

	文件名称：飞纳台式扫描电镜扫描电镜样品制备作业指导书		版本号：GGPT-SOP-280A	
	编制	刘丽萍	发布实施日期	2016-4-1

扫描电子显微镜生物样品制备技术

无论是透射电镜或是扫描电镜，样品均处于电镜镜筒的真空之中。而大多数的生物样品都是柔软而且含大量水分的。因此，也和透射电镜的样品一样，在进行扫描电镜观察前，必须对生物样品作相应的处理。

扫描电镜的功能很多，不同的功能对样品的要求不同。例如二次电子像与背散射电子像和吸收电子像对样品的要求基本相同，而与X射线微区分析对样品的要求相差较远。我们首先介绍二次电子像的生物样品制备技术。此外，由于样品的性质不同，其处理方法和程序也有不同。主要分两大类，一类为含水量少的硬组织，如毛发、牙齿及植物的花粉、孢子、种子等。此类样品一般含硅质、钙质，角质，珞琅质和纤维素等成份，所以通常只经过表面清洁、装台(粘胶)、导电处理等简单过程即可进行观察。如要观察其断面或内部结构时，经断裂、解剖或酶消化、蚀刻等再装台、镀膜处理，即可进行观察拍照。另一类为含水分较多的软组织，如大多数的动植物器官、组织及细菌等均属此类。对于此类样品，在金属镀膜前，一般都需经过固定、脱水、干燥等处理，如不经处理或处理不当，就会造成样品损伤和变形，出现各种假像，因此对每一处理步骤都应给予重视。

但是，不管是那一类样品的制备，都应达到以下要求：

- 尽可能保持样品活体时的形貌和结构，以便如实地反映样品本来面目。
- 在样品的干燥过程尽可能减少样品变形。
- 样品表面应有良好导电性能和二次电子发射率，以防止和减少样品的荷电效应。

样品的前期处理

扫描电镜样品的前期处理主要包括表面清洁、固定、漂洗和脱水等过程。而每一过程的处理方法基本上都是沿用透射电镜样品的处理方法的，所以，这里不一一再作详述。但是，由于两种电镜观察的要求不同，因此，在处理中也有不同之处：

- a) 透射电镜主要研究样品的内部结构要求内部结构保存好，因而样品宜尽可能小使固定液能迅时渗入固定。扫描电镜观察表面形貌，而且为了操作方便选取较大样品。一般在 $8\sim 10\text{mm}^2$ 左右，高度可达 5mm 。
- b) 扫描电镜要求完整且清洁表面，但是在许多样品的表面常附有粘液、血液、组织液及灰尘等杂物，妨碍着观察，以致造成对图像的错误解释，所以，在固定前都必须特别做好表面的清洁工作。

以下简介前期处理方法:

清洁: 对样品的清洁可根据不同的样品采用不同的方法, 其中常用的方法有:

- 表面正常干燥的样品如叶、花瓣、茎等蜡叶标本, 可用吹气球或用除尘器吹净, 也可用软毛笔轻扫等方法除去表面的灰尘和其它杂物, 但需注意不要损伤样品, 吹风和清扫的力量取决于样品的硬度和污染的程度。
- 一般动植物组织, 可用蒸馏水、生理盐水或缓冲液漂洗或冲洗。至于采用何种清洁液清洗, 要视组织本身对清洗液渗透压变化的敏感程度而定, 如用缓冲液清洗时, 应与配制固定液的缓冲液一致, 否则会因性质不同而产生化学反应从而影响固定效果。
- 对有油脂分泌物和蜡质覆盖层的样品如毛发、蛭虫等, 应采用有机溶剂反复浸洗。
- 对一些附有粘液的组织可采用酶解法或其它试剂处理来清洗, 如一般组织可用木瓜蛋白酶和淀粉酶清洗; 肠粘膜可用糜蛋白酶清洗; 用胰蛋白酶可分离和清洗胃粘膜的细胞。有些组织也可用试剂进行清洗, 如要分离神经细胞可用稀释的乙二胺四醋酸处理, 用甘油和稀释的乙醇延长浸渍时间可以从分泌乳腺中除去乳汁等。
- 对微小的样品要用离心法或放在用镍过滤网制的小容器中清洗。
- 对于特殊的样品还须用特殊的方法进行清洗。

