

制备扫描电子显微镜微生物标本的干燥和导电技术

乔 宝 义

(中国科学院微生物研究所,北京)

扫描电子显微镜(以下简称SEM)的成像原理不同于透射电子显微镜和其它各类光学显微镜。利用它进行观察,为微生物学研究提供了特异,精细而丰富的微生物结构信息。但是,不当的制备技术往往人为地造成微生物标本的严重改变。为了减少或避免人为损伤,使所得信息尽可能反映标本的自然状态,要求SEM标本的制备采取独特的一套方法,不能只满足于借鉴其它显微镜标本技术中的常规方法。制备SEM标本时的关键技术就是干燥和导电。

临界点干燥技术

干燥是制备SEM标本不可缺少的步骤。一般的空气干燥过程,由于水份蒸发,不断退缩的液面不仅接触并穿过标本表面,而且穿过多孔的组织内部。这样,液面所呈现的表面张力会对标本产生一种结构应力。就会造成标本收缩和破坏。Bartlett^[1]等曾计算过直径粗细为 5×10^{-6} 厘米的标本,它在此过程中将受到28个大气压的轴压应力,而且直径愈小、或作用时间愈长,所受到的应力愈大。除此之外,有机溶剂脱水 and 替换,不适宜的冰冻和化学固定操作也会损伤标本,但较之结构应力的作用是次要的原因^[2]。

由于材料和观察目的不同,具体操作步骤多种多样,但都是为了减少或完全克服表面张力所造成的结构破坏。这些方法归纳起来有:①溶剂替换法,②替换液固化升华法,③冰冻干燥法和④临界点干燥法(CPD法)^[2]。这些方法

各有利弊,其中CPD法也能有效地克服标本萎缩和破坏,而且操作简便,成功率高,重复性好,标本易保存^[3],所以近年来广泛使用,流程也日趋简化。现着重介绍CPD法。

一、临界点和临界点干燥的原理

液体与气体是物质聚集状态的一种差异,这种差异随温度和压力而变化,在恒容条件下,温度达到一定值时,液体和蒸汽的密度完全相等,这种状态就叫临界状态。此时的温度和压力即为临界温度和临界压力。图1是CO₂的容积对压力的等温曲线,由图中可见,在31.1℃等温曲线以上的线是连续的,它以下都是不连续的,后者都有一段与横坐标(密度)相平行的直线,这段直线表示在液体和蒸汽处于平衡时,容积改变而压力保持恒定,当温度升高时,直线愈

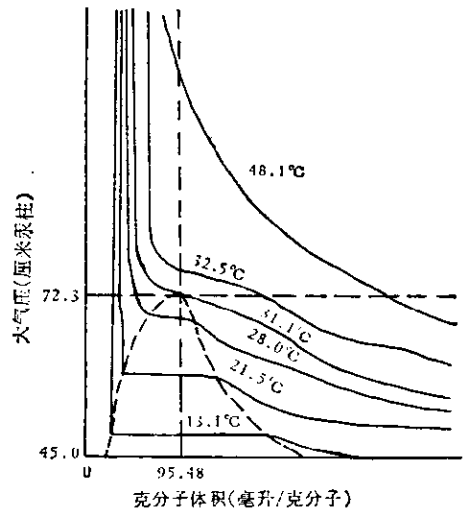


图1 CO₂的等温曲线

表 1 临界点干燥法的种类和处理用液体^[3]

干燥方法	转移液	分子式	临界压力 (公斤/厘米 ²)	临界温度 (°C)	沸点 (1 大气压, °C)	中间液
氟里昂法	氟里昂 13	CClF ₃	38.2	28.9	-81.4	乙醇氟里昂 113
氟里昂法	氟里昂 23	CHF ₃	47.7	25.9	-82.0	乙醇
氟里昂法	氟里昂 116	CF ₃ -CF ₃	32.6	24.3	-78.2	丙酮
二氧化碳法	二氧化碳	CO ₂	72.8	31.4	-78.5	乙醇醋酸异戊酯
亚硝酸法	一氧化二氮	N ₂ O	71.7	36.5	-89.5	无

趋缩短,至 31.1°C 时直线缩为一点(B 点),这一点即为临界点(临界压力为 72.3 个大气压),这说明液体和蒸汽密度在此点开始相等,液面消失,表面张力不复存在^[3,4]。

