

技术与方法

一种快速、简易的扫描电镜植物样品干燥新方法

徐秀苹¹ 孟淑春² 冯旻^{1*}¹中国科学院植物研究所,系统与进化植物学国家重点实验室,北京 100093;²北京市农林科学院,蔬菜研究中心,北京 100097)

摘要 扫描电子显微镜是观察植物样品表面超微结构的有效方法,大部分新鲜植物样品需经过干燥处理才可以进行扫描电镜观察。该研究在传统叔丁醇冷冻干燥法的基础上,建立了叔丁醇一步冷冻干燥法,省略了固定、脱水、置换等步骤,简便易行,干燥后的样品形态饱满,最大程度保持了样品原貌。用叔丁醇一步冷冻干燥法干燥的样品可以与CO₂临界点干燥法和常规叔丁醇冷冻干燥法的效果相媲美。通过对不同的样品进行干燥处理,结果证明,该方法具有广泛适用性。

关键词 扫描电子显微镜; CO₂临界点干燥法; 叔丁醇冷冻干燥法; 叔丁醇一步冷冻干燥法

New Method on Scanning Electron Microscopy (SEM) Samples Drying

Xu Xiuping¹, Meng Shuchun², Feng Min^{1*}

¹State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097, China)

Abstract As an effective method to observe surface ultra-structures of plant samples, the scanning electron microscope requests most of the fresh plant samples to be dehydrated before final observation. Based on the general tert-butanol method, we created one new technique by deleting the traditional fixation, dehydration and substitution steps from the protocol, named it as one step tert-butanol freeze-drying. Our results showed that samples dried by this new method hold their original surface features without shrinkage. The comparison of sample dehydration among CO₂ critical point drying, the normal tert-butanol freeze-drying and our new way indicated that almost no difference could be detected, except the last one is much easier to carry out. Different plant samples were also tested by this new dehydration to prove its feasibility for different sample types furthermore.

Keywords scanning microscope; CO₂ critical point drying; tert-butanol freeze-drying; one step tert-butanol freeze-drying

近年来,随着科学技术的不断发展,扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)的发展日臻完善,在各专业领域的应用越来越广。目前,SEM已成为一种研究微观世界的有力工具,很多重大发现和研究成果都是通过SEM观察获得。

大多数生物样品都含有丰富的水分,比例约占三分之二,必须去除水分方可喷镀观察^[1]。如果含水量高的样品直接放入样品室,水分蒸发后样品会收缩变形,破坏表面的微细结构,水蒸汽引起电子束流大幅度波动,使图像模糊,出现雾状,造成物镜、镜头、光阑等的污染,此外,灯丝碰到水蒸汽会氧化变质乃至熔断^[2]。所以,绝大多数植物样品需干燥处理,干燥是生物样品制备中的关键环节,如果处理不好会直接影响到观察的清晰度与准确度^[3]。

收稿日期: 2016-09-01 接受日期: 2016-12-30

*通讯作者。Tel: 010-62836443, E-mail: fengmin@ibcas.ac.cn

Received: September 1, 2016 Accepted: December 30, 2016

*Corresponding author. Tel: +86-10-62836443, E-mail: fengmin@ibcas.ac.cn

网络出版时间: 2017-02-07 15:47:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170207.1547.006.html>

CO₂临界点干燥法是目前扫描电镜生物样品制备中常用的干燥方法。但是,操作时有诸多的细节要求严苛,细小环节的操作不当会导致干燥失败,样品缩水变形;而且临界点干燥需要固定液、乙醇和乙酸异戊酯等中间液,而这些液体对植物样品的有些成分如蜡质等有溶解作用而造成假象;此外,CO₂临界点干燥法需要的操作步骤较多,有可能会对样品造成机械损伤。

