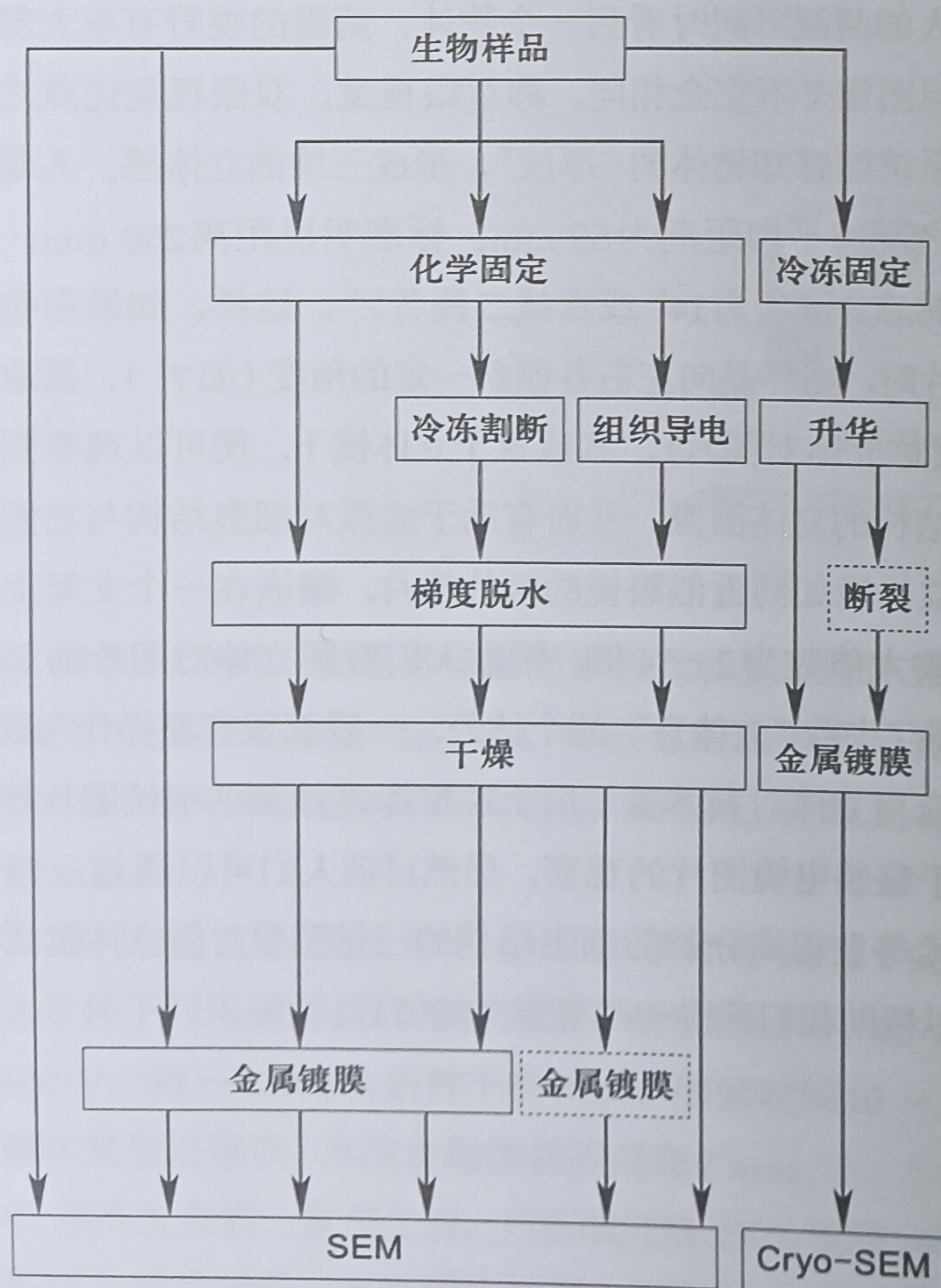


1.7 扫描电镜生物样品制备技术

扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 是利用电子束与固体样品作用产生的各种物理信号进行成像或成分分析, 对于生物样品而言主要是应用二次电子像进行表面形貌的观察, 也有以背散射电子像进行成像研究。根据研究对象的性质及目的要求不同, 扫描电镜制样方法也各不相同 (图1-90), 对于干燥的样品如某些昆虫、植物种子、毛发、牙齿等, 可以经过表面清洁后直接粘样镀膜观察; 对于样品内部含水而外部水分较少的样品如植物茎、叶、花, 以及部分菌类、昆虫等, 最佳方法是经过快速冷冻和表面升华, 直接进入冷冻扫描电镜观察。大部分含水生物样品, 如腔隙类器官组织、培养细胞、水生生物、已浸泡在固定液中的样品等, 均需要经过取材、清洗、固定、脱水、干燥及金属镀膜等处理以后, 才能进行镜下观察。生物扫描电镜样品制备过程必须遵循两个基本原则: 一是尽量保持生物样品的原始状态; 二是增加样品导电性能, 提高二次电子产率。



↑ 图1-90 扫描电镜生物样品制备技术

1.7.1 常规扫描电镜生物样品制备

大部分生物样品具有以下主要特点: ① 含水量较多, 有的可达80%以上, 质地

较柔软; ② 机械强度低, 对热、干燥、压力和电子束轰击的耐受力差; ③ 一些生物样品的形貌结构易受渗透压、pH、湿度等环境因素影响; ④ 绝大多数生物组织主要是由低原子序数元素组成, 导电性能差, 二次电子产率低。

因此, 为了保持生物样品的自然状态, 提高样品的导电性能, 一般生物组织细胞均需要经过取材、清洗、固定、脱水、干燥及金属镀膜等处理后, 才能进行电镜观察 (图1-91)。

1.7.1.1 取材

取材是整个样品制备过程中的关键步骤之一, 其基本原则是根据研究目的选择合适的取材方法。例如: 大鼠肠黏膜上皮取材方法与小鼠不同, 贴壁培养细胞和悬浮培养细胞取材方法也不同, 即使同一种悬浮培养细胞或细菌, 可以用离心法收集取材, 也可以滴在玻片上吸附取材, 但不论哪种取材方式, 均应遵循以下原则。

① 取材前做好药品及器材准备, 并根据实验目的与需要, 制定取材方案。取材用的刀片等器械要使用锋利的不锈钢材质, 事先用丙酮擦去外层的油渍; 操作要轻巧敏捷, 避免对样品的牵、拉、挤、压等损伤, 尽量避免取材器械与待观察面的接触, 特别注意保护好观察面, 做好观察面的标记。

② 取材部位要准确, 取样大小要适当。以观察组织表面结构为主的样品, 样品块可以稍大, 其直径最大不宜超过5 mm, 高度可在3~5 mm; 为提高固定、脱水、干燥及镀膜效果, 在满足所需要观察内容的前提下, 样品块以尽量小、薄为宜, 选取有代表性的部位, 减少非观察部位。

③ 材料应尽量新鲜, 要按研究目的、样品的特点, 选择适当的时间取样。

1.7.1.2 清洗

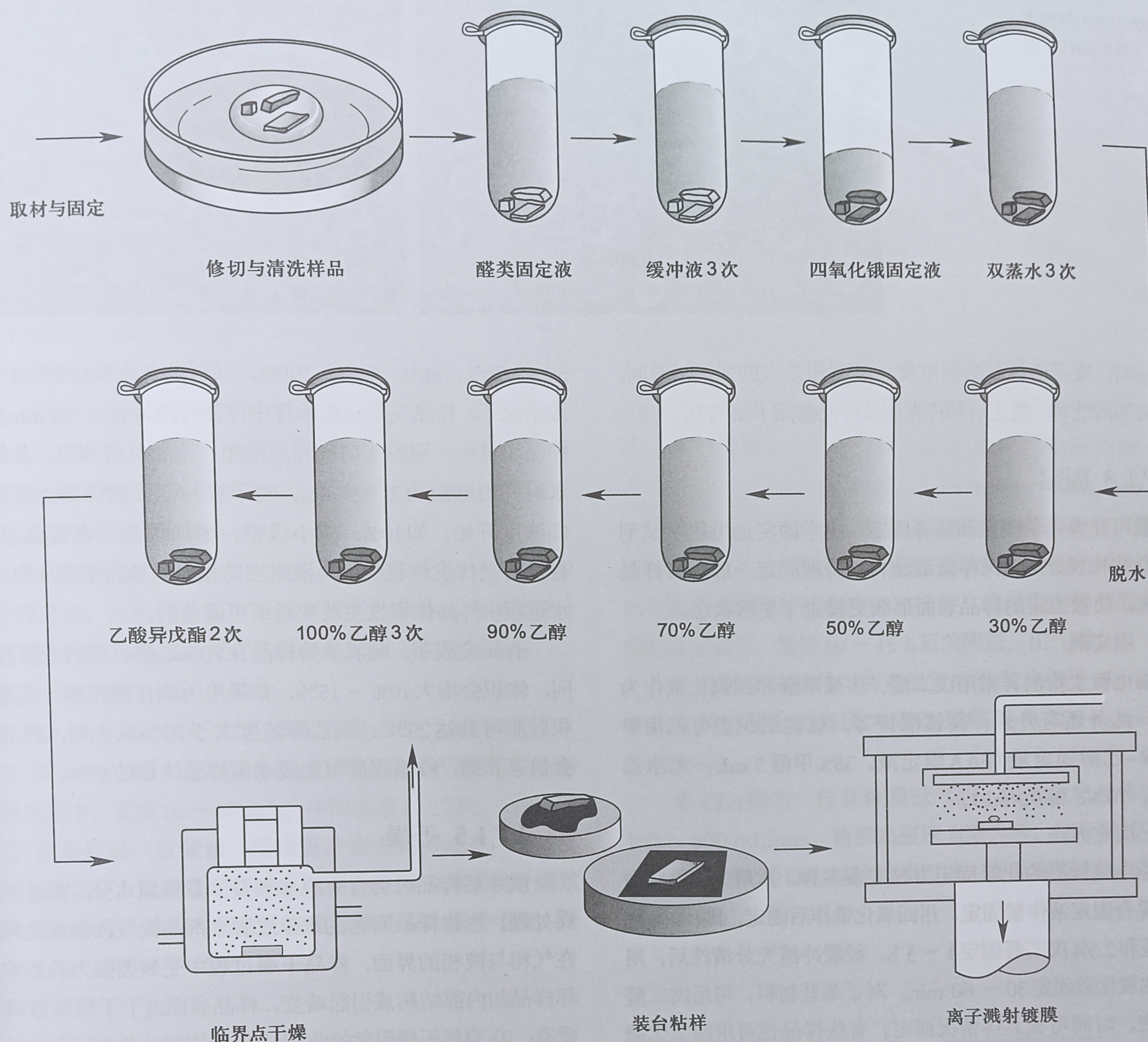
扫描电镜主要观察样品表面, 因此在很多情况下需要对样品表面进行清洗, 如清除覆盖于样品表面的黏液、血液等污物, 通过清洗充分显露样品表面的微细结构 (图1-92)。清洗方法如下。

(1) 直接吹拭法

对于表面干燥、坚硬的样品, 如骨、齿、表皮、毛发、指甲、爪、植物的茎叶、花瓣、昆虫等, 可用洗耳球等吹拂, 也可用软毛笔轻轻刷除, 清洁表面灰尘和其它杂物。

(2) 振荡水洗法

对于培养细胞、气管内壁、植物根等一般组织细胞可选择在固定前或固定后都要用双蒸水、生理盐水、各种缓冲液等对样品进行浸洗、漂洗、流洗或冲洗。将样品放入干净的玻璃小瓶内, 倒入足量的清洗液, 按一定方向轻轻摇动小瓶, 并反复



↑ 图 1-91 常规扫描电镜生物制样操作程序

更换新清洗液，以达到充分清洗的目的。对于表面覆盖黏液和杂质等的样品，多在固定之前先彻底清洗干净后，再放入固定液中。

(3) 酶解法

对表面覆盖大量黏液的样品如胃黏膜、肠黏膜等组织，可在样品被预固定之后，选用不同的低浓度蛋白水解酶，如胃黏膜用胰蛋白酶、肠黏膜用糜蛋白酶等，将这些黏液类物质分解成易溶于水的物质或颗粒状沉淀，再用水洗去。采用酶解法必须注意所用清洗液的浓度和时间，避免正常组织的损伤。

(4) 离心清洗法

与样品比重差异大的杂质，如游离细胞、微生物及其它微小生物样品，及去除血清等黏液里的物质很有效。离心的速率、时间与次数，要视样品及需分离物的大小和重量而定。

(5) 有机溶剂清洗法

某些特殊样品则需要针对性地选用一些特殊的清洗液，如

表面有蜡质的材料，要用氯仿、二甲苯脱蜡等处理再清洗；如乳腺组织，含有多蛋白质与脂质，所以需分别用16%甘油和20%乙醇浸泡处理，才能清洗干净。

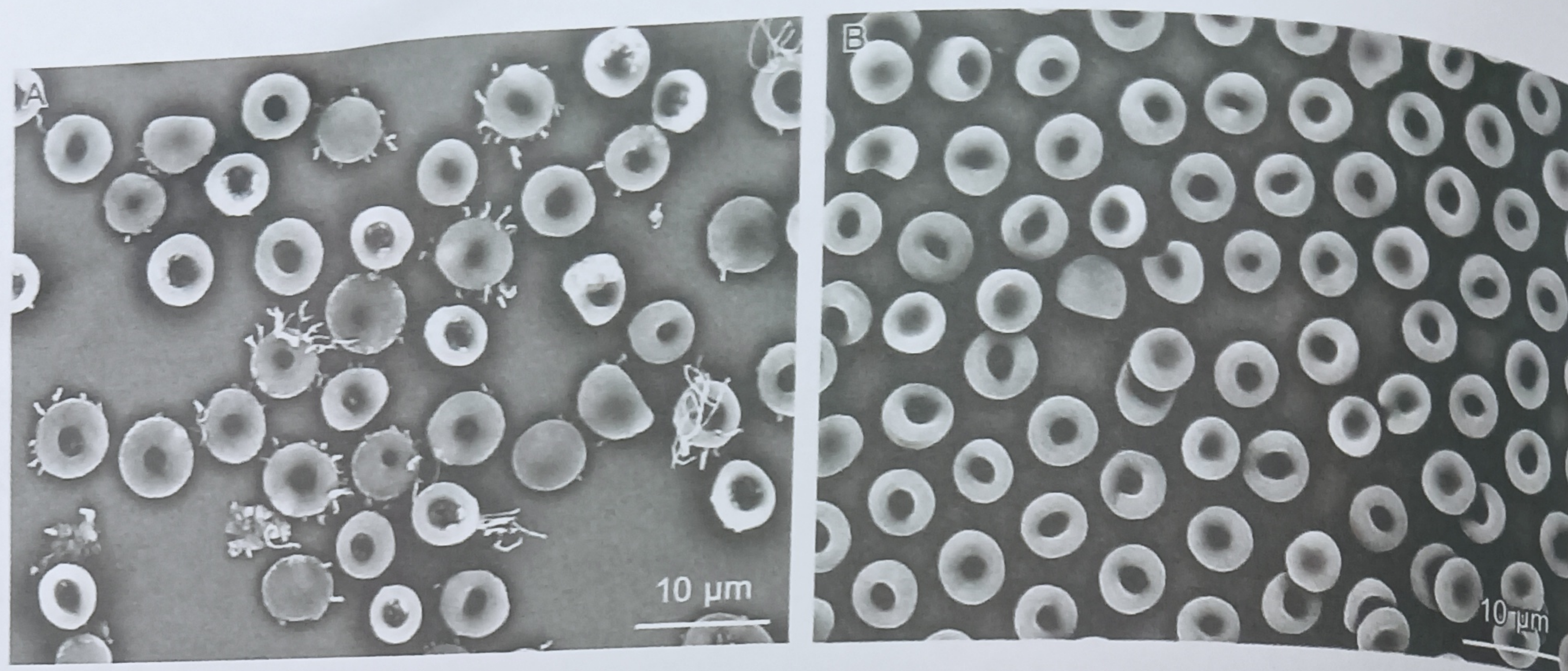
(6) 酸碱腐蚀法

有些顽固的杂质掩盖细节的外膜等，可用酸碱腐蚀后再反复用缓冲液洗净，根据杂质及样品的情况选择腐蚀液的种类与浓度，注意保护样品观察细节不受损伤。例如：覆盖于内耳壶腹嵴表面的胶质状膜，需用5%~10%盐酸浸泡才能被清除；消化道可用10 g/L乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、5 g/L碳酸氢钠清洗；呼吸道用70 g/L碳酸氢钠清洗；气管、子宫颈部的黏液可用20 g/L N-乙酰半胱氨酸清洗。但多数生物样品对酸碱较敏感，易产生损伤，应少用。

清洗生物样品时应注意：在选择清洗液时，使其pH、渗透压及温度接近组织细胞处于活体状态时的生理条件。在多次更换清洗液的操作中，应避免夹持样品。用喷射或作用较强的溶剂

→ 图 1-92 扫描电镜样品清洗效果比较

A. 未清洗干净的红细胞;
B. 清洗干净后的红细胞



清洗样品时,要严格控制溶剂浓度、温度和处理的时间。用有机溶剂清洗时,防止溶剂挥发而使样品暴露于空气中。

1.7.1.3 固定

一般可分为化学固定和物理固定,化学固定是用化学试剂稳定细胞结构成分,以保存微细结构;物理固定一般是将样品快速冷冻,使被固定的样品表面形貌更接近于生活状态。

(1) 固定剂

扫描电镜生物制样常用戊二醛、多聚甲醛和四氧化锇作为固定剂,此外还有升汞、高锰酸钾等,植物组织也可以用甲醛-乙酸-乙醇固定液(FAA固定液,38%甲醛5 mL,无水乙酸5 mL,70%乙醇90 mL)。

(2) 固定方法

扫描电镜样品的化学固定方法有很多种,常用多聚甲醛与戊二醛混合固定液作前固定,用四氧化锇作后固定,即:40g/L多聚甲醛和2.5%戊二醛固定1~3 h,经缓冲液充分清洗后,用10 g/L四氧化锇固定30~60 min。对于某些材料,可用戊二醛单一固定,时间可视具体情况而定。有些样品也可用四氧化锇单一固定,时间一般在30~60 h,如观察固体培养的真菌菌丝,可用四氧化锇蒸气熏蒸固定,但目前多采用冷冻固定替代。

对于缺血缺氧反应敏感的组织可选择灌注固定法,操作同透射电镜制样。而有些样品如干燥的种子、昆虫、甲壳动物、毛发等,即使不固定,其形态结构也不会发生变化,所以可以不用化学固定。

(3) 固定注意事项

① 固定液的液体量要充足,样品量与固定液的体积比在1:20以上,固定期间轻微摇晃,使样品得到充分固定。

② 有些样品易漂浮于固定液表面,如肺组织、植物叶片等,可采用抽真空法去除样品中气体,使样品完全浸没在固定液中。

③ 化学固定不可避免会引起样品不同程度的皱缩变形,这在扫描电镜制样中需引起关注。

1.7.1.4 脱水

脱水剂通常是水溶性、低表面张力的有机溶剂,如乙醇、丙酮、叔丁醇等,脱水剂的浓度由低至高,浓度梯度为30%、

50%、70%、80%、90%、100%,以逐渐去除样品中的水分。一般情况下,样品在每一级浓度中停留时间为10~15 min。如果样品块较小,则脱水时间相应缩短,比如单层细胞,其每级脱水时间可缩短为2~5 min。对于容易变形的样品,需要从更低浓度开始,如10%,减小级差,增加级数。在脱水过程中,有机溶剂挥发性较强,换液时应防止样品暴露于空气中。在脱水过程中样品体积发生改变是不可避免的。

有研究表明,哺乳动物样品在70%乙醇以前的浓度脱水期间,体积会增大10%~15%,如果用丙酮作脱水剂,引起的体积肿胀可高达25%;当乙醇浓度大于70%以上时,样品体积会快速收缩,收缩程度可达脱水前样品体积的67%。

1.7.1.5 干燥

脱水后样品内仍含有脱水剂及少量残留水分,需进一步干燥处理。生物样品所含的水分或脱水剂与大气接触面之间,存在气相与液相的界面,样品干燥过程中受表面张力的影响,破坏样品的内部结构或引起畸变。样品表面由于干燥所致畸变主要有:①自然干燥引起的收缩;②组织部分收缩引起的微小龟裂;③以细胞为中心的收缩,引起细胞间隙龟裂;④由表面张力引起纤毛等微细结构的凝聚或收缩。因此干燥过程是扫描电镜制样中最关键步骤,目前常用的样品干燥法主要有以下几种。

(1) 自然干燥法

自然干燥法又称空气干燥法,是经(或不经)脱水处理的样品在大气中自然挥发的方法,是一种最简便而比较原始的干燥法。在干燥过程中,样品易受表面张力的作用而发生形变,对大多数生物样品来说不宜采用,只适用于比较坚硬,或具有鳞片及含水分较少的生物样品,如某些昆虫、骨组织、毛发、种子、果壳等样品。

(2) 临界点干燥法

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。多数液体在室温下都存在明显的气相-液相界面,若容器体积不变(如密闭容器),随温度升高,变热膨胀,饱和蒸气压增高,气相密度增加,液相密度下降;当温度达到某一特定值时,气相和液相密度相等,相互混合成一种均一的流体,相界面消失,此时

的状态称为临界状态，此时的温度和压力分别称为临界温度和临界压力。处于此状态时，无论在多大气压下，气态不再变为液态，如果缓慢放气减压，样品含有的液态物质全部气化，并且不受表面张力影响，从而实现样品干燥，此方法即为临界点干燥法 (critical point drying method)，简称 CPD 法 (图1-93)。1951年 Anderson 发明此技术 (Anderson, 1951)，1969年美国首先将此方法应用于扫描电镜样品制备，使样品干燥技术大大推进了一步，是目前认为既可靠又理想的样品干燥法。