水与其它液体一样,也有它特定的临界点。如果在临界点或临界点以上把水蒸汽排掉,可以使标本干燥而不致于损伤标本。人们把这个过程称作临界点干燥(或称临界态干燥)。然而实际操作不能直接在水中进行临界点干燥,因为它们的临界温度(374°C)和临界压力(235 个大气压)都较高。而在过热条件下微生物标本易被破坏,标本台架也易被腐蚀,实际干燥压力偏高而超过高压槽安全系数(一般不超过 168 个大气压),操作很不安全^[2,3]。所以在实际操作中经常利用替换液和中间液,最后把组织中的水份置换成临界温度和临界压力较低的转移液,再进行临界点干燥。常用的转移液有 CO₂, N₂O 和 Freon 13(见表 1),它们不仅临界温度和压力较低,而且不和组织发生强烈化学反应。

二、临界点干燥器使用原理及干燥过程

干燥器的结构见图 2。主要由高压槽、高压针阀、压力表和加温水浴装置组成。干燥器的商品种类繁多,但均以这些部件为主,增增减减而已。

目前,CO₂ 临界点干燥法的使用原理搞得较清楚。

Bartlett^[1] 利用 CO₂ 的压力(P)一体积(V)一温度(T)的三平面坐标图(图 3)说明了三个有关问题:① CO₂ 所有不同聚集状态都可以从坐标各点反映出来;②通过 KM 等温线可表示钢瓶中在室温下 CO₂ 容量改变而压力不变;③图

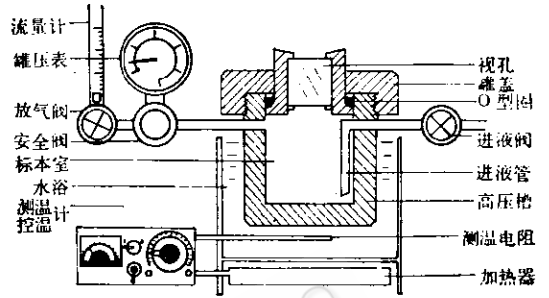


图 2 临界点干燥器示意图

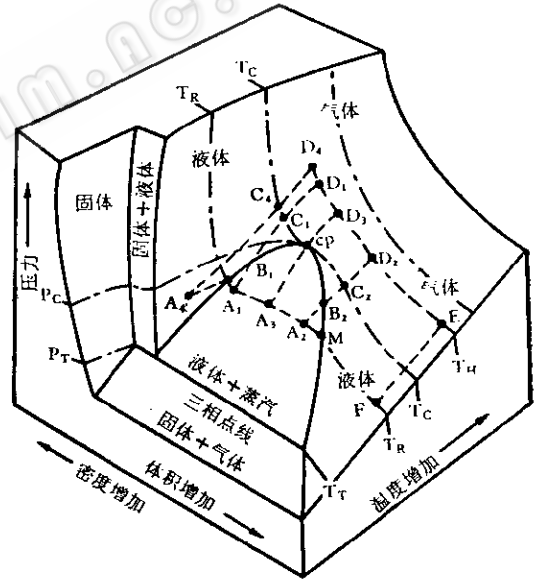


图 3 CO₂ 的压力-体积-温度平面坐标图^[1]

上 A₁, A₂, A₃, A₄ 诸点反映高压槽在起始点时液态 CO₂ 容量可能出现的四种状况^[1],图 4 的 a、b、c、d 示意这四种状况。

当恒容加热时,CO₂ 的聚集状态分别沿垂直于体积轴的 A₁B₁C₁D₁, A₂B₂C₂D₂, A₃CPD₃ 和 A₄C₄D₄ 等路线发生变化。按 A₁B₁C₁D₁ 路线,开始时液体减少,当压力升到 B 时,液体完全充满

