

利用国产氟利昂 22 作置换剂的临界点干燥技术*

刘如葵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

临界点干燥 (CPD) 技术^[1-3]在我国是近几年引入的一种生物材料制样技术, 特别广泛地应用于扫描电镜观察。在 CPD 技术中, 我国一直使用液态 CO_2 作为临界点干燥剂, 但由于有些市售品含残余杂质过多, 有时效果很差。我们采用氟利昂 13 或氟利昂 22 代替 CO_2 作临界点干燥剂, 取得了较理想的效果。

材料和方法

(一) 观察菌种

乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*), 凤梨条孢牛肝菌 (*Boletellus ananas*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*) 等。

(二) 样品制作

1. 固定: 将上述菌种用 2% 戊二醛, pH 6.8—7.2, 固定 1—18 小时。

2. 脱水: 固定后用 30%、50%、70%、95% 乙醇逐级脱水, 每次 10 分钟, 再转入 100% 乙醇中脱水 2—3 次, 每次 15 分钟。脱水后的材料保存在 100% 乙醇中, 直接放入临界点干燥器。

(三) 临界点干燥

1. 按图 1 所示接好输液管道, 把储有氟利昂 22 的小钢瓶放在磅秤上, 放出少量氟利昂检查管路及阀门是否畅通或漏气。检查后把承压室和管路中的氟利昂气体放掉。用棉球蘸取少量丙酮清洗承压室及“O”形圈。

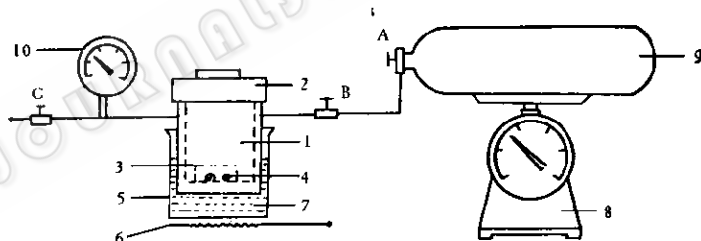


图1 临界点干燥设备示意图

1. 承压室 2. 承压室盖 3. 样品篮 4. 样品 5. 水容器 6. 加热器 7. 水 8. 磅秤 9. 钢瓶 10. 压力表
A、B. 进气管 C. 放气阀

2. 接好仪器的电源及控温装置。

3. 打开阀门 A、B 和 C, 放少量氟利昂于承压室冷却, 一分钟后关闭 C, 再关闭 B 和 A 阀门。15 分钟后打开 C 阀门, 放出气体并再次擦净承压室, 同时把磅秤上钢瓶的总重量减去 100g。

4. 迅速将样品移入样品篮中, 若为菌液, 可将其置于事先准备好的载体上再放入篮中。用滤纸吸去多余的乙醇, 盖好样品篮盖, 放入承压

室并盖好承压室盖。

5. 打开阀门 A、B, 开始时小些, 逐渐加大。打开阀门 C, 开始时不要过大, 直到没有中间液或乙醇气味时关闭 C 阀门, 压力不再上升并达到平衡时为止 (约 3 分钟)。此时氟利昂已注满 100g, 关掉 B 和 A 阀门。

6. 打开温度自控系统, 加温至 70℃、压力

* 本工作承徐浩同志指导; 徐浩、齐祖同、应建浙同志提供材料, 一并致谢。

约 50 kg/cm^2 下平衡 15 分钟,使氟利昂有充分时间置换样品中的乙醇。然后将温度升至 90°C ,这时压力约为 80 kg/cm^2 左右,平衡 10 分钟,使氟利昂完全取代乙醇。打开 C 阀门,先以 2 l/min 的排气量放气,当压力降低于临界点压力之后,把 C 阀门逐渐开至最大,以免由于放气凝聚形成的水把阀门堵死。

7. 当压力降至零时,关掉电热器,把承压室周围清除干净。取出样品进行喷涂。

8. 用离子喷涂装置喷涂,真空度 $0.1-0.01 \text{ Torr}$,电压 $600-1400 \text{ V}$,电流 $8-15 \text{ mA}$ 维持 30 秒钟, $3-5 \text{ mA}$ 维持 2-3 分钟,金属膜厚度约 150 \AA 。

9. 将喷涂好的样品用导电胶粘在样品托上,即可电镜观察。

结果与讨论

氟利昂 13,22,12 均可做为临界点干燥剂,以氟利昂 13 为好,但不易购到。市售氟利昂 22 易购,可以达到与 CO_2 同样的目的和效果(图 2),获得的图像样品表面丰满,细微结构清晰,三维空间感强。凤梨条孢牛肝菌经制样处理,在扫描电镜下观察孢子呈椭圆至长椭圆,有表面平滑纵走凸起的条纹,未见皱缩变形损伤。6000 倍下观察可清晰看到纵向凹陷的条纹以及条纹之间的横脉(图版 I-3)。这是采用临界干燥扫描电镜才能看清楚,而用光学显微镜或透射电镜则观察不到。

用此法制做的乳酸链球菌样品也未发现菌体干瘪凹陷、皱折或表面模糊不清、菌体之间不易区分的现象(图版 I-1,2)。

图版 I-4 所示黑曲霉的孢子头仍保持原

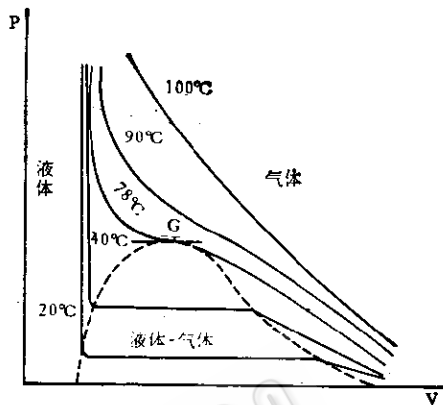


图 2 国产氟利昂 22 等温曲线

状,未见分生孢子梗干瘪、弯曲、变形等现象。其它各菌(图版 I-5,6)的瓶梗、分生孢子和菌丝也都显示丰满,保持生活状态下的原貌而未见干瘪、萎缩变形现象。

据我们试验,认为市售氟利昂 22 是 22 与 13 的混合产物。临界温度和压力较低。此干燥剂对样品没有不利影响。氟利昂可直接与乙醇混合,本身无毒、不着火、安全可靠,但使用时不应有电炉等明火,以防形成毒气。使用氟利昂 22 可节省时间(全过程约 2 小时),效果理想。而目前市售 CO_2 纯度低,含有较多的醇类和其它游离物,往往达不到干燥的目的反而污染了样品。

参考文献

- [1] Hayat, M. A.: Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Application, Vol. 3, pp. 399-411, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1973.
- [2] 田中敬一: 一般走査電鏡用生物試料製法, 日本電子顕微鏡学会関西支部, pp. 152-161, 1974.
- [3] 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>