冷冻干燥法也是一种常用的扫描电镜样品制备方法。根据选用的冷冻介质的不同,冷冻干燥法又可以分为从水中直接冷冻干燥和从有机溶剂中干燥^[4]。与水相比,有机溶剂在冷冻时形成无定形结构的机会多,并且固相重结晶的机会少,可以减少冰晶对样品的损伤,且能以最快的速度从固态升华,干燥时间大为缩短^[1]。在冷冻和低真空条件下,有机溶剂由固相直接升华,不经过液态阶段,因而避免了气相和液相之间表面张力对样品的损伤,以达到干燥样品的目的。一般有机溶剂选用叔丁醇(*tert-butanol*)置换样品中的游离水,叔丁醇又称三甲基甲醇,熔点25.5℃,水溶性无限大,能与乙醇等溶合,是一种理想的脱水剂,在低真空中可很快升华(1 mL叔丁醇在真空中升华约需40 min, 2 mL约需60 min)。叔丁醇的这些物理性质决定它可以用来干燥生物样品。

传统的叔丁醇冷冻干燥法需要样品固定、脱水、置换^[5-9]。本研究在传统叔丁醇冷冻干燥法的基础上,减少了固定、脱水、置换等步骤,建立了叔丁醇一步冷冻干燥法,其效果可与CO₂临界点干燥相媲美。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.)、西红柿(*Lycopersicon esculentum*),均生长于中国科学院植物研究所科研用温室。

1.2 方法

1.2.1 样品固定 FAA固定液(100 mL): 50%乙醇89 mL,冰乙酸6 mL,甲醛5 mL。用刀片切取刚离体的植物组织(拟南芥切取叶片,矮牵牛取花瓣,蒲公英取花瓣、花丝和花药,番茄取花萼和叶片),大小为2 mm×2 mm,放入固定液中,4℃固定24 h。

1.2.2 CO₂临界点干燥法 固定后的样品进行梯度

乙醇脱水,70%、80%、90%、95%、100%乙醇各处理15 min;乙酸异戊酯置换:75%乙醇+25%乙酸异戊酯、50%乙醇+50%乙酸异戊酯、25%乙醇+75%乙酸异戊酯、100%乙酸异戊酯各处理15 min;最后,将样品放入CO₂临界点干燥器(日立HCP-2)内完成样品干燥。

1.2.3 常规叔丁醇冷冻干燥法 参考李向党^[5]和高德禄等^[6]的方法,稍作改动。样品经FAA固定后进行乙醇梯度脱水,70%、80%、90%、95%、100%乙醇各处理15 min;之后进行叔丁醇置换,90%乙醇+10%叔丁醇、80%乙醇+20%叔丁醇、65%乙醇+35%叔丁醇、50%乙醇+50%叔丁醇、25%乙醇+75%叔丁醇、100%叔丁醇,每次15~20 min;最后将样品浸泡在100%叔丁醇中,-20℃过夜,之后放在冷冻干燥器(日立ES-2030)内完成样品干燥。

1.2.4 叔丁醇一步冷冻干燥法 将新鲜植物材料不经固定直接投入叔丁醇中,马上放到-20℃过夜。之后放在冷冻干燥器(日立ES-2030)内完成样品干燥。然后将温度升至室温,再打开干燥器,取出样品。

1.2.5 扫描电镜观察 干燥后的样品用导电胶粘在电镜样品台上,离子溅射仪(日立E1010)对样品台喷金、镀膜。在扫描电镜(日立S-4800)下观察样品、拍摄图片。

2 结果

图1、图2和图3分别为经常规叔丁醇冷冻干燥法、叔丁醇一步冷冻干燥法和CO₂临界点干燥法干燥的拟南芥幼嫩叶片,其中的白色颗粒为蜡质。图3的白色蜡质和其他杂质明显少于图1和图2,这可能是由于图3的样品经过固定、脱水、置换步骤,有些

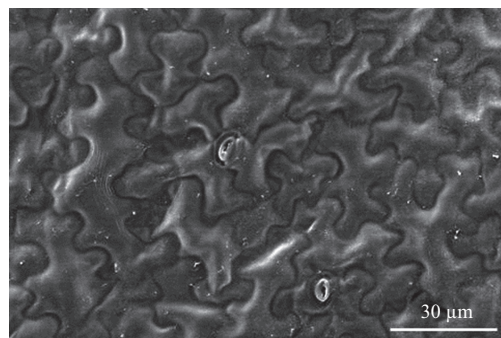


图1 常规叔丁醇冷冻干燥法干燥的拟南芥叶片
Fig.1 *Arabidopsis* leaf dried by general *tert-butanol* freeze drying