不同的液体有不同的临界温度和临界压力值 (表1-13)。直接从水进行临界点干燥是最理想的，然而水的临界温度为 374°C ，临界压力为 218 kg/cm^2 ，这样的温度和压力对于生物样品易造成结构破坏。液体 CO_2 的临界温度为 31.5°C ，临界压力为 72.8 kg/cm^2 ，生物样品也可承受，且易获得纯品，价格也较低，保存方便，与其它媒介液相比更符合选择条件，已被普遍使用，故仪器也称为“二氧化碳临界点干燥仪” (图1-94)。

乙醇或丙酮这两种脱水剂与 CO_2 的互溶性较差，因此在临界点干燥之前，先用与脱水剂和 CO_2 互溶性都较好的中间液处理，以取代样品中的脱水剂，常用的中间液有乙酸异戊酯、乙酸乙酯和环氧丙烷。

以 CO_2 临界点干燥法为例，其操作程序如下 (图1-95)。

① 样品预处理 样品从100%丙酮取出后立刻放入100%乙酸异戊酯中，置换15 ~ 30 min，中间换液1 ~ 2次。

② 放置样品 放置前，预冷进液管道及样品室，使其低于室温 10°C 以下，以避免液体 CO_2 过早气化增压而影响干燥效果。并且经常用乙醇或丙酮清洗管道及样品室，保持干净，严

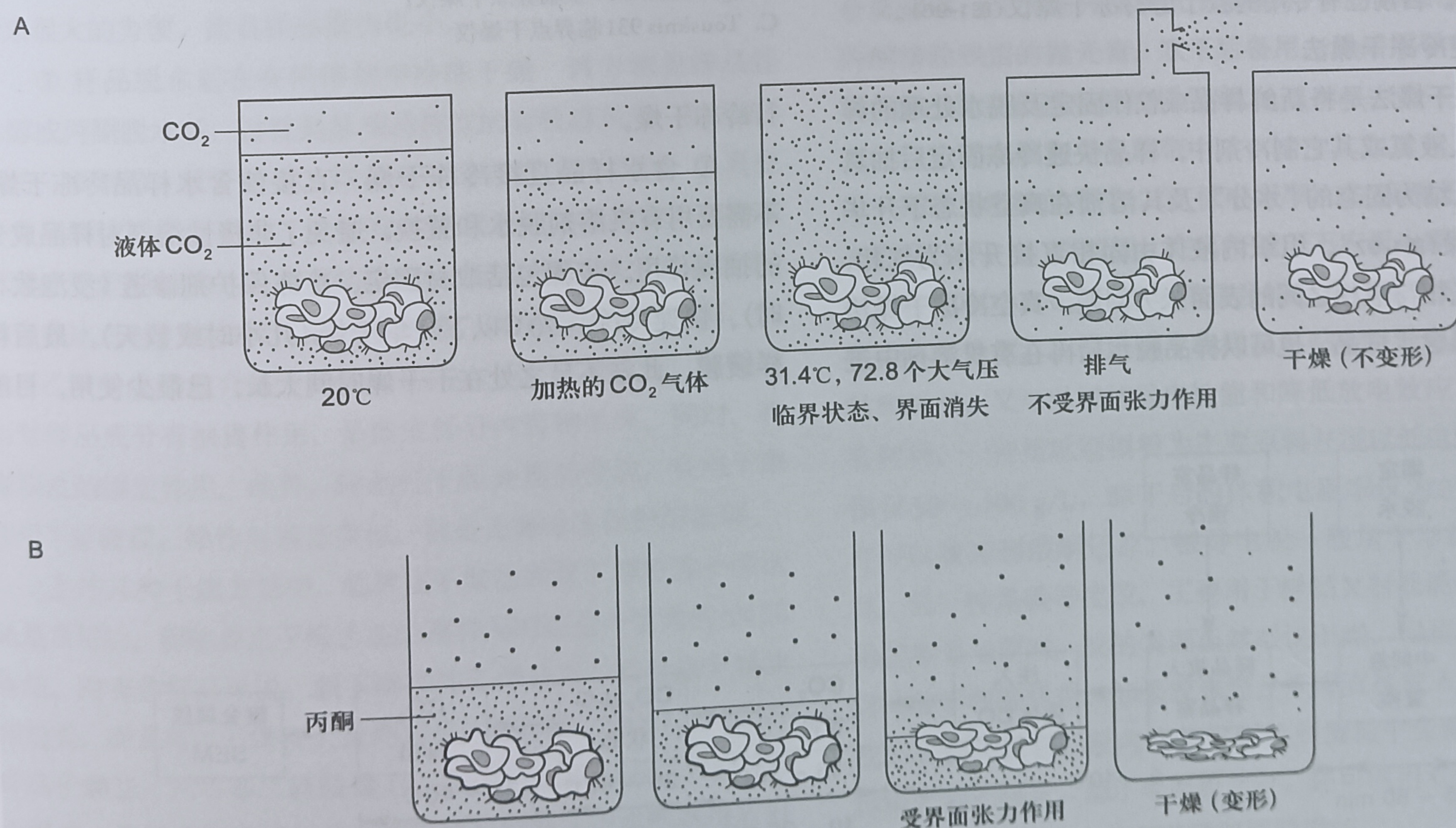
防污染样品，保证充入液体 CO_2 的纯度。样品从乙酸异戊酯中取出后，迅速放入样品室的干燥篮内，这期间一定要保证样品浸没在乙酸异戊酯中。样品篮顶部及底部要垫好滤纸，在保持小环境范围内湿度的同时，还能吸附反流的乙酸异戊酯，防止 CO_2 内的残渣污染样品。每次加入的样品不宜过多，一般样品篮的高度不超过样品室深度的 $1/3$ 。

③ 注入液体 CO_2 打开干燥器进气阀门，将 CO_2 缓缓注入样品室，样品室内压力逐步上升与钢瓶内压力持平可达 $50 \sim 65\text{ kg/cm}^2$ 。当 CO_2 注入量占样品室体积 $70\% \sim 80\%$ 时立即关闭贮液钢瓶和进气阀门。开闭阀门时，动作要轻柔，尽量防止冲击力的突然变化造成的样品损伤。 CO_2 钢瓶及样品室的压力很大，应注意旋紧各部件的螺口，以防发生意外。

④ CO_2 置换 将样品室的温度控制钮调至 $15 \sim 20^{\circ}\text{C}$ ，室内压力由 50 kg/cm^2 左右上升到 $60 \sim 70\text{ kg/cm}^2$ ，持续 $10 \sim 20\text{ min}$ ，液体 CO_2 将会置换样品中的乙酸异戊酯。再次降低温度，先打开进气阀，保证新液持续补充的情况下稍打开出气阀，将溶有中间液的 CO_2 排放。此过程中样品篮必须始终浸没在液面下。维持 $10 \sim 15\text{ h}$ 后关闭进、出气阀。

⑤ 临界状态保持 将样品室的温度升高至 $35 \sim 40^{\circ}\text{C}$ ，液体 CO_2 开始气化，当压力表达达到临界值 72.8 kg/cm^2 ，保持 $5 \sim 10\text{ min}$ 。

⑥ CO_2 排出 打开微量放气阀，缓缓放出气体 CO_2 ，约 $100 \sim 500\text{ mL/min}$ ，待样品室压力降为零，打开样品室。此过程必须缓慢，若 CO_2 排放速率过快，样品室压力急剧降低会使样品涨破。



↑ 图1-93 临界点干燥法 (A) 与自然干燥法 (B) 示意图

表1-13 部分临界点干燥用媒介液的临界值

试剂名称	水 H ₂ O	二氧化碳 CO ₂	氟利昂-13 CClF ₃	液氮 N ₂	乙醇 C ₂ H ₆ O	乙醚 C ₄ H ₁₀ O	乙酸戊酯 C ₇ H ₁₄ O ₂
临界温度 /°C	374.0	31.5	28.9	36.5	243.0	194.0	143.0
临界压力 /kg·cm ⁻²	218.5	72.8	38.0	71.6	63.0	35.0	66.0

临界点干燥后,样品呈完全干燥状态。干燥样品一般会变成白色,同时易脆,因此取放样品动作要轻,防止损伤。样品最好立即镀金处理,避免再度从空气内吸水。若无法立即镀膜,则应在干燥的密闭容器中保存,以防受潮。临界点干燥法对细胞成分也有提取作用,导致样品的进一步收缩及细胞外物质的丢失。当然也有一些办法可以防止或减少收缩,比如用戊二醛-四氧化钨双重固定,再用单宁酸-四氧化钨处理。

总之,每一步操作均决定着临界点干燥的成败,需要严格控制温度、压力、时间等条件,严守操作规程。即使选择全自动临界点干燥仪,也要根据以上原理设定程序。

(3) 叔丁醇冷冻干燥法

20世纪80年代末Inoué等又发展了叔丁醇冷冻干燥法(Inoué和Qsatake, 1988),并认为其比临界点干燥法更快速、稳定,同时所获得的生物图像效果相当。叔丁醇又名2-甲基-2-丙醇(*t*-Butyl Alcohol),为无色油性液体,其熔点为25.5°C,沸点为82.4°C,凝固点为23.5°C。脱水后用100%叔丁醇进行置换,控制叔丁醇的体积,使其冷冻降温变为固体时刚好浸没样品。放入真空罩内抽气,使固态的叔丁醇逐渐升华变成气态,以达到干燥的目的。目前已有专用的叔丁醇冷冻干燥仪(图1-96)。

(4) 真空冷冻干燥法

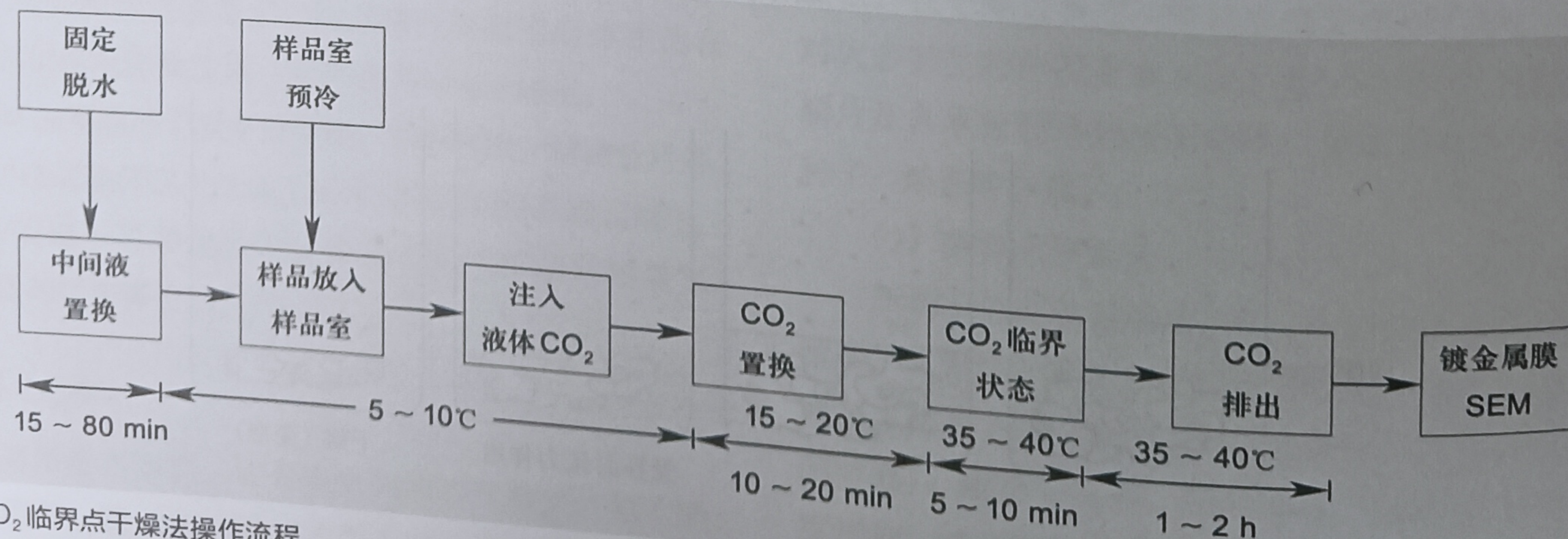
真空冷冻干燥法是将新鲜样品或仅作固定及脱水处理的样品,迅速投入液氮或其它制冷剂中,样品快速冷冻固定后抽真空,样品中已结为固态的“水分”及其溶剂在真空状态下升华而使样品干燥(图1-97)。组织内液体由固相直接升华为气相,因此不存在气相与液相之间的表面张力问题。真空冷冻干燥法可以直接干燥含水样品,也可以样品脱水后再在有机溶剂中进行

↑ 图1-94 临界点干燥仪

- A. Leica EM CPD300型全自动临界点干燥仪;
B. Quorum K850型临界点干燥仪;
C. Tousimis 931临界点干燥仪

行冷冻干燥。

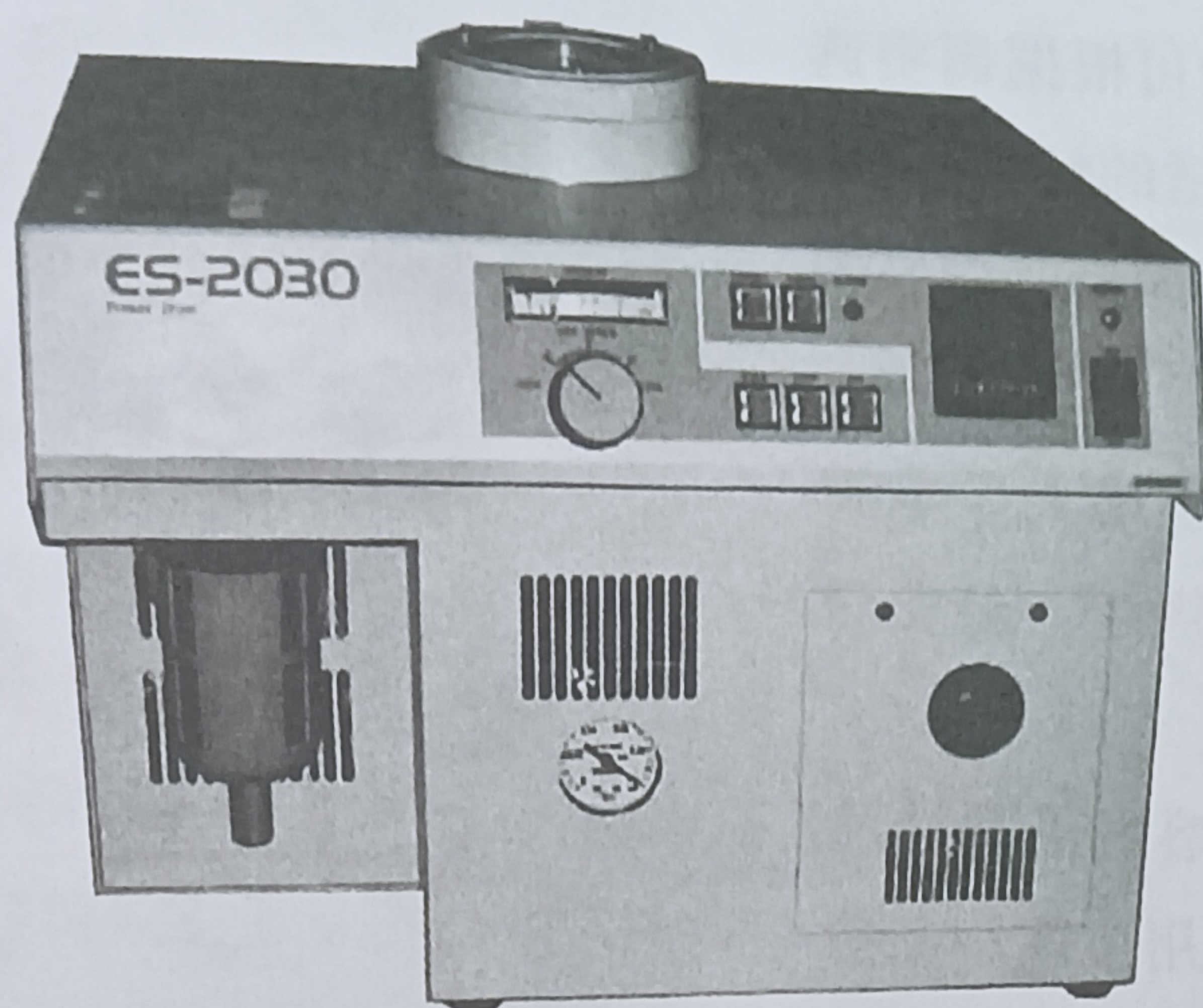
① 含水样品直接冷冻干燥 直接使含水样品冷冻干燥,不需要用有机溶剂脱水和置换,避免了非极性溶剂对样品成分的抽提作用。步骤包括取材固定、冷冻保护剂渗透(浸泡数小时)、快速冷冻、-70°C以下升华干燥(几小时或数天),最后粘样镀膜。此法不足之处在于干燥时间太长,已很少使用。目前



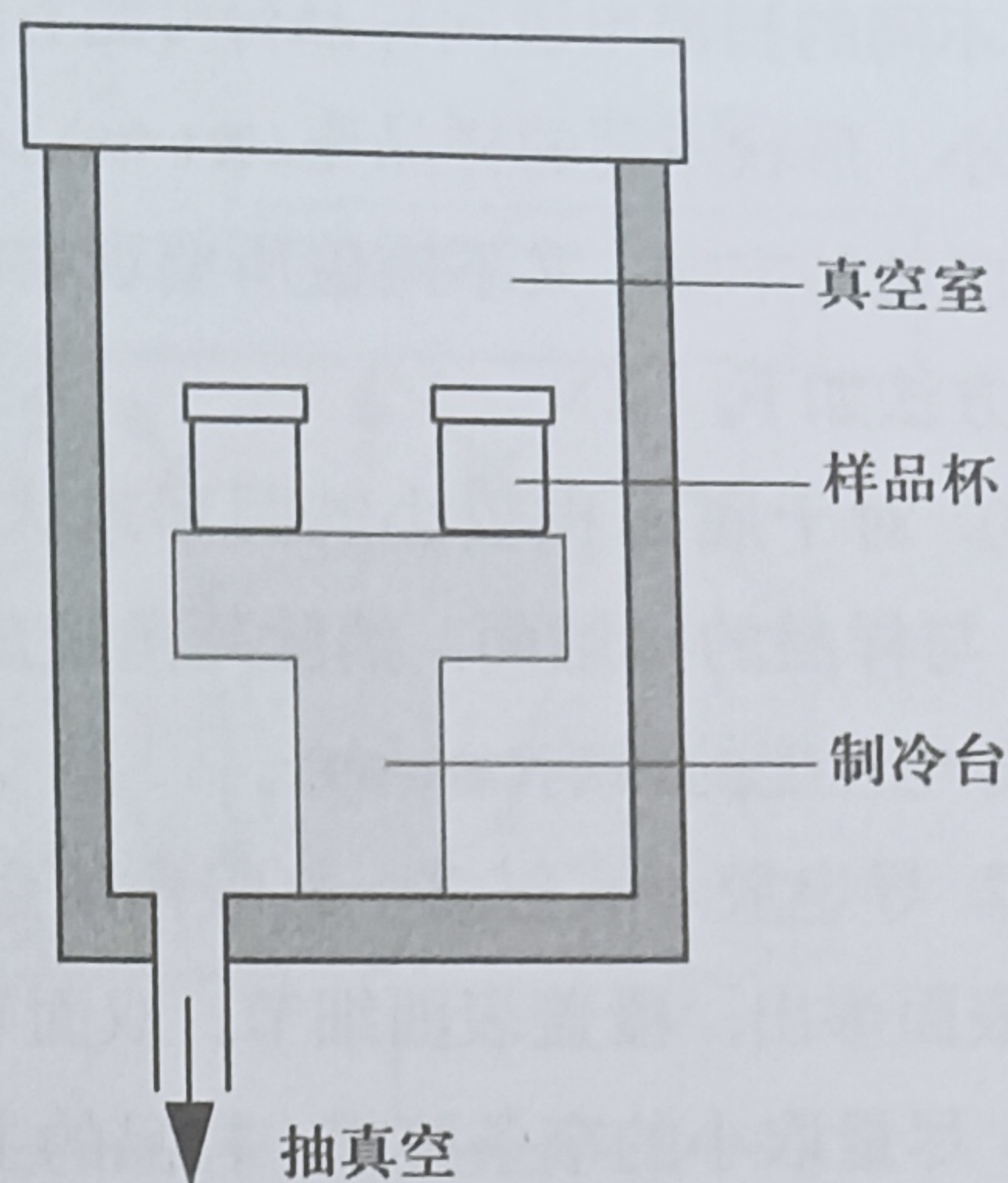
↑ 图1-95 CO₂临界点干燥法操作流程

→ 图1-96 叔丁醇冷冻干燥仪

A. 仪器外观;
B. 真空室示意图

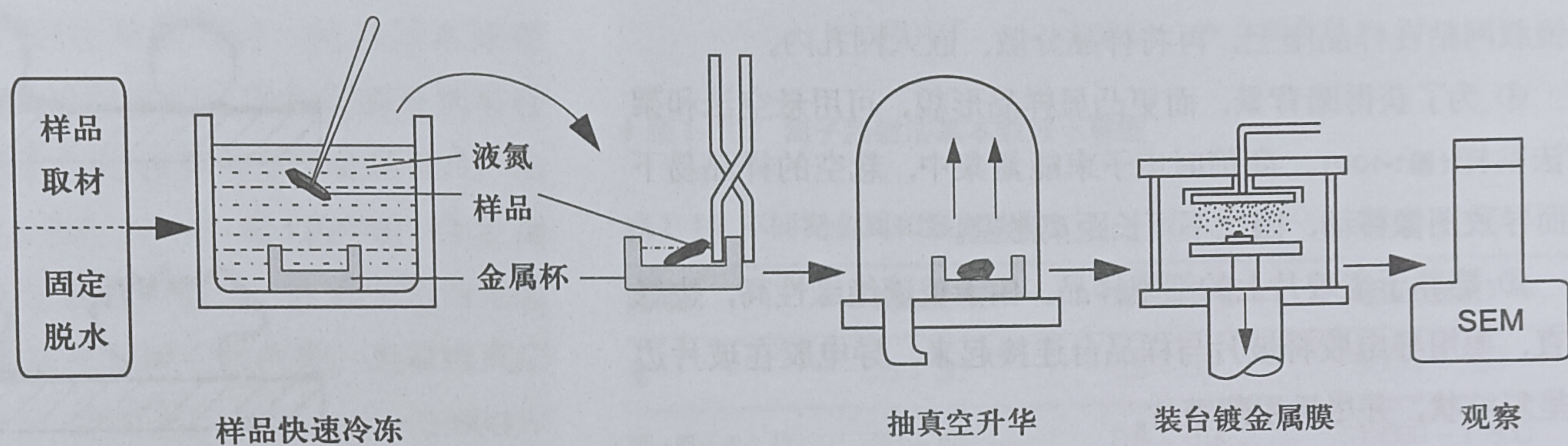


A



B

→ 图1-97 真空冷冻干燥法操作流程



扫描电镜可选配冷冻传输装置,可在装置内完成冷冻断裂、升华干燥、金属镀膜等操作后,直接进入电镜观察,给工作人员带来很大的方便,而且样品损伤也小。

② 样品脱水后在有机溶剂中冷冻干燥 该方法是样品经乙醇或丙酮脱水后,过渡到某些易挥发的有机溶剂中,如乙醚、氯仿、氟利昂、叔丁醇等。样品连同这些溶剂冷冻后,在真空中升华而达到样品干燥。这些有机溶剂是非极性物质,在冷冻时形成无定型结构,固相重结晶的机会少,可以减少冰晶损伤;而且在冰点时,饱和蒸气压比水的高,可以缩短干燥时间,如利用乙酸异戊酯做介质干燥仅需0.5 h。不足之处在于,有机溶剂对样品成分有抽提作用,易造成部分内容物丢失。同时,有凝聚性的固定作用。此外,样品经干燥处理后变脆,在电子束作用下易破裂。操作与前法类似,只是无需冷冻保护剂处理。

