

原生质体扫描电镜观察研究方法的改进及其效果初报

钟 荣 亮

(广西农学院)

摘要 本文介绍了一种原生质体扫描电镜观察研究方法。比较了三种不同配方的固定剂, 结果证明: 用添加甘露醇作渗透压稳定剂和用原生质体培养液作稀释剂配制的固定剂效果良好。用常规电镜固定剂则会造成原生质体变形、破裂。设计了室温下的快速脱水方案, 取得较满意结果。观察到原生质体表面有许多大小约100—200毫微米的微孔结构。

关键词 原生质体; 扫描电子显微镜

用酶解方法除去了细胞壁的植物细胞原生质体经过培养, 可以再生成完整的植株。近年来发展迅速的遗传工程技术手段之一, 就是通过原生质体融合, 进行体细胞杂交; 或者将某种细胞器、DNA、病毒等外源遗传基因导入原生质体, 再培养成新的植物。它为广泛地组合各种基因型, 培育出具有优良性状的植物新品种展示了美好前景^[1]。

用电子显微镜详细研究各种植物原生质体的超微结构, 了解它在培养过程和融合杂交中的变化, 对于探索体细胞杂交的机理和外源基因导入途径有重要意义。

由于原生质体仅有一层非常薄的柔性质膜包被, 十分脆弱而且高度液泡化。用常规电镜制样方法处理, 原生质体将在处理过程中破裂、崩解或者严重变形。本文介绍笔者参考L.C. Fowke的原生质体透射电镜镜检方法^[2], 加以改进用于扫描电镜样品的制备, 可以获得较为满意的结果。

作了以下改进试验:

- (1) 比较了三种不同配方的固定剂。
- (2) 将冰浴下脱水, 改为在常温下脱水。
- (3) 用快速脱水方案代替常规脱水。将脱水时间缩短为常规脱水的五分之一。

材料与方 法

1. 原生质体的分离 用含有0.5M甘露醇的1.5%纤维素酶(Onozuka R10)和1%果胶酶混合酶液, 分别从马铃薯和木薯幼叶中分离原生质体^[2], 用离心沉淀法纯化。

2. 固定 要使原生质体超微结构迅速得到固定而不造成损伤、破裂, 前固定选择合适的固定液十分重要。我们比较了三种固定剂的作用结果。

- (1) 常规电镜制样使用的3%戊二醛固定剂(用pH=7.2的磷酸缓冲液配制)。
- (2) 用原生质体培养液为稀释剂, 配成3%的戊二醛固定剂。
- (3) 在磷酸缓冲液中, 添加7%甘露醇(渗透压稳定剂)。以此为稀释液, 配制3%戊二醛固定液。

