

doi: 10.3969/j.issn.1007-8096.2017.05.020

## 须癣毛癣菌扫描电镜观察中的固定过程研究\*

曾智<sup>1\*\*</sup>, 刘瑞娟<sup>1\*\*</sup>, 胡娜<sup>1</sup>, 索有瑞<sup>2</sup>, 白波<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所藏药研究重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100000)

[关键词] 超声固定; 梯度固定; 须癣毛癣菌; 场发射扫描电镜

[中图分类号] R [文献标识码] B [文章编号] 1007-8096(2017)05-0386-03

须癣毛癣菌是引起人类皮肤感染最常见的致病菌之一, 岳学苹等<sup>[1]</sup>研究表明须癣毛癣菌的正常菌丝在扫描电镜(SEM)下显示笔直、细长、延伸生长, 分隔明显, 表面光滑, 顶端和局部无膨大。它可引起头癣、体癣、股癣、手足癣和甲癣, 以及一些罕见的深部蜂窝状毛囊炎等。目前治疗皮肤癣的各种处方药大部分为化学合成或者含有激素的, 其毒副作用大, 易产生耐药性, 且易复发。因此, 寻找有效治疗皮肤癣的中草药已经越来越受到人们的关注。

为了更有效地观察受试物的治疗效果, SEM已广泛成为抗菌活性研究领域科研工作者的必备工具之一。根据SEM的原理, SEM观察的是样品表面的形态特征, 由于生物样品本身含水量较高, 因此, 生物样品的前处理尤其重要。查阅文献发现对于不同的样品材料, 其前处理有多种不同的方式, 但基本上均采取双固定, 即先用戊二醛固定, 再用锇酸二次固定, 然后用乙醇或者丙酮进行梯度脱水, 接着利用冷冻干燥或者临界点干燥, 然后喷金进行观察<sup>[2-5]</sup>。然而, 以上制样过程步骤繁多, 每一步都会对观察到的结果产生或多或少的影响<sup>[6]</sup>。因此, 一旦制样过程出现偏差, 就可能得到假阳性结果。本文通过对须癣毛癣菌正常菌丝的制样过程进行探讨, 直接利用戊二醛超声辅助固定或者梯度固定, 再用乙醇或者丙酮进行梯度脱水、叔丁醇置换、冷冻干燥、喷金、观察, 以期能高效、快速地做出效果更理想的电镜观察结果, 为同行的科研工作提供参考。

### 1 材料与方法

1.1 材料 菌种: 须癣毛癣菌(Trichophyton mentagrophytes, 60050), 由北京大学第一附属医院皮肤科真菌室提供。试剂: 25%戊二醛(天津市福晨化学试剂厂), 乙醇、丙酮(天津市百世化工有限公司), 叔丁醇(上海广诺化学科技有限公司), 以上试剂均为AR级别。培养基: SDA培养基: 蛋白胨10g, 葡萄糖20g, 琼脂18g, 纯水定容至1L。SD培养基: 蛋白胨10g, 葡萄糖20g, 纯水定容至1L。

#### 1.2 方法

1.2.1 菌种培养 活化: 将冷冻保藏的菌种在超净工作台(双人单面净化工作台SW-CJ-1C 沪净®净化)中接种于无菌的SDA培养基上, 置于30℃的培养箱中培养7~10d, 备