上述几种干燥方法中,临界点干燥法和叔丁醇冷冻干燥法是最常用的。但临界点干燥法在处理样品时也会产生大约5%的收缩。对有些样品来说,叔丁醇冷冻干燥法可与临界点干燥法相媲美,而且可以干燥较大量的样品(郭素枝,2006)。此外将冷冻干燥法、六甲基二硅胺烷(hexamethyldisilazane, HMDS)干燥法、苧烯干燥法等运用在某些样品的制备中也能获得较好的结果(Vennat等,2009; Lee和Chow,2012)。

1.7.1.6 粘样

扫描电镜样品在干燥处理之后,需粘在样品座上,再进行金属镀膜。样品座先用抛光膏擦净污染物和油渍,再用乙醇、丙酮清除残留的抛光膏,吹干后备用。然后用导电胶或导电胶带将样品粘在扫描电镜的样品座上。

(1) 导电胶和导电胶带

对于导电胶的要求:① 低电阻率;② 室温下能较快固化,又容易还原;③ 颗粒细,在高倍镜下不应看出颗粒状,胶膜平滑,收缩率小;④ 不能与样品及样品台产生反应;⑤ 受电子轰击不易分解。扫描电镜生物样品粘贴专用导电胶水,既可以粘牢样品,又可以增加导电性能和降低放电效应。常用导电胶有两种,一种是以细银粉为主要原料并混以低电阻树脂液,含银量50~100 g/L,晾干后的体积电阻率仅为 $2 \times 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$,并可以被溶剂溶解还原。银导电胶一般用于形貌观察样品粘样。另一种是碳导电胶,主要用于样品X射线能谱分析。当使用过多导电胶时,胶的表面虽然很快干燥,但里面的物质可长时间处于潮湿状态。如果胶未完全干燥直接放入电镜,真空下胶的表面会破裂,胶内水蒸气释放到镜筒中会破坏电镜真空,污染光阑和极靴。除了导电胶之外,还可以用双面碳或铜导电胶带,实际工作中也有用普通双面胶带的。

(2) 粘样方法

不同的扫描电镜间样品台可能有差异,用户可根据需要选择大小、形状不同的样品座(图1-98),并采用合适的粘样方式,使之既粘贴牢固,又不掩盖所要观察的结构。不同形状样品的粘样方法如下。

① 对于底面积较小的圆形或大块样品,应增大导电胶(带)与样品的接触面,消除死角造成的不连续镀层,避免对样品导电性能的影响(图1-99)。

② 导电胶不宜过多,虹吸作用会导致一些溶剂沿裂缝从样品表面渗出,覆盖表面细节。双面导电胶带使用方便,在粘样时,尽量取小的窄条胶带,样品的主要观察部位向上粘在胶带上。

③ 对于很细小的样品,如花粉、孢子等,可用棉签或毛笔蘸取,轻轻敲击使样品洒落在贴有导电胶带的样品座上,再用洗耳球轻轻向外吹掉未被粘牢的样品,以免污染镜体。还可把电镜载网粘在样品座上,再将样品分散、嵌入网孔内。

④ 为了获得暗背景,而更凸显样品形貌,可用悬空法和架桥法粘样(图1-100)。高倍时电子束能量集中,悬空的样品易下坠而导致图像移动,因此不可长距离悬空。

⑤ 培养于盖玻片上的细胞样品,由于玻璃绝缘性高,边缘陡直,要用导电胶将玻片与样品台连接起来,导电胶在玻片边缘呈斜坡状,并尽量用薄玻片。

⑥ 对于有取向要求的样品,如纤维,要使用特殊的样品座,以便观察样品特定表面的形态结构(图1-101)。

(3) 粘样的注意事项

扫描电镜粘样需要认真细致,在操作过程中,应注意以下几点。

① 经脱水和干燥处理的样品脆而易碎,特别是临界点干燥后样品受到挤压不能复原,因此在粘贴时必须动作轻柔、安放准确。

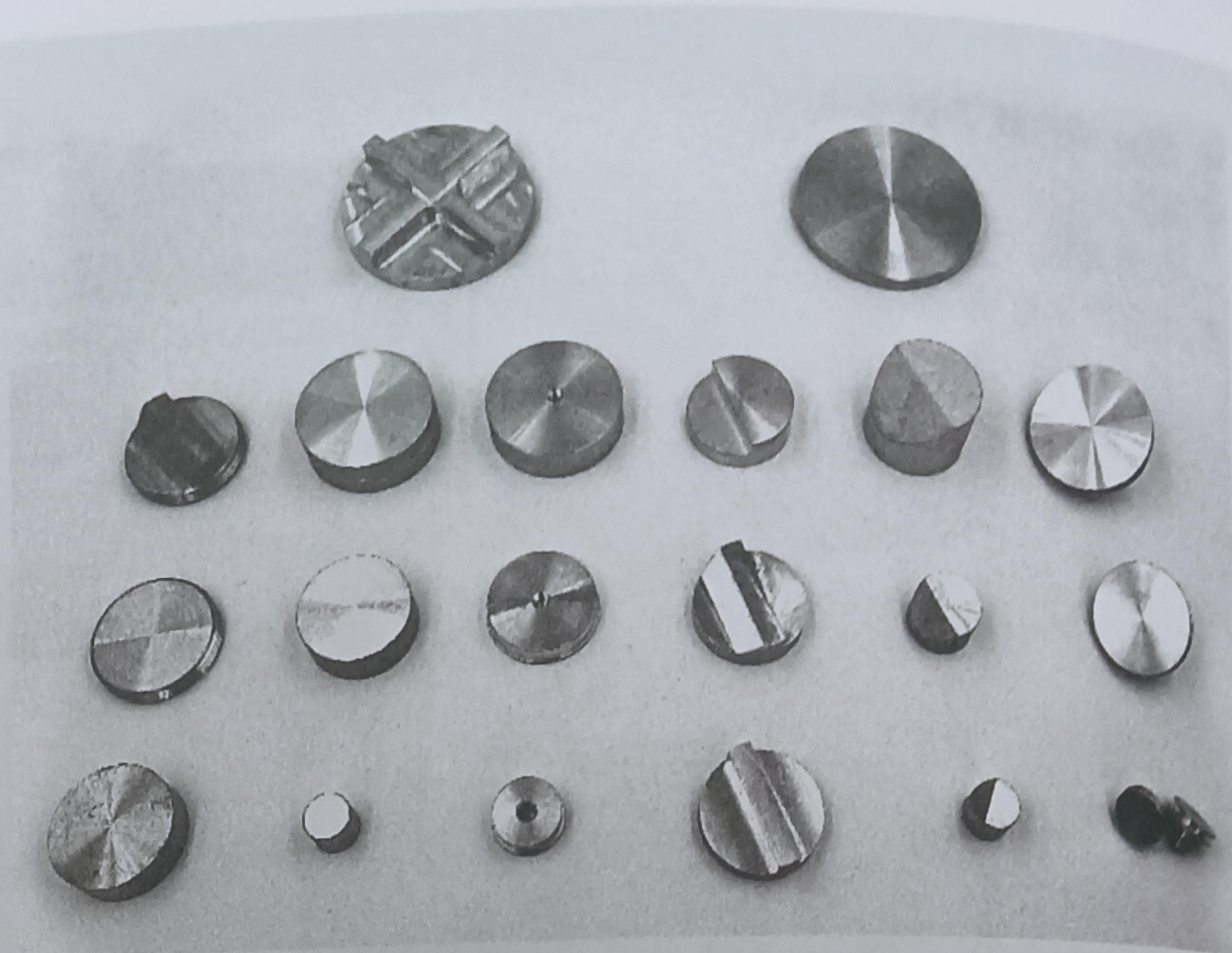
② 安放样品之前,确实认准样品的观察面向上,以免损坏样品。

③ 为了在电镜下快速准确找到样品,第一个与最后一个样品之间应留有明显空隙,并做标记;样品不要过于靠近样品座边缘,以防手指触碰污染。

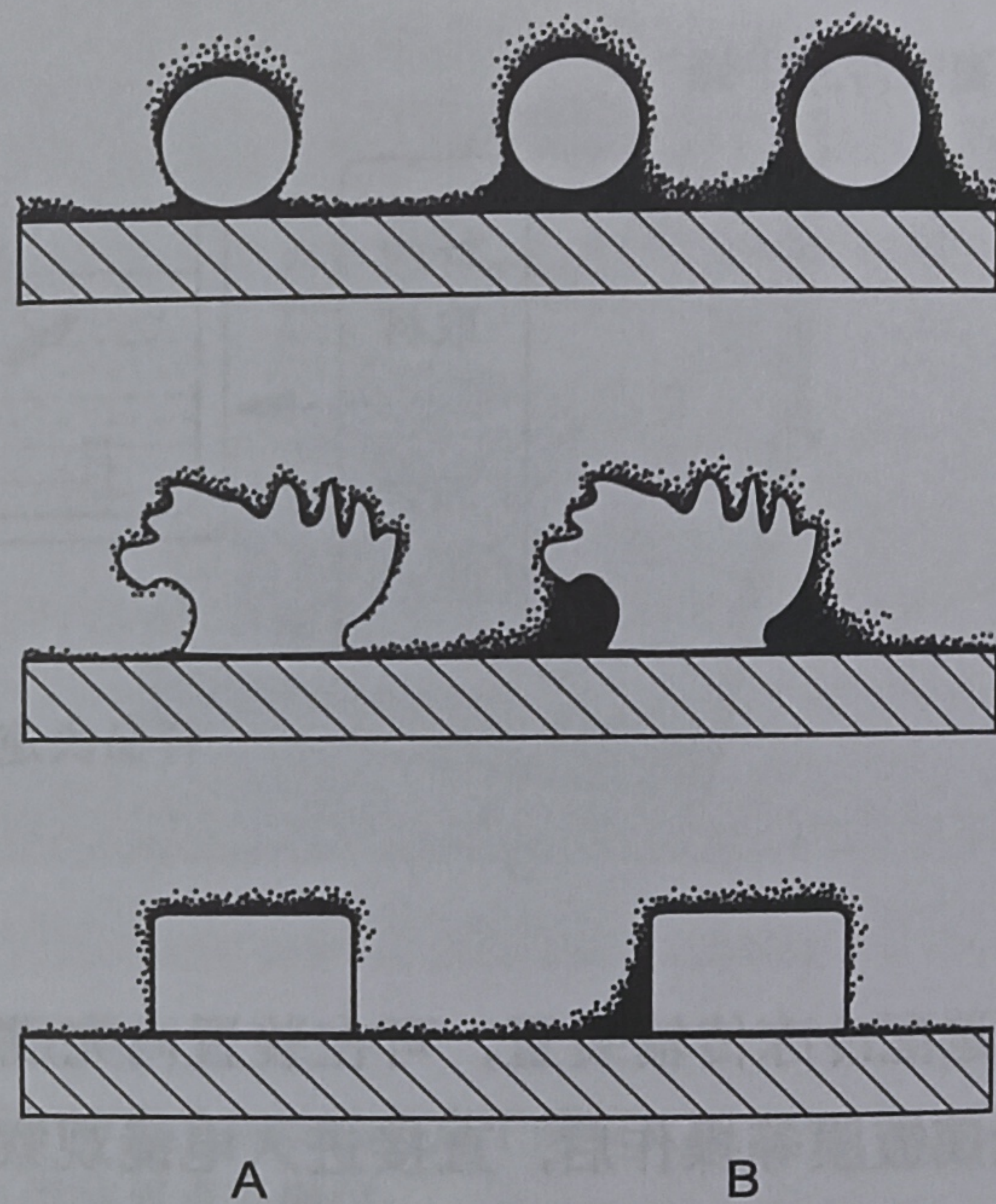
④ 粘样完成后,注意防尘、防潮和防止易飞散样品的互相混合,并及时放入干燥器皿中。

1.7.1.7 导电处理

生物样品和其它非导电样品,特别是经过干燥处理的样品,其表面电阻率 ρ 一般在 $10^{10} \Omega \cdot \text{mm}^2/\text{m}$ 以上,故导电性能很差,当受到电子束照射时,会产生电荷积累,造成电子充放电效应。此外,生物样品元素成分中的原子序数大都较低,二次电子发射率低,而且不能耐受电子轰击,故必须对样品进行增加导电性能处理。导电处理的作用是:① 低电阻率利于二次

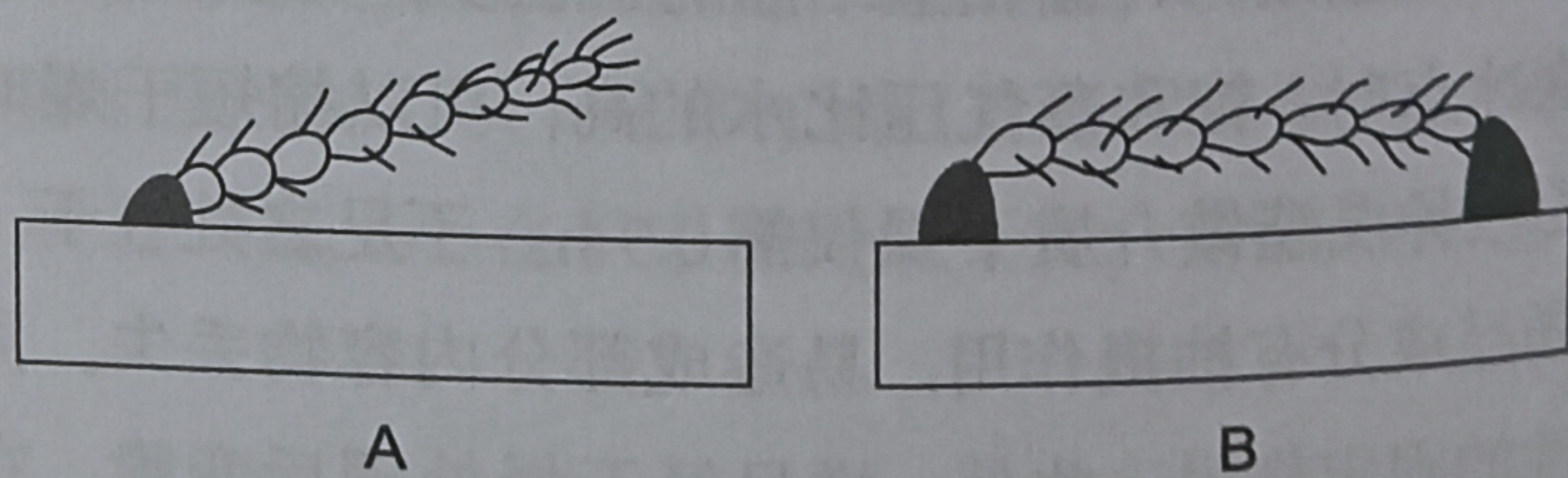


↑ 图1-98 各种类型的扫描电镜样品座

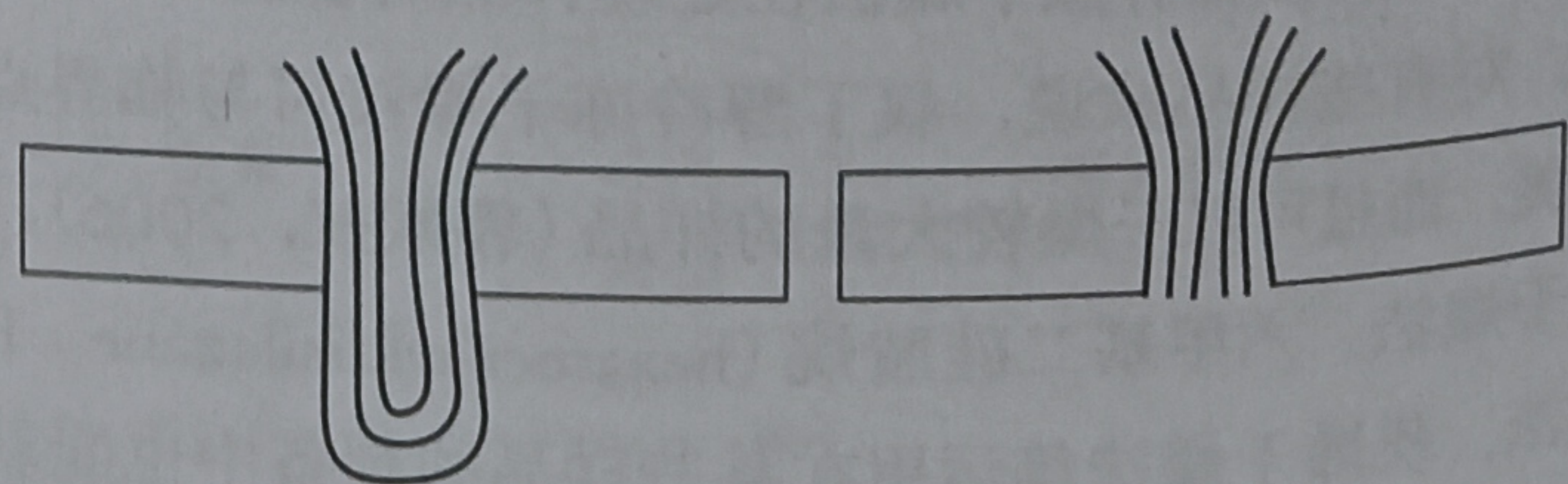


↑ 图1-99 圆形和大块样品的粘样方法

A. 接触面小,死角大,金属层不连续;
B. 增加接触面成斜坡状,金属层容易连续



↑ 图1-100 悬空粘胶法(A)和架桥粘样法(B)



↑ 图1-101 纤维断面的粘样方法

电子释放，防止或减轻放电；② 较强的机械强度和抗电子轰击能力，可防止或减轻样品损伤；③ 易产生大量二次电子，增强图像的亮度和衬度；④ 把信息来源限定于样品表面。目前，对生物样品的导电处理主要包括金属镀膜法和组织导电法两类。

(1) 金属镀膜法

金属镀膜法主要有真空喷镀法和离子溅射法两种方法。

① 真空喷镀法 是一种使用很久的高真空金属镀膜技术，具有对样品损伤小，污染少，可喷镀铜、铝廉价金属等优点，虽能基本达到扫描电镜对生物样品观察的要求，但对于一些形貌复杂的样品易形成“影子”和死角。目前较少用于扫描电镜样品镀膜，多用于透射电镜金属投影技术以及载网碳膜的制备等。

② 离子溅射法 是在低真空条件下产生辉光放电时，由于离子冲击，将阴极金属物质溅射出来进行镀覆的方法，又称离子镀膜法或阴极溅射法。离子溅射法是增强生物样品导电性能比较理想的技术，也是目前最常用的镀膜方法。

尽管各厂家生产的离子溅射仪结构各异，但其基本原理(图1-102)是一样的。即在溅射仪真空罩的顶部和底部分别装有阴极和阳极，阴极的内表面覆盖一层镀膜所用的金属箔片，由金(Au)、铂(Pt)、金-钯(Au-Pd)或铂-钯(Pt-Pd)合金制成，又称作金属靶。样品放在底部的阳极上，在真空室内先通入氩或氦、氮等惰性气体，亦可用新鲜空气代替。当罩内真空度达到 $10.0 \sim 0.1$ Pa低真空时，在两极间加以 $800 \sim 3\,000$ V的直流电压，阴极为负高压，阳极为零电位，在电场作用下，真空室内残留的气体分子被电离为阳离子和电子，分别飞向阳极和阴极，并不断地与其它气体分子相碰撞，表现为紫色的辉光放电现象。阳离子同时又可轰击阴极上的金属靶，使部分金属原子被溅射出来，在电场加速作用和气体分子碰击作用下，这些金属原子从不同的方向和角度飞向阳极，并呈漫散射方式覆盖在样品表面，形成一层连续而均匀的金属膜。

