

# 扫描电镜标本制作中的若干问题

卢宝廉

(中国科学院动物研究所)

随着扫描电子显微镜的发展及分辨率的不断提高,要求标本制作的技术也更高;目前,很多珍贵的标本由于制作不好而得不到较好的照片;很多标本由于制作不好细微结构反应不出来或出现人为假象;有的照片水平太低不能发表。现在就标本制作中的问题讨论如下:

**1. 标本太脏如何处理?** 扫描电镜主要观察标本表面构造,如果表面有污物拍下来就很难看,有时污物还把要观察的细微结构挡住了,故标本拿来后,首先用生理盐水(动物用 0.85% NaCl 溶液、昆虫用 0.65% NaCl 溶液)反复洗,如表面为硬壳,可用细毛笔轻轻刷洗,如是软膜状组织,用 4% 戊二醛固定以后可放在微型超声波清洗器(银鱼牌 H66005 型,功率 50W)中处理 1—5 分钟,就可洗去表面附着的污物,在脱水过程中可在解剖镜下检查,如还不干净可用吸

管吸溶液冲洗。有些标本表面粘着粘液、脂肪、蛋白类物可用石油醚或蛋白酶处理(见图 1、2)。

**2. 标本有放电现象怎么办?** 标本放电主要是因为镀金不匀,未镀上或太少。一般镀金厚度:单层细胞、血球、菌孢子等 50—100 埃,小昆虫、小动物肢节 150—200 埃。最好是在真空度稍高  $1 \times 10^{-5}$  左右时旋转喷镀,这样金粒子细而匀。如果标本的表面绒毛、刺、棘、鳞片很多则应旋转喷镀 2—3 次(电流由低至高反复操作),让金粒子能多次喷镀于毛丛里。标本已经在观察发现放电,也可以将标本取出放入真空镀膜机中再镀金,只要镀金均匀,厚度适中就不会放电;镀金太厚(超过 200 埃)或真空度太低(金粒子太粗)都会掩盖其表面细微结构(见图 3、4)。