固定: 样品的固定、漂洗和脱水等处理所用的试剂和方法基本上与透射电镜的样品相同, 但由于扫描电镜观察的是样品的表面, 主要是要求保持样品表面的原貌, 因此, 在固定、漂洗和脱水过程也与透射电镜样品处理有不同之处。

除采用戊二醛、四氧化锇、高锰酸钾等固定液进行固定外, 还可采用下列几种固定液:

- Sjodstrand 固定液:

A 液: 氯化钠 40.3g+氯化钾 2.1g+钙 0.9g+双蒸馏水 500ml

B 液: 醋酸钠 9.714g+凡罗那钠(Veronal)14.74g+双蒸馏水 500ml

使用时吸取 A 液 10ml, B 液 3.4ml, 再加 0/1mol/L 盐酸 11ml 和锇酸 05g+50ml 蒸馏水

Dalton 氏固定液:

此种固定液为 4%重铬酸钾(pH7.2)与 3.4%氯化钠等量混和后, 再与 2%四氧化锇等量混使即得。

这种固定液无沉渣, 对样品损伤少。

在能保持样品不变形的前提下, 不少样品(特别是植物样品)采用戊二醛单固定即可。

为了加强固定效果，还可将几种不同的固定液配合使用，进行双固定或多次固定(尤其是动物样品)；如用戊二醛作前固定，用锇酸作后固定。

脱水：脱水剂常用乙醇和丙酮。丙酮能使组织块变硬，是它的优点。

样品的干燥

生物样品的制备中，干燥是最关键的步骤。干燥过程除引起样品收缩之外，水的表面张力会使样品表面形貌发生很大的变化，这对扫描电镜的表面形貌观察特别有害。在透射电镜的样品制备中用乙醇脱水，是为了包埋剂的渗透(因水不与包埋剂互溶，而乙醇则能互溶)。而在扫描电镜的样品制备中，脱水是用表面张力小的乙醇取代表面张力很大的水，从而使干燥过程对样品表面产生的影响较少。然后就是如何设法使样品表面不受或少受表面张力影响的条件下除去乙醇，这就是干燥。目前常用的干燥方法主要有空气干燥法、临界点干燥法、冰冻干燥法、真空干燥法和苧烯干燥法等。

空气干燥法

空气干燥法又称自然干燥法，就是将经过脱水的样品，让其暴露在空气中使脱水剂逐渐挥发干燥。此法的最大优点是简单易行和节省时间，它的致命缺点是在干燥过程中，组织会因脱水剂挥发时表面张力的作用而产生收缩变形。因此，此种方法一般只适用于外壳(表面)较为坚硬的样品。

在采用空气干燥时，为了减少样品的收缩变形，除使用易挥发和表面张力小的脱水剂如乙醇、丙酮等外，还应使样品得到充分固定，特别是须经四氧化锇固定效果才较好。因为它会使组织变得较为坚硬，使收缩变形减少。

然而，空气干燥引起的收缩并非完全不利，有时可以通过收缩使细胞之间相互剥离，从而能清楚地观察到一个个单独存在的细胞及其表面结构。此外，还可通过细胞成份在干燥时的收缩，观察到细胞内的线粒体、细胞核等成份的存在。但这种机会很少，而且因收缩带来的不利是主要的，所以，目前很少采用。

临界点干燥法

临界点干燥法是一种消除了物相界面(液相 / 气相)，也就是消除了表面张力来源的干燥方法。这种方法由于没有表面张力的影响，所以样品不易收缩和损伤，此法所用的仪器结构不甚复杂，操作较为方便，所用的时间也不算长，一般约 2h 左右即可完成，所以，是最为常用的方法。