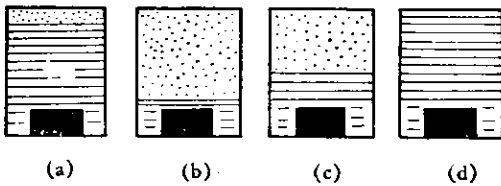


图4 液态 CO₂ 可能出现的四种状况

高压槽没有蒸汽存在,达到临界点温度时(T_c),压力升到 C_1 ,液体完全变成气体;如按 $A_2B_2C_2D_2$ 路线,压力升到 B_2 ,液态 CO₂ 完全蒸发,由于在此过程中液-气界面通过标本,从而使标本损伤;若按 A_3cpD_3 路线,当达到临界点 cp ,液-气两相密度相等,当 $T < T_c$ 时,液相和气相明确存在, T 接近 T_c 时,两相界面模糊,当 $T > T_c$ 时,弯月面消失,只有气相存在;按 $A_4C_4D_4$ 路线,CO₂ 一直保持液体状态,到达 C_4 时,高压液体变成高压气体。在这四种状态下,如果连续加热到 T_H (50℃),则压力分别达到 D_1, D_2, D_3 和 D_4 ,若恒温放气使它们达到 E 点(CO₂ 密度等于 0),最后冷却到 F 点(室温),干燥过程即完成。

由以上分析可见,除第二种状况外,其它状况下对标本都是安全的。但实际操作时人们多喜采用第四种状况,因为在这种状况下,高压液变成高压气的整个过程中不出现沸腾现象。而 $A_2B_2C_2D_2$ 路线和 A_3cpD_3 路线中,在液-气平衡过程很容易发生沸腾,特别是后一路线中沸腾过程较长,微生物标本会长时间暴露在沸腾状态中。

三、临界点干燥操作方法

(一) 干燥前的准备过程

固定: 一般可按透射电镜标本的制备方法进行固定。Boyd^[5] 曾建议用醛类固定几天到几个月,这样可以增加组织的坚韧性,减少脱水造成的萎缩。有些标本外表有大量杂质(如粘多糖等),常影响观察,可以用酶或其它理化方法进行清除处理。

脱水: 固定后的标本在脱水之前要用水尽量除去无机盐和附着物。然后用逐步提高浓度

的乙醇或丙酮脱水,开始脱水剂的浓度应较小,而且要较缓慢地提高浓度,如 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%。如果一开始就用 50% 的乙醇,则表面易积聚盐的沉淀。同时,用 80%—95% 的乙醇脱水时容易损伤组织。逐级脱水的时间为:标本在 1 毫米以下以 10 分钟为宜,1—3 毫米的以 10—20 分钟为宜^[2,6]。脱水过程的步骤多,时间长,标本也易受损伤,所以 Muller^[7] 等提出了化学脱水法,即用二甲氧基丙烷在微酸性条件下与组织中的水分反应,达到脱水的目的。以后, Jalanti^[8] 用甲氧基乙醇成功地制备了用戊二醛固定的大肠杆菌,变形杆菌和梭菌的 CO₂ 临界点干燥扫描电镜标本。

中间液替换^[2,3]: 在 CO₂ 临界点干燥法中,多用醋酸异戊酯(或醋酸戊酯)作为中间液替换乙醇或丙酮。之所以称它为中间液,是因为它不只与乙醇(或丙酮)互溶,而且与 CO₂ 互溶,通过它,可以把样品转到 CO₂ 中。具体步骤是在 70% 乙醇(或丙酮)与 30% 醋酸异戊酯混合液中浸泡后,然后将这两种溶剂以相反的配比混合,再浸泡样品,最后用 100% 中间液浸泡两次。用醋酸异戊酯作中间液,最初是因为其所具独特气味,可用嗅觉鉴别替换是否完全。Freon TF (113) 也可作为中间液,它的替换速度快,对标本的损伤轻。DeBault^[2] 介绍了不用中间液而用液态 CO₂ 直接替换的方法,也得到了好结果。

转移液替换^[2,3]: 临界点干燥时所采用的液体叫做转移液。用 CO₂ 作转移液替换中间液的过程是在封闭的高压槽内进行的。步骤是:首先将槽冷却,由中间液中取出标本(在架上),甩掉多余的中间液后立即放入高压槽内,封闭后依次打开钢瓶阀和进液阀,CO₂ 便很快注满槽内,此时压力表指示为 45—50 公斤/厘米²。然后徐徐打开放气阀,以 5 升/分的流量放气,此时可闻到酯味,以后每隔 1—2 分钟放气一次,直至闻不到酯味,此时可认为中间液即被替换完毕。此过程约需 20 分钟或更长。最后关闭放气阀和进液阀。

(二) 干燥^[2]

