RAW 264.7 巨噬细胞的扫描电镜样品制备与观察

刘 博[1],路 菊[2],江 澈[3],陶忠芬[2] (1. 解放军第 210 医院检验科,辽宁 大连 116021;2. 第三军医大学基础医学部中心实验室,重庆 400038;3. 重庆三峡中心医院培训中心,重庆 万州 404000)

[摘 要] **目的** 探索贴壁细胞扫描电镜样本最佳制备方法及仪器工作参数调节与图像质量之间的关系。**方法** 通过对样品制备中清洗、脱水、镀膜步骤的对比试验,调整样品处理的次数、时间、样品台距离、喷涂厚度,获得最佳制备条件;优化电镜加速电压、物镜光阑、工作距离,得到最佳工作参数。**结果** 制备 RAW 264.7 巨噬细胞扫描电镜样品的最佳方法是用0.1 mol/L PBS 清洗 2 次,每次 5 min;30% 、50% 、70% 、90% 、100% 乙醇梯度脱水,每次 3 min;镀膜导电时靶与样品之间距离为 5 cm,真空度 1.33 ~ 13.33 Pa,电流 10 mA,时间 150 s,间断镀膜。观察样品时最佳工作参数设置为加速电压 10 kV,物镜活动光阑孔 50 μm,工作距离 12 mm。**结论** 制备样品程序中清洗、脱水、镀膜条件的设定及仪器的加速电压、物镜光阑孔大小、工作距离的优化,有利于获得清晰、细节丰富、反差适中、立体感强的扫描电镜图像。

[关键词] 扫描电镜;贴壁细胞;制备样品;工作参数

[中图分类号] Q-336 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)01-0062-04

Preparation and observation of scanning electron microscopy specimen of RAW 264.7 macrophages

LIU Bo, LU Ju, JIANG Che, TAO Zhong-fen (Clinical Laboratory, 210th Hospital of PLA, Dalian Liaoning 116021, China)

Abstract: Objective To explore the best method for preparing the scanning electron microscopy (SEM) samples of adherent cells and to investigate the relationship between operating parameters and image quality. **Methods** The best preparing condition was obtained by adjusting the processing time and frequency, distance to the specimen stage and the coating thickness after comparing the procedures in cleaning, dehydrating and coating. The optimum working parameters were fixed through optimizing the SEM accelerating voltage, objective aperture and working distance. **Results** The best method for preparing SEM samples of macrophages in RAW264.7 rats was as follows: wash twice with 0.1 mol/L PBS, 5 min once, dehydrate with graded ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), 3 min once, conduct the coating procedure inconsistently for 150s and fix the distance between the target and the specimen at 5 cm, the vacuum pressure at 1.33 ~ 13.33 Pa and the current at 10 mA. The best operating parameters for specimen observation were designed as follows: speeding voltage 10 kV, objective active aperture 50 μm, the working distance 12 mm. **Conclusion** It is helpful to obtain ideal images with abundant details, proper contrast and strong stereoscopic vision by designing the procedures in cleaning, dehydrating and coating and optimizing the accelerating voltage, objective aperture and working distance

Keywords: scanning electron micrscopy; adherent cells; specimen preparation; operating parameter

随着扫描电镜(SEM)的普及和发展,扫描电镜已经从高层次的研究发展成为应用广泛的测试手段[1]。想要获得高分辨率、立体感强、层次、细节分明,保持样品原始形貌的高质量扫描电镜图像,样品的制备起着至关重要的作用,同时扫描电镜的使用和参数的调节也直接影响到图像质量。RAW 264.7 巨噬细胞来源于成年 BALB/c 雄性小鼠,为贴壁生长细胞。细胞较小,传代后第 1 天呈圆型,生长速度较快。生长一定时间,密度较高时细胞呈梭形或多边形。贴壁后,细胞外周的表面结构由于受多种因素的影响,反差降低,加上脱水、镀膜等样品处理的影响,图像质量下降,必须选择合适的样品处理方法与电镜观察参数才能观察到清晰的细胞外周微细结构。因此需要反复试验对比,摸索最佳处理方法和观察条件。本实验以 RAW264.7 巨噬细胞为对象,摸索贴壁细胞样本处理的最佳方法以及仪器参数设置的最佳值。通过对该细胞的实验,总结出一套贴壁细胞样品的处理方法和观察条件,具有推广意义。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW 264.7 巨噬细胞来源于成年 BALB/c 雄性小鼠,为贴壁生长细胞。