用。培养: 取活化的菌种转接至SD培养基, 置于30℃的培养箱中培养7~10d。

1.2.2 取样 将培养7~10d的SD培养液取0.5~1mL至2mL的EP管中, 进行下一步处理。

1.2.3 样品处理 通过查阅文献<sup>[7-9]</sup>, 对样品前处理进行了归纳总结, 并设计了以下具体的样品处理过程: ①清洗: 取样后, 吸出多余培养基, 用纯水清洗2~3次, 尽可能的洗净菌丝表面的培养基等杂物。②固定: 分别按(表1)中的处理方式向清洗干净的菌丝中加入适量(至少能没过菌丝)的戊二醛固定液, 需要超声处理的放入超声清洗机(AS3120A 220V 120W)中处理, 梯度固定组中每个梯度之间间隔1h, 最后放到4℃冰箱中过夜。③清洗: 将固定后的菌丝分别用纯水洗涤2~3次。④脱水: 分别按30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇或丙酮梯度依次进行脱水处理, 前6个梯度每个每次处理15~20min, 100%的乙醇或丙酮处理3次, 每次30min。⑤置换: 梯度置换则按照叔丁醇: 乙醇(或者丙酮)=1:3、2:2、3:1和4:0的比例进行, 前3个梯度每次15~20min; 100%的叔丁醇每次30min, 共3次; 将第3次100%的叔丁醇处理的样品保存于适量叔丁醇(刚好没过样品为宜, 便于后续冷冻干燥处理)中, 置于-20℃的冰箱中冻存。⑥干燥: 待保存的样品中叔丁醇冻成雪花状, 取出来置于预冷的冷冻干燥仪(VFD-21S)中干燥。⑦粘样与观察: 将干燥的样品用导电胶粘到样品台上, 用吹风机的冷风吹掉多余未粘上的菌丝及其他杂物, 并做好标记, 然后用离子溅射仪喷金(日立MC1000), 取出样品放到FESEM(SU8010 HITACHI)上观察结果。

根据不同处理方式, 将其分组(表1)。

### 2 结果

图A、B、C分别为不同浓度的戊二醛固定处理的样品所观察到的结果, 由图A、B、C可以看到, A中部分菌丝饱满, 呈现了其正常状态, 但其中仍有部分菌丝出现轻微皱缩的现象; B中菌丝饱满, 整体出现皱缩的菌丝相对于A较少, 程度较轻; C中仅有一部分菌丝比较饱满, 相比于A、B, C中菌丝整体皱缩的多, 且皱缩程度更为严重。由此可见, 固定时戊二醛的浓度不宜过高。

\* 基金项目: 自主部署-引进人才项目(Y229441211); 通讯作者: 白波。E-mail: baibo@chd.edu.cn

\*\* 在读于中国科学院大学。

表 1 样品的不同处理方式与时间

样品编号	固定液(戊二醛)浓度	超声辅助固定时间(60 W)	梯度脱水	置换(叔丁醇)	固定时间
A	2.5%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜
B	3%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜
C	3.5%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜
D	3%	-	丙酮	梯度置换	4℃过夜
E	3%	-	乙醇	100% 三次	4℃过夜
F	3%	15 s	乙醇	梯度置换	4℃过夜
G	3%	30 s	乙醇	梯度置换	4℃过夜
H	3%	60 s	乙醇	梯度置换	4℃过夜
I	3%	90 s	乙醇	梯度置换	4℃过夜
J	2% → 2.5%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜
K	2% → 2.5% → 3%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜
L	2% → 2.5% → 3% → 3.5%	-	乙醇	梯度置换	4℃过夜

D 与 B 的不同之处是用丙酮代替乙醇进行梯度脱水,而 E 与 B 的不同之处是在置换过程中直接用 100% 叔丁醇置换 3 次,再进行冷冻干燥。尽管 D 中仍有部分菌丝出现了较为严重的皱缩,但其饱满的菌丝的饱满程度优于 B。从图 E 中可以看到,菌丝轻微皱缩的较多。由此说明,丙酮脱水效果稍好于乙醇,但叔丁醇梯度置换能得到更为理想的结果。

F、G、H、I 是用 3% 的戊二醛加上 60 W 的超声分别处理 15 s、30 s、60 s、90 s 辅助固定所得到的 FESEM 图片。由图可见,60 s 处理的效果较好,15 s、30 s 和 90 s 的处理中仍有大部分皱缩,且部分皱缩的程度较为严重。由此说明,适当的超声处理能起到辅助固定的目的。

由于前面的处理中,均是用戊二醛一次固定,虽然得到

了图 A、B 及 H 这种较好的效果,但仍不够理想。通过多次重复试验,结果发现在制样过程中,固定这一步至关重要。因此补充了 J、K、L 三个处理,即分别用梯度进行固定前处理,详见(表 1)。由图 J、K、L 可以看到,菌丝仍有部分皱缩,但 J、K 中整体水平较 A、B (J、K 固定时的终浓度分别与 A、B 相同)高,尤其是 J; L (L 固定时的终浓度与 C 相同)中菌丝皱缩得多,且比较严重,如图所示,效果不如 C。

