今以戊二醛为例,说明如下:

取15毫克铁蛋白和3毫克球蛋白(IgG)溶于0.9毫升0.1M磷酸缓冲液(pH 7.0)中,加入0.1毫升新鲜稀释的戊二醛,使戊二醛最终浓度为0.005—0.5%,此混合液置37℃24小时(无需搅拌)。加入0.02% NaN_3 防腐,结合完结时加0.01M赖氨酸中止反应。

细菌悬液加铁蛋白抗体溶液,在反应之后以离心法去掉未反应的铁蛋白,然后把它滴在有支持膜的铜网上进行电镜观察。

电镜放射自显影

电镜放射自显影法的操作包括用放射性同

位素标记、细菌样品的固定和包埋、超薄切片、核子乳胶膜的制备、曝光、显影和定影等步骤。

一、标记

通常用 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记。

二、细菌样品的固定、包埋、超薄切片

按前述方法操作。

三、核子乳胶膜的制备和曝光

常用乳胶有国产 HW-4 和英国产 Ilford L₄₀。制备核子乳胶膜和曝光的方法有以下几种。

(一) 环套法

核子乳胶在常温下为半固体, 40℃ 以上时呈液态。加入适量 (1:4—1:5) 的重蒸水稀释, 45℃ 水浴中溶解 15 分钟, 并轻轻搅拌, 待溶解后取出, 在冰浴中放 2—3 分钟, 再在室温下放置 15—30 分钟, 使乳胶呈粘胶状。后用一直径为 4 毫米的白金环 (用前洗净) 浸入乳胶中, 轻轻提起, 即形成一单层乳胶膜, 然后复于有切片的铜网上, 即可置小暗盒内, 在 4℃ 下曝光。

(二) 火棉胶膜法

先以 2% 火棉胶在 2% 琼脂块上制成火棉胶薄膜, 然后将稀释 4 倍的 Ilford L₄₀ 乳胶铺上, 利用薄膜均匀渗透, 向琼脂扩散出去而形成一层颗粒均匀的乳胶膜, 然后将乳胶膜浮于水面, 以铜网从水上捞起, 覆盖于标本上, 进行曝光。

(三) 平基法:

1. 取洁净的载玻片垂直置于 0.5—0.7% 火棉胶醋酸戊酯溶液中, 取出, 待干, 备用。

2. 把标记后的样品, 按常规制成超薄切片, 用小金属环把切片捞到载玻片的火棉胶膜上的水滴中 (事先在火棉胶膜上放一滴水), 去除多余的水, 在无尘处干燥。

3. 进行常规染色 (铀、铅双染), 染色后水洗, 待干。

4. 然后喷一层碳 (厚约 50—60 埃), 其作用是为了便于涂乳胶, 避免 O_2O_3 与乳胶起作用, 而不使已经形成的潜影衰退, 防止染料在显影、定影时脱掉。

5. 在暗房中, 把载玻片放在 45℃ 铜板上预热或电炉上烤一下 (天热时可以不), 使乳胶不会遇冷凝固在载玻片上, 这样就可使乳胶涂布均匀。

6. 从冰箱取分装的乳胶一管 (每管 1 毫升), 用重蒸水 1:5 稀释 (体积比), 45°—50℃ 水浴上溶化 15 分钟 (用玻棒轻轻搅拌, 使水与乳胶混匀)。

7. 用吸管吸取乳胶, 涂在载玻片上, 水平位放 5—10 秒后再垂直放, 多余的乳胶收回可再用。然后倾斜放于搪瓷盘内的滤纸上, 干燥 30 分钟 (亦可将载玻片垂直插入乳胶中, 取出后擦去背面的乳胶, 垂直置于无尘处干燥)。

8. 抽出没有切片的载玻片, 检查一下厚度, 如干涉色为紫色, 即为厚 1,400 Å。其他标本可抽样检查一下。

9. 把载玻片放入玻璃染缸中, 玻璃染缸放在带盖的铝盒或塑料盒中 (盒底放有干燥剂如无水氯化钙), 置 4℃ 冰箱中曝光 1—2 个月。

10. 同时切一些 0.5—1 微米的厚片作对照, 切片放在载玻片上 (载玻片上涂 0.1% 明胶, 内含 0.01% 硫酸铬钾作防腐剂, 用红外线灯或热板烘干; 部分厚切片先经 Feulgen 反应染色。然后与超薄切片一样涂布乳胶, 曝光 5—7 天, 抽出厚片显影、定影, 用光学显微镜检查, 确定超薄切片合适曝光时间及确定标记的部位。如果光学显微镜放射自显影标本需曝光一星期的话, 那末电镜放射自显影标本将需曝光 2—4 个月。