蜡质已溶解, 有些杂质被洗掉。3种干燥方法相比, 效果基本没有差别, 样品形态饱满, 没有缩水, 最大程度保持了样品原貌。所以, 与常规叔丁醇冷冻干燥和CO₂临界点干燥相比, 叔丁醇一步冷冻干燥法更为简单、方便、快捷。

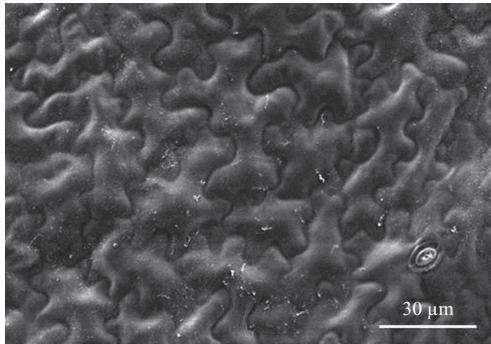


图2 叔丁醇一步冷冻干燥法干燥的拟南芥叶片
Fig.2 *Arabidopsis* leaf dried by one step tert-butanol freeze drying

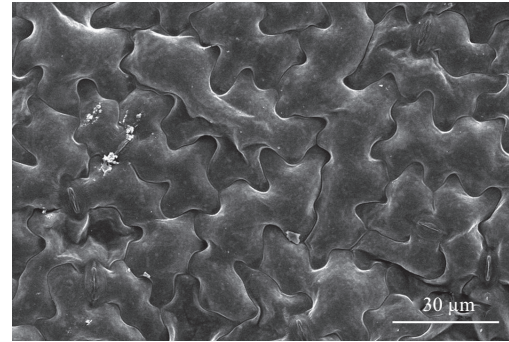
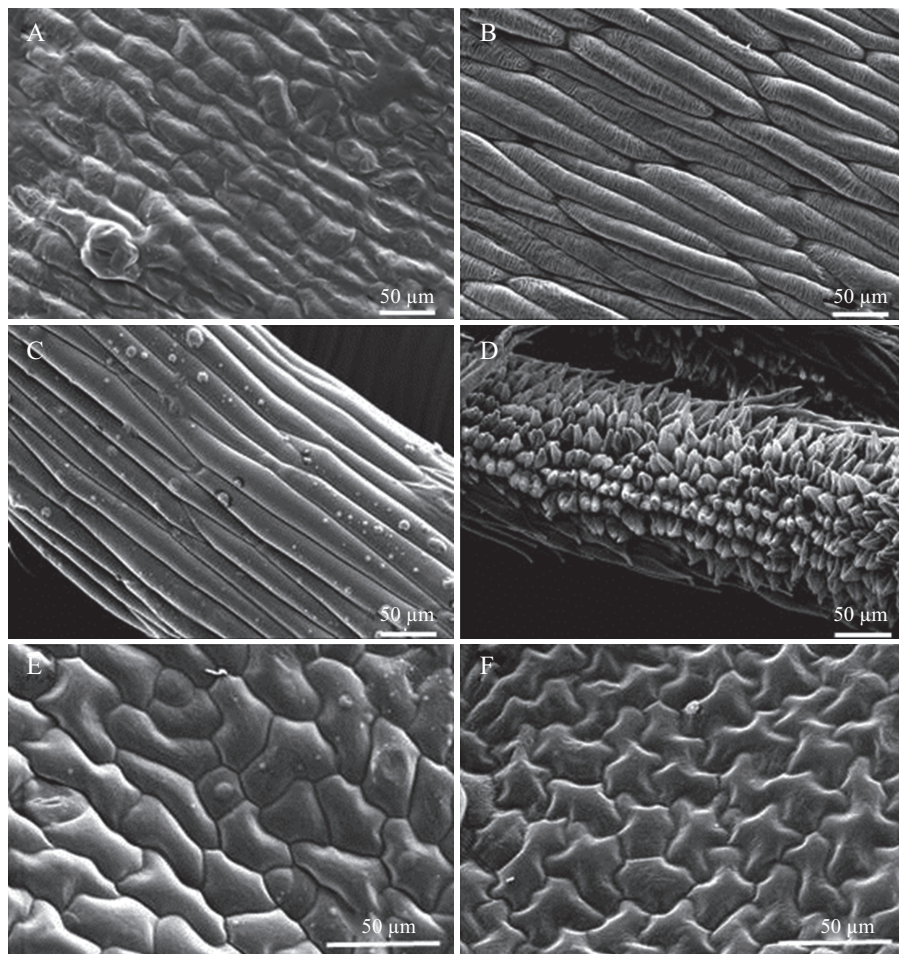