物质的临界点是 1822 年由 Charles cagridge La Tour 发现的。他将不同的液体分别装进玻璃试管并密封起来，然后一边转动一边加热，这时，他发现随着温度的升高，试管内的液相和气相之间的弯月面开始变得模糊起来，只有在试管冷却之后，弯月面才又重新出现。每种液体都存在某一温度，在这一温度时，液相的弯月面完全消失。

那么,弯月面的消失意味着什么呢?它意味着液相和气相之间的界面没有了,之所以出现这种现象,是因为在密封的容器里,液体受热膨胀,而气体本身被压缩,最后在某一特定的温度和压力下,液体由于膨胀,气体由于被压缩而使两者的密度相同,因而相互混合成一种均一的流体,原先存在它们之间的弯月面(即液面)就消失了,表面张力也自然消失了。因此,所谓临界点,就是指使物质的气态和液态两相之间达到相同密度,成为均一流体状态时的温度和压力的总称。此时的温度称临界温度;此时的压力称临界压力。

不同的物质都有其特定的临界点,一般用于扫描电镜样品临界点干燥的置换剂的临界温度和压力见表 10-1。如果在临界点进行干燥,由于表面张力消失就不会造成样品表面的损伤。但进行临界点干燥,需用专用的临界点干燥器。具体处理步骤如下:

- 1) 固定脱水 按透射电镜常规制样方法进行。
- 2) 纯丙酮置换乙醇 如样品是用乙醇脱水的,在脱水至 100%后,用纯丙酮置换 15~20min。
- 3) 中间液处理 即在用丙酮置换乙醇后,用醋酸异戊酯(乙酸异戊 B8)处理 15-80min(也可以过夜)置换丙酮。由于醋酸异戊酯与液态二氧化碳能互溶,使液态二氧化碳容易渗入样品中。
- 4) 装样 将样品从醋酸异戊酯中挑入(或倒入)样品笼中,用滤纸吸去样品笼外围的醋酸异戊酯,然后连笼移入仪器的样品杯(高压容器)内,盖上盖并拧紧以防漏气。(注:在装样前,应先打开仪器电源,将温度调节设定在 0℃处预冷 10~15min,以保证液态二氧化碳有足够量进入样品杯中)。
- 5) 注入液体二氧化碳 依次打开二氧化碳钢瓶排气阀和仪器的进气阀在 0~10℃下,向样品杯注入液体二氧化碳。
- 6) 漂洗 当液体二氧化碳充至样品杯容积的 50%(通过刻度尺观察,以液面超过样品笼为度)时,关闭仪器进气阀,静置 15~20min,让醋酸异戊酯向液态二氧化碳中充分扩散,然后,打开仪器排气流量计阀门和进气阀门,让其边排气边充液 10min 左右,(让含有醋酸异戊酯的二氧化碳排出和充入新鲜的液态二氧化碳)再关闭排气阀;继续充入液体二氧化碳至样品杯的 80%左右,关闭进液阀,停止充液。
- 7) 加温置换 将温度调节设定在 20℃处经 15~20min 后,由于温度升高,杯内液体二氧化碳逐渐气化,因此,压力也随之上升至 7000Pa 左右,样品中的醋酸异戊酯将与二氧化碳充分置换。
- 8) 气化 将温度旋钮调至临界温度以上(35~40℃),此时随着温度升高,样品杯内的压力也逐渐增加,达到二氧化碳的临界点,界面也随之消失。当压力达到 7134Pa 时,经 5min 后,即可排气。
- 9) 排气 在保持温度不变的条件下(即不关电源),打开流量计的排气阀门,以 1.0~1.51 / min 的速度排气(速度慢些更好)。约经 45~60min 后,排气完毕,样品杯的压力下降到零,将温度调节至室温约 5min 后,即可取出样品装台镀膜(若不能立即装台,应置于干燥器内保存)。
- 10) 临界点干燥的成败如何;与每一步的操作有很大关系,因此,操作时应注意以下事项:
- 11) 在样品放进样品杯前,样品杯应预先冷却至 0~10℃,因为温度过高,充入的液体二氧化碳会立即气化膨胀,压力增加,妨碍二氧化碳液体继续进入样品杯。
- 12) 样品不宜过湿,但也不能让其表面干涸,应在半干半湿时送入样品杯。因为过湿表明乙酸异戊酯太多会干燥后样品仍含有乙酸异戊酯,影响干燥效果。而过干又会因空气干燥而造成样品已变形,再进行临界点干燥也没有意义了。

