

柯伪绦虫卵电镜扫描附件样品的制备方法

THE METHOD OF PREPARATION OF ATTACHMENT SPECIMENS OF PSEUDANOPLOCEPHALA CRAWFORDI EGGS FOR SCANNING AIM IN ELECTRON MICROSCOPE

刘天福 张琳辉

(陕西省农科院黄土高原农业测试中心)

Liu Tienfu Zhang Linghui

(Testing Center, Shaan-xi Provincial Academy of Agriculture)

摘要 本文具体介绍了柯伪绦虫卵临界点干燥电镜扫描附件样品的制备方法,它不仅适用于寄生虫卵,而且也适用于植物花粉。

关键词 柯伪绦虫卵; 电镜扫描; 样品制备

Key words Pseudanoplocephala Crawfordi eggs; Electron Microscope scanning; Preparation of specimen

H-600-I型电镜的H-6010扫描附件具有真空度高(1×10^{-6} Torr以上),分辨率高(6×10^{-9} m)、放大倍数高(20万倍)、样品室小等特点,加之使用透射样品杆替代扫描样品杆,这就增加了样品制备的特殊性和难度。根据柯伪绦虫卵含水份高、体积小、采样难的特点,为适应电镜扫描附件的特殊要求和防止虫卵在制样过程中变形,通过实验探索出了柯伪绦虫卵临界点干燥电镜扫描附件样品的制备方法。

1 制样方法

柯伪绦虫卵电镜扫描附件样品的制备方法需经过采样(固定前予处理)、戊二醛固定、磷酸缓冲液漂洗、乙醇脱水、丙酮脱水、醋酸正戊酯置换、临界点干燥、导电胶粘样、离子镀膜、电镜观察等步骤,具体操作如下:

1.1 采样(固定前予处理)

将患有柯伪绦虫病猪的新鲜粪便中的卵节片或将其病猪肠中的柯伪绦虫的卵节片采集起来,用生理盐水冲洗干净,在解剖镜下将卵节片用尖镊撕裂,使卵溢出,置于生理盐水小瓶中备用。此过程由送样者进行。

1.2 固定

将备用虫卵过滤在滤纸上,用磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH7.2)冲洗3次,每次5 ml,再用2.5%戊二醛固定液(此液系用0.2 mol/L磷酸缓冲配成pH7.2)从滤纸上将卵冲入小瓶内,加固定液至5 ml,用胶塞盖好,采用50 ml注射器反复抽气,使卵沉在固定液内,在4℃冰箱中固定48 h以上。

1.3 漂洗、脱水、置换

1.3.1 具体程序 将2.5%戊二醛固定的虫卵用0.2 mol/L, pH7.2的磷酸缓冲液冲洗,接着用50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% (加无水氯化钙去水)乙醇脱水,又用100%丙酮脱水,再用100%醋酸正戊酯中间液置换,每一步骤各2次,每次均为20 min。

1.3.2 采用方法

低速离心法：在漂洗、脱水、中间液置换的过程中，利用小型台式低速离心机离心，使柯伪缘虫卵沉淀，然后缓慢倒出上清液，留卵于离心管内备用。

漏斗滤纸过滤法：利用小玻璃漏斗，使用直径 7 cm 的滤纸，下接小烧杯，将固定好的柯伪缘虫卵过滤，然后用吸管或注射器依次加滴有关液体，按时按量完成漂洗、脱水、中间液置换的过程，留卵于滤纸上备用。

小瓶浸样滤纸裹注射针头抽液法：利用滤纸裹在注射器的针头上，用细线扎好，用它将小瓶中固定柯伪缘虫卵的固定液以及随后依次加换的有关液体抽净，注意每加换一次新液，需将针头滤纸上的虫卵在新液中搅动使卵落入，换注射器不换此针头进行抽液，按时按量完成漂洗、脱水、中间液置换程序，留卵于小瓶中备用。