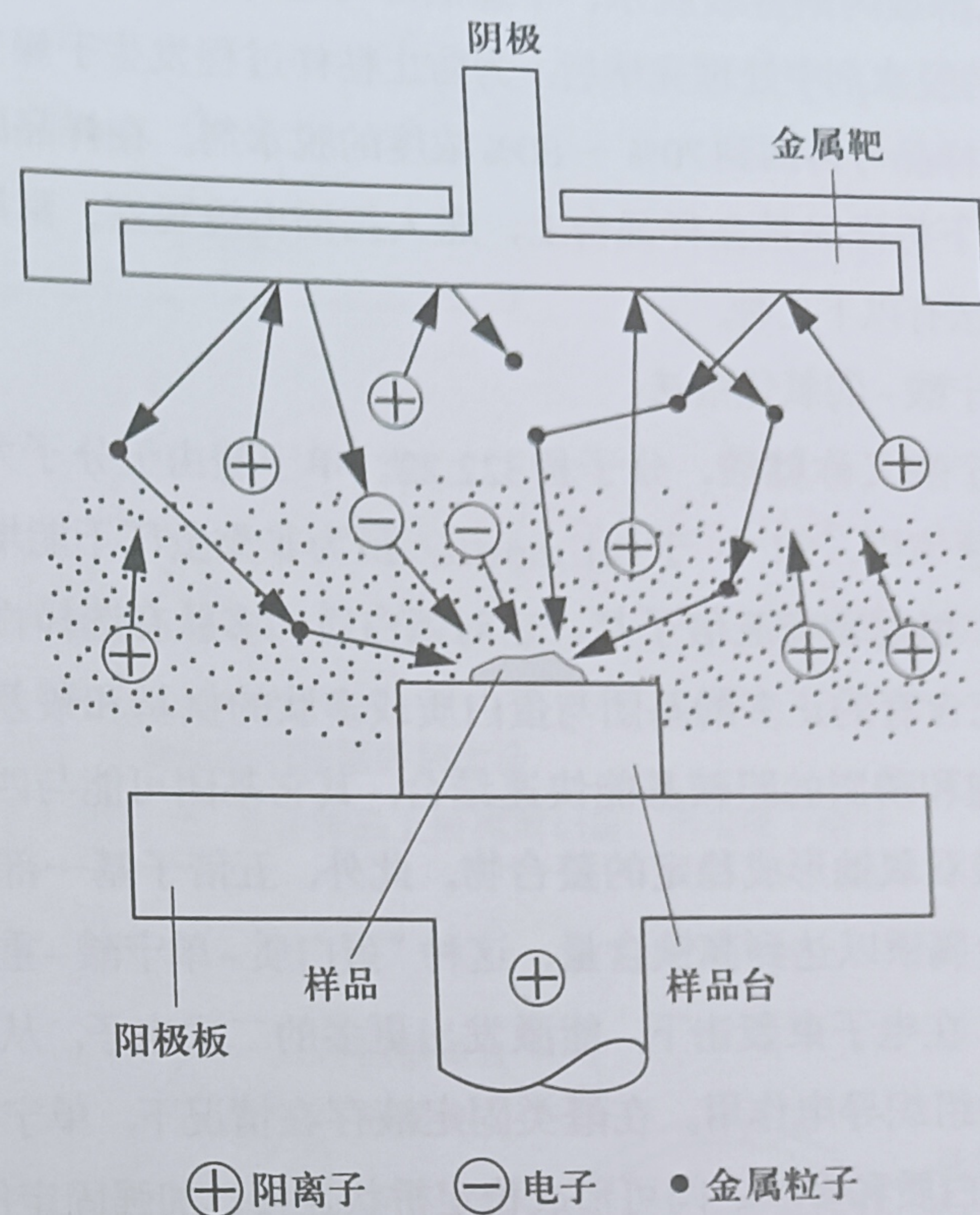
离子溅射法的技术要求及注意事项如下。

① 镀金属膜前样品必须彻底脱水干燥。

② 控制离子溅射条件，以达到最适喷镀状态。在一定范围内，样品室真空度越高，覆盖在样品上的金属颗粒越细，分辨率越高；金属厚度与靶材原子序数、样品到金属靶的距离、溅射电流、溅射时间有关。使用金靶时，阴极与阳极之间的电压可选择为 $800 \sim 1\,200$ V，铂靶需用 $1\,800 \sim 3\,000$ V电压。使用不同的靶金属需要有不同的操作条件(表1-14)。一般情况下金属膜的合适厚度为 $4 \sim 10$ nm。

③ 离子溅射仪中的靶装置如果不干净，会导致样品表面污染。干净的镀膜仪也会引起样品的热损伤和离子损伤。

④ 离子溅射时建议使用惰性气体(如氩气)，否则样品室内上部、侧壁和样品表面全部都会产生积碳。如果样品不够干燥，在辉光放电时剩余的水蒸气可被电离，羟基或水合氢离子可使脆弱样品表面出现坑穴或沉陷。此外，保养不好的真空泵，会使泵油倒流而产生严重的污染和样品损伤。



↑ 图1-102 离子溅射法基本原理示意图

表1-14 不同靶金属和溅射条件

靶材料	极间距/mm	真空度/Pa	电压(直流)/V
金	25 ~ 35	0.5 ~ 0.1	800 ~ 1 200
金-钯(4:1)	30 ~ 40	0.8 ~ 0.3	1 000 ~ 1 500
铂-钯(3:2)	40 ~ 50	0.5 ~ 0.1	1 200 ~ 2 000
铂	50 ~ 100	0.1 ~ 0.01	1 800 ~ 3 000
银	25 ~ 35	1.0 ~ 0.3	1 200 ~ 1 500

(2) 组织导电法处理

组织导电染色技术最早是在1973年由Penessa和Gennara提出，利用金属盐类作为界面活性剂与样品内蛋白质、脂质和淀粉起化学结合作用，使表面离子化或产生导电性能较好的金属化合物；或者细胞质膜等组织成分吸收金属盐，使得样品表面离子化、增强样品导电率、防止组织皱缩变形损伤及增强样品对电子束轰击的耐受性。样品经过此技术处理后，即使不镀膜也可以直接进行扫描电镜观察。由于表面离子化使许多电子被吸收中和，充放电效应大大减少。但组织导电法的总体效果不如金属镀膜法，通常只在低电压、低放大倍数时使用，如将组织导电技术和金属镀膜结合起来效果会更好。

组织导电液的处理时间与样品的性质、大小及导电液种类有关。一般质地比较致密、内含液体比例小、体积比较小、柔软程度小和以观察表面结构为主的样品，处理30 min至数小时。体积大而柔软，或以观察内部结构为主的样品，处理时间需要延长，有时甚至高达几十小时。一般情况下处理时间稍长结果较好，至今未发现因处理时间延长而产生不良现象的情况。样品经取材、固定和清洗后，用组织导电液处理、清

洗,乙醇或丙酮逐级脱水,干燥后即可进行扫描电镜观察。在100%的脱水剂中处理完毕后,为防止粘样过程发生干燥变形的现象,样品可再回到70%~80%浓度的脱水剂。在样品即将干的状态下将样品粘在样品台上,送入扫描电镜观察。常用的组织导电法有以下几种。

单宁酸-四氧化铁法:

单宁酸又称鞣酸,分子量322.22。单宁酸由于分子大,渗入组织速率慢,约小于0.1 mm/h,虽为非重金属不能增加图像衬度,但是含有五倍子基,它对蛋白质和多肽有选择性固定作用。它含有的正多酚基团与蛋白质或多肽的氨基和羧基,与多肽和饱和磷脂的胆碱基能快速结合,其它基团可能与四氧化铁或乙酸双氧铀形成稳定的螯合物。此外,五倍子基一部分还可还原金属铁以达到高铁含量,这种“蛋白质-单宁酸-重金属螯合物”在电子束轰击下,能激发出更多的二次电子,从而达到良好的组织导电作用。在醛类固定液存在情况下,单宁酸在可溶性蛋白质和多肽之间可形成稳定桥状连接,加强固定作用。此外,又能在被铁化的细胞结构(如膜性结构和糖原)和铅染液之间起到媒染作用,使四氧化铁或其它重金属容易结合到细胞的各种微细结构上,以增加图像衬度。所以它在生物样品制备中发挥了辅助固定剂或媒染剂的综合效应,故可称其为金属进入组织的“植入剂”“导电固定剂”或“配位结合剂”。

单宁酸-四氧化铁(TA-O)法制备时将经过常规取材或灌注固定取材的样品,放入20~40 g/L单宁酸或该液与1%~6%戊二醛混合液中处理。期间换液2次,表面扫描约需处理30 min,观察内部结构则需处理8 h以上,每次处理后均需充分清洗。然后将样品放入20~40 g/L四氧化铁中固定30 min至数小时,经常规脱水及干燥处理后,进行扫描电镜观察。此外,也有四氧化铁-单宁酸(O-TA)法,即四氧化铁固定后进行单宁酸染色,可以用来保存特殊结构,如糖原等。所以有人将两种方法结合建立了四氧化铁-单宁酸-四氧化铁(O-TA-O)法,能更好地保存结构,提高衬度。但也有人提出此种导电染色法引起组织内部二次电子释放,使得表面结构的图像受到底层结构图像的影响,遮蔽了表面结构的细节。后来根据不同研究需要,在此染色基础上陆续演变出许多染色方法,比如单宁酸-精氨酸-四氧化铁(TA-A-O)法,对于观察内耳耳蜗Corti器毛细胞的纤毛结构效果很好(Dunnebir等,1995);高锰酸钾-戊二醛-四氧化铁-单宁酸-四氧化铁(K-G-O-TA-O)法,可避免酵母之类厚壁细胞因剧烈收缩而变形和破裂。

制样时的注意事项:①单宁酸溶液不稳定,宜在用前配制,加热溶解,并要注意防止污染,所用器皿必须洁净。②单宁酸为酸性物质,一般宜用0.2 mol/L二甲砷酸钠缓冲液配制,以降低酸性。必要时可用氢氧化钠溶液调整pH,pH保持在7~9时染色效果最佳。③单宁酸穿透组织能力较差,组织块应适当缩小,处理时间以15 min最合适,时间不足或过久都影

响观察。④单宁酸容易与四氧化铁起反应,必须充分浸洗。

四氧化铁-硫卡巴肼-四氧化铁法:

硫卡巴肼(thiocarbohydrazide, TCH)又称二氨基硫脲,其本身不导电,但两极的-NHNH₂嗜铁,能提高导电率,并能取得更好的衬度。TCH结晶放入双蒸水中常呈粉红色,要用水反复清洗,直到粉红色消失,然后用双蒸水定容,加温至60℃保持2~3 min,再冷却至室温1 h,即达到饱和状态。此期间应尽量避免强光,溶液用前配制,并用0.45 μm微孔滤膜过滤。

样品取材后,用20 g/L四氧化铁固定30~60 min,经充分清洗后浸泡于10 g/L TCH过饱和水溶液10~30 min,水洗15 min,重复2~3次,以除去未结合的TCH,再次用20 g/L四氧化铁固定30~60 min,最后转入常规脱水干燥。若样品块较大,则延长组织导电处理时间至数小时以上。有的在第二次四氧化铁处理后再重复以上TCH和四氧化铁的操作,即为O-T-O-T-O法,图像分辨率更好一些。也有用O-T-O-T-O处理后再用二甲氧基丙烷处理,这使得二次电子产率增加、图像衬度好、分辨率较高,即使在高加速电压和高倍率下,样品变形也少。该技术还可结合冷冻割断、冷冻树脂割断等技术,观察样品断面结构,此时导电处理时间要适当延长,如3 mm³的组织块,四氧化铁处理需8 h,TCH处理需4 h,并要注意充分清洗。

除以上常用的几种方法以外,硝酸银、乙酸双氧铀、高锰酸钾、重铬酸钾、碘化钾、乙酸铅、钨红、硝酸镧等组织导电液都曾使用。近年来,国内外许多研究机构已开始使用离子液体(ionic liquid, IL),是一种室温下保持液态的盐类,真空情况下不蒸发,并能增加样品导电性,制样过程简单,无须脱水、干燥、导电处理(Ishigaki等,2011)。此外,还有放电防止液处理法和温性化学法等,都可以减少样品的充放电效应。

组织导电法操作注意事项如下:

①导电液易产生沉淀,用前须经微孔滤膜过滤,导电液处理后,样品要充分洗涤,否则将析出结晶或与铜样品台起反应,残余导电液在镜筒内受轰击后会发生分解,并造成镜筒的污染和腐蚀,故须加强镜筒的清洗保养工作。

②组织导电处理后的样品,具有硬而脆的特点,后续操作必须要注意。

③组织导电处理后的样品,可保存于70%~80%乙醇或1:1乙醇-甘油中几小时,时间不可过长。

④组织导电主要提高表面导电率,但并不能消除电子充放电效应。单纯采用组织导电处理的样品,其导电效果和二次电子产率目前均不够理想,一般在万倍以下观察,所以建议与其它镀膜法结合使用。

⑤金属离子对不同细胞结构的结合力不同,对电子产生不同程度的散射。

⑥对于含水较多的样品效果较差,有蜡质、脂质表面的样品效果更差。

⑦组织导电法并不能完全解决样品收缩变形问题,若将几

种制样方法结合起来使用,可取长补短,取得更好的效果。

1.7.1.8 样品的贮存

长期贮存的样品,由于表面有灰尘污染或镀膜破裂,受潮时破裂加重等原因,在电子束下其结构常常发生改变。因此,样品制备完成,应尽快观察记录图像。样品观察完毕,可放在相应大小的封口袋或培养皿中,写好标签,保存在干燥容器中。一般可使用电子干燥器或真空干燥器,而真空干燥器贮藏的效果更好,能防尘、防潮,并避免日光直射和温度过高或过低。最好用有颜色变化的硅胶颗粒作干燥剂,它既能吸湿又能指示湿度。无水硫酸钙不可用作干燥剂,因产生的尘埃会污染样品表面。

1.7.2 扫描电镜特殊生物样品制备

随着扫描电镜生物样品制备技术的发展,相继出现了许多适应不同研究目的和

特殊要求的新制样技术。其中目前应用较广泛的为割断法、管道铸型技术、冷冻扫描电镜技术(Cryo-SEM)等。

1.7.2.1 割断法

割断法是观察样品内部结构较为常用的一种方法,即将组织细胞的观察部位剖开暴露出来,核心问题是将样品包埋固化,在固化状态下以机械力将样品割断,断面即所要观察的部位,经临界点干燥和金属镀膜后进行观察。

(1) 简易剖出法

将双面刀片用丙酮擦拭干净,去除油脂,掰成合适形状,然后切割已经固定、脱水和干燥后的组织(图1-103),最后粘贴好样品进行金属镀膜和扫描电镜观察。本法仅适用于肺、脾等多孔隙组织。这种方法适用于观察断面上出现的管腔内面,但断面上的细胞微细结构可能已经损坏无法观察。

(2) DMSO冷冻割断法

DMSO冷冻割断法是效果较理想的割断法(田中敬一,1984)。DMSO为水溶性试剂,故该法属于水溶性包埋剂割断法。这种割断法的断面一般比较粗糙。通过此方法制备的样品,不仅能充分显示细胞内部结构的立体影像,而且由于没有像甘油那样的黏稠性,所以组织浸透快而简便,具有操作简单和重复率高等优点,其操作程序如下。

① 灌流取材与固定 将动物麻醉后,用生理盐水经腹主动脉灌流后取材,组织块大小为 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 5\text{ mm}$,即刻投入 10 g/L 四氧化锇固定 1 h 。

② 固化包埋与割断 样品固定后,经缓冲液清洗 2 次,每次 10 min ,依次浸泡于经过预冷的 25% 、 50% DMSO内各 $20\sim 30\text{ min}$,中间换液各 1 次。DMSO在此作为防冻剂,有利于防止或减少样品在冷冻过程中的冰晶损伤。然后往冷冻

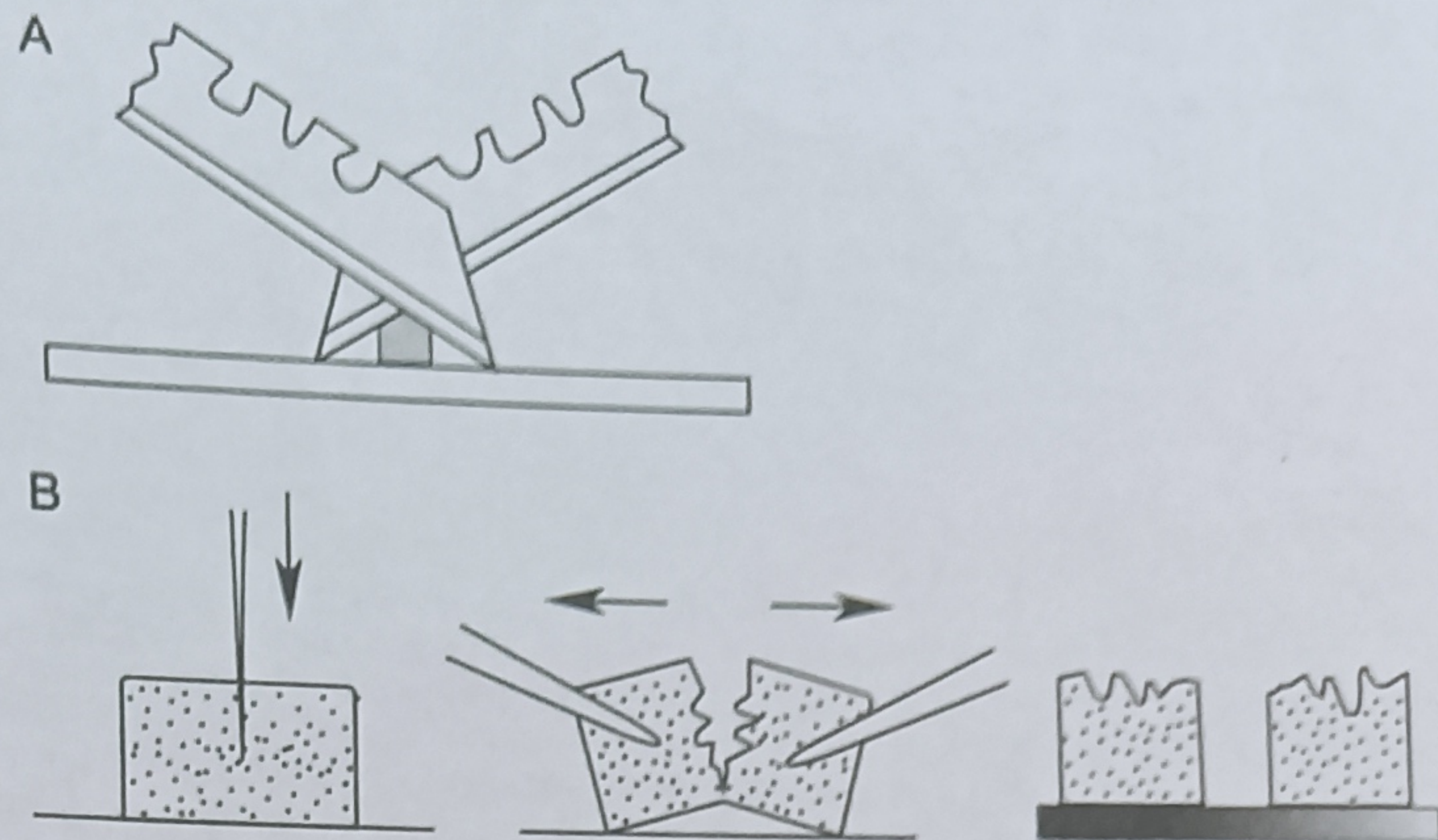


图1-103 干燥样品的观察面剖出法

A. 用刀片切断; B. 先在样品上面稍做切缝,再用镊子掰开

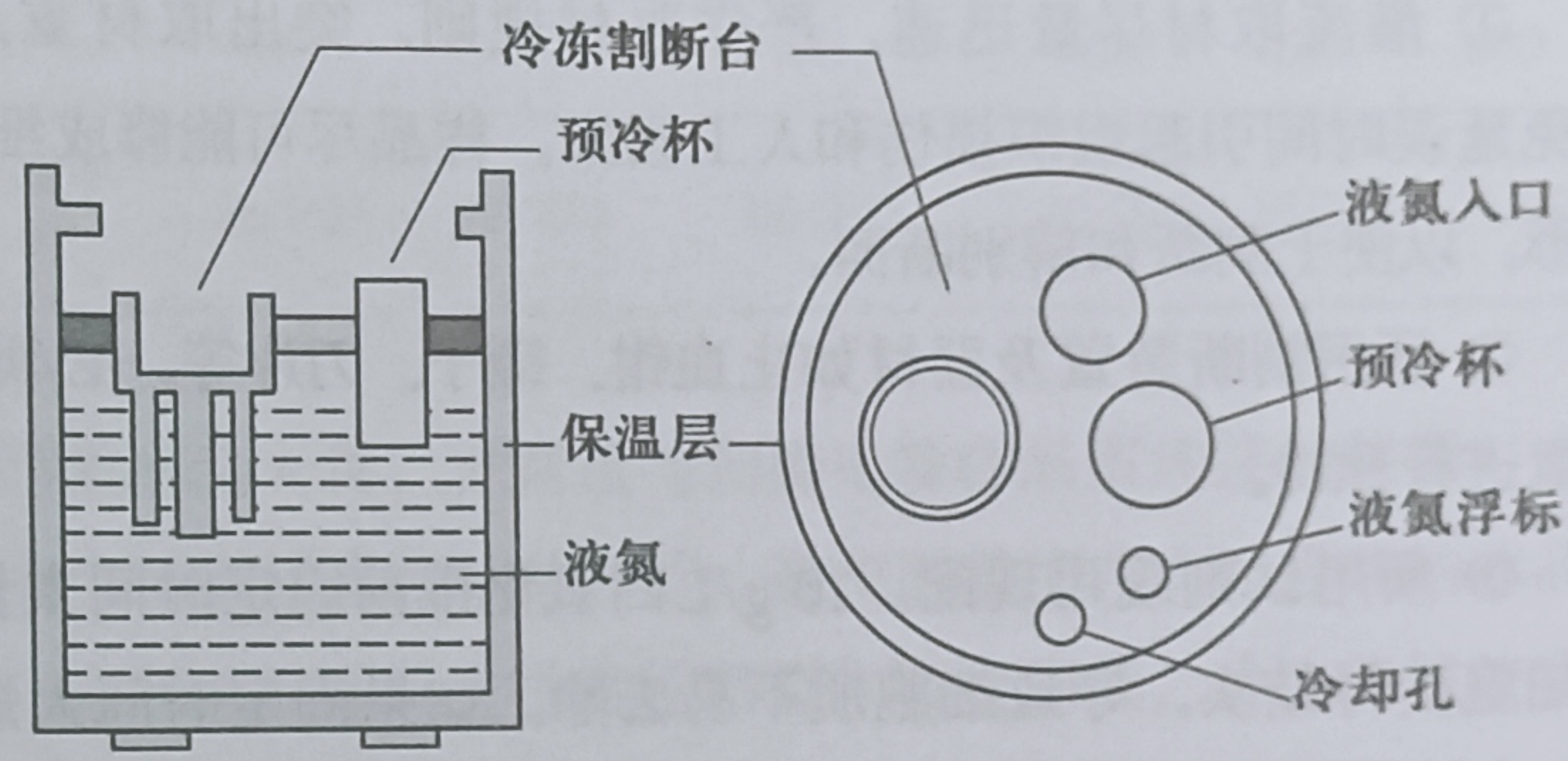


图1-104 冷冻割断装置示意图

割断装置(图1-104)内注满液氮,待割断台充分预冷后,用吸管将 50% DMSO滴在台上呈直径 $6\sim 8\text{ mm}$ 圆珠状,并迅速将样品放入DMSO液珠中,DMSO迅速冷却固化后,将预冷的刀片垂直放在样品表面,用凿子叩击刀柄,样品被震裂形成断面,避免切割而断造成结构上的挤压变形。裂断开的冰珠(含组织)夹入 50% DMSO中融化 $10\sim 15\text{ min}$,之后再放入 25% 、 12.5% DMSO中各 30 min 。