[作者简介] 刘 博(1986 -),男,黑龙江省大庆市人,检验技师,学士,主要从事临床检验及扫描电镜技术方面的研究。电话:(0411)85841279

[通讯作者] 路 菊(1964 -),女,高级实验师,第三军医大学基础部中心实验室。电话:(023)68752350

[收稿日期] 2010-09-20 [修回日期] 2010-10-08

1.2 方法

1.2.1 样品准备及制备 细胞传代培养,吸出瓶内培养液。向瓶内加入胰蛋白酶和 EDTA 混合液少许,覆满瓶底。置37 ℃温箱中 2 ~ 5 min。吸出消化液,向瓶内注入 Hanks 液数毫升,轻轻转动培养瓶,将残余消化液冲掉。用营养液(DMEM)轻轻反复吹打瓶壁细胞,形成细胞悬液。将细胞悬液等量分成 6 组,分别置于六孔培养板中的无菌盖玻片上,37 ℃温箱中培养。48 h 后,光镜下见大部分细胞贴壁后,停止培养。样品制备过程:向装有爬满细胞盖玻片的培养板中加入 0.1 mol/L PBS,以浸过盖玻片为宜。按一定方向轻轻摇动。清洗 2 次,每次 5 min。细胞清洗干净后,吸除 PBS,加入 2.5% 的戊二醛(pH 为 7.2 ~ 7.4)固定液,置于 4 ℃冰箱内固定 1 h。0.1 mol/L PBS 再次清洗样品,乙醇梯度脱水去除样品中水份,脱水剂的浓度依次为 30%、50%、70%、80%、90%、100%(二次),每步脱水时间 5 min。将样品放入临界点干燥仪内进行干燥,约1.5 h。最后离子溅射镀膜仪对样品进行导电处理。

1.2.2 扫描电镜观察 将制备完好的标本放入样品室,样品室真空度达到要求后,选择加速电压,调整工作距离,根据样品挑选合适活动光阑孔,选择放大倍数,调焦,调整图像的亮度、对比度,拍照,保存图片。观察中,主要注意加速电压、物镜活动光阑孔、工作距离的调试。