图3 CO₂临界点干燥法干燥的拟南芥叶片
Fig.3 *Arabidopsis* leaf dried by CO₂ critical point drying



A: 矮牵牛花瓣; B: 蒲公英花瓣; C: 蒲公英花丝; D: 蒲公英花药; E: 西红柿花萼; F: 西红柿叶片。
A: petunia petal; B: dandelion petal; C: dandelion filament; D: dandelion anther; E: tomato calyx; F: tomato leaf.

图4 叔丁醇一步法冷冻干燥的其他样品
Fig.4 Other samples dried by one step tert-butanol freeze drying

本研究还使用叔丁醇一步法干燥了矮牵牛花瓣、蒲公英花瓣、蒲公英花丝、蒲公英花药、西红柿花萼、西红柿叶片(图4), 干燥后的样品均形态饱满, 基本没有缩水。由此证明, 该方法适用性广, 方便、快捷。

3 讨论

CO₂临界点干燥法是植物扫描电镜样品前处理最常用的方法,该方法干燥的样品能最大限度地保持样品原貌。但是,该方法操作繁琐,有些样品对该方法中的乙醇、乙酸异戊酯等有机溶剂敏感,并且化学固定剂对固定的细胞成分有选择性,可能会引起可溶性物质的丢失甚至重新组合,使样品形态失真。叔丁醇是一种小分子醇,为无色油性液体,非极性分子,很容易挥发。叔丁醇的凝固点为25.5 °C,在室温下即可凝固,因此在低真空环境下样品可经叔丁醇的升华而达到干燥的目的,避免因气液界面的存在造成对细胞的损伤,能使细胞结构保存在活体状态^[10]。冷冻干燥过程中冷冻和脱水应力会对生物材料造成非常不利的影响,因此,添加冷冻保护剂能有效抑制冷冻和脱水引起的损伤。

在药剂学中,叔丁醇被认为是最好的冷冻干燥溶剂^[11]。叔丁醇具有理想的冷冻干燥溶剂需要的特点:凝固点高、挥发性强。在冷冻干燥配方中加入叔丁醇后,冻结时会形成针状结晶;冰晶升华后,留下了管状通道,使水蒸汽流动阻力大大减小,升华速率显著提高。添加叔丁醇保护剂冷冻后干燥得到的红细胞形态相对较为完整,这是因为叔丁醇升华过程留下了管状通道,此通道可以减少水蒸汽的流动阻力,使细胞受到的挤压相对较小^[12]。基于叔丁醇的这些特点,在本实验中省略了固定、脱水、置换等步骤,在冷冻过程中叔丁醇对植物样品有保护作用,之后快速放于-20 °C,样品得到了固定,所以省略了常规的FAA或戊二醛固定,而脱水是在冷冻干燥的过程中完成,所以就省略了脱水和之后的置换过程。

叔丁醇一步冷冻干燥法不但具有常规叔丁醇冷冻干燥法的优点,而且具有简单易行、时间短、效果好的优点。这一方法在已经发表的文献中未见报道。该方法只需要叔丁醇和冰箱、冷冻干燥器,无需其他试剂和设备。该方法不需固定、脱水、置换等处理,省时省力;尤其适于对固定液及乙醇、乙酸异戊酯等有机溶剂敏感的样品;此外,操作步骤的减少也可以降低对样品的机械损伤,最大限度地保持样品原貌。总之,叔丁醇一步冷冻干燥法是一种非常简单、快速、实用的扫描电镜样品干燥新方法。但使用本方法时需特别注意,干燥完成后需将干燥器温度升至室温,再取出样品,否则样品温度过低,易吸附水分结霜,影响样品形态。

参考文献 (References)