将高压槽浸在水浴中,接通测温控温电源,水温升高,压力很快增大,应调节放气阀使压力维持在110公斤/厘米²左右(有时可以稍高些)。将温度升至50℃,恒温,打开放气阀,以5—10公斤/厘米²/分的速度降压,开始减压时应尽量缓慢,否则压力骤然下降会使组织爆裂,或出现绝热冷却现象。由于槽的内壁温度降到临界温度以下,热量不能及时补充,就会引起CO₂的重聚。从视镜孔可监测CO₂是否发生重聚(有凝聚液滴时即发生了重聚)而重聚会影响干燥效果。放气过程中不但要使高压槽温度维持在45—50℃,而且要使放气阀和管道的温度保持在临界点温度以上,否则同样会出现重聚现象。特别在放气阀高压面上凝聚了液体,会发生间歇性爆发。

当压力降至大气压,或流量计的浮子落到底部时,说明CO₂气已排净,即完成干燥过程。

(三) 几种改良的干燥方法

1. 干冰干燥: 由于向高压槽注入液态CO₂的瞬间,猛烈的气流往往会冲掉微小的标本(如血球和孢子),而且掺杂在液态CO₂中的钢瓶油污及铁锈易污染标本,所以Tanaka^[9]等介绍了用干冰进行临界点干燥的方法。他们用电热丝把干冰切割成高压槽腔的形状,放进预冷的高压槽内,封闭后加热至15℃,干冰融化后体积会增大,CO₂不仅能浸没标本,而且完全充满槽内,标本不受任何机械作用。由于干冰除含少量(0.02—0.06%)水分外,很少杂质,故干燥效果不比一般方法差。

2. Freon 干燥: 此法由Collen^[2,6]在1968年首先介绍。操作方法与CO₂法相同,中间液为Freon 113。转移液为Freon 13。由于它们的临界点压力比CO₂低,操作更加安全,干燥速度也更快。但Freon 113极易挥发,在标本转移到高压槽时,容易损伤标本,而且Freon价格较贵。

3. N₂O 干燥: 此法是Koller^[6]等提出的,

操作过程与上述方法稍有不同。N₂O溶解在水中,故不需用中间液替换。标本放入高压槽后封闭槽盖,在低压下充满N₂O液,搅拌24小时后加热至45℃,压力升高,在恒温下放气使其降至大气压,即完成操作,干燥标本完整无损。

(四) 干燥标本的鉴别

用肉眼直接观察可以进行初步鉴别。空气干燥标本有明显收缩和损伤,质脆,经常保持原色,甚至呈黑褐色。而临界点干燥标本没有明显收缩,看上去有光泽,呈海绵状,质软而有弹性,色泽变白或褪色。与冰冻干燥标本相比,它不易吸水,容易保存。