滤纸包裹浸样法：将固定好的柯伪缘虫卵过滤在滤纸上，等液体空净后，将卵用其滤纸包好，然后按时按量依次完成漂洗、脱水、中间液置换任务，可利用 1 个或数个小瓶完成此过程。浸样的每一步骤都要注意摇动小瓶，以达到预期的效果。

1.4 干燥

将醋酸正戊酯置换好的柯伪缘虫卵利用 HCP-2 型临界点干燥器进行临界点干燥。具体操作是：将醋酸正戊酯置换好的卵用滤纸包裹好，放入样品笼内。临界点干燥起始温度低于室温 10℃，样品室放样前充入液态 CO₂ 使压力达 4.90333×10^5 Pa，然后排出液态二氧化碳使压力下降为零，如此充、排液态 CO₂ 1 次，然后再充入 70% 液态 CO₂。将温度控制钮扭至 20℃，停 15 min，压力达 6.86466×10^5 Pa，再将温度控制钮扭至 38℃，停 30 min，压力达 9.31632×10^5 Pa，慢慢开细放气阀，使指示放气量的小红球处在 1~1.5 格之间，大约 30 min 放完液态 CO₂，停 10 min 后取样。

1.5 粘样

取直径 3 mm 的单孔或多孔铜网放在干净的载玻片上，用牙签蘸一点自配的组织导电胶涂在铜网上，在实体显微镜下用尖镊一粒一粒地将临界点干燥的柯伪缘虫卵点播在涂胶的铜网上，或将有卵的滤纸折叠一下，沿折线用新毛笔尖将其卵撒播在带胶的铜网上，待半小时后用双面刀片将粘样铜网与载片分离，然后把粘样铜网移放在玻皿内记有标号的滤纸上备用。

1.6 镀膜

将裁好的 15 mm×30 mm 干净载片背面用透明胶带贴好标号，然后对号入位并将铜网样放在该载片的正面，用镜检确保铜网样胶面朝上，用 IB-5 型离子镀膜仪喷镀黄金 4 min。

1.7 上样

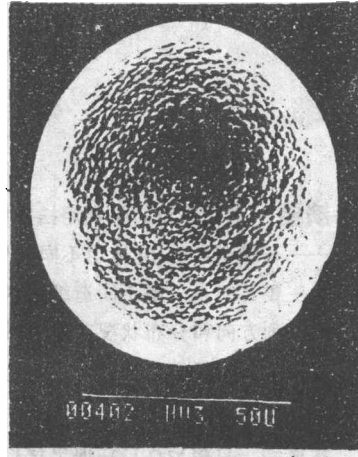
给透射双样品杆装样时要特别小心，装好后面朝下用电镜专用竹杆轻敲或晃动几下样品杆，若卵不掉时方可给电镜上样。使用双样品杆的好处是可以节省换样时间和移动找样，便于镜检。

1.8 镜检

使用 H-600-I 型电镜的 H-6010 扫描附件，在 75 KV 下，可以从 0~±30° 进行扫描观察和拍照。

2 结果讨论

实验结果证明：柯伪缘虫卵临界点干燥电镜扫描附件样品的制备方法是成功的（见照片）。在虫卵漂洗、脱水、中间液置换的过程中，低速离心法比较麻烦，在倒上清液时，容易引起虫卵的流失，虽然用滤纸条进行阻挡虫卵，但效果不理想，故未再用。漏斗滤纸过滤法、小瓶浸样滤纸裹注射针头抽液法和滤纸包裹浸样法效果比较好，尤以滤纸包裹浸样法为最好，故后来多用此法。柯伪缘虫卵临界点干燥电镜扫描附件样品制备方法，不仅适用于寄生虫卵，而且也适用于植物花粉，不仅适用于电镜扫描附件的样品制备，而且也适用于扫描电镜样品的制备。电镜扫描附件因有“三高一小”的特性，故观察小的薄的样品比较理想，但由于焦深不够长，样品室小，所以对观察较大的较厚的样品就受到了限制。



柯伪缘虫卵扫描附件电镜照片，放大540倍，
卵长直径 83 μm ，短直径 75 μm