

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	

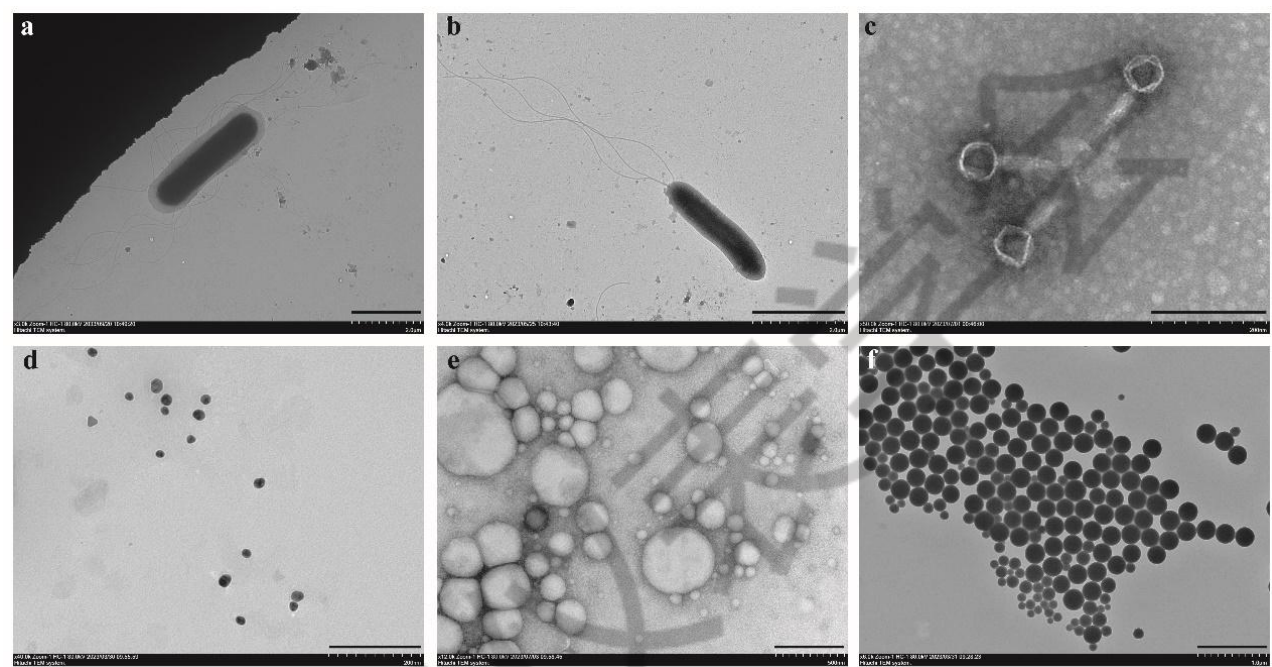


图 1 微生物和纳米材料样品的负染色电镜图

- 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。

负染色样品不需经过固定、脱水、包埋和超薄切片等复杂的制备过程。负染色技术优点明显：实验成本低，操作简单快速，分辨率较高。在样品制备过程中，通过严格控制悬浮液的吸附时间和染色时间来避免背景杂质污染和着色不均匀等问题。负染技术对于超微结构研究具有十分重要的意义。

中国仪器仪表杂志