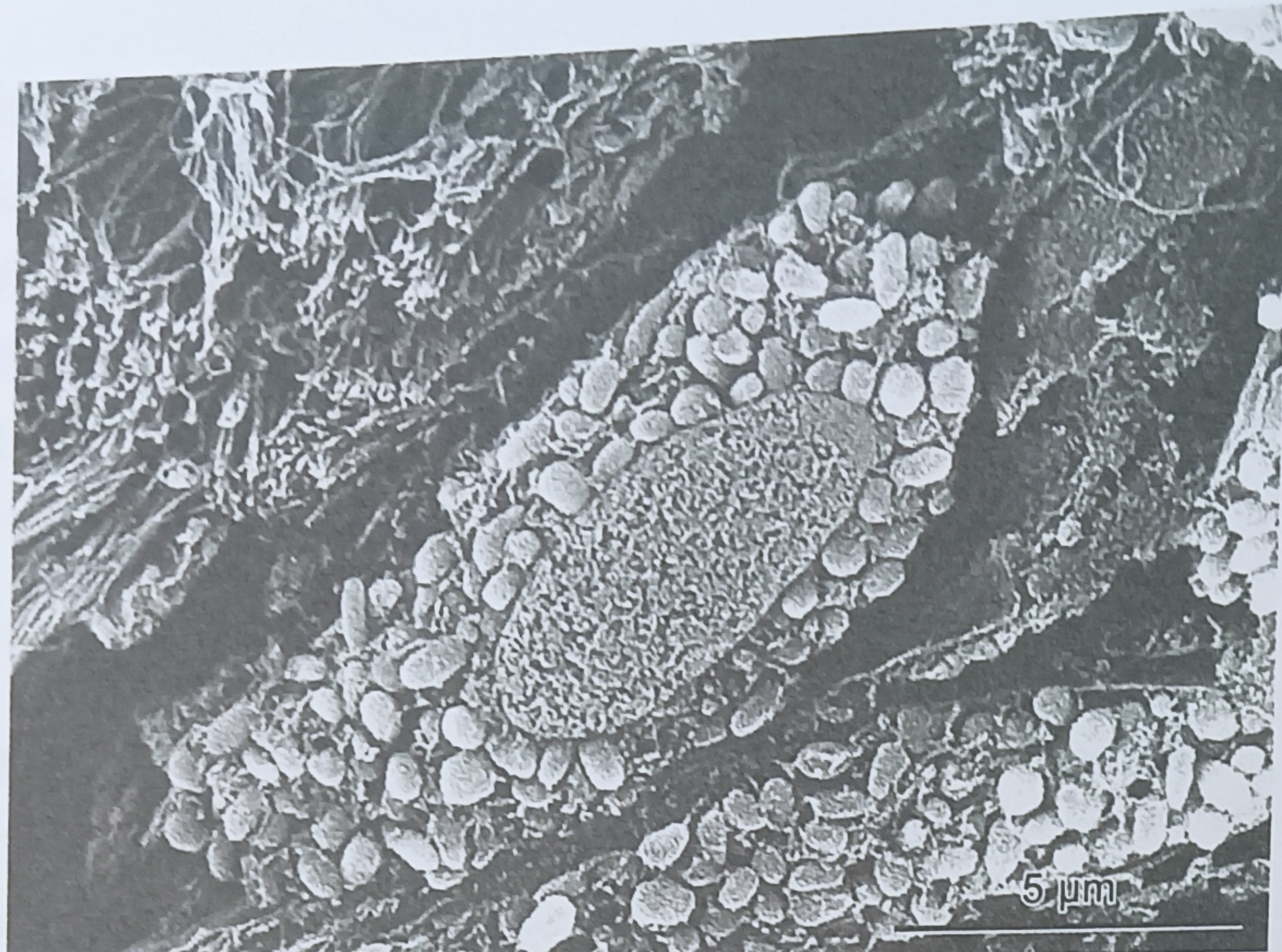
③ 细胞基质的软化 将样品用PB缓冲液浸洗 60 min ,每 10 min 换液 1 次。充分清洗以后,置入 1 g/L 四氧化锇内进行基质软化 30 min , 10 min/次 ,并在 4°C 冰箱内过夜。而后用双蒸水清洗样品 60 min , 20 min/次 。

④ 样品后固定 将样品再次放入 10 g/L 四氧化锇内固定 $30\sim 60\text{ min}$,使样品的割断面得到充分固定。

⑤ 组织导电处理 用双蒸水浸洗样品 60 min , $10\sim 20\text{ min/次}$,然后将其置入 $10\sim 20\text{ g/L}$ 单宁酸内 60 min , 30 min/次 ,再经双蒸水浸洗以后,用 10 g/L 四氧化锇浸泡 60 min ,对样品作终末固定及TA-O导电染色法,以增强样品的导电性能。

⑥ 样品经双蒸水浸泡,进行梯度脱水、临界点干燥或用叔丁醇冷冻干燥、金属镀膜,进行扫描电镜观察(图1-105)。

DMSO冷冻割断法操作时的注意事项:



↑ 图1-105 经DMSO法冷冻切断的猴虹膜色素细胞断面

① 灌流取材尽量迅速，严守取材规则，突出取材重点，以免延误时间引起组织损伤和人工假象。样品尽可能修成细长梭形，以便于割断和辨别断面。

② 所用割断装置及器材如止血钳、镊子、刀片等，必须用液氮进行预冷。

③ 所用试剂现用现配。10 g/L四氧化锇前固定时间太长，使细胞变得结实，导致细胞质不易去除。如果固定时间太短，则在下一步处理时，细胞的内部结构就容易被破坏。断裂后用1 g/L的四氧化锇浸软和溶解细胞质内非膜性成分，可使细胞内的膜性结构保留并得以清晰地显示。一般处理12 ~ 72 h为宜，视不同组织而异。

④ 操作时，要不断地单方向转动样品，力求样品固定和浸洗均匀一致。

⑤ DMSO防冻处理前，溶液需在4℃预冷，浸泡时间要充分，否则固化时易出现混浊现象，引起冰晶损伤。

⑥ 割断后的样品必须充分清洗，否则四氧化锇后固定时液体会变成深黑色。

⑦ 辨认样品的割断面是此项技术的观察重点，由于四氧化锇固定后全呈黑色，给割断面的辨认带来一定困难。故在操作过程中应始终设法确认和保护观察面，割断后，切忌用镊子夹割断面，勿使其受损伤。

(3) 改进的DMSO冷冻割断法

为了获得高分辨率的图像，田中敬一等又在DMSO冷冻割断法的基础上，改进并建立了“四氧化锇-DMSO-四氧化锇法”(O-D-O)。操作程序与DMSO法基本相同，主要做了以下几点改进。

① 将四氧化锇后固定提到细胞基质软化之前进行，以提高对割断面的固定效果。

② 严格控制1 g/L四氧化锇细胞基质软化过程的温度，延长软化时间，尽量浸软并去除细胞内非膜性成分，突出膜性结构，有利于高分辨观察。其具体要求是：作用温度为20℃，作用时间一般为72 h左右，亦可根据不同样品摸索适宜的时间。

③ 为了加强组织的导电性能，将单宁酸的作用时间增至2 ~ 24 h，并将其作用温度掌握在5 ~ 15℃之间，以防在高温状态下单宁酸溶液可能出现的分解破坏。

④ 为了防止试剂之间的相互作用，O-D-O法加强了试剂更换之间的样品清洗，且将整个操作过程的清洗液全部改用0.067 mol/L PB缓冲液(pH 7.2 ~ 7.4)，清洗时间均为60 min，10 min/次。

此外也有其它改良的制样方法，比如省掉了20 g/L单宁酸浸泡和10 g/L四氧化锇终末固定；用纯丙酮配制单宁酸和四氧化锇，浓度皆为20 g/L，亦用丙酮清洗样品，可使试剂较快渗透样品和还原更多锇金属使之沉着在结构上，无须再镀金属膜就可获得良好导电效果。只用四氧化锇固定的样品多在核与细胞质交界处剖开，适于观察细胞质的细微结构；而用卡诺液-四氧化锇双重固定，细胞核容易断裂，适于观察细胞核内的细微结构。

1.7.2.2 管道铸型样品制备技术

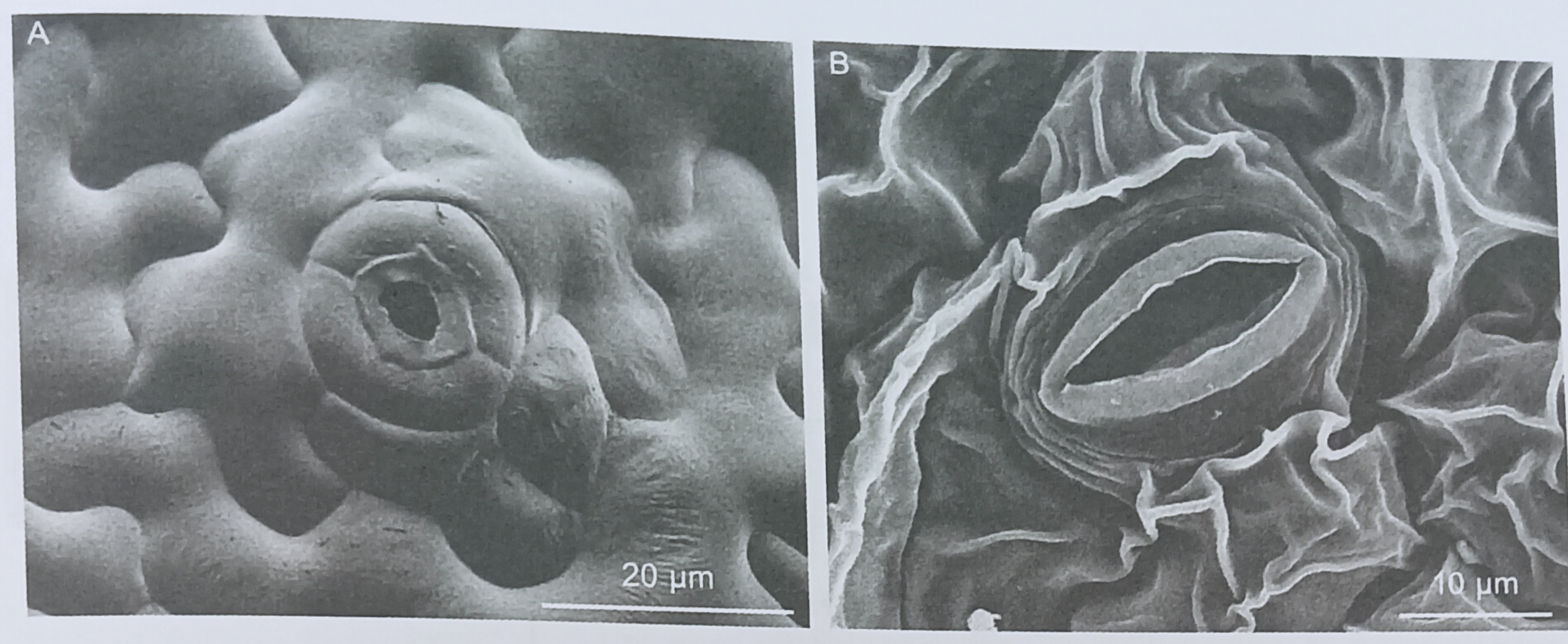
当年达·芬奇将蜡注入脑室内进行复制的方法，视为铸型法的开始。20世纪70年代末，河北医科大学解剖教研室和电镜室共同合作，将血管铸型技术与扫描电镜有效结合，专门对人、猴的全身器官微血管的构筑形式做了较系统的观察研究，积累了各系统全部器官微血管扫描电镜图像。其主要操作过程是将凝固较慢的液体物质(铸型剂)向管腔内注入，待其硬化成型以后，利用腐蚀剂将组织去掉，将铸型的管腔样品裸露并保留下来，接着对铸型样品进行金属镀膜和扫描电镜观察，做出超微构筑分析(廖瑞等，1993)。然而管道铸型操作复杂，应用范围有限，目前已经很少被使用。

1.7.2.3 冷冻扫描电镜技术

大多数生物样品都含有丰富的水分，比例占70% ~ 80%。除了毛发、齿、角质和含水量非常低的昆虫等少数样品能够直接镀金属膜观察，绝大多数实验材料都必须经过固定、脱水、干燥处理的过程，样品的结构会发生不同程度地皱缩变形(图1-106)，无法反映出生物在自然生活状态下的真实结构。冷冻扫描电镜技术(Cryo-SEM)是根据低温生物学原理，在超低温条件下将生物样品组织中的水分及非水溶性组分迅速固定，直接进行扫描电镜观察的一种方法。1970年Echlin等首次提出了扫描电镜中冷冻样品台的设计(Echlin等，1970)，然而当时受到样品冰晶损伤的限制，该方法并未被广泛使用。直至20世纪80年代，随着快速冷冻及真空转移等附件设计的不断完善(Sargent, 1988)，才使得Cryo-SEM技术变得简便。

与常规化学固定-临界点干燥技术相比，Cryo-SEM技术有着如下主要优点：① 能保持可溶性物质，保持含水样品的自然状态；② 可弥漫物质很少移位；③ 机械损伤小；④ 唯一能对样品进行动态实验的方法(不同时间间隔冷冻)；⑤ 操作简

图1-106 冷冻固定与化学固定的比较
A. 冷冻扫描电镜观察的植物叶片表面；
B. 化学固定-临界点干燥处理后的植物叶片表面



便、省时，从新鲜材料到冷冻、断裂、镀金属膜、观察样品可在短时间内完成；⑥ 通过冷冻断裂和选择性蚀刻，可观察到常规扫描电镜很难观察到的结果；⑦ 液体、半液体及电子束敏感样品也可采用。因此，Cryo-SEM是观察生物样品快速、可靠和有效的方法。

1.7.2.3.1 Cryo-SEM的技术条件

冷冻扫描电镜主要由样品快速冷冻装置、真空冷冻传输装置和装有冷台的扫描电镜3部分组成。

样品的快速冷冻固定，是冷冻电镜技术的关键。因为在冷冻过程中，细胞会受到冰晶损伤。不同冷冻条件，冰晶生长的状态不同，样品也会形成不同的固化结构。若降温速率较慢，冰晶生长很快，会形成严重破坏结构的直径大于100 nm的宏晶；若在较快的冷冻速率下，由于结晶时释放的潜热可被及时带走，会阻碍冰晶生长，因此可形成的是直径约20 nm的微晶；若在冷冻速率极快的条件下，将不会发生结晶的过程，从而形成的是玻璃态结构，这种结构没有任何可分辨晶粒。一般在-90℃到0℃范围内的温度下冷冻，冰晶呈六角型晶体状；在-140℃到-90℃范围内的温度下冷冻，冰晶呈立方体状；只有在低于-140℃温度的条件下，才会形成玻璃态无定型结构的非晶态。此时生物样品内不形成冰晶或只形成小冰晶，因此其超微结构和组分分布能正确地反映原始的状态。理论上，一般的生物样品冷冻速率高于 10^6 K/s时，即可形成真正的玻璃态结构。实际应用中冷冻速率超过 10^4 K/s时，冰晶的生长已经不会对电镜样品的超微结构造成损伤。

目前扫描电镜样品冷冻方法主要采用投入冷冻法(图1-107)。将样品直接投入到冷冻剂中，不同的冷冻剂冷冻速率不同(表1-15)，通常以液氮(-196℃)作为主要冷冻剂，既经济又简便，适合样品表面的观察。但由于样品接触液氮时，其周围的液氮迅速汽化形成气膜(莱顿弗罗斯特效应)，阻碍热量传导，从而影响冷冻速率，因此采用液氮泥(-210℃)作为冷冻剂可将冷冻速率提高一倍。也有先用液氮冷却其它冷冻剂，再将样品投入到冷冻剂中进行间接冷冻(中间冷媒法)，这种方法可以获得较好的内部断裂面。

冷冻传输装置是将样品冷冻、传输、断裂、升华、镀金属

表1-15 常用冷冻剂的制冷参数

冷冻剂	丙烷	氟利昂-13	氟利昂-22	异戊烷	液氮	液氮泥
熔点/℃	-189.6	-185	-160	-160	-196	-210
冷冻速率/℃·s ⁻¹	98 000	78 000	66 000	45 000	16 000	21 000

膜功能集为一体，并直接与扫描电镜样品室连接的装置，它可以大大缩短样品传输的时间，避免因温度升高而导致的冰晶损伤，也可以对样品进行重复断裂和镀金属膜。冷冻传输装置配备的涡轮分子泵可保持样品室内的高真空度，同时还配有大容量一体式液氮冷阱，其上部装有冷台和防污染板。冷台可以利用低温氮气高效冷却，内置的可控温加热器和精确的温度感应器，控温范围为-185℃至50℃，可以达到控温升华的目的。防污染板可独立显示温度，温度可达到-190℃，确保了无污染的操作环境。处理室还配置了冷冻断裂刀具，顶部配有离子溅射仪，可对样品进行镀金属膜处理。

1.7.2.3.2 Cryo-SEM的操作及注意事项

目前，国内扫描电镜配置Cryo-SEM系统还不是很普遍，制样方法还在不断完善，在实际操作中应注意以下几点。

(1) 取材

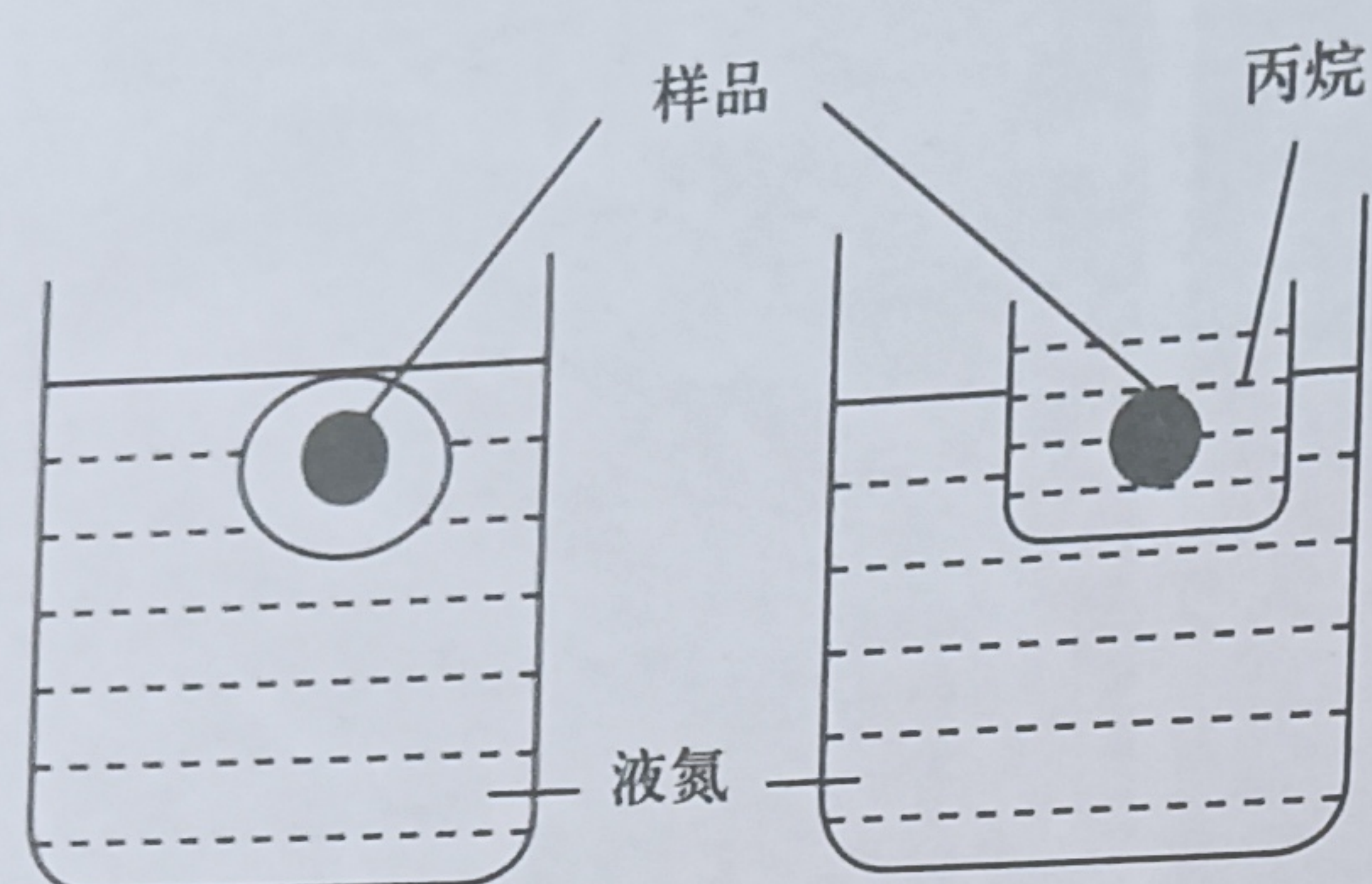
样品尽量取得小些，有利于快速冷冻，根据样品采用合适的样品座。一般观察表面的样品可以在样品座上滴加少量OCT冷冻固定胶，然后将样品置于胶上即可。液体样品用移液器吸取微量加入细管或小孔中，液体必须露出孔口形成小液珠，便于冷冻后断裂。需要断裂的样品则采用带夹的样品座，取条状样品插到缝隙中并旋转螺丝夹紧样品(图1-108)。取样完毕后，将样品座安装在样品杆上。