四、临界点干燥过程中使用的标本架

从脱水、替换直至干燥之前,标本均放在标本架上。标本架可根据需要设计成各种形式,以使用方便为原则。图5所示的是一种较好的形式。由薄厚不同、孔径不一的孔板组成,其间

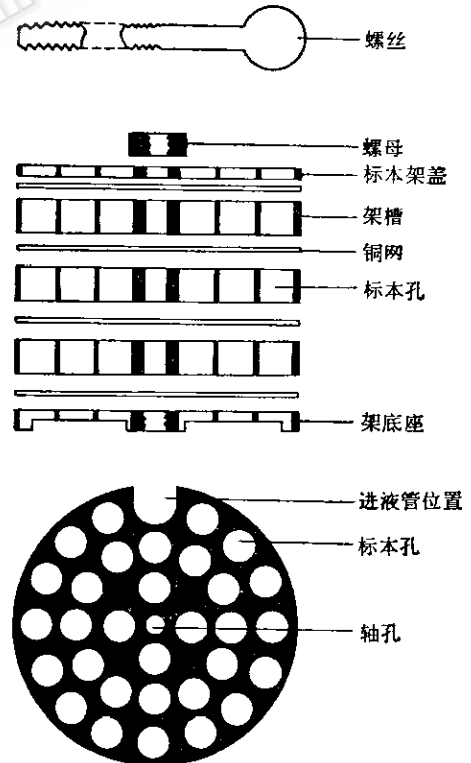


图5 标本架结构图

上: 纵切面; 下: 横切面

隔有铜网,可根据标本大小选用。一次最多可干燥七八十个标本。

标本导电技术

生物标本不仅导热性能低,而且导电性能也很差。有些标本虽然不经导电处理也能在低加速电压下观察,但反差很弱,分辨率不高,得不到良好的二次电子像。

标本导电性能差,或标本与标本台接触不良,经常导致间歇充电和放电现象,妨碍成像。充电一般有两种情况,一种是充电区域比未充电区域亮度大;另一种是充电区域改变了正常的连续线性扫描,出现周期性的很强的“Z”字形图像。如果给标本表面喷涂一层金属,或进行导电染色,并与标本台良好地接触,则标本表面被电子束冲击所形成的负电荷和热量,可通过金属层和标本台传出去,以免电荷堆积和热量积累。

一、金属层喷涂^[10,11]

在标本上喷涂一层金属,不仅增强了导电和导热性能,而且金属层发致的二次电子比标本本身多。这样,信号增强后所得到的像鲜明,分辨力亦提高。同时,标本表面的机械强度也得到提高。

(一) 对金属层性能的要求

1. 连续而不形成“岛状”积累。
2. 在 SEM 的分辨范围内不显示金属本身任何结构特征。
3. 金属层在标本表面任何方向和部位厚薄均匀。
4. 厚度适宜,二次电子只从金属表面层发致。不能厚于 200 Å,以免遮盖精细结构。但细菌的纤毛,鞭毛和一些病毒颗粒,金属层应厚一些,以便提高它们的能见度。

(二) 喷涂材料的选择

喷涂材料应符合以下条件:

1. 单位金属发致的二次电子多。
2. 机械性能好。
3. 易蒸发。
4. 在保存期间稳定。
5. 与标本不起化学反应。

比较常用的喷涂材料有金、铂、金-钨、铂-钨等。它们的特性列于表 2^[11]。其中金的熔点较低,不与钨丝相互作用,产生二次电子多,蒸发膜稳定(如蒸发膜太厚,容易形成岛状聚集);金-钨的蒸发颗粒细,但熔点稍高;铂和铂-钨合金的熔点更高,必须用碳弧法蒸发。钨与钨丝形成合金会影响喷涂效果,可用直钨丝或灼热处理的“V”形钨丝进行蒸发[见图 9(b)],可避免相互反应。另外也可使用铝、铜、银等,但易被氧化或硫化。

表 2 金属材料及其蒸发特性表^[11]

材 料	蒸发方法	蒸发层厚度 (Å)	蒸发速度 (Å/秒)	融 点 (°C)
金	钨丝篮	100	~2	1063
金-钨	钨丝篮	100	~2	1555(钨)
铂-碳	炭 棒	150	~50	1774(铂)
铂-钨-碳	炭 棒	150	~50	3700(碳)
铂	钨丝篮	150	~2	1700

(三) 金属蒸发方法

在高真空中蒸发金属可以得到纯净而稳定的金属层。但是,大部分金属在温度接近或稍超过它的熔点时,即使在真空度为 10^{-4} 托时也具有很高的蒸汽压,不需要过高的温度,金属原子就会投到标本表面,使标本粗糙表面呈现投影效应,从而就得到不连续的金属层。为了避免这种效应,保证原子随机蒸发,必须采用下述方法。

1. 旋转两次投影法:把标本固定在以 60—200 转/分转动的水平转台上,分别以 30° 和垂直两个方向喷涂(图 7),则在有效喷涂面积内,可以完整而均匀地形成金属层。