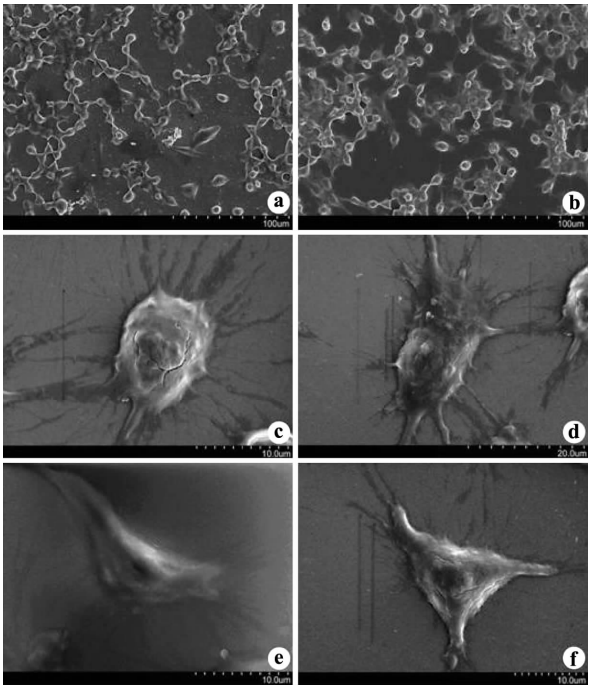
2 结果

2.1 样品处理最佳条件

清洗最佳条件为 0.1 mol/L PBS 在六孔板中漂洗 2 次,每次 5 min。RAW 264.7 巨噬细胞经过 1 次 1 min 漂洗的标本可见背底有很多杂质颗粒(图 1a)。经过 2 次 5 min 漂洗的标本,背底干净(图 1b)。脱水最佳条件为 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇梯度脱水每步 3 min。脱水的时间不同对样品表面结构影响较大,观察结果显示,样品梯度脱水每步 10 min,细胞表面龟裂、细胞突触断裂(图 1c),损伤较大[2]。样品梯度脱水每步 3 min,细胞表面完整,无裂痕、层次分明、清晰,保持了样品的原始形貌(图 1d)。镀膜的最佳条件:真空度 1.33 ~ 13.33 Pa,电流 10 mA,镀膜时间 150 s,镀膜的厚度约为 10 nm。样品台与金靶之间的距离 5 cm 较为适宜[3]。样品镀膜时,电流、工作距离一定的情况下,延长镀膜时间,表面厚度增加,细胞表面结构模糊,边缘不清,影响分辨率(图 1e)。样品镀膜时间合适,可得到高质量的图像(图 1f)。

2.2 电镜参数最佳设置

加速电压最佳值选择 10 kV,细胞微细结构、反差最好,图像质量最高(图 2a)。5 kV 加速电压的细胞表面结构更多、更真实,但反差稍差(图 2b)。20 kV 加速电压细胞表面微细结构分辨率较前两种效果差,反差不够(图 2c)。物镜光阑 50 μm、工作距离 12.5 mm 为最佳设置,图像清晰,分辨率高(图 2d)。与之相对照工作距离设置为 12.4 mm、光阑孔 150 μm,图像模糊、分辨率差(图 2e)。工作距离设置为 32.5 mm、光阑孔 50 μm,图像分辨率略差(图 2f)。工作距离设置为 55.4 mm、光阑孔 80 μm,图像清晰度较差,但焦深好,立体感强(图 2g)。