四、显影与定影

显影液可用 D-19, 20℃, 2 分钟。菲尼酮对苯二酚, 24℃, 3 分钟。

蒸馏水洗 30 秒, 1% 醋酸定影 10 秒, 蒸馏水洗 30 秒, 30% 硫代硫酸钠 3 分钟, 定影后用蒸馏水洗数次, 每次 30 秒至 1 分钟。平基法由于是用载玻片进行的, 因此定影后要漂膜。

漂膜的方法是: 用小刀将火棉胶膜的三边刮破后, 在水面上漂起, 如漂不起来, 可用 3% HF 水溶液涂载玻片碰水端数十秒即可。将空

铜网放在膜的切片上,捞到滤纸上,干后即可用电镜观察。

采用“一”、“二”两法时,定影后要用醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色。

扫描电镜标本制备法^[9]

扫描电镜可用以观察物体表面,观察较大的范围,弥补了透射式电镜视野狭小的缺点。

一、空气干燥法

将琼脂培养基上的细菌菌落刮取下来,或离心收集液体培养基中的细菌,放在2.5%戊二醛溶液(用0.1M磷酸缓冲液配制,调pH至7.2)中固定数小时,用蒸馏水洗,再用2% OsO_4 或2% KMnO_4 溶液固定12—24小时,用蒸馏水反复洗,然后用30、50、70、90、100%丙酮脱水,每步10分钟,100%丙酮数次。标本放在滤纸上在空气中干燥;也可用吸管取100%丙酮溶液(含有细菌)滴在盖玻片上,迅速在45℃热空气中干燥。干燥后在表面喷一薄层金(约50—200埃),也可先喷碳后喷金,以改进表面导电性和增加表面二次电子的发射能力。最后用扫描电镜观察。

二、临界点干燥法

1. 固定: 把样品放在缓冲液或生理盐水中洗净后,低速离心,弃上清,取下面的混浊液滴在铜网膜或盖玻片上,放在1—3%戊二醛中固定。

2. 洗净: 在缓冲液中冲洗2—3次。

3. 脱水: 在50—100%酒精中脱水,每步10—15分钟。

4. 取代: 用100%酒精和100%醋酸戊酯(或醋酸异戊酯)1:1的溶液进行取代后,再用

100%醋酸戊酯取代10—15分钟。

5. 把样品放到样品室中去。

6. 把样品室放到预先冷却的干燥器中(冷却样品干燥器时,应在放入标本之前。装入液体 CO_2 ,然后将入口阀 V_2 急速打开)。

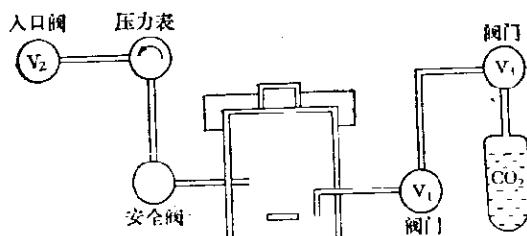


图3 临界点干燥装置结构图

7. 通入液体 CO_2 ,旋松 CO_2 钢瓶阀门 V_3 ,同时打开 V_1 ,关闭 V_2 ,使样品干燥器内充满液体 CO_2 ,用液体 CO_2 取代醋酸戊酯,此时压力在室温下为57—65公斤/厘米²,同时通过观察窗确定液体 CO_2 是否盖住了样品。取代时,将 V_1 、 V_2 都打开,使进出压力保持平衡,持续1小时左右,直至闻不到醋酸戊酯味为止。

8. 加热: 用50°—70℃的热水加温样品干燥器,使压力表上的指针达到95—105公斤/厘米²,放置5—10分钟(加热时将 V_1 、 V_2 关闭)。

9. 排气。打开出口阀 V_2 ,要尽可能缓慢地排气,当压力表上的指针指向“0”时,打开样品干燥器的盖子取出样品(取出的样品要注意防潮,可保存在干燥器内)。

10. 喷镀。按先碳后金的顺序。要用回转倾斜的样品台,并以一定速度旋转。(每分钟数十转至数百转均可)。

除以上技术外,还有用电镜直接观察核酸大分子的方法,国内已有介绍^[10,11],限于篇幅,就不详谈了。