- 13) 一次加入的样品不宜过多, 以免带进过多的中间液, 使样品干燥不完全, 另外, 样品过多使二氧化碳量充入不足而达不到临界点。
- 14) 充入液体二氧化碳的量要足。因为充液量不足, 达不到临界值, 起不到临界点干燥作用, 一般充液量应达样品杯容积的 2/3 左右。
- 15) 在加温气化时, 实际操作温度应超过临界值, 以保证达到充分的临界状态。
- 16) "开"、"闭"阀门时, 动作要轻缓, 尽量防止二氧化碳液对样品产生突然冲击而造成样品损伤。因此, 样品笼的上下应垫上一层镜头纸或滤纸。排气速度也应尽量缓慢, 一般放气时间应在 40min 以上, 有时也可以放气过夜或过中午。
- 17) 二氧化碳临界点干燥法除用液体二氧化碳外, 也有用固体二氧化碳(干冰)作干燥介质的。与液体二氧化碳比较, 固体二氧化碳有以下优点:
- 18) 有利于微小样品的干燥, 例如像玻璃片上的游离细胞, 若用液体二氧化碳干燥, 由于二氧化碳气体急剧地喷入样品杯内很可能使样品被吹掉, 而用固体二氧化碳干燥, 则完全没有这种危险。
- 19) 不需要用钢瓶, 钢瓶很重, 搬运麻烦; 用固体二氧化碳时, 有适当大小的保温瓶(如冰壶)就可以了, 因此很方便。
- 20) 能保证二氧化碳装满样品室, 即使用固体二氧化碳时, 每次都能准确地放入足够酌量, 而不会像使用液体二氧化碳时由于钢瓶中二氧化碳不足, 充不进样品杯内, 使样品干燥不完全而造成损伤。
- 21) 夏天使用方便 在使用液体二氧化碳时, 若室温超过临界温度, 液体二氧化碳难以从钢瓶进入样品室, 而固体二氧化碳则不受室温高低的影响, 即无论多热的天气也能放进足够量。
- 22) 不污染样品 使用液体时, 往往由于钢瓶内有铁锈粉末充进样品杯而污染样品, 而固体二氧化碳则无此种污染。
- 23) 固体二氧化碳临界点干燥法除使用专门装置外, 也可用任何一种液体临界点干燥器, 不过由于液体临界点干燥器的样品室较小, 操作起来不大方便。固体二氧化碳临界点干燥法的样品处理(固定、脱水等)与液体二氧化碳临界干燥法相同, 所不同的是在于干燥时的具体操作。其操作步骤是: 先将干冰用加热器切成样品杯容积大小的圆柱体(也可敲成碎块或粉末), 放于样品笼的顶部, 盖好样品杯盖, 然后加热到 15℃, 使干冰熔化成液体二氧化碳, 这时干燥器内的压力上升, 再加热到 40℃, 使液体二氧化碳逐渐气化, 压力继续上升达到临界值, 几分钟后即可排气(温度不变)。当气体全部排出, 压力回到零后, 即取出样品, 装台镀膜观察。

冰冻干燥法

冰冻干燥是将经冰冻的样品置于高真空中通过升华, 除去样品中的水分或脱水剂的过程。冰冻干燥的基础是冰(或固态溶剂)从样品中升华, 也就是使水分从固态直接转化为气态, 不经过中间的液态, 不存在气相和液相之间的表面张力对样品的作用, 因此, 能较好地避免或减少了在干燥过程中对样品的损伤。冰冻干燥方法有两种, 即含水样品直接冰冻干燥和样品脱水后从有机溶剂中冰冻干燥。

含水样品直接冰冻干燥法:

此法相对于临界点干燥有其明显优点, 即能直接使含水样品冰冻干燥, 不需要用有机溶剂脱水和置换, 避免了无极性溶剂对样品成份的抽提作用, 因此, 不会使样品收缩和膜结构或表面物质产生穿蚀。如用此法干燥植物叶的样品, 叶面角质层能保持自然状态, 从而得到好的实验样品。

含水样品冰冻干燥的步骤如下：

- 1) 取材固定，按常规方法进行。
- 2) 冰冻保护剂渗透 将样品置于 10%~20%的二甲基亚砷(DMSO)水溶液或 15%~40%的甘油水溶液，或氯仿中浸泡数小时。
- 3) 骤冷 将经保护剂处理过的样品迅速投入到用液氮预冷到-150℃的氟利昂 12 或氟利昂 22 冷冻剂中，使样品中的水分在片刻间冻结。
- 4) 升华干燥 将已骤冷冻结的样品移到冰冻干燥器内已预冷的样台上(保持-70℃以下),抽真空(真空度为 10~10⁻¹Pa), 经几小时或数天后，样品即达到干燥；
- 5) 装台镀膜 先将冰冻干燥器的样品台加热至室温，然后将干燥器放气，取出样品迅速装台粘样，送入镀膜仪中镀膜。

但是这种方法也有其不足之处，就是干燥时间太长，如单层细胞也要几小时才能达到干燥，而几毫米厚的组织块可能要持续干燥一至数天，同时要判断是否干燥也较为困难，冰冻过程中会形成冰晶，使细胞成份因受冰晶挤压而产生移位和变形，造成人为的网状结构。因此必须采取一些防止这一不良情况产生的措施，以使样品的损伤减少到可以忽略的程度。

为了防止冰晶的形成，可采用以下办法：①用骤冷剂提高冰冻速度。常用的骤冷剂有氟利昂 12 和氟利昂 22；此外，液态-固态氮的半凝固状混合物的温度可低至-210℃，因此可作为骤冷剂；②用冷冻保护剂如二甲基亚砷、甘油、明胶或氯仿处理样品，能抑制水分子集成冰晶和限制冰晶的大小，以保护样品免受冰晶的损伤，尤其以氯仿处理的效果为好，因为氯仿易于挥发，不留在样品表面而影响观察。此外，透射电镜冰冻制样技术中的冷冻方法，也适用于扫描电镜。

样品脱水后的冰冻干燥：

这种方法是用乙醇或丙酮脱水后过渡到某些易挥发的有机溶剂如乙醚、氯仿、氟利昂 113 等中，然后连同这些溶剂一起冰冻并在真空中升华(直接用于脱水的乙醇作为冰冻干燥剂也有效)而达到样品干燥的；这种方法相对于前一种方法有下列优点：即有机溶剂在冰冻时形成非晶体固态，不像水那样结冰时膨胀，因此不会产生冰晶对样品的损伤。有机溶剂能以比水快得多的速度从固态中升华，因此，干燥时间比上一方法短得多，不需要专用的冰冻干燥装置，只用普通的真空干燥器加一块金属块作样品台即可。但此法也有不足之处，就是有机溶剂对样品成份有抽提作用，易造成部分内含物丢失。

此法的操作程序与前法基本相同，只是无需用冷冻保护剂处理而已。现将几种方法介绍如下：

氟利昂 TF 冷冻干燥法：

- 1) 固定脱水按常规方法进行。
- 2) 置换 按图中所示的比例配好氟利昂 TF 和酒精混合液，并通过这些混合液将样品逐步引入 100% 氟利昂 TF。
- 3) 冷冻 把样品浸入液氮中冷冻。

4) 干燥 将样品放在预先冷却的铝座上,再移入真空喷镀仪中抽真空(约 1Pa),经 0~20min 后即完全干燥。90min 后铝座变为室温,即取出样品、装台、镀膜观察。

● 乙腈(acetonitrile)真空干燥法:

这是一种利用乙腈在急速蒸发时会冷却固化这一性质,将样品干燥的很独特的方法。其操作步骤如下:

固定、水洗按常规方法进行。

- 1) 脱水 使用上升的系列乙腈(50%~100%)脱水各 20min。
- 2) 渗透 在容量约 1ml 的铝制容器中装满乙腈,并投入样品。
- 3) 升华 把容器放入真空喷镀仪中抽真空,此时由于乙腈急速蒸发而使容器急剧冷却,其中乙腈也变成冰状固体。然后继续抽真空,使乙腈升华,约经 30min,样品即达干燥。
- 4) 待容器回升到室温后,即可取出样品装台镀膜进行观察。
- 5) 据田中敬一报道此法干燥的效果与临界点干燥没有什么不同。

苈烯干燥法

苈烯是一种樟脑类无色结晶体,能溶于醚、环乙烷、环己烯和氯仿中,室温下呈固体状,能在较低的温度下升华,从固态直接变成气态,表面张力小,故经它干燥的样品较松软,变形小,操作也较简便。

苈烯干燥法是由 Warrens. Buk 于 1971 年提出的,其操作步骤如下:

- 1) 取新鲜材料迅速投入 0.1mol/L 磷酸缓冲液中漂洗,然后投入 5%的戊二醛(用磷酸缓冲液配制的 pH7.4)中固定 1h。
- 2) 转至加有 5.4%蔗糖的 0.1mol/L 磷酸缓冲液中,在冷冻温度下过夜。
- 3) 用 1%的四氧化锇(磷酸缓冲液配制)溶液中固定 2h。
- 4) 用磷酸缓冲液或双蒸水漂洗 2~3 次,每次、15min。
- 5) 用 30%, 50%, 70%, 90%, 95%和 100%丙酮脱水,每级 15min。
- 6) 用 100%的苯脱酯。
- 7) 在 1:1 苯与环氧丙烷中浸泡 15min,再转至纯环氧丙烷中,在 45℃下经 20min 后,转入预先在水浴箱中加温成液体的苈烯中浸透,取出样品装台。

放入真空干燥器中,在室温下抽真空 1h 左右,使苈烯直接从固体中升华,然后镀膜。

样品的装台粘胶

将样品装固在样品台上,最好采用导电胶。常用的导电胶有两种:一种是银粉导电胶,这是一种将很细的银粉拌在低电阻树脂液内制成的胶水,使用较为方便,这种树脂的绝缘电阻低,干后的电阻率仅

为 $0.02\Omega / \text{mm}$ ，并可以被溶剂溶解还原,也有其它产品的银粉导电胶。另一种是将石墨粉拌在低电阻树脂液内的碳导电胶，它价格低廉，效果也很好。

对不镀膜而直接观察的样品，必须用导电胶来粘固，对于要镀膜的样品，则可以用其他胶水(如万能胶、乳胶等)来代替，微细的样品(如粉末、纤维)也可用双面胶纸来粘贴。

样品底面面积较小的样品(如圆形)，装台粘胶时，不能像图 10-3(a)那样，胶水仅涂样品与样品台接触的那一小部分，这样不仅样品不易装固，而且镀膜时产生死角，金属膜层与样品台不相接，导电性能差，易产生充电现象，从而影响观察和拍照。因此，应多涂点胶，像图 10-3(b)那样，这样就能保证镀层在最薄的情况下也能与样品台形成连续的导电膜，同时也使样品粘得牢；样品粘好后应待胶水层内外都干透后才进行镀膜和观察，否则会影响镀膜效果和污染电镜镜筒，尤其是光栏。

对于大块的多角形的厚样品，装台时，胶水也应涂成斜面。对纤维类样品，可以像牙刷那样穿在钻有孔的样品台上，齐根处涂以胶水加固(观察横切面时)或平粘于样品台上，两端用胶水固定(观察纤维表面时)。

对于微粒、粉末类样品粘胶时应尽量避免成团，以利于寻找典型图样和提高镀膜效果，对于此类样品，可制成稀的悬浮液，然后滴在样品台上，或在样品台上粘上双面胶纸后，用牙签缠上棉花蘸取粉末样品，再用吹气球将样品轻轻吹落在样品台上，效果也较好。

总之不论是那类样品，都应达到粘胶牢固，便于镀膜和图像背景美观清晰的要求。