**3. 如何能使细胞表面结构不被破坏?** 一般

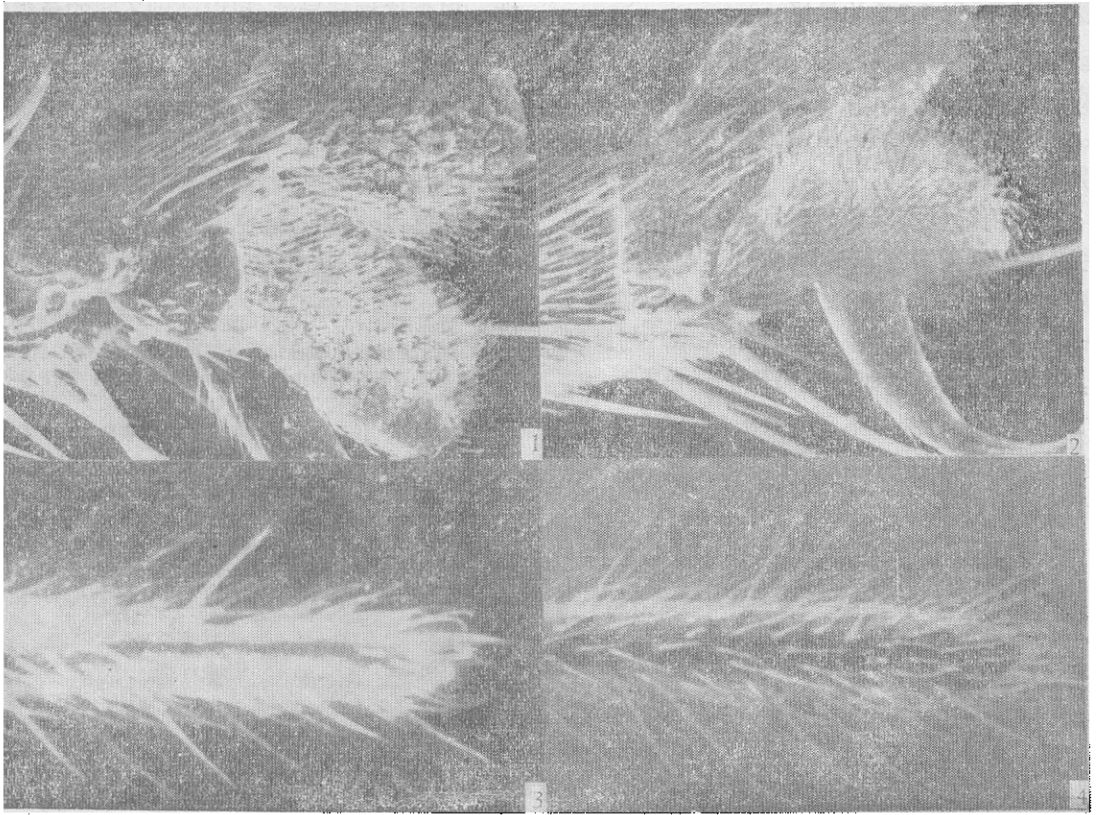


图1 麻蝇足未洗净,污物很多,400×;  
 图2 麻蝇足洗净后细微结构清晰,400×;  
 图3 军配虫触角镀金不匀,有放电现象,900×;  
 图4 重新喷镀后,照片效果良好,900×。

药品处理以后,当药品干燥时其表面张力都会使细胞表面发生变化:收缩或变形。如何能真实保存细胞表面微细结构,这是最重要的。过去国内外曾介绍过用嵌烯 Camphene 法使标本直接升华以保存表面结构,但以后证明这一方法并不理想,目前使用较多而又比较理想的方法是临界点干燥法,但应掌握好以下几点:(1)乙酸异戊酯不要带人太多,装标本时用滤纸吸去多余的乙酸异戊酯,但也不要太干或暴露在空气中时间太长。(2)液体二氧化碳按标杆指示量六格为宜,不要过多或过少;二氧化碳要纯,含水量多的不可使用。(3)打开放气阀时要缓缓排气,切忌太快,一般排气约40—60分钟;将标本取出粘在标本台上后立即镀金,然后保存于干燥器内。

#### 4. 细菌、细胞、血细胞、精子等样品如何作?

细菌、噬菌体、包涵体等必须先用0.1克分子的磷酸缓冲液洗涤,缓冲液要求为等渗的,不然细胞变形,经1000转/分离10—15分钟,除去杂物提纯样品,一次不行可多次离心提纯;包涵体需要脱去包膜,可用0.1克当量的碳酸钠泡30—60分钟,经常滴一滴在载片上用光学显微镜检查,见包膜破裂立即用0.1克当量盐酸中和,再用重蒸馏水洗;血细胞必须先加抗凝剂,缓冲液用1000—1500转/分离离心分开白血球及红血球;精液应先用缓冲液将精液稀释,再离心提纯除去粘液及杂质;样品提纯后立即固定、脱水,滴在铜片上或有载膜的铜网上,稍干燥移入乙酸异戊酯然后作临界点干燥。

5. 不镀金标本如何作? 不镀金的方法实际是利用化合物与生物体蛋白质、脂类、淀粉等的化学结合,使表面生成导电性能较好的金属化

合物来提高生物体表面对电子轰击的能力和导电率,作法是:(1)将标本表面洗净后,固定、缓冲液洗,然后放在碘化钾(配法:碘化钾 2 克、碘 0.2 克加水 100 毫升,溶解后过滤)中泡 2 天左右,标本表面就镀上一层,观察前将标本取出用缓冲液洗,用 1:1 缓冲液乙醚洗,再过一次纯乙醚,取出干燥后用导电胶粘在样品台上就可观察了。(2)将样品放入密闭容器内,用四氧化钨结晶薰 10—20 分钟,取出在大气中放置 30—70 分钟,然后再把样品放入盛有水合肼(Hydrazide Hydrate)的密闭容器中薰 10—20 分钟。(3)样品用 1% 硫卡巴肼(Thiocarbo-Hydrazide)浸 30 分钟,用重蒸馏水充分洗涤后再入 1% 四氧化钨中 30 分钟,这些方法都可得到与喷金同样效

果。

**6. 标本如何粘在样品台上?** 粘标本一般用银导电胶或树胶,要特别注意胶不能太多,不要将标本埋在胶内或将标本表面弄上胶。银胶导电性强但粘性低,标本粘不牢,旋转镀金时易甩掉;树胶粘力强,对较大的标本能粘得很牢,胶不必多,能粘住就行了,待胶干后再喷镀,如果胶未干就放入镀膜机内,一抽真空胶易起泡,会将标本移位。

细菌、细胞等要展布成均匀的单层,可先在样品台上滴一小滴 0.5% Formvar,使之形成一薄膜,干燥后再滴样品,或在样品台上粘上一块双面胶纸,将样品撒在或滴在上面,令其均匀粘上一层,镀金后观察。