



花粉亚显微结构研究技术

黄 斌

(中国科学院遗传研究所)

做过花粉超薄切片的人们都知道,要想得到完整满意的连续切片和清晰的花粉电镜照片是比较困难的。造成困难的原因主要有:(1)花药壁(尤其是禾本科植物的花药壁)外表皮上有一层较厚的蜡质,在固定、脱水及包埋过程中溶剂较难渗入。(2)花粉囊中往往有空气,花药漂浮在固定液上不下沉。(3)较成熟的小孢子的外壁厚而坚硬,其内壁也较厚。花粉外壁的主要成份是能耐酸、碱和射线的孢粉素。外壁不仅是溶剂渗透的重要障碍,而且在切片时坚硬的花粉壁和胞质间往往出现裂痕。(4)单核靠边期小孢子具有中央大液泡,在制样过程中容易破裂。因而在电子显微镜下观察到的小孢子往往呈新月形或三角形,而不是圆形或椭圆形。

本文根据作者在进行活体植株上的花粉及培养花药中花粉亚显微结构研究的经验,向读者介绍适用于花药和花粉的电子显微镜制样和切片方法。依此方法能得到较满意的花粉超薄切片,而且细胞亚显微结构保存较好。

材 料 和 方 法

材 料

小麦(*Triticum aestivum*)和芍药(*Paeonia lactiflora*)的花药。

方 法

I. 取材 欲固定的植物组织一定要新鲜。从植株上或培养中取下花药后应迅速投入固定液中。若将麦穗或芍药花蕾在室温下置放一小时后再取其花药固定,则会出现细胞质壁分离现象。

II. 固定 固定液为以0.05 M 磷酸钠缓冲液配制的2%戊二醛(pH 7.0)。先在有机玻璃板上滴一滴固定液,将取出的花药迅速投入固定液,并在固定液中用锋利刀片将花药切成 $\leq 1 \text{ mm}^3$ 的小块。然后将花

药转入盛有固定液的小瓶内,置真空干燥器中抽气。只有将花粉囊中所含空气排出方能保证固定液较好地渗入组织细胞内。后在室温下固定花药两小时或稍长时间,一般不超过24小时。

吸去固定液后,用0.05 M 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)漂洗花药两次,然后让花药在缓冲液中过夜。次日再用缓冲液漂洗花药一次,以1%钨酸(0.05 M 磷酸钠缓冲液配制, pH 7.0)在室温下固定2小时。此时花药变成黑色。

III. 脱水 花药经蒸馏水漂洗一至两次后,再按顺序经下列溶剂脱水:

以蒸馏水配制的饱和醋酸双氧铀 15分钟

30%、50%乙醇 各15分钟

70%、乙醇(含饱和醋酸双氧铀) 约2小时(置于暗处)

80%、90%乙醇 各15分钟

100%乙醇 1小时

100%丙酮(含饱和醋酸双氧铀) 1—2小时

100%丙酮(含饱和醋酸双氧铀) 过夜

100%环氧丙烷 15分钟

100%环氧丙烷 15分钟

IV. 树脂的渗透与聚合 所用树脂(包埋剂)为Spurr's 树脂[1]适用于花药和花粉包埋的配方如下:

ERL 4206 10.0 g

D.E.R.736 6.0 g

NSA 26.0 g

S.1 0.2 g

充分搅拌均匀后方可使用,配好的树脂可在室温下保存七天。

脱水后的花药再经下列溶剂渗透:

环氧丙烷:包埋剂(1:1) 2小时

环氧丙烷:包埋剂(1:3) 2小时

纯包埋剂 30小时至一周

然后将花药转入盛有包埋剂的胶囊中,在70℃烘箱中聚合16小时。此时包埋块呈透明状浅黄色,质地坚硬。

综上所述,整个固定、脱水、包埋过程可在5—6天内完成。第1天:固定、漂洗;第2天:后固定及脱水;第3—5天:树脂的渗透;第6天便可得到聚合完毕的包埋块。

V. 切片 先在包埋块头修出一块下底边 <0.5 mm,高 <0.3 mm的光滑平面。一个较易掌握的修块方法是:先用玻璃刀在包埋头上切出一个光滑平面(切法同超薄切片法),尔后在此平面上修出一梯形面。梯形上下底边必需平行,否则得不到连续切片。

一般来说,每块玻璃刀在切出了三十片左右的片子后便不再锋利。这时应把切片从水槽中捞起,换刀再切。捞片前,先用牙签或滤纸蘸少量氯仿,在离切片 $0.5—1$ mm上方薰片刻。见到切片伸展开即可,一般不超过10秒钟。左手持镊子,夹住铜网并伸入水下;右手持睫毛针,将切片带拨到铜网正上方。在将铜网提出水面的同时用睫毛针稳住切片的位置,切片带就会粘在铜网上指定的位置。一枚铜网可粘两排切片带,每排4—5块切片。如果对切片的连续性要求不高;亦可采用更简便粘片法,即用睫毛针将水面上的切片拨到一起,用铜网的膜面接近切片,使切片粘附在铜网上。

VI. 染色 用毛细管滴一滴醋酸铅染液在铜网上,1—2分钟后用流水冲洗铜网约1分钟。用滤纸吸走铜网上的水,在白炽灯下烘烤铜网片刻后便可入电子显微镜中观察。

醋酸铅染液配方^[2]:以40%NaOH配制2%酒石酸钾钠。取1 ml上液,与5 ml 20%醋酸铅 $[Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3 H_2O]$ 混合,搅拌。稀释10倍后过滤备用。此染液pH值为酸性,不易沉淀,可在冰箱中长期保存。染色快速,方便,无污染。

VII. 花粉粒的电子显微镜制样方法 有些植物的花药很大。一枚烟草花药约含40,000个花粉粒;一

枚芍药花药中的花粉粒更多,花药长度均在3 mm以上,欲得到 <1 mm³的材料需将花药切成6块以上。花粉囊中松散排列的花粉往往散落到固定液中,随溶剂流失。在这种情况下,固定花粉粒比固定花药更有优越性,固定和包埋花粉的方法如下:

在固定液中撕开花药,抖出花粉。固定2小时后离心(100×g 5分钟),弃去上清液(固定液)。沉淀下来的花粉按上述处理花药的方法漂洗,后固定、脱水及包埋,只是每次更换溶液都要经过离心(100×g 5分钟)。使用花粉制样一定要掌握好离心速度,速度高于100×g则花粉容易破裂。

讨 论

欲得到满意的花粉超薄切片,应注意下述几点:(1)材料需新鲜,固定迅速。以磷酸钠缓冲液固定效果好。(2)脱水要彻底。在无水丙酮及无水乙醇中置放少量无水硫酸铜(包在定量滤纸中)以保持其无水。(3)以花粉等较坚硬组织或细胞为材料,Spurr包埋剂效果优于其它常用包埋剂(如Epon 812)。

按本文介绍方法细心操作,便能得到较理想的花粉超薄切片及电镜照片。本文所附图版,均为按上述方法操作所得到的亚显微结构照片。小孢子及花粉形状保持良好,细胞质细微结构清晰。

参 考 文 献

- [1] Spurr, A. R. 1969. *J. Ultrastruct.* 26:31-43.
- [2] Millonig, G. 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:736-739.

制备小鼠染色体新法——利用腹腔引流细胞制备染色体*

郑瑞珍 冯燕玲 高晓虹 陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所)

利用外周血淋巴细胞体外培养法制备染色体,已被广泛应用于各类动物^[1,4,5,8]。在小鼠也有成功的报道^[3,6],但在实际应用中还

极不稳定,用同样的材料和条件,分裂相也会

* 刘若枫同志参加部分技术工作,李建荣同志参加相片放大,谨致谢意。