(2) 样品快速冷冻

根据不同的样品及实验条件，可采用直接冷冻法和间接冷冻法。

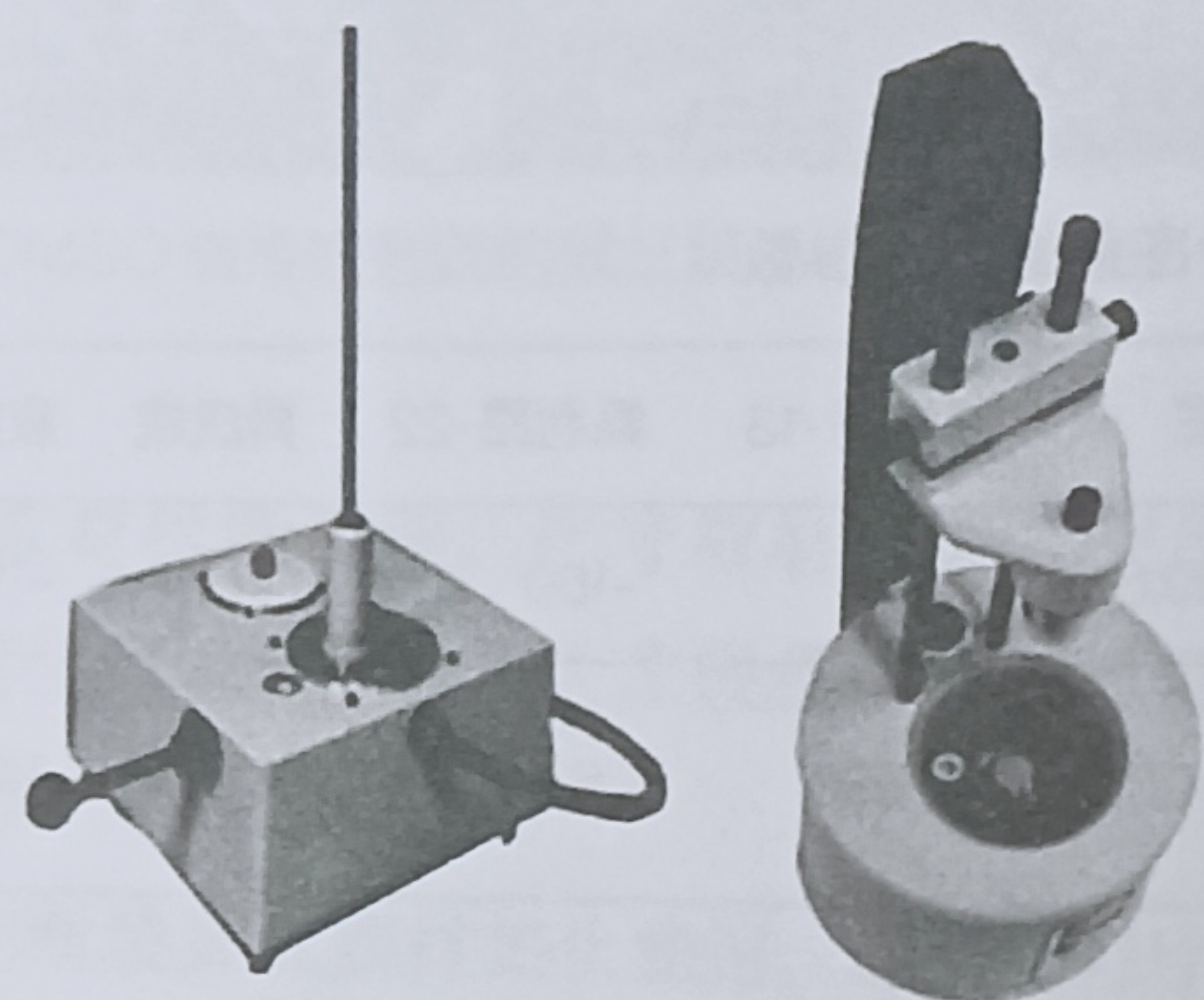
① 直接冷冻法 首先向快速冷冻装置的冷冻室内注入液氮，抽真空使冷冻室内的液氮快速变为液氮泥。迅速将样品杆插入液氮泥并搅拌，直至液氮不再沸腾。

② 间接冷冻法 将装有冷冻剂(如乙烷等)的金属小杯放



直接冷冻

间接冷冻



手动投入冷冻仪

弹射冷冻仪

↑ 图1-107 投入冷冻装置及投入冷冻法示意图

入样品冷冻室，周围注入液氮，液氮面低于金属杯，静止片刻待液氮液面不再沸腾，将样品杆插入冷冻剂冷冻。

(3) 冷冻样品的传输

将样品杆从冷冻室内拿出，迅速转移至预抽室内抽真空。达到预抽室的预定真空度后，将样品座推到已经预冷的处理台上，进行断裂、升华蚀刻、镀金属膜等处理。

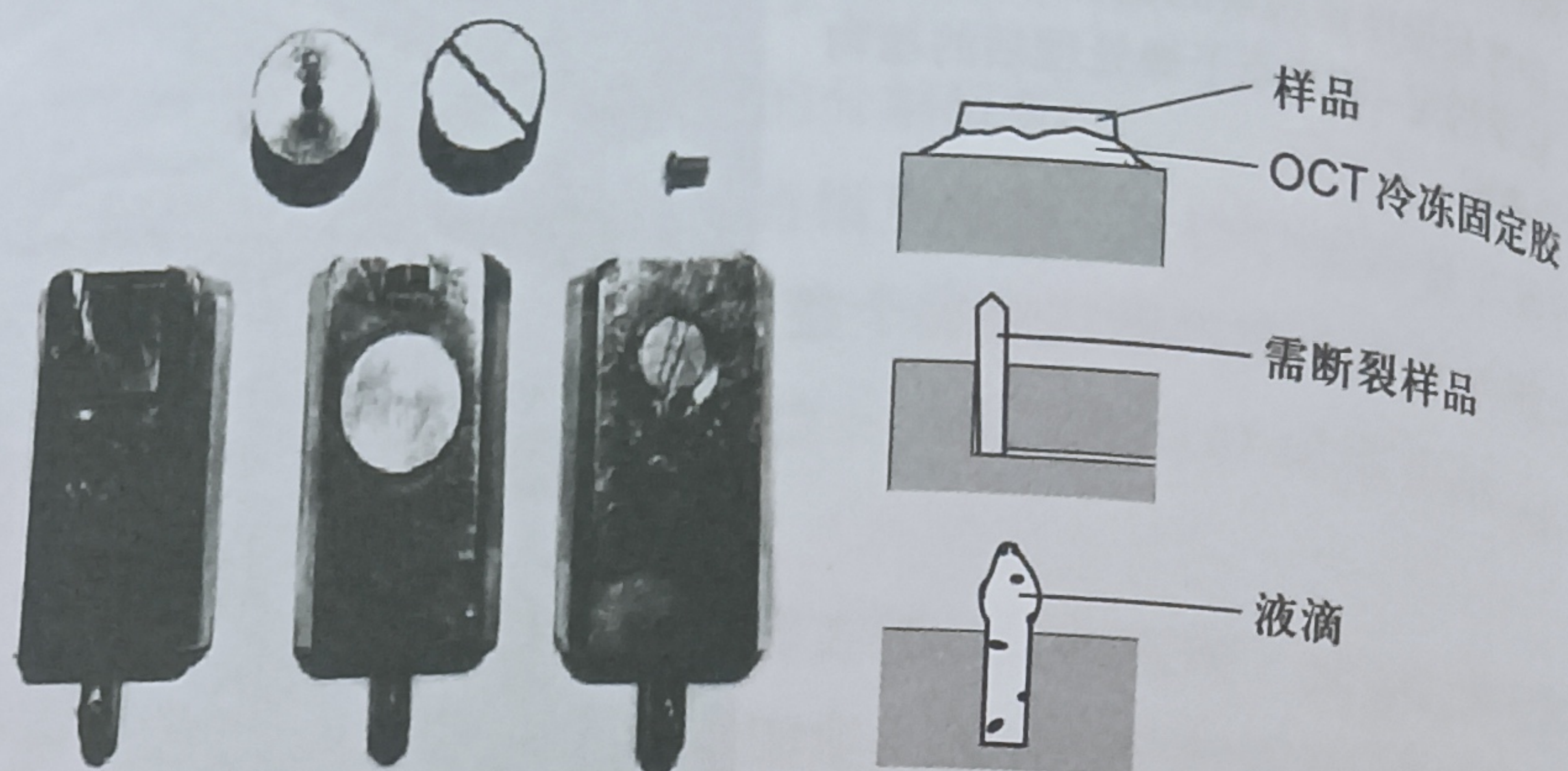
① 断裂 观察样品内部结构或者液态样品时，需要对样品进行断裂。断裂时的温度须低于 -160°C ，通常达到 -180°C ，断裂使用的刀必须预先冷却（低于 -160°C ），断裂总是沿着阻力最小的面进行的，因此，断裂面的情况并不可预知（图1-109）。

② 升华蚀刻 设定升华温度开始升温，断裂面上的冰从固态直接变成气态升华，暴露出样品的表面结构。蚀刻的速率及深度与蚀刻温度及时间有关（表1-16，表1-17），升华温度一般为 -100°C 至 -95°C ，时间为2~5 min。升华蚀刻后，必须将处理台温度降到 -160°C 以下。

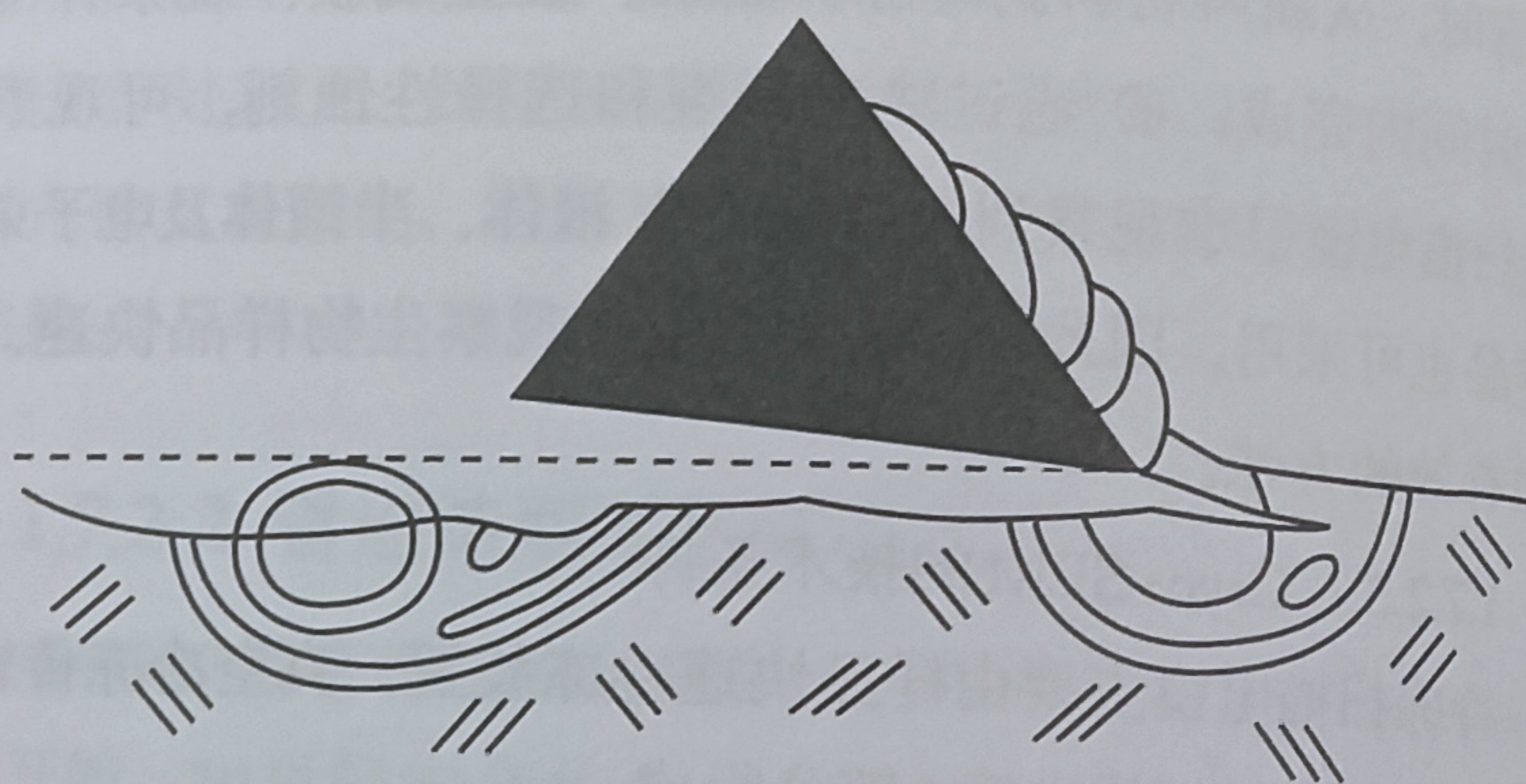
③ 镀金属膜 利用冷冻传输装置内的离子溅射仪，可以对样品表面镀金属膜，以减小电荷积累和增加二次电子信号，通常以Au-Pd为靶材镀金属膜2~3 nm。也可以不镀金属膜，直接在扫描电镜低电压下观察，效果有时优于镀金属膜样品。

(4) 扫描电镜观察

电镜样品台的冷台温度必须低于 -146°C ，通常保持在 -160°C ，这个温度下不会影响电镜的真空度。防污染板的温



↑ 图1-108 各种冷冻样品座及样品的安放示意图



↑ 图1-109 冷冻断裂示意图

表1-16 蚀刻温度与蚀刻速率的关系（真空度 $1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ ）

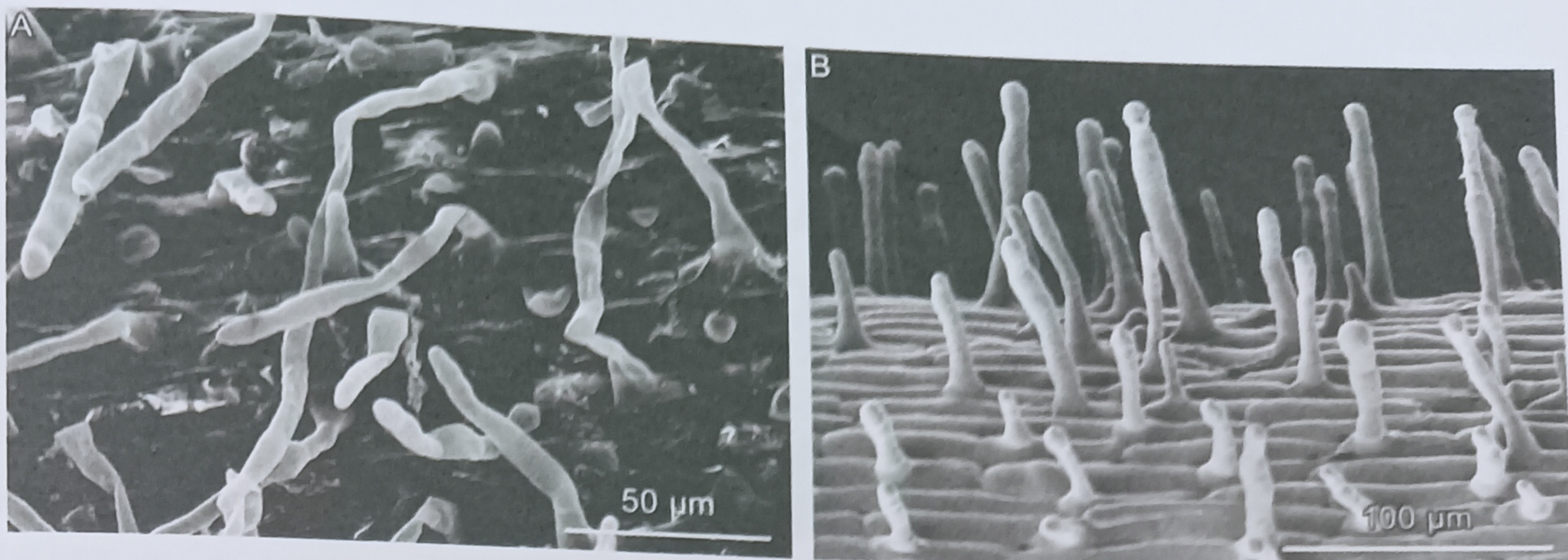
蚀刻温度/ $^{\circ}\text{C}$	蚀刻速率/ $\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$
-130	0.001
-120	0.02
-110	0.25
-100	2
-90	14

表1-17 蚀刻时间与蚀刻深度的关系（ -100°C ， $1 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ ）

蚀刻时间/s	蚀刻深度/nm
15	30
30	60
60	120
90	180
120	240

度必须低于冷台温度，一般处于 -180°C 。场发射扫描电镜通常采用低电压观察，对于已镀金属膜样品可以在3 kV下观察，未镀金属膜样品可以在1 kV下观察。图1-110是高度含水的水稻根临界点干燥法与冷冻扫描电镜法观察结果的比较。

图1-110 临界点干燥法与冷冻扫描电镜法观察液体培养的水稻根表面比较
A. 临界点干燥的根毛变形严重;
B. 冷冻扫描电镜观察根毛饱满挺立
(陈汉民提供)



1.7.3 扫描电镜生物制样技术应用实例

生物样品种类繁多,不同的样品有其自身独特性。在此列举一些扫描电镜生物制样的应用实例,具体可参阅相关文献(王仲涛等,1986;Crang和Klomprens,1992;王丽,2012)。

1.7.3.1 游离细胞扫描电镜制样

(1) 材料

人外周血红细胞,小白鼠红细胞。

(2) 样品制备

- ① 用玻璃毛细管从鼠眼内眦取血,抗凝,离心清洗2~3次,用生理盐水稀释3~5倍,涂于蚀刻好的载玻片上。
- ② 1%戊二醛固定液固定10 min;双蒸水清洗3次,5 min/次。
- ③ 常规乙醇梯度脱水、临界点干燥、镀金属膜观察。

(3) 注意事项

① 一般外周血需要抗凝处理,固定之前进行2~3次离心清洗。一般选用2 500~3 000 r/min离心5 min,去掉样品表面的杂质,充分显露样品表面的细节,否则杂物堆积成块,影响观察效果(图1-111A)。

② 涂细胞的玻璃片或载玻片,在离子溅射仪里蚀刻数秒钟,可使滴附的细胞贴服紧凑、不易脱落,而且分散均匀(图1-111B、C)。

③ 细胞比组织更容易受固定液渗透压的影响,所以固定液的浓度、渗透压及稀释固定液的缓冲液都非常重要。宜选用低浓度固定液和等渗清洗液,以免细胞膨胀或皱缩,引起细胞变形。

(4) 适用范围

血液、尿液、胸腹水、脑脊液中的细胞及卵细胞、精子细胞等。

1.7.3.2 支架共培养细胞扫描电镜制样

组织工程支架为细胞和组织生长提供适宜的环境,并随着组织的构建而逐渐降解和消失,从而将新的空间结构提供给细胞以获取营养、气体交换、废物排泄和生长代谢的场所,是形成具有新的形态、功能的组织和器官的基础。组织工程支架材料包括:骨、软骨、血管、神经、皮肤、肝、脾、肾、膀胱等的

组织支架材料,除此之外还有合成高分子材料和无机材料等。

(1) 材料

人(猪)真皮组织支架培养的成纤维细胞诱导分化的上皮细胞。

(2) 样品制备

- ① 用不加牛血清的培养液置换,30 min×3次。
- ② 1%戊二醛固定10 min;双蒸水清洗3次,15~20 min/次。
- ③ 乙醇梯度脱水,50%、70%、80%、90%、100% I 和 100% II,每级15~20 min。
- ④ 叔丁醇干燥 75%叔丁醇,15~20 min;100%叔丁醇2次,第一次15~20 min,第二次置于冰箱冷冻固化10 min,放入低温真空干燥仪中干燥。

(3) 注意事项

① 75%叔丁醇的配制要用100%乙醇进行稀释,即取75 mL的100%叔丁醇与25 mL的100%乙醇,混合后得到所需浓度。

② 人(猪)真皮组织支架有一定厚度,需要延长固定和脱水时间,但培养在支架表层的成纤维细胞固定和脱水时间不能太长,两者之间应兼顾。先要保证细胞形态结构,固定时间可设为10 min、脱水时间可设为5 min,但支架脱水时间短会造成观察时放电,所以制样时应适当延长脱水时间。从观察结果看:爬在支架上成纤维细胞生长舒展,有向上皮细胞分化的趋势,而下面的支架主要是胶原纤维结构,固定时间长短对其形态影响不大(图1-112)。