2. 倾斜旋转一次投影法:所用标本台既能水平旋转,又能以不同角度和速度同步倾斜。图 7 是陀螺式标本台,倾斜角度可以调节,马达

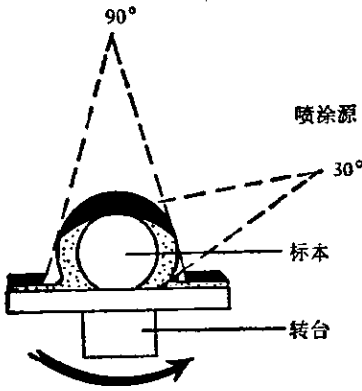


图6 旋转两次喷涂法示意图

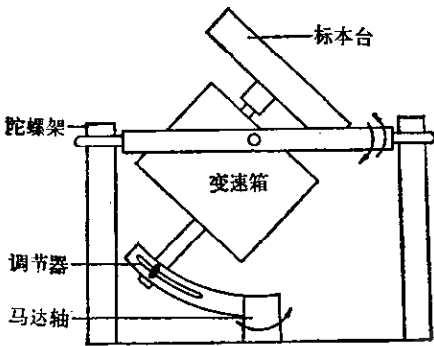


图7 陀螺式标本台示意图

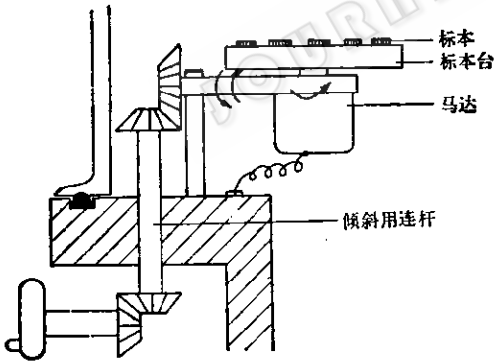


图8 手动倾斜式旋转台示意图

传动，水平转速为倾斜转速的1/2。图8是手动倾斜式旋转台，以马达带动进行水平旋转，用手通过连杆进行倾斜角度和速度的调节。

用这两种标本台进行喷涂，距离为8—15厘米，真空度为 $1-3 \times 10^{-3}$ 托。一次垂直喷涂就可得到均匀的薄层。

(四) 碳电弧喷涂

为防止金属在标本表面积聚，必须在喷涂之前，先喷涂碳，以提供大量碳核，便于金属附着，并防止金属层凝聚和破裂，避免呈岛状积累。同时，表面粗糙多孔的标本，经喷涂碳处理，可大大增加金属层的连续性。在X光扫描分析中，碳的喷涂是不可少的。

碳的熔点很高，必须采用电弧喷涂。具体方法是：将两支碳棒修成图9(d)的形式，彼此接触并用弹簧压紧。以6—30伏，20—50安培的电流使接触点的温度达到熔点，使碳蒸发。此时真空度不宜太高，一般保持在 $10^{-3}-10^{-4}$ 托，碳原子经空气分子的作用呈散射状态，从各个不同方向均匀地溅落在标本表面。很少形成投影效应，喷涂时距标本8—15厘米，不致引起热辐射效应。如果把碳棒修成图9(e)的形式，一端成长5毫米，直径1毫米的小柱，并在末端缠上难融金属丝与另一根熔点低于碳棒的石墨棒接触并压紧。加热到一定温度后，金属和碳同步蒸发，在高真空下倾斜旋转一次喷涂标本表面，就能形成均匀的金属-碳薄层。

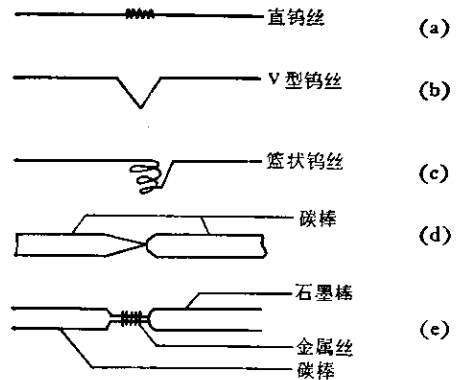


图9 几种类型的蒸发装置

(五) 金属层厚度的测量

金属层的厚度必须测量。有些镀膜机配有振荡石英晶体，或连有光学系统，可以精确测量金属层厚度。由于测量仪器不能恰当地放在标本台上，因此测量数据要校正。在没有专用测量仪器时，可根据经验来估计^[10]。如利用金属

量和膜厚的关系,进行定量蒸发,基本上可以得到可重复的金属层厚度;也可以按 Multer 或 Pease 经验公式计算厚度,这个公式是:

$$M = \frac{4}{3} \frac{TR^2 P 4\pi \cdot 10^4}{\cos \theta}$$

其中 T 为金属层厚度(毫微米), M 为金属材料的质量(毫克), P 为材料密度(克/厘米³), R 为蒸发距离, θ 为喷涂方向与法线的夹角。

此外,还可以把扩散泵油滴在白瓷片上,比较油滴和周围的颜色,从此粗略估计膜度。

二、导电染色方法^[12,13,14]