- 徐柏森, 杨 静. 实用电镜技术. 南京: 东南大学出版社(Xu Bosen, Yang Jing. Practical electron microscope technique. Nanjing: Southeast University Press) 2008, 93-6.
- 曹君迈, 贝盖临, 江 涌, 魏 杰, 许 鑫. 枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨. 北方园艺(Cao Junmai, Bei Zhanlin, Jiang Yong, Wei Jie, Xu Xin. Flower bud of *Lycium barbarum* L. scanning electron sample preparation methods discussion. Northern Horticulture) 2013; 3: 30-2.
- 郭素枝. 电子显微镜技术与应用. 厦门: 厦门大学出版社(Guo Suzhi. Electron microscopy technology and application. Xiamen: Xiamen University Press) 2008, 69-70.
- 肖 媛, 刘 伟, 汪 艳, 左艳霞, 胡 锐, 李婷婷, 等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法. 实验室研究与探索(Xiao Yuan, Liu Wei, Wang Yan, Zuo Yanxia, Hu Rui, Li Tingting, et al. Drying methods of biological sample preparation for scanning electron microscope. Research and Exploration in Laboratory) 2013; 32: 45-53.
- 李向党. 单用叔丁醇的扫描电镜样品制备法. 电子显微学报(Li Xiangdang. Scanning electron microscopy sample preparation by tert-butyl alcohol. Journal of Chinese Electron Microscopy Society) 1993; 1: 97.
- 高德禄, 张和民, 苏秀珍. 一种制备植物扫描电镜样品的新干燥法——叔丁醇冻结干燥法. 植物学报(Gao Delu, Zhang Hemin, Su Xiuzhen. A new drying method of plant specimens for scanning electron microscopy—the t-butyl alcohol freeze-drying method. Acta Botanica Sinica) 1989; 31(10): 770-4.
- 邵素霞, 段相林, 鹿 萍. t-丁醇冷冻干燥法在植物扫描电镜样品制备中的应用. 河北师范大学学报(自然科学版)(Shao Suxia, Duan Xianglin, Lu Ping. Application of t-butyl alcohol freeze-drying method in preparation of SEM samples. Journal of Hebei Normal University, Natural Science Edition) 1990; 4: 111-2.
- 蒋功博, 杨文庆, 许庭良. 简易扫描电镜生物样品干燥法——叔丁醇冰冻干燥法. 贵阳医学院学报(Jiang Gongbo, Yang Wenqing, Xu Tingliang. Journal of Guiyang Medical College) 1990; 15: 80-1.
- 钱天乐, 周逸卿, 邹珍友, 王 琰, 孔肖菡, 史永红, 等. 微生物扫描电镜样品清洗方法的改进与固定干燥方法比较. 安徽农业科学(Qian Tianle, Zhou Yiqing, Zou Zhenyou, Wang Yan, Kong Xiaohan, Shi Yonghong, et al. Improvement of bathing method of microorganism samples for SEM and comparison of their fixing and dryness methods. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2009; 37(23): 10886-8.
- 王响英, 吴淑燕, 李苏安, 毛隼华. 叔丁醇脱水干燥法在游离细胞扫描电镜样品制备中的应用. 苏州大学学报(医学版)(Wang Xiangying, Wu Shuyan, Li Su'an, Mao Lihua. Application of tert-butanol dehydration in the preparation of free cell for scanning electron microscopy. Suzhou University Journal of Medical Sciences) 2005; 25(5): 834-5.
- 杜 松, 左建国, 邓英杰. 叔丁醇-水共溶剂冷冻干燥工艺及其在药剂学中的应用. 中国药剂学杂志(Du Song, Zuo Jianguo, Deng Yingjie. Freeze drying using tert-butyl alcohol-water cosolvent and its application in pharmaceutical science. Chinese Journal of Pharmaceutics) 2006; 4(3): 116-21.
- 肖 鑫, 陶乐仁, 刁德成, 华泽钊. 冻干红细胞干燥过程及冻干样品的微CT实验分析. 中国医学物理学杂志(Xiao Xin, Tao Leren, Xi Decheng, Hua Zezhao. Micro-CT experimental analysis on drying process of red blood cells during freeze-drying and lyophilized samples. Chinese Journal of Medical Physics) 2007; 24(1): 12-6.