



图1 含有甲醛胺与不含有甲醛胺的琼脂糖胶电泳的分辨能力比较

DNA 片段是限制性内切酶 *Hpa* I 水解质粒 pBR322 的产物。胶的厚度是 2 毫米，电泳条 1, 2, 3 分别加样量为 0.8 微克。电泳条 1 是 2% 琼脂糖胶；电泳条 2 是 2% 琼脂糖—5% 甲醛胺胶；电泳条 3 是 7% 琼脂糖—50% 甲醛胺胶

溶液冷至 60℃ 后注入底部密封、两侧夹紧的两块塑料板中，插入电泳梳，于 4℃ 放置 1 小时后即可用于电泳。

DNA 样品溶解在蔗糖浓度为 25%，不含

甲醛胺的电泳缓冲液中。电泳缓冲液的甲醛胺浓度为 50%。此缓冲液可反复使用数次。电泳电压为 100 伏。电泳可在 4℃ 或室温进行。用溴酚蓝作指示染料。电泳后，胶用蒸馏水漂洗，用 ethidium bromide 染色，紫外线下拍照，图 1 指出了甲醛胺—琼脂糖胶电泳的高度分辨能力。胶在 0.5M NaOH—1M NaCl 溶液中浸 10 分钟，用蒸馏水漂洗几次，以去除碱处理所产生的氨气，再用转移缓冲液 (1M NaAC, pH6.1) 浸洗二次，每次 20 分钟。随后进行 Southern DNA 转移和分子杂交反应。

关于甲醛胺—琼脂糖胶电泳的制备、特性、应用等详细内容见参考文献^[5]。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- [2] Reiser, J., Renart, J. and Stark, G. R., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1104-1112.
- [3] Levy, A., Frei, E. and Noll, M., 1980, *Gene* 11, 283-290.
- [4] Stellwag E. J. and Dahlberg, A. D., 1980, *Nucleic Acids Res.* 8, 299-317.
- [5] Y. L. Sun, Y. Z. Xu and P. Chambon, 1982, *Nucleic Acids Res.* 10, 5753-5763.

经验交流

“钨酸—丹宁酸—钨酸”法在扫描电镜术中植物样品制备的应用

徐 敏 源

(浙江人民卫生实验院电镜组)

用扫描电镜 (SEM) 观察生物样品，首先要使样品表面导电。现在的常规法是用金属喷镀法来达到这一目的。该方法的主要缺点是金属膜的厚度和膜层的不均匀性，而对一些多孔粗糙的样品要在整个表面喷镀一层连续的金膜更为困难。随着细胞生物学的不断发展，所观察样品结构的要求也越来越细微，使这一

问题显得更为突出。使用金属喷镀法所喷金属膜厚度越大，被覆盖的细微结构就越多；厚度太薄，在样品表面不能形成一层连续的金膜，会导致样品的滞电现象 (charging artifact) 而

* 实验材料部分由浙江林学院植物教研室、杭州大学生物系遗传教研室、浙江人民卫生实验院药物研究所提供，特此谢意。

看不清真实结构^[1]。目前,国内外用常规法操作的金属膜厚度一般是30—250 Å,对表面多孔粗糙的样品还要增加厚度,对一些表面特别粗糙的样品困难就更多。现有的商品SEM的分辨力可达到30—60 Å,这样要观察100 Å以下的细微结构使用金属喷镀法就较难实现。为此,寻找新的样品表面导电术就成为生物SEM工作者共同关注需积极研究的课题。

作者根据近年来的有关资料和自己的工作实践,试用了“钨酸—丹宁酸—钨酸”(下称“O—T—O”法),使生物样品表面导电,对植物样品表面导电进行了多次反复实验,结果还比较满意。它的基本原理可能是丹宁酸的多酚根与组织细胞中蛋白质的肽键结合而另一部分多酚根与金属钨结合,在样品表面形成一种稳定的“蛋白质—丹宁酸—金属钨”的螯合物,从而在样品表面产生了导电层^[2]。因此“O—T—O”法既不在样品表面覆盖一层有厚度的金属膜,又能使样品导电,对多孔粗糙的样品也不易产生滞电现象,为植物SEM的样品制备提供了一种新的方法。

供试材料为檫树(*Sassafras*)花、浙贝母(*Fritillaria Verticillata* Willd. var *thunbergii* Bak)花药、青蒿叶(*Artemisia annua* L.)、普通小麦(*Triticum aestivum* L.)花药、玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)的花药等。采样后立即用2.5%戊二醛和1%钨酸常规双固定,接着按下面方法操作: [1]用0.1M的磷酸缓冲液和蒸馏水各浸泡冲洗2—3次(每次2—3分钟)后,用4%丹宁酸—8%戊二醛固定液(由0.1M磷酸缓冲液配制)固定,置4℃冰箱1—2小时。 [2]用0.1M磷酸缓冲液和蒸馏水冲洗2—3分钟后,用2—4%钨酸固定液(0.1M磷酸缓冲液配制)固定,置4℃冰箱1—2小时。在室温下将[1]和[2]重复一次。然后按常规法脱水和干燥。用ASM—SX型和S—450型SEM观察,工作电压5—25KV,放大倍数40—8,000倍。

用不同的植物样品和不同的放大倍数进行

重复实验,结果如下:

在玫瑰花花丝的SEM照片上,能清楚地看到它的表皮是由褶皱的不同杆状结构排列组成(图版图1)。在玫瑰花的部分花药外壁SEM照片上可见清晰裂沟。外壁是由大小相似排列整齐的表皮细胞构成(图版图2)。在金钱松和浙贝母的花粉粒的SEM照片上,整个花粉的轮廓清楚,外壁的雕纹和其它结构都比较好(图版图3、4)。

从以上图片可见,用“O—T—O”法处理的植物材料,从叶片到整只花芽,由花药、花丝到花粉粒等均显示图像比较清楚,细微结构丰富,可得到比较满意的结果。

“O—T—O”法是一种组织导电法。它的全部过程必须在液相中完成,而生物材料均属于亲水性样品,因此该方法不仅适用于植物材料,同时也可用于动物样品。由于在样品表面能形成一层“蛋白质—丹宁酸—金属钨”可供SEM成像的导电层。对一些表面多孔粗糙的样品,同样也能形成一层连续的导电层,使样品表面导电。这是“O—T—O”法的一个优点。从实验结果也可明显地观察到,图像都比较清晰。这可能是由于在样品表面产生的“蛋白质—丹宁酸—金属钨”的螯合物导电层是比较均匀的缘故。这是它的第二个优点。此外,本方法还有能使样品避免高温热辐射所引起的损伤、所需要的设备简单、操作方便以及能节省黄金消耗等优点。

使用“O—T—O”法处理的样品硬脆,所以有人称它为硬固定。这是该方法的主要缺点。因此,在丹宁酸—戊二醛和钨酸中处理的时间不宜太长,每次以1—2小时为宜。处理时间愈长,样品脆性愈大,这样在脱水、干燥和装样品座等操作中可能发生细微结构的破损而影响观察结果。

根据以上实验结果可以认为,使用“O—T—O”法能使植物样品表面产生供SEM观察的导电层。至于它是否一定优于金属喷镀法,还有待于进一步研究。