

透射电镜负染标本简易制备方法

胡钢, 胡冰, 秦春, 邢桂培

(南京农业大学, 南京 210095)

摘要: 透射电子显微镜 (Transmission electron microscope) 广泛应用于生命科学领域, 能直观、准确地检测动植物组织细胞的超微结构。其中, 利用重金属盐溶液进行负染色反衬出透亮的样品, 在电镜下可快速完成样品的结构分析。负染技术包含了样品悬液制备、样品吸附、漂洗和染色等多重步骤, 每一个因素都会影响图片的成像效果。本研究针对不同类型的样品, 通过优化悬浮液浓度、染色剂选择以及吸附和染色时间等因素, 筛选快速简易的电镜负染方案, 以期在今后更好地辅助临床和科研工作。

关键词: 透射电镜; 负染; 超微结构; 悬浮液

1 材料与方法

1.1 材料

生物样品包括杆菌、噬菌体、外泌体, 材料样品有纳米金和硅球。透射电子显微镜 (Hitach-HT7700)、200 目碳支持膜铜网、醋酸双氧铀 (中镜科仪, GZ02625)、双蒸水等。

1.2 方法

在超净工作台中, 用一次性吸管吸取 1 ml 双蒸水, 缓慢冲洗固体平板上的单菌落并转移至 2 ml 离心管中, 轻柔吹打后 1000 r/min 离心 15 s, 弃上清后加入 1 ml 双蒸水重悬菌液备用。已纯化的样品 (噬菌体、外泌体、纳米金和硅球) 直接加入双蒸水, 制备合适浓度的悬浮液。分别吸取 10 μ l 上述悬液滴于封口膜上, 将覆有碳支持膜的铜网 (孔径 80 μ m) 倒扣在菌液上, 吸附 1 min 后用滤纸吸去铜网中多余的液体。待上一步样品自然晾干后, 将铜网倒扣在相应的染液中分别染色 30 s、1 min、1.5 min, 随即用滤纸毛边在铜网边缘吸干多余的染液并放置在白炽灯下烘烤 3 min 即可进行透射电镜观察。

2 结果与讨论

根据不同类型样品的特性, 控制悬浮液浓度, 选择合适的染色剂, 优化吸附和染色时间, 筛选最优的负染标本制备条件 (表 1)。

表 1 不同类型样品的制备条件

样品	浓度	染色剂	吸附/染色时间	注意事项
----	----	-----	---------	------

杆菌（有荚膜，鞭毛）	$1.0 \times 10^{13}/\text{ml}$	磷钨酸	100 s/60 S	染色剂需避光低
杆菌（仅有鞭毛）	$1.0 \times 10^{13}/\text{ml}$	磷钨酸	100 s/60 S	温储存，悬浮液
纳米金	$1.0 \times 10^{12}/\text{ml}$	钼酸铵	60 s/30 S	制备时动作轻
硅球颗粒	$1.0 \times 10^{12}/\text{ml}$	钼酸铵	60 s/30 S	柔，致病样品需
噬菌体	$2.0 \times 10^{11}/\text{ml}$	醋酸双氧铀	90 s/30 s	消毒处理
外泌体	$1.0 \times 10^{11}/\text{ml}$	醋酸双氧铀	90 s/40 S	

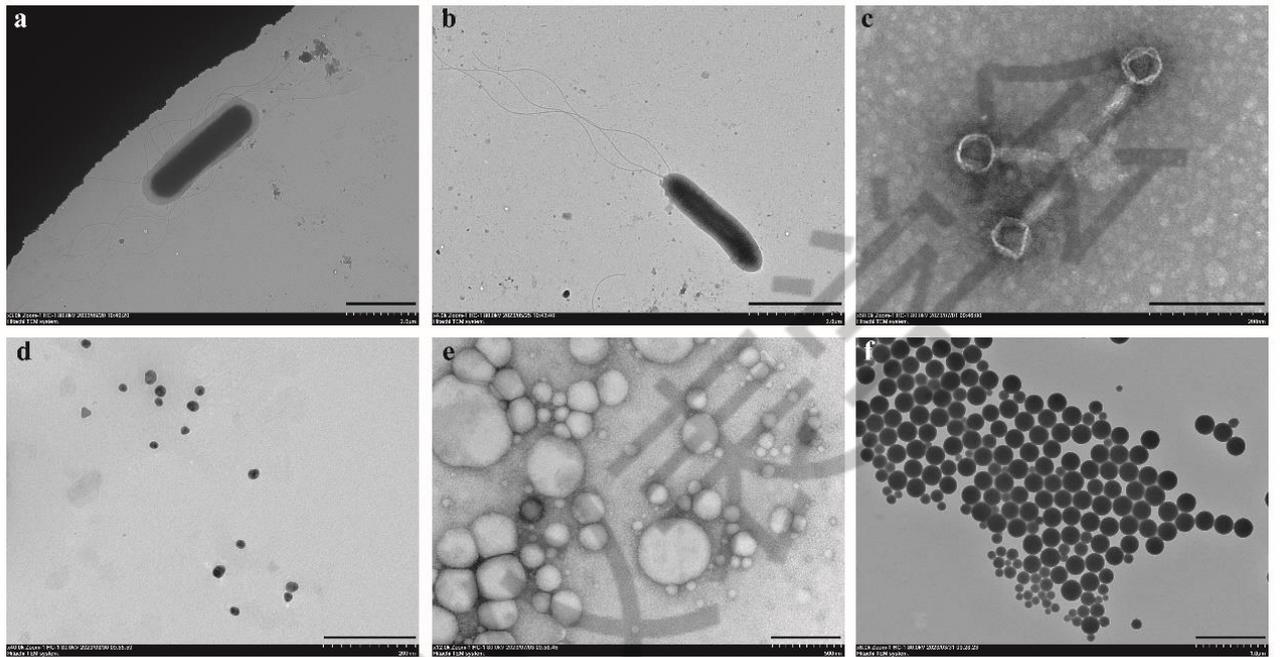


图 1 微生物和纳米材料样品的负染色电镜图

- a, 带有周鞭毛和荚膜的杆菌，Bar=2 μm ;
- b, 带有丛鞭毛的杆菌，Bar=2 μm ;
- c, 噬菌体，Bar=200 nm;
- d, 纳米金，Bar=200 nm;
- e, 外泌体，Bar=500 nm;
- f, 硅颗粒，Bar=1 μm

根据透射电镜观察结果，染色 100 s 的细菌样品背景无明显的染液污染，菌体着色适中，菌毛和荚膜保存较好，立体感强，结构清晰可见（图 1 a, b）。外泌体典型的圆盘状结构清晰可见，染色背景干净，轮廓分明，反差效果强（图 1 e）。电镜下纳米金颗粒和硅颗粒边缘清晰，视野清楚，反差明显（图 1 d f）。

负染色后进行透射电镜观察是研究微生物、外泌体和纳米材料形态最常用的实验方法。