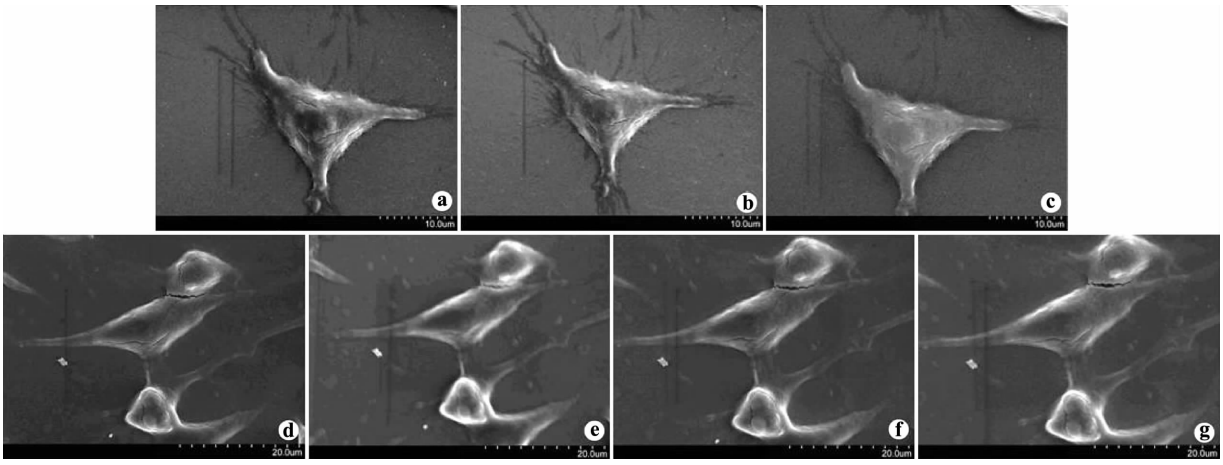


a:背底有很多大小不一杂质颗粒(SEM × 500);b:背底干净(SEM × 500);c:梯度脱水每步 10 min,细胞表面干裂破损(SEM × 3 000);d:梯度脱水每步 3 min,细胞表面层次分明,无裂痕(SEM × 3 000);e:镀膜 240 s 细胞表面结构模糊,边缘不清(SEM × 3 000);f:镀膜 150 s 细胞表面细微结构和外周清晰可辨(SEM × 3 000)

图 1 不同样品处理条件下的扫描电镜图像

3 讨论

样品制备得好坏,会直接影响扫描电镜图像的质量和真实性。样本制备过程中,清洗步骤非常重要。清洗效果与时间、次数有关。清洗时间过长,次数过多,样品表面易受损伤、并造成样品脱落。RAW 264.7 巨噬细胞清洗 2 次,每次 5 min,可以达到图像清晰、真实、无杂质的效果。RAW 264.7 巨噬细胞含有较多水分,需脱水处理。由于乙醇是低表面张力的有机溶剂,可代换组织细胞中的游离水,使样品在干燥时表面张力减小,最大限度地减少样品表面的损伤。若急剧脱水会引起收缩。因此采用从低浓度到高浓度的乙醇梯度脱水方法去除水分,以达到仪器观察样品的要求。脱水过程中脱水时间的掌握非常重要,脱水时间过长,使脂质和蛋白质丢失,引起细胞体积变化,细胞发生形态结构的失真。RAW 264.7 巨噬细胞梯度脱水每次 3 min 处理的标本,扫描电镜观察细胞表面完整,无裂痕、层次分明、清晰,保持了样品的原始形貌。生物样品不导电,入射电子易堆积在样品表面形成负电荷区,产生充放电现象,严重影响二次电子图像质量。为样



a:10 kV 加速电压细胞表面细微结构清晰、丰富、反差好(SEM ×3 000);b:5 kV 加速电压细胞表面结构清晰、反差略差(SEM ×3 000);c:20 kV 加速电压细胞表面结构不清晰、反差不够(SEM ×3 000);d:工作距离 12.5 mm,光阑孔 50 μm(SEM ×2 500);e:工作距离 12.4 mm,光阑孔 150 μm(SEM ×2 500);f:工作距离 32.5 mm,光阑孔 50 μm(SEM ×2 500);g:工作距离 55.4 mm,光阑孔 80 μm(SEM ×2 500)

图 2 不同工作参数条件下的扫描电镜图像

品喷涂金属薄膜,可避免放电,并增加二次电子产率,获得良好图像。离子溅射镀膜时,样品室对真空和电流有一定要求。真空度应达到 1.33 ~ 13.33 Pa,电流小于 10 mA。电流过高,离子的能量和温度增加,会损伤样品形貌。镀膜时间小于 100 s,膜太薄,导电效果差,会引起放电现象。喷涂时间大于 300 s,膜过厚,样品表面细微结构会被掩盖。样品台与金靶之间的距离对镀膜也有影响,距离较短,金粒子密度较大;反之亦然。本试验镀膜各项参数最佳值为真空度 1.33 ~ 13.33 Pa,电流 10 mA,时间 150 s,厚度约为 10 nm[4]。