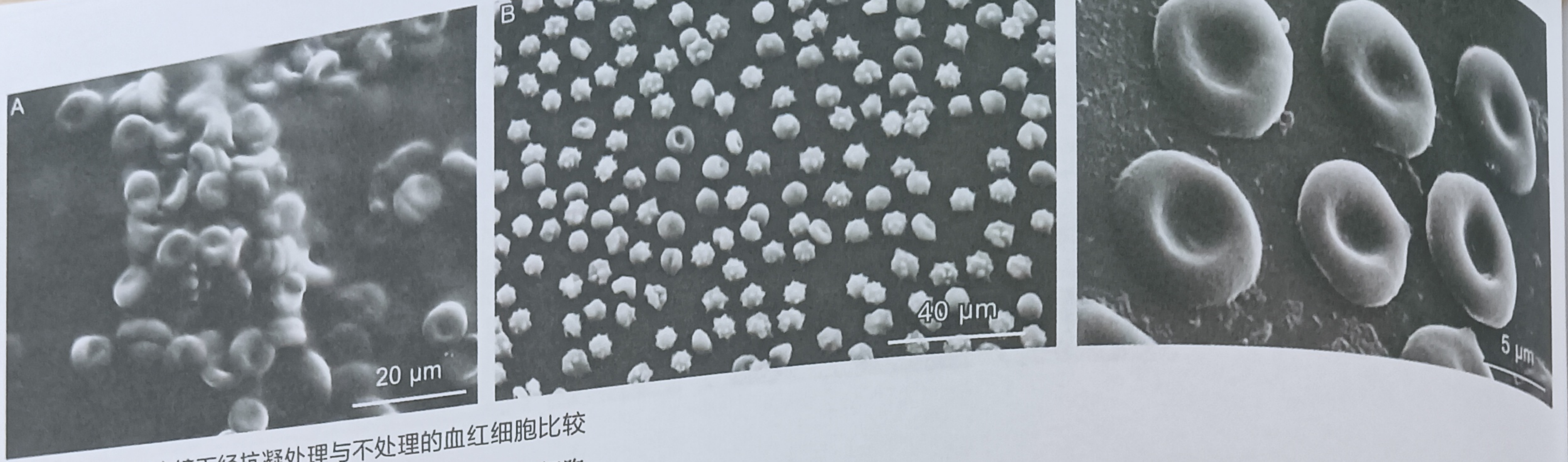
③ 猪小肠黏膜下层比较薄,在培养过程中会悬浮在液体中,支架正反两面都会长有细胞,且细胞的生长速率及状态都好。由于无法随时观察细胞生长状态,最好同时加做一组爬于载玻片上的细胞以掌握时机,即先在载玻片上辨清细胞形态后再在支架上寻找,尤其适用于较扁平类似成纤维的细胞。

(4) 适用范围

与支架共培养的细胞。

1.7.3.3 肾小球扫描电镜制样

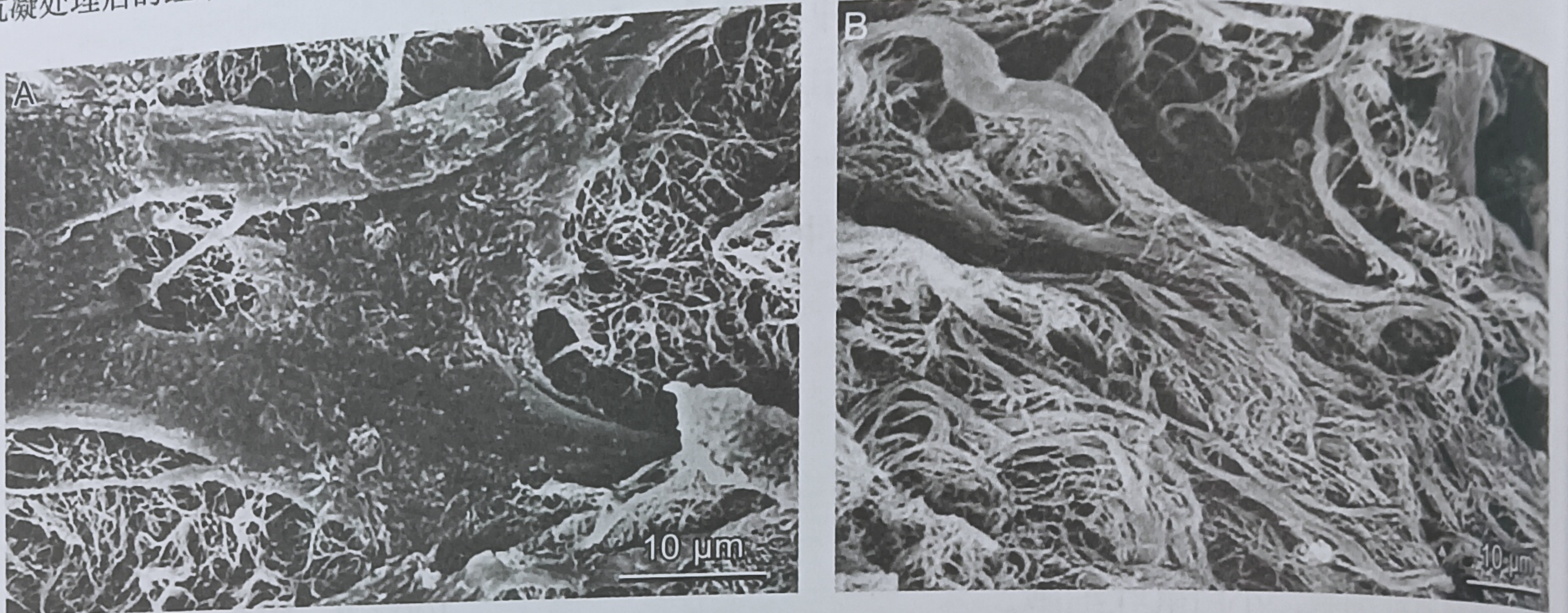
肾小球是肾组织研究的重要内容,常用透射电镜观察超薄



↑ 图1-111 扫描电镜下经抗凝处理与不处理的血红细胞比较
A. 未经抗凝处理的红细胞；B, C. 经过抗凝处理后的红细胞

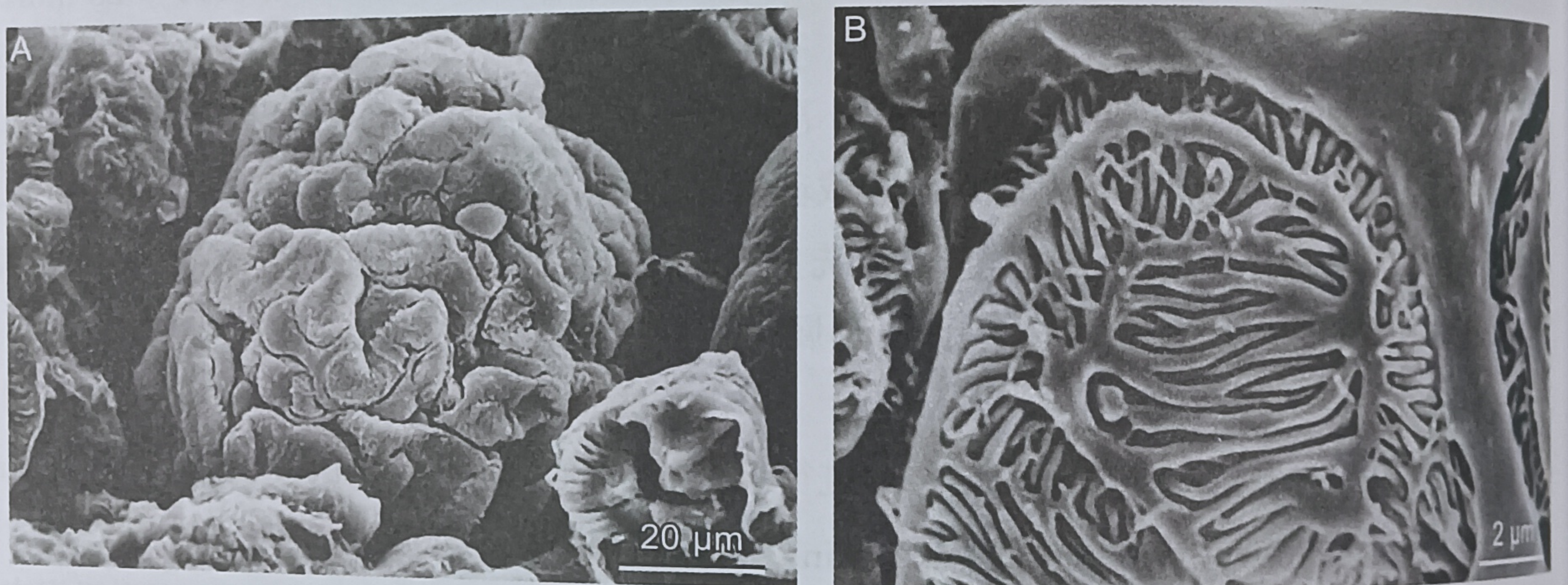
→ 图1-112 扫描电镜下的组织支架共培养细胞

- A. 组织支架培养的成纤维细胞；
B. 组织支架下面的胶原纤维结构



→ 图1-113 扫描电镜下的肾组织

- A. 肾小球；
B. 肾足细胞表面足突走向



切片获得其二维的超微结构。利用冷冻割断技术显示割断面结构，可观察肾小球的立体结构。采用灌注固定，保持接近自然状态的形貌，不仅可清楚辨别肾小球、肾小管的形态及足突走向(图1-113)，还可以观察肾小球有孔毛细血管内皮细胞等结构(王丽等, 2012)。

(1) 材料

大鼠肾皮质。

(2) 样品制备

① 经心全身灌流固定，取材修块，2.5%戊二醛固定液固定2 h或数周。

② 双蒸水清洗3次，15 ~ 30 min/次。

③ 乙醇梯度脱水，根据样品块大小，50%、70%、80%、90%、100%每级设定时间10 ~ 30 min。

④ 叔丁醇冷冻干燥或临界点干燥。

⑤ 双面刀片在组织上切一道缝，用镊子把裂缝两侧的组织掰开，使所出现的两个观察面向上粘于样品座上。

⑥ 镀金属膜观察。

(3) 注意事项

① 一定要进行灌注固定，使其接近良好自然状态的超微结构。
② 由于肾小球主要分布在肾皮质，取材靠肾外缘处成功率较高。

③ 切缝掰开而不要用刀片完全切开，以保证肾小球的完整性。

(4) 适用范围

肝、脾和肺等实质性器官的组织结构。

1.7.3.4 脂肪组织扫描电镜制样

脂肪组织是一种以脂肪细胞为主要成分的结缔组织，由脂肪细胞和脂肪细胞间质成分构成，其主要作用是为机体的活动提供能量。脂肪组织中脂质最多，尤以三酰甘油为最，此外还有少量游离脂肪酸、二酰甘油、胆固醇、磷脂等成分。因此常规扫描电镜制样技术无法满足观察需要，轻则样品表面因脂膜析出，犹如覆盖一层厚厚的被膜，脂肪细胞的轮廓隐隐约约显

现,重则脂肪细胞皱缩、塌陷,甚至完全破坏,从而导致组织结构杂乱无章。

(1) 材料

大鼠脂肪组织。

(2) 样品制备

① 取材大小为 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$, 0.1 mol/L 二甲砷酸钠配制的 2.5% 戊二醛固定液中行前固定。

② 清洗I 双蒸水清洗3次, 30 min/次 。

③ 后固定 10 g/L 四氧化锇避光室温 30 min 。

④ 清洗II 同清洗I。

⑤ 乙醇梯度脱水, 50% 、 70% 、 80% 、 90% 、 100% 每级 30 min 。

⑥ 叔丁醇冷冻干燥 75% 叔丁醇 30 min ; 100% 叔丁醇两次, 第一次 30 min , 第二次置于冰箱冷冻固化 10 min , 抽真空升华干燥。

⑦ 镀金属膜观察。

(3) 注意事项

① 取材严格遵循“快、小、轻、准”的原则, 样品大小在 1 mm^3 以内, 每组样品瓶内放入 $1\sim 2$ 块组织。

② 样品必须经过四氧化锇后固定。

③ 清洗、脱水各步时间可适当延长, 70% 乙醇和 100% 乙醇均可过夜, 便于组织内的水分和细胞内某些物质被有机溶剂充分抽提置换, 以保证脂质不残留于样品表面而影响成像效果。

(4) 适用范围

含脂质较多的样品, 如脂肪组织(图1-114)(崔芳等, 2012)。

1.7.3.5 原生动物扫描电镜制样

原生动物是最简单的真核生物, 一个原生动物既是一个真核细胞, 也分化产生各种“小器官”, 执行类似多细胞生物体的独立活动, 诸如运动、摄食消化、生殖等生理功能。因此原生动物的复杂程度是多细胞生物中的单个细胞远不能及的。不同原生动物由于其体积大小、表膜厚度及培养难度等不同, 扫描电镜制样方法也略有不同(顾福康和倪兵, 1993; 王正君等, 2010)。一般可以大量培养表膜较厚的原生动物, 可采取离心

法收集细胞, 制备方法如同游离细胞、细菌等; 有些动物如腹毛目纤毛虫, 个体较大, 表膜较薄, 不宜大量培养, 无法离心收集, 只能用微吸管逐一收集, 整个制样过程需在体视显微镜下操作。

(1) 取材和清洗

实验前一天观察细胞培养状态良好, 种群密度大, 于当天晚上停止喂食鞭毛虫, 第二天一早于体视显微镜下, 在虫体生长密集处用微吸管挑取其中生长状态良好(如细胞饱满、运动活跃、胞质均一透明等)的个体到干净的凹面皿中。在凹面皿中加入适量的过滤水对虫体进行漂洗和冲洗, 以清洗培养液里的鞭毛虫及虫体表面附着污物。

(2) 样品制备

① 固定 采用弯头吸管将凹面皿中虫体转到洁净的固定缸中(图1-115A), 然后再吸取配制好的固定剂四氧化锇和升汞的混合液注入固定缸中于 4°C 冰箱内固定 $5\sim 10\text{ min}$ 。固定时间因样品不同情况各异, 皮层较厚者如游仆虫、棘尾虫可适当延长至 10 min 。固定结束后, 用 0.1 mol/L PBS缓冲液清洗3次, 前两次各 10 min , 最后一次边清洗杂物边浸泡, 约 30 min , 彻底洗去固定液。

② 脱水 用弯头吸管慢慢吸取固定缸中的液体, 进行乙醇梯度脱水。 15% 、 30% 、 50% 、 70% 、 90% 脱水各1次, 100% 脱水3次, 每次各 5 min 。

③ 置换 用弯头吸管将虫体收集到特制的筛绢样品篮中(图1-115C), 并将此小篮放置于称量瓶内, 依次加入无水乙醇-乙酸异戊酯($1:1$)、无水乙醇-乙酸异戊酯($1:3$)、 100% 乙酸异戊酯、 100% 乙酸异戊酯依次置换乙醇, 每次 10 min 。

④ 干燥 将筛绢样品篮盖上盖子, 放入 CO_2 临界点干燥中进行干燥。

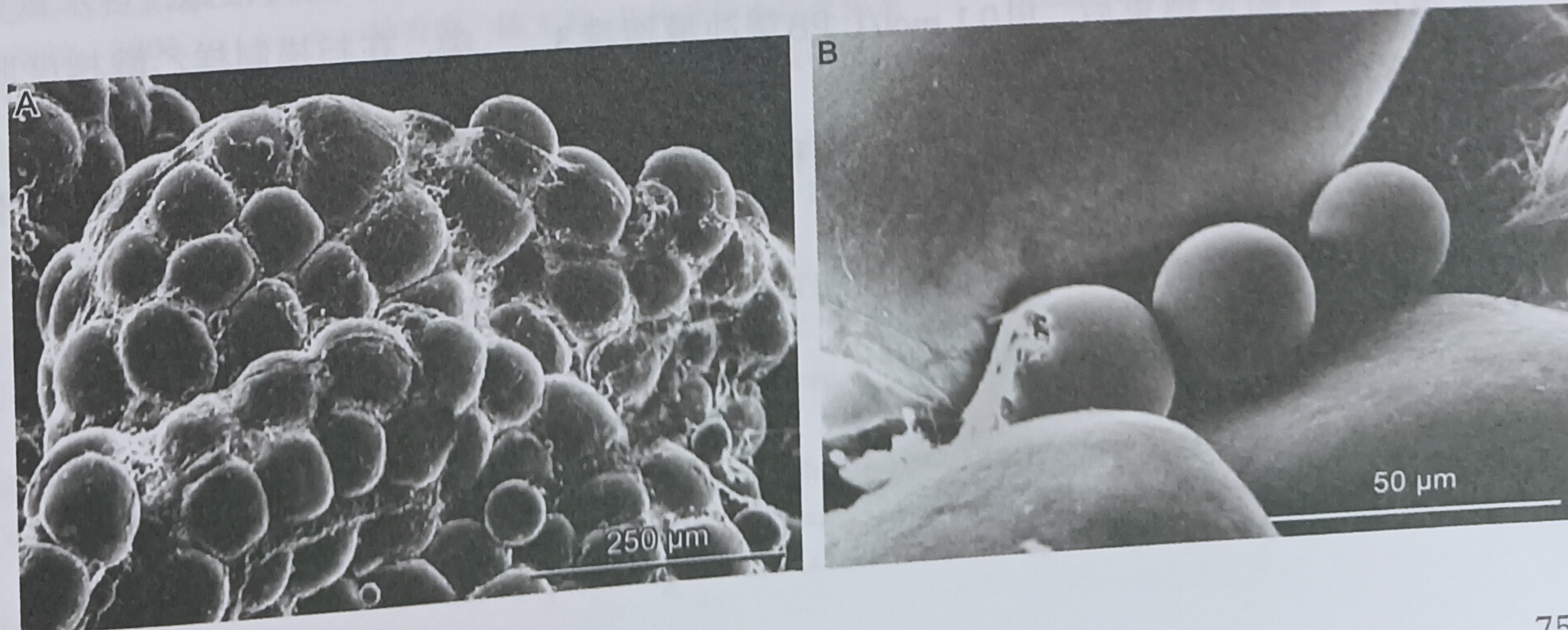
⑤ 装样及镀金属膜 在无风、干燥、安静的实验室里, 于体视显微镜下, 将筛绢上干燥好的实验样品轻轻倒置铜台导电胶上, 使样品篮中的细胞落到导电胶上, 用睫毛针将样品在导电胶上调整好姿势, 再用睫毛针将残留在筛绢上的样品转移到导电胶上, 然后离子溅射镀金属膜。

⑥ 扫描电镜观察(图1-116)。

→ 图1-114 扫描电镜下的脂肪组织

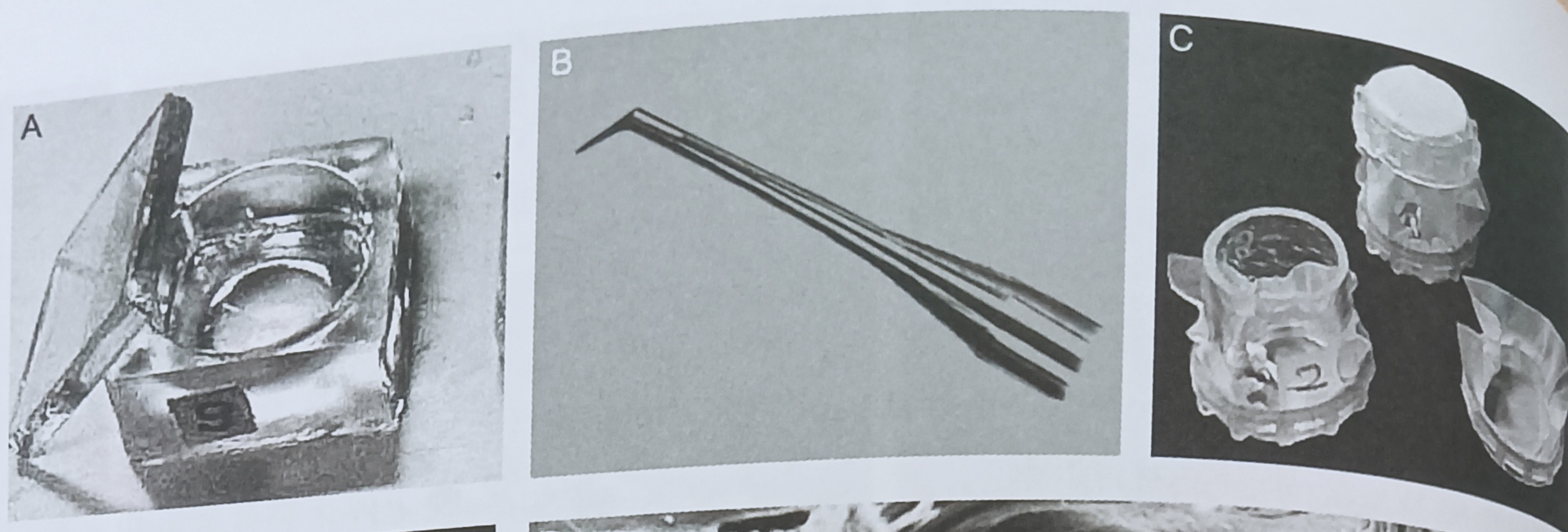
A. 制备较好的脂肪组织细胞表面基本无脂质残留;