实验发现,自然干燥法不适用于须癣毛癣菌的前处理过程,自然干燥的样品会出现严重的褶皱、甚至断裂。本实验采用叔丁醇真空干燥法,其效果显著优于自然干燥的样品。

### 3 讨论

样品的前处理是含水样品尤其是生物样品电镜观察的

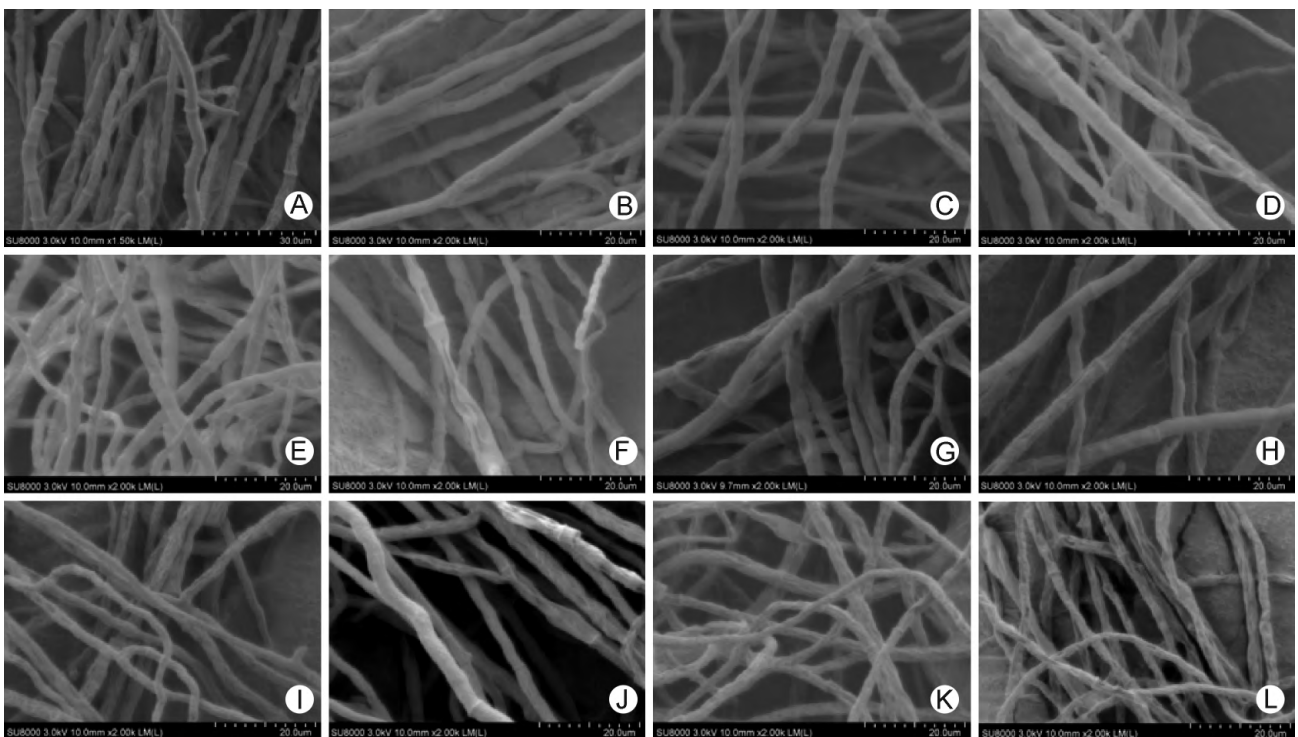


图 各个不同处理 FESEM 所观察到的结果 图 A SU8000 3 KV 10.0 mm × 1.50 K bar = 30 μm; 图 B—L SU8000 3 KV 10.0 mm × 2.00 K bar = 20 μm