样品制备与图像质量有关,电镜参数的正确设置更是关系到能否获得理想图片的关键。电子束射入样品的能量取决于加速电压。一般情况下,加速电压越低,图像的信息越限于表面,图像就显得自然细节丰富,但样品表面对污染变得更为敏感,而且得不到高倍放大图像[5]。反之,加速电压越高,电子束越容易聚焦变细,也就越容易得到高分辨率,适用于高倍放大图像,但图像会损失细节。高电压对样品有较大损伤,不适于同一位置长时间观察。在满足分辨率需求的情况下,尽量选用较低的电压,因为加速电压增加,噪音就会随之增加,会影响图像质量[6]。想要得到细节丰富、清晰的图像,须设不同的加速电压进行反复比较,最终选择一最佳数值观察。本实验 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞在 10 kV 加速电压下图像质量最好。

物镜光阑是电子光学系统中的重要组成部分,通过选用不同孔径的光阑可调整孔径角,吸收杂散电子,减少球差等,以达到调整焦深、分辨率和图像亮度的目的。物镜光阑孔径越小,图像的分辨率越高、焦深越深、电子束流越小、噪音越多。反之,光阑孔径越大,图像的分辨率越低、焦深越浅、电子束流越大、噪音越少。一般观察 2 000 倍以下可用 80 μm 或 50 μm 光阑孔径,高倍观察用 50 μm 或 30 μm 光阑孔径。工作距离是指样品与物镜下端的距离,是影响图像质量的另一个重要因素,通常其变动范围为 5 ~ 56 mm。工作距离越小,分辨率越高、景深越浅。相反,工作距离越大,分辨率越低、景深越深。如果观察试样是凹凸不平的表面,要获得较大的焦深,必须采用大的工作距离,但样品与物镜光阑的张角变小,使图像的分辨率降低。要获得高的图像分辨率,必须选择小的工作距离,通常选择 10 ~ 20 mm,以期获得小的束斑直径和减小球差。本实验选择光阑孔 50 μm、工作距离 12.5 mm,图像清晰、焦深好更具立体感。

综上所述要获得理想的、高质量的扫描电镜图片,首先生物样品制备非常重要,它关系到能否观察样品的原始形貌。其次扫描电镜的工作参数设置也至关重要,它的调试与图像的清晰、细节的丰富、样品的立体感有着密不可分的作用。

[参考文献]

[1] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用[M]. 厦门:厦门大学出版社,2006.
[2] 黄晓红,张奇亚. 扫描电镜细胞样品制备方法的改进[J]. 电子显微学报,2003,22(6):671 -672.
[3] 康莲娣. 生物电子显微技术[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2003.

[4] 李香庭,曾 毅,钱伟君,等. 扫描电镜的试样制备方法及应用[J]. 电子显微学报,2004,23(4):514.
[5] 陶淑凤. 扫描电镜低加速电压在样品分析中的应用研究[J]. 矿冶,2002,11(2):85-88.
[6] 徐柏森,杨 静. 实用电镜技术[M]. 南京:东南大学出版社,2008.

(编辑:余汇洋)

·经验交流·

肺脏支气管铸型标本制备的改良技术

Improved method in making casting mold of bronchopulmonary

苗兰英[1],白 剑[2],林大勇[1],刘书林[3],于胜波[3],张健飞[3],张成鸿[3],隋鸿锦[2,3] (1. 辽宁中医药大学实验技术中心,辽宁 沈阳 110033;2. 大连鸿峰生物科技有限公司,辽宁 大连 116052;3. 大连医科大学人体解剖学教研室,辽宁 大连 116021)

[关键词] 铸型标本 制备
[中图分类号] R322.34. [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2011)01-0065-01

管道铸型技术是通过向管腔内灌注某种可塑材料,使其在管腔内模塑成型,然后再用强酸、强碱等药品或者采用自然腐蚀等方法将器官组织除去,从而获得反映管道真实分支与分布情况的铸型样品[1]。肺脏是一个含有肺动静脉、支气管及支气管动静脉的多管道脏器,常规固定处理的肺,因管道内通常有血凝块或分泌物,不易清除干净,故铸型通常不够完美,存在断支、分支不饱满等现象,笔者采用改良的肺固定及灌注方法,提高铸型标本的制作的质量。