金属喷涂虽被广泛使用。但由于该方法有一些缺点,如蒸发原子的轰击使标本发生蚀刻,喷涂不均匀时会遮盖精细结构,金属颗粒会污染标本表面,这些人为造成的改变不利于进行高分辨率的观察。所以有人采用导电染色法。如 Goldmen^[12]等提出了湿化学法。即用 0.12M 的硝酸银铵溶液浸泡标本 10 分钟,然后以柯达定影液固定 3 分钟,即可达到导电染色目的。渡部忠雄等^[13]认为上述反应太强烈,易损伤标本。因此提出了另一方法(见图 10)。即首先在固定后脱水前用三种药剂进行导电处理,使戊二醛固定后残存在标本组织内的醛基与氨基

酸结合。再用单宁酸与标本组织中的蛋白质、糖和氢结合,同时单宁酸还会和浸入标本组织内的氨基酸和糖结合。水洗除去多余单宁酸后,再使钼酸与标本组织内的单宁酸螯合,这些金属螯合物具有优良的导电性能。Broers^[14]用 2% 的磷钨酸乙醇溶液染葡萄球菌,用醋酸双氧铀对 T,噬菌体进行染色,也得到良好的导电效果。

总之,导电染色虽然是新发展的技术,但它已表现出其优点。如高倍率的像稳定,不易损伤标本,可长期保存,以及通过改变导电染料的种类和浓度可以增加不同标本表面的信息等。

参 考 文 献

- [1] Bartlett, A. A.: A Review of the Physical Critical Point Drying, *Proc. SEM/1975* (ed. by Johari, O. and I. Corvin) IIT Reserch Institute Chicago, Chicago Illinois, 1975, p. 305—316.
- [2] Lewis, E. R. and K. H. Michael: Critical Point Drying Techniques, *Proc. SEM/1973* (ed. by Johari, O. and I. Corvin) IIT reserch Institute Chicago, Chicago Illinois, 1973, p. 768—774.
- [3] 大隅正子: 细胞, 7:99—117, 1975.
- [4] 高仰震: 物理化学及胶体化学(上), 农业出版社, 北京, 1961, 第 21—23 页。
- [5] Boyde, A. and C. Wood: *J. Microscopy*, **90**: 221—249, 1969.
- [6] Boyde, A.: *Histological and Cytological Methods for the SEM in Biology and Medicine, Scanning Electron Microscopy* (ed. by Wells, D. C.) McGraw-Hill Book Company, inc., New York, 1976, p. 308—333.
- [7] Muller, L. L. and T. J. Jacks: *J. Histochem. Cytochem.*, **23**(2): 107—110, 1975.
- [8] Jalanti, T. and G. Demicierre: *Experientia*, **32**(6): 798, 1976.
- [9] Tanaka, K. and A. Iino: *Stain Technology*, **49**: 203—206, 1974.
- [10] Pfefflerkorm, G.: Techniques for Non-conductive Samples, *Proc. SEM/1973* (ed. by Johari, O. and I. Corvin) IIT Reserch Institute Chicago, Chicago Illinois, 1973, p. 752—757.
- [11] 永谷 隆、斎藤 稔: 细胞, 7:29—35, 1975.
- [12] Goldmen, M. A. and R. C. Leif: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**(12): 3599—3603, 1975.
- [13] 渡部忠雄、永谷 隆、村上宅郎: 细胞, 7:118—125, 1975.
- [14] Broer, A. N. High Reolution Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens, *Proc. SEM/1975* (ed. by Johari, O. and I. Corvin) IIT Reserch Institute Chicago, Chicago Illinois, 1975, pp. 234—242.

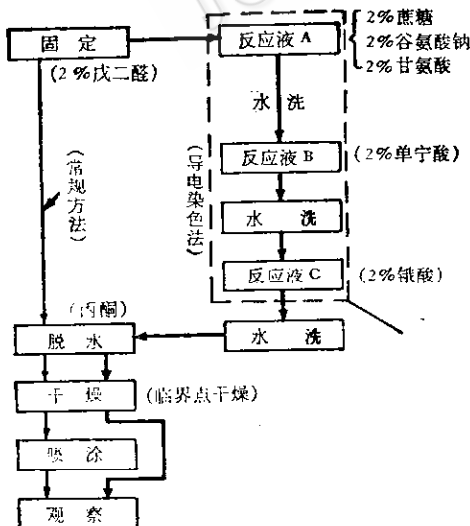


图 10 导电染色过程