B. 清晰的脂肪细胞轮廓



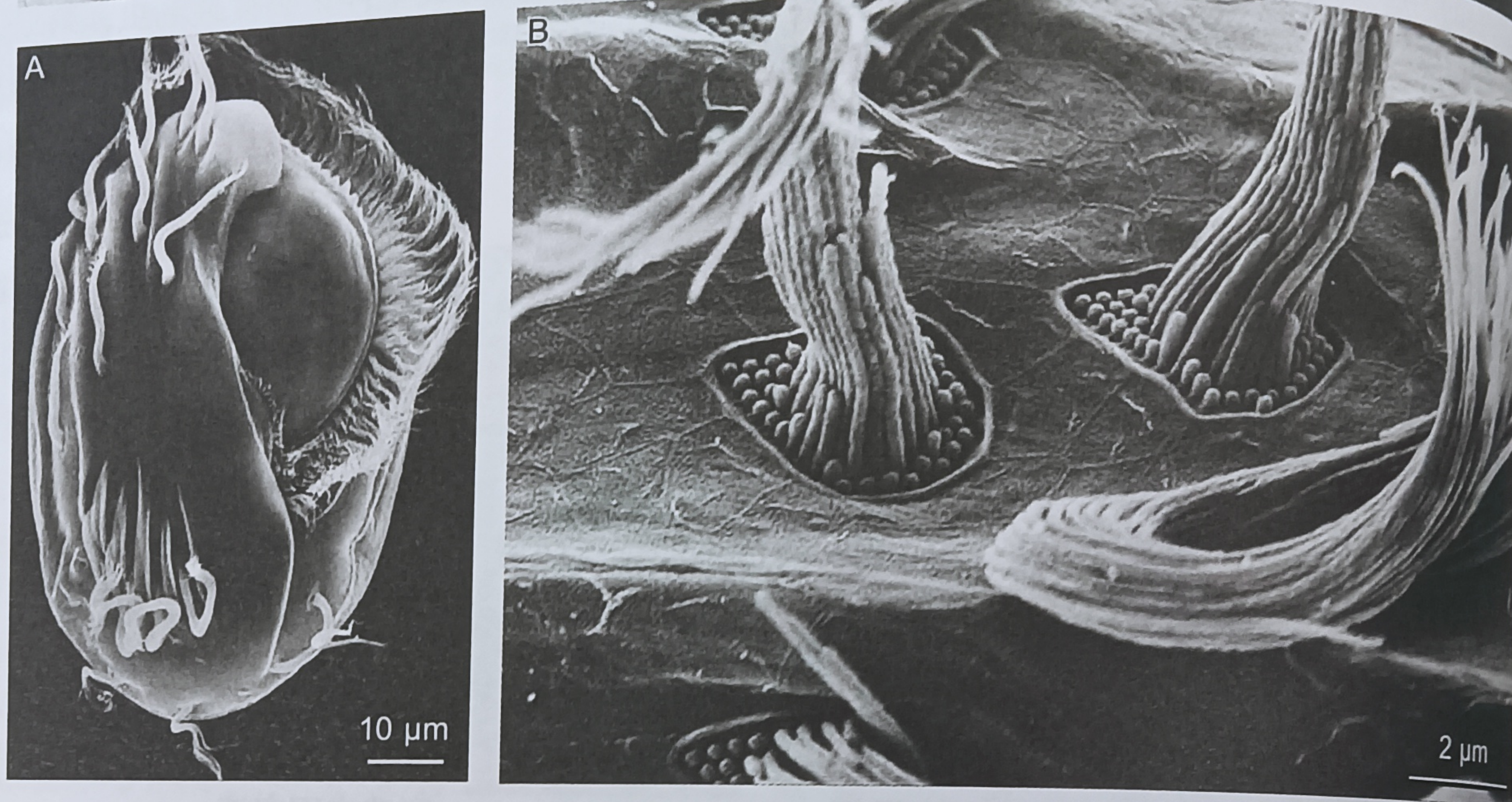
→ 图 1-115 原动物扫描电镜制样常用工具

- A. 固定缸;
B. 弯头吸管;
C. 筛绢样品篮



→ 图 1-116 扫描电镜下的游仆虫

- A. 整体观;
B. 额腹棘毛



1.7.3.6 植物叶片扫描电镜制样

在植物学研究中经常需要观察植物叶片表面的超微形态结构,如表皮细胞形态、气孔开闭状态、表皮毛的数量及形态等。植物组织由于细胞壁的存在,相比动物组织要耐受因脱水干燥引起的组织收缩变形,尤其是那些表面角质化的组织。但一些含水量高的幼嫩叶片、芽、幼根等,仍需要进行化学固定和临界点干燥处理,以保持其原有的表面形貌,有条件时最好进行冷冻扫描电镜观察。

(1) 材料

温室人工栽培的烟草叶片。

(2) 样品制备

① 固定 取生长至实验条件的叶片,避开叶脉,切成 $3\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 左右的小条,加入用 0.1 mol/L PB 缓冲液配制的 3% 戊二醛固定液,用真空泵或注射器抽真空至叶片沉入离心管底部。室温固定 2 h , 4°C 冰箱内过夜保存。

② 清洗 前固定结束后,用 0.1 mol/L PB 缓冲液清洗 3 次, 10 min/次 ,彻底洗去固定液。

③ 后固定 用 10 g/L 四氧化锇(去离子水稀释) 4°C 固定 30 min 。

④ 清洗 去离子水清洗 3 次, 10 min/次 。

⑤ 脱水 乙醇梯度脱水 30% 、 50% 、 70% 、 90% 、 100% 、 100% 各 1 次, 10 min/次 , 4°C ; 100% 10 min , 室温。

⑥ 干燥 将样品用吸管吸取放入样品篮,放入临界点干燥仪中进行干燥。

⑦ 粘样及镀金属膜 干燥结束后,取出样品,在体视显微镜下分上下两面粘在导电胶带上,然后离子溅射镀金属膜,厚度约 10 nm 。

⑧ 扫描电镜观察,结果见图 1-117。

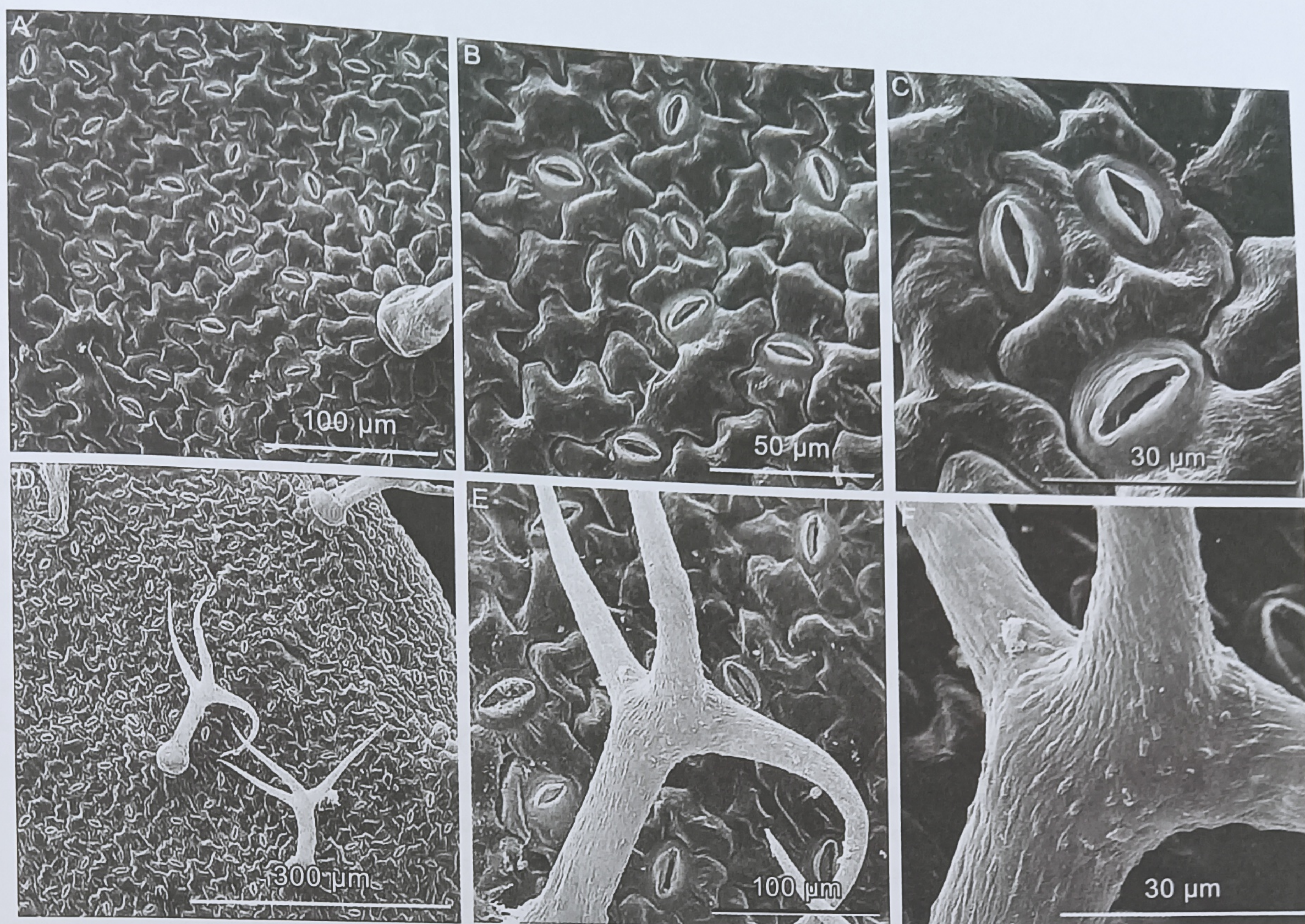
(3) 注意事项

① 植物样品由于内部含有气体,必须抽真空使得固定液能渗透到组织内部,有些样品抽真空需要 30 min 以上。抽真空要缓慢进行,当离心管内的气泡慢慢增多增大时,停止抽真空,等待 $2 \sim 3\text{ min}$ 气泡破裂后慢慢放气。放气过程中贴到管壁上的叶片丢弃,如此往复至叶片沉底。

② 更为稚嫩、含水量更高的样品,例如植物的新叶、藻类,在扫描制样乙醇梯度脱水时可以从 10% 开始,依次递增 10% ,逐渐升高至 100% 。

③ 对于一般植物样品可以只用戊二醛进行单固定,但四氧化锇后固定可以硬化表面结构并增加导电性,使表面形态结构更加饱满。

→ 图 1-117 烟草叶片的扫描电镜观察结果
A-C. 表皮细胞和气孔结构;
D-F. 表皮上的表皮毛
(李英提供)



—常规生物电镜样品制备技术

参考文献

参考文献

- ◇ Crang R F E, Klomparens K L. 生物电镜技术假象分析及预防. 段相林, 马建社, 译. 石家庄: 海洋出版社, 1992.
- ◇ 陈文列, 钟秀容, 陈莲云. 微波辐射环氧树脂 618 包埋剂的快速聚会法. 电子显微学报, 1994, 13 (5): 388.
- ◇ 崔芳, 刘超, 杨建民, 等. 脂肪组织扫描电镜样本制备方法. 南方医科大学学报, 2012, 32 (3): 435-436.
- ◇ 顾福康, 倪兵. 原生动物扫描电镜样本制备方法的探讨. 电子显微学报, 1993 (6): 525-528.
- ◇ 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用. 厦门: 厦门大学出版社, 2006.
- ◇ 洪健. 金属投影法制备细菌 TEM 样品的几个技术问题. 浙江农业大学学报, 1986, 12 (4): 461-463.
- ◇ 康莲娣. 生物电子显微技术. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003.
- ◇ 李伯勤, 张圣明. 医学超微结构基础. 济南: 山东科学技术出版社, 2003.
- ◇ 李文镇. 组织细胞冷冻复型电镜图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1981.
- ◇ 廖瑞, 袁桂琴, 魏宝林. 人和猴器官内微血管三维构筑. 北京: 科学出版社, 1993.
- ◇ 石雪迎. 微波技术在光镜和超微结构中的应用. 北京: 北京大学医学出版社, 2008.
- ◇ 田中敬一, 永谷隆. 图解扫描电子显微镜. 李文镇, 应国华, 等译. 北京: 科学出版社, 1984.
- ◇ 王丽. 被覆上皮扫描电镜图谱. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- ◇ 王响英, 吴淑燕, 李苏安, 等. 微波辐射大鼠脏器组织超快制备电镜样品的实验研究. 实验动物与比较医学, 2005, 25 (4): 221-225.
- ◇ 王正君, 翟楠, 张小翠, 等. 原生动物细胞结构的扫描电镜标本制备方法. 广东农业科学, 2010 (7): 169-170.
- ◇ 王仲涛, 雷建章, 应国华. 组织和细胞扫描电镜图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- ◇ 夏愿耀. 诊断电镜方法学标本制备程序. 电子显微学报, 1997, 16 (5): 686-691.
- ◇ 叶煦亭, 沙继宏, 郑尊. 微波辐射对细胞膜通透性的影响. 电子显微学报, 1995, 14 (2): 154-156.
- ◇ 张存硅, 孟秀珍, 丁明孝, 等. 核酸分子的暗场成像. 电子显微学报, 1985 (4): 1-6.
- ◇ 钟秀容, 陈文列. 几种骨标本微波快速脱钙的电镜实验研究. 电子显微学报, 2002, 21 (6): 936-938.
- ◇ Adrian M, Dubochet J, Fuller S D, et al. Cryo-negative staining. Micron, 1998, 29: 145-160.
- ◇ Aebi U, Cohn J, Buhle L, et al. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. Nature, 1986, 323(6088): 560-564.
- ◇ Anderson T F. Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Transaction New York Academy of Sciences Ser II, 1951, 13(4): 130-134.
- ◇ Brenner S, Horne R W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim Biophys Acta, 1959, 34: 103-110.
- ◇ Chen H M, Han J J, Cui K M, et al. Modification of cambial cell wall architecture during cambium periodicity in *Populus tomentosa* Carr. Trees, 2010, 24(3): 533-540.
- ◇ Dunnebie E A, Segenhout J M, Kalicharan D, et al. Low-voltage field-emission scanning electron microscopy of non-coated guinea-pig hair cell stereocilia. Hear Res, 1995, 90(1-2): 139-148.
- ◇ Echlin P, Paden R, Dronzek B, et al. Scanning electron microscopy of labile biological material maintained under controlled conditions. Scanning Electron Microsc, 1970, 3: 69-76.
- ◇ Fernandez-Moran H. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid Helium II. Ann N Y Acad Sci, 1960, 85: 689-713.
- ◇ Giberson R T, Demaree R S Jr, Nordhausen R W. Four-hour processing of clinical /diagnostic specimens for electron microscopy using microwave technique. J Vet Diagn Invest, 1997, 9(1): 1-6.

- 61-67.
- ◇ Hall C E. Visualization of individual macromolecules with the electron microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1956, 42: 801-806.
 - ◇ Harris J R. Negative Staining and Cryoelectron Microscopy: the Thin Film Techniques. RMS Microscopy Handbook Number 35. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1997.
 - ◇ Harris J R, Horne R W. Negative staining: A brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron*, 1994, 26: 5-13.
 - ◇ Hayat M A. Principles and Techniques of Electron Microscopy. 4th Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
 - ◇ Heinmets F. Modification of silica replica technique for study of biological membranes and application of rotary condensation in electron microscopy. *J Appl Physiol*, 1949, 20: 384-388.
 - ◇ Hendricks G M. Metal shadowing for electron microscopy. *Methods Mol Biol*, 2014, 1117: 73-93.
 - ◇ Heuser J. Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. *Trends Biochem Sci*, 1981, 6: 64-68.
 - ◇ Heuser J. The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 2011, 60 (Suppl 1): S3-S29.
 - ◇ Heuser J, Salpeter S R. Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. *J Cell Biol*, 1979, 82(1): 150-173.
 - ◇ Hippe-Sanwald S. Impact of freeze substitution on biological electron microscopy. *Microsc Res Tech*, 1993, 24(5): 400-422.
 - ◇ Hirokawa N. Quick-freeze, deep-etch electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1989, 38: S123-S128.
 - ◇ Hirokawa N, Heuser J E. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*, 1981, 91(2 Pt 1): 399-409.
 - ◇ Horowitz R A, Giannasca P J, Woodcock C L. Low-temperature preparation of chromatin and nuclei. *J Microsc*, 1990, 157(Pt 2): 205-224.
 - ◇ Hu J, Sun L, Shen F, et al. The intra-s phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, 2012, 149(6): 1221-1232.
 - ◇ Humbel B, Müller M. Freeze substitution and low temperature embedding//Müller M, Becker R P, Boyde A, et al. The science of biological specimen preparation 1985. AMF O' Hare, IL: SEM, 1986: 175-183.
 - ◇ Inoué T, Osatake H. A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch Histol Cytol*, 1988, 51(1): 53-59.
 - ◇ Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, et al. Comparative study of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids for observing cultured human cells by scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech*, 2011, 74(12): 1104-1108.
 - ◇ Itoh T. Deep-etching electron microscopy and 3-dimensional cell wall architecture// Chaffey N J. Wood formation in trees. London: CRC Press, 2002.
 - ◇ Itoh T, Ogawa T. Molecular architecture of the cell wall of poplar cells in suspension culture as revealed by rapid-freezing and deep-etching techniques. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34: 1187-1196.
 - ◇ Jiang S J, Chen J Y, Lu Z F, et al. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. *J Dermatological Sci*, 2006, 44(1): 29-36.
 - ◇ Joseph E. Molecular weight and conformation of DNA. *Methods Enzymol*, 1968, 12: 361-372.
 - ◇ Kellenberger E. The response of biological macromolecules and supramolecular structures to the physics of specimen cryopreparation// Steinbrecht R A, Zierold K. Cryotechniques in biological electron microscopy. Berlin: Springer-Verlag, 1987: 35-63.
 - ◇ Klotz G, Sängler H L. Electron microscopic evidence for viroid conformers. *Eur J Cell Biol*, 1981, 25(1): 5-7.
 - ◇ Kolotuev I, Schwab Y, Labouesse M. A precise and rapid mapping protocol for correlative light and electron microscopy of small invertebrate organisms. *Biol Cell*, 2009, 102(2): 121-132.
 - ◇ Kuo J. Electron microscopy methods and protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2007.
 - ◇ Lee J T, Chow K L. Sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. *Scanning*, 2012, 34(1): 12-25.
 - ◇ Leong A S-Y. Microwave technology for light microscopy and ultrastructural studies. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Company, 2005.
 - ◇ Login G R, Dvorak A M. Application of microwave fixation techniques in pathology to neuroscience studies: a review *J Neurosci Methods*, 1994, 55(2): 173-182.
 - ◇ Martin S. Chemistry. 8th Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018.
 - ◇ Marton L. La microscope électronique des objets biologiques. *Acad R Belg Bull CI Sci*, 1934, 20: 439-446.
 - ◇ Mayers C P. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol*, 1970, 23(3): 273-275.
 - ◇ McCann M C, Wells B, Roberts K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J Cell Biol*, 1990, 96: 323-334.
 - ◇ McDonald K, Müller-Reichert T. Cryomethods for thin section electron microscopy// Guthrie C, Fink G. Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. San Diego: Academic Press, 2002: 96-123.
 - ◇ Moor H. Theory and practice of high pressure freezing//Steinbrecht R A, Zierold K. Cryotechniques in biological electron microscopy. Berlin: Springer-Verlag, 1987: 175-191.
 - ◇ Moor H, Muhlethaler K. Fine structure of frozen etched yeast cells. *J Cell Biol*, 1963, 17: 609-628.
 - ◇ Moor H, Riehle U. Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze-etching // Steve Bocciarelli D. Electron microscopy. Rome: Proc 4th Eur Reg Conf Electron Microsc, 1968: 33-34.
 - ◇ Morphew M K. Practical methods in high-pressure freezing, freeze-substitution, embedding, and immunocytochemistry for electron microscopy. 2006. <http://bio3d.colorado.edu/docs/mmanual.pdf>
 - ◇ Mould P A, Holmes D F, Kadler K E, et al. Mica sandwich technique for preparing macromolecules for rotary shadowing. *J Ultrastruct Res*, 1985, 91: 66-76.
 - ◇ Müller-Reichert T, Hohenberg H, O'Toole E T, et al. Cryoimmobilization and three-dimensional visualization of *C. elegans* ultrastructure. *J Microsc*, 2003, 212 (Pt 1): 71-80.
 - ◇ Nermut M V, Eason P. Cryotechniques in macromolecular research (a comparative study). *Scanning Microsc Suppl*, 1989, 3: 213-224.
 - ◇ Nicolas M T, Bassot J M. Freeze substitution after fast-freeze fixation in preparation for immunocytochemistry. *Microsc Res Tech*, 1993, 24(6): 474-487.
 - ◇ Riesner D, Henco K, Rokohl U, et al. Structure and structure formation of viroids. *J Mol Biol*, 1979, 133(1): 85-115.
 - ◇ Roux K H. Negative-stain immunoelectron-microscopic analysis of small macromolecules of immunologic significance. *Methods*, 1996, 10(2): 247-256.

- ◇ Sargent J A. Low temperature scanning electron microscopy: advantages and applications. *Scanning Microsc*, 1988, 2: 835–849.
- ◇ Schaefer F J, Harker D J. Surface replicas for use in the electron microscope. *J Appl Phys*, 1942, 13: 427–433.
- ◇ Shimon E, Müller M. On optimizing high-pressure freezing: From heat transfer theory to a new microbiopsy device. *J Microsc*, 1998, 192(Pt 3): 236–247.
- ◇ Sogo J M, Thoma F. Electron Microscopy of Chromatin. *Methods Enzymol*, 1989, 170: 142–165.
- ◇ Steinbrecht R A, Müller M. Freeze-substitution and freeze-drying// Steinbrecht R A, Zierold K. *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Berlin: Springer Verlag, 1987: 149–172.
- ◇ Tyler J M, Branton D. Rotary shadowing of extended molecules dried from glycerol. *J Ultrastruct Res*, 1980, 71: 95–102.
- ◇ Van Harreveld A, Crowell J. Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation. *J Anat Rec*, 1964, 149: 381–385.
- ◇ Vennat E, Bogicevic C, Fleureau J M, et al. Demineralized dentin 3D porosity and pore size distribution using mercury porosimetry. *Dent Mater*, 2009, 25(6): 729–735.
- ◇ Vollenweider H J, Sogo J M, Koller T H. A routine method for protein-free spreading of double- and single-stranded nucleic acid molecules. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, 72(1): 83–87.
- ◇ Webb R I, Schieber N L. Volume scanning electron microscopy: Serial block-face scanning electron microscopy focussed ion beam scanning electron microscopy // Eric Hanssen: *Cellular imaging, Electron Tomography and Related Techniques*, 2018, 117–143.
- ◇ Webster P. Microwave-assisted processing and embedding for transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol*, 2007, 369: 47–65.
- ◇ Wendt K D, Jensen C A, Tindall R, et al. Comparison of conventional and microwave-assisted processing of mouse retinas for transmission electron microscopy. *J Microsc*, 2004, 214(1): 80–88.
- ◇ Wischnitzer S. *Introduction to electron microscopy*. 2nd Ed. New York: Pergamon Press, 1970.

(1.1, 李伯勤、石洪波; 1.2, 陈文列、钟秀容、刘欣然;
1.3, 祝建、简万能、何万中; 1.4, 朱平、冯红丽、梁静南、胡迎春、李峥、吕林茂;
1.5, 李国红、孙磊、丁明孝、刘翠芳; 1.6, 丁明孝、贺新强; 1.7, 崔芳、倪兵)