1 材料与方法

首先将新鲜的肺脏标本取出后,用自来水压灌注肺脏支气管,将残余的血液冲出。将排出淤血的肺脏放入含有 2% 福尔马林溶液中在室温下固定 24 h(如夏季时间缩短到 16 h,防止肺脏腐败)[2]。在固定过程中注意定型,使肺脏充盈,使铸型标本更美观。从肺门处切断左右主支气管,在每个肺段支气管内分别插管后,并用线缝扎支气管的远端,防止铸型剂外溢。随后按照质量比例 100:5、100:10、100:20 分别配制乙酸乙酯和聚氯乙烯的铸型剂(可以根据需要加入油性染料),注意配制后应放入细口瓶中密闭保存,防止铸型剂固化。首先注入 100:5 的铸型剂,待肺脏表面可见铸型剂的颜色之后停止灌注,约 4~5 h 后,触及肺脏表片铸型剂凝固,可继续灌注 100:10 铸型剂[3]。铸型剂的灌注剂量由支气管的充盈度决定,如充盈度差则补充 100:10 铸型剂,充盈度好则补充 100:5 铸型剂。待支气管内的铸型剂凝固后较为充盈时,将切下的左右主支气管与原切断部位缝合后,在主支气管内灌注 100:20 的铸型剂直至铸型剂凝固后支气管较为充盈时为止。将肺脏放入 50% 的浓盐酸中腐蚀,并注意每天应取出用清水冲洗腐蚀的残渣,防止因放置过久而未冲洗造成组织与铸型剂一起脱落。

2 体会

铸型标本具有三维立体感强、构型美观、色泽鲜艳、直观、形象的特点,同时也为研究脏器管道提供真实的解剖学基础。肺脏是一个含有肺动静脉、支气管及支气管动静脉的多管道脏器,以往的制作方法是将新鲜的肺脏标本从肺门处切断左右主支气管,在每个肺段支气管内分别插管后,将切下的左右主支气管与原切断部位缝合后,再灌注左右主支气管及气管[4]。由于是在未用福尔马林固定的情况下进行,虽然支气管的弹性尚好,插管容易成功,但不易缝合;如选用固定尸体,则因支气管丧失弹性,标本充盈度差。最好选用新鲜尸体材料标本制作宜选用聚氯乙烯,因其具有爽滑、流动性好、韧性好,适宜灌注小口径脏器管道。同时溶剂宜选用乙酸乙酯,引起挥发速度慢,较丙酮等其它溶剂相比具有韧性好的特点。肺脏因先用低浓度福尔马林固定 24 h 左右,固定后的肺脏较为坚韧,防止肺脏发生形变而影响标本质量。同时因其固定浓度低且时间较短,可以保留一定的新鲜组织的弹性,使得灌注的充盈度好。在腐蚀的过程中,应及时用水冲除残留的组织,防止细小的分支因重力作用随组织一起脱落。肺段支气管剪切时,注意使用斜行截面,以便后期对各肺段支气管进行更好的原方位缝合。

[参考文献]

[1] 赵建红,俞红贤,刘 英,等. 绵羊支气管动脉立体铸型方法研究[J]. 甘肃农业大学学报,2007,42(3):38-40.
[2] 谢拥军,汪 莉,刘兴国,等. 头面部动脉铸形标本的制作和体会[J]. 四川解剖学杂志,2005,13(2):55.
[3] 陈彦文,高秉琴. 肺段支气管铸型标本分色喷镀法[J]. 解剖学杂志,2009,32(3):417-418.
[4] 牛家峰,郭福运. 气管支气管及肺动静脉铸型标本的设计与制作[J]. 局解手术学杂志,2009,18(5):327.

(编辑:唐秋姗)

[收稿日期] 2010-10-09 [修回日期] 2010-11-05