

# 真菌的冷冻扫描电镜观察

董光军 初昭峤 谢家仪

(中国科学院微生物研究所, 北京)

冷冻扫描电镜法是根据低温生物学原理, 生物样品经过超低温处理后进行电镜观察的一种方法。经超低温冷冻固定的生物样品可保持其原有的形态特征和生物活性。样品内部水份在超低温( $-150^{\circ}\text{C}$ )下, 即使在真空中升华速度也很慢。且因水的存在, 使样品具有一定的导电性, 样品在电镜中经过长时间观察而不会发生脱水和严重的放电现象<sup>[1,2]</sup>。所以把超低温冷冻固定的样品放到一个能保持在超低温的台子上, 就可以观察到处于生活状态的样品, 这也是这种方法的优点。

相比之下, 经常规方法处理的样品均已脱水、干燥、不能保持其生物活性, 而且会产生收缩和某些细微结构的变形<sup>[3]</sup>。此外, 常规方法程序繁杂, 使用化学药品种类多, 对样品影响大, 有时出现假象。

## (一) 材料和方法

1. 材料: 青霉 (*Penicillium* sp. 2800, sp. 2775) 和曲霉 (*Aspergillus* sp. 2798)。使用的仪器是日本日立公司制造的 S-570 型扫描电镜和冷冻台; 冷冻台可控温度由  $-150^{\circ}\text{C}$  以下至室温。冷冻台上带有加热器(升温除霜用)、冷刀(切断样品进行内部观察时用)、金蒸镀装置和换样杆等。

2. 方法和步骤: 向达到高真空的电镜冷冻台和上、下冷阱中注入液氮, 待温度降到  $-150^{\circ}\text{C}$  以下后, 将培养好的真菌连同基物取下, 切成 3—4 毫米见方, 厚度 1—2 毫米的小块, 放到样品座上, 把样品座迅速投入液氮杯中, 样品被冻结在样品台上, 15—20 秒后用换样杆取出, 迅速装到冷台上。在此过程中可能有霜结在样品表面, 这时打开加热器除霜, 在温度升到  $-80^{\circ}\text{C}$  时保持几分钟。霜除去后使温

度降回  $-150^{\circ}\text{C}$  以下, 选择加速电压 5kV 以下进行电镜观察。如需高倍观察或样品信息不足时, 可在样品表面蒸镀金。

## (二) 结果

从图版 I-1, 2 (曲霉 *Aspergillus* sp. 2798) 和 I-3, 4 (青霉 *Penicillium* sp. 2800) 可看出菌体各部形态饱满, 孢子和菌丝体均未发生变形, 这说明经冷冻后的样品基本保持了原生活状态。另外值得一提的是经过常规方法处理的样品, 往往观察到菌体稀少, 孢子散落的现象, 这是由于化学药品的作用和繁杂的步骤中溶液的冲洗产生的; 但是用冷冻扫描电镜法处理的样品, 一般只与液氮接触一次, 所以受影响要小得多。总之, 利用这种方法观察的真菌类样品结果令人满意。日本的德永纯一曾强调<sup>[4]</sup>: 霉菌类孢子经冷冻直接观察摄影以后, 再将这些孢子重新送回发育环境进行培养, 结果仍能继续生长。这说明此法也是对活细胞进行生态观察的一种尝试。

### 注意事项:

1. 样品从冷冻到装上冷台动作应迅速, 以尽量减少样品表面结霜。

2. 除霜的温度和时间要掌握好, 否则会发生真空干燥和细胞内部的冰重新结晶而损伤样品。

3. 可采用液态氟里昂等冷冻剂, 使样品冷冻速度更快, 以防止细胞内部产生冰晶。

此方法的缺点是比常规方法占用电镜时间长, 电镜电子光学系统污染较重。

(下转第 16 页)

承蒙齐祖同先生提供样品、指导实验, 并与徐浩先生共同审阅此文, 在此一并致谢。

(上接第 41 页)

### 参 考 文 献

- 【1】 田中敬一等著, 李文镇等译: «图解扫描电子显微镜-生物样品制备», 科学出版社, 1984 年。
- 【2】 Jones, D. and W. J. McHardy: *Microbiol. Sci.*, 2 (8): 225—230, 1985.