必备过程,其处理效果的好坏直接关系到电镜观察的效果。因此对其制样过程的研究具有重要意义。李庚午<sup>[10]</sup>研究了选用不同固定剂对扫描电镜生物制样的效果,结果发现,戊二醛固定与戊二醛-锇酸双固定对植物根尖材料固定效果差异不明显,但双固定效果更优,这与杨瑞等<sup>[11]</sup>的研究一致。本实验中仅用戊二醛进行固定,未选用剧毒的锇酸固定,所得到的样品也能取得较好的效果。黄立等<sup>[12]</sup>用微波处理生物样品—胃和小肠,结果发现微波处理取得了较好的效果。杨瑞等<sup>[13]</sup>在昆虫材料样品制备过程中利用超声和微波处理也取得了较好的效果。因此,在本实验中选择了超声辅助固定处理,发现超声处理在此过程中起到了较好的效果,能有效改善用戊二醛单固定效果不理想的缺陷,这为电镜制样的固定提供了新思路。

另外,由于生物样品本身导电性差,在观察过程中发现样品很容易产生严重的放电现象,致使无法正常观察样品的形态结构。通过实验发现,减小加速电压和适当增加喷金时间可以改善这种现象。但喷金时间也不宜过长,太长会使金颗粒遮盖样品的表面,不利于样品表面微观结构的观察。

肖媛等<sup>[14]</sup>对电镜制样的干燥方法进行了归纳总结,微生物样品通常简单的自然干燥法或烘干干燥法。但通过实验,自然干燥法不适用于须癣毛癣菌的前处理过程,采用叔丁醇真空干燥法,其效果要显著优于自然干燥的样品。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 岳学苹,王晓红,王爱平,等. 特比萘芬对皮肤癣菌形态学的影响[J]. 中国皮肤性病杂志, 2008, 22( 8 ): 464 - 466.
- [ 2 ] 谢家仪,董光军,刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24( 4 ): 440.
- [ 3 ] Ranjan G , Soma B , Arijit M , *et al.* Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria [J]. Biological Control , 2015 , 83: 29 - 36.
- [ 4 ] Yang R , Elankumaran Y , Hijjawi N , *et al.* Validation of cell-free culture using scanning electron microscopy ( SEM) and gene expression studies [J]. Experiment Parasitology , 2015 , 153: 55 - 62.
- [ 5 ] Shigeharu I , Yayoi N , Katsuhisa U. The vapor activity of oregano , perilla , tea tree , lavender , clove , and geranium oils against a Trichophyton mentagrophytes in a closed box [J]. J Infect Chemother , 2006 , 12: 349 - 354.
- [ 6 ] 李培京. 扫描电镜生物样品制备与观察[J]. 现代科学仪器 , 2008 , 3: 124 - 125.
- [ 7 ] 钱天乐,周逸卿,周珍友,等. 微生物扫描电镜样品清洗方法的改进与固定干燥方法比较[J]. 安徽农业科学, 2009 , 37 ( 23 ): 10886 - 10888.
- [ 8 ] 邹如意,李妍,邹珍友,等. 用扫描电镜观察不镀膜导电膜对大肠杆菌损伤和图像的影响[J]. 安徽农业科学, 2009 , 37 ( 32 ): 15692 - 15693.
- [ 9 ] Park MJ , Gwak KS , Yang I , *et al.* Effect of citral , eugenol , nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes [J]. Fitoterapia , 2009 , 80 ( 5 ): 290 - 296.
- [ 10 ] 李庚午. 不同固定剂对扫描电镜生物制样效果的探讨[J]. 河南师范大学学报( 自然科学版) , 1994 , 22( 1 ): 69 - 72.
- [ 11 ] 杨瑞,王歧,张露,等. 放线菌扫描电镜样品制备方法比较研究[J]. 电子显微学报, 2014 , 33( 1 ): 84 - 89.
- [ 12 ] 黄立,王玲. 扫描电镜生物标本制备的超快微波处理技术[J]. 电子显微学报, 1993 , 1: 87.
- [ 13 ] 杨瑞,张玲娜,范敬伟,等. 昆虫材料扫描电镜样品制备技术探讨[J]. 北京农学院学报, 2014 , 29( 4 ): 33 - 36.
- [ 14 ] 肖媛,刘伟,汪艳,等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J]. 实验室研究与探索, 2013 , 32( 5 ): 45 - 54.

收稿日期: 2016 - 09 - 16