本文承我院何若天副教授审阅指导, 特此致谢。

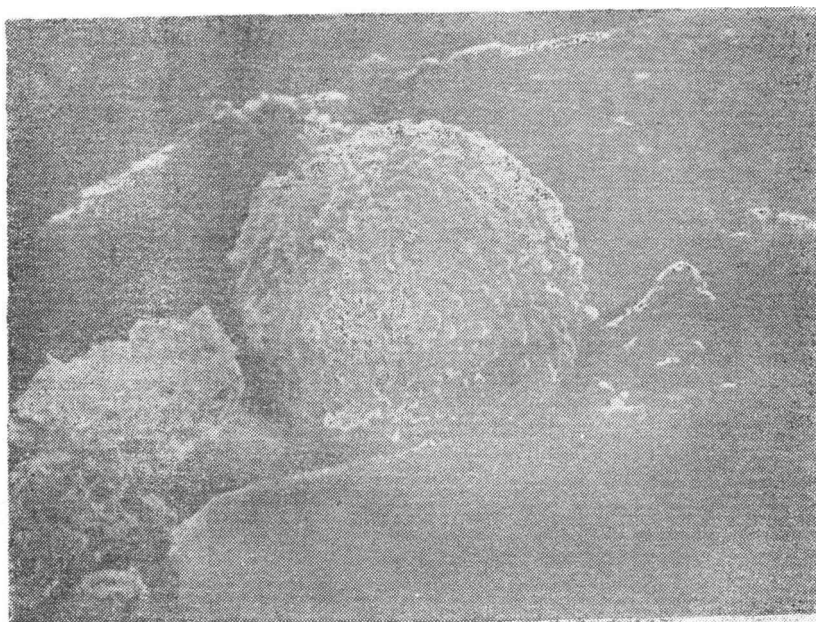


图1. 马铃薯叶细胞原生质体扫描电镜照片 3000×
Fig. 1. Protoplast of potato leaf cells ×3000

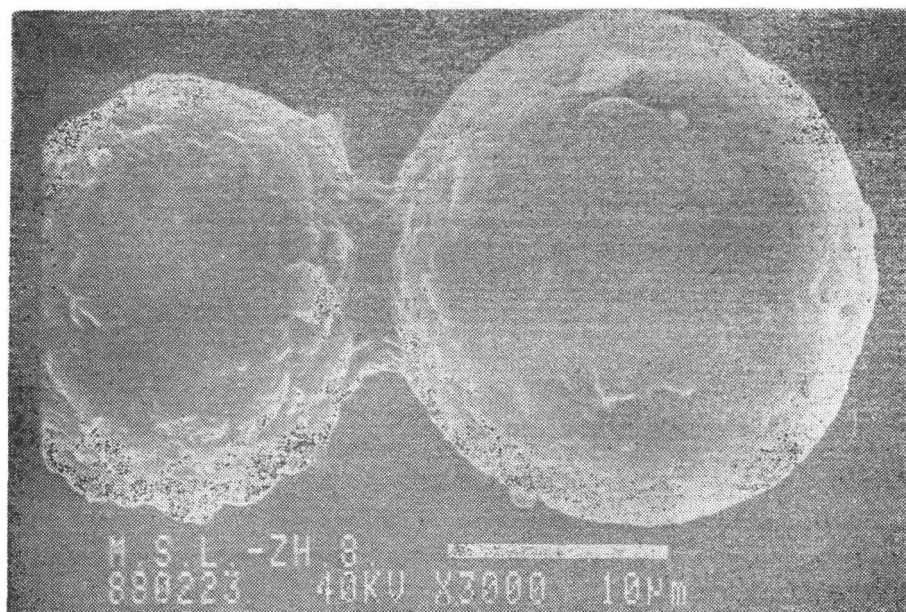


图2. 木薯叶细胞原生质体及其自发融合现象。
表面可见200—300nm的微孔结构。3000×
Fig. 2. Protoplast of cassava leaf cells ×3000

处理方法:在3支离心管中,保留较高浓度的原生质体悬液0.5毫升。分别加入上述三种固定剂各1毫升,使戊二醛在离心管的最终浓度为1%,轻轻摇匀,在室温下固定2小时。中途轻轻摇匀几次。(以后各步直到脱水完毕均在离心管中进行)。于 $100\times g$ 下低速离心3~5分钟,弃去上清液,再分别加入上述3%的戊二醛固定剂各1毫升。室温下放置1~2小时,离心($100\times g$,下同)弃去上清液。用磷酸缓冲液($pH=6.8$)洗涤3次,以除净戊二醛。最后加入1%四氧化钬溶液,室温下放置一小时作为“后固定”,以进一步提高原生质体外膜的强度,减少脱水、干燥过程中的变形和损伤。

四氧化钬固定后,用蒸馏水洗涤两次,然后转入脱水过程。

3. 脱水:按照Fowke介绍的方法^[2],原生质体样品应在冰浴下进行脱水。我们考虑到原生质体只有一层细胞膜包被,个体微小,比表面极大,通透性好,于是试验了在室温下的快速脱水方案。方法是:

在室温下,从10%乙醇开始(用丙酮亦可)每3分钟递增10%,每更换一级脱水剂,均轻轻振荡以促进脱水作用;在100%乙醇中更换两次,第二次结束时加入等量醋酸异戊酯,使乙醇:醋酸异戊酯=1:1。浸洗五分钟后,离心,转入100%醋酸异戊酯中,置4℃冰箱中过夜。

4. 干燥:由于原生质体外膜十分脆弱,常温空气干燥法会使它产生严重收缩变形。用临界点干燥法处理,能缓解表面张力的影响而很好地保持样品的真实形貌。

方法是:在垫好滤纸的不锈钢样品篮里,放置1~2块 2×3 毫米大小,事先喷镀有一层金属膜的盖玻片。用吸管将脱水后悬浮于醋酸异戊酯的原生质体滴在此盖玻片上(可避免样品变形并保证导电良好),置于HCP-2临界点干燥仪的样品室中,旋紧盖子。注意:要缓慢通入液体二氧化碳,防止液流冲走样品。以后按仪器规程操作。

临界点干燥结束,立即用导电胶或双面胶将附有干燥样品的盖玻片粘在扫描电镜样品台上,作导电处理。

5. 导电处理:在样品表面喷镀一层均匀的金属膜进行导电处理,可以防止观察时出现放电现象,提高二次电子信号强度从而增强图象的亮度和反差。我们用IB-5型离子溅射镀膜仪,阴极为金—钨合金(6:4)。样品与阴极靶间距40毫米,溅射电流6~7毫安,时间5~10分钟。溅射镀膜金属颗粒细,扫描观察时分辨率高,图象清晰^[3]。

镀金属膜后,用JEM-1200EX型电子显微镜的扫描系统观察拍照。

结果与讨论

1. 在光学显微镜下,各种细胞的原生质体大都是圆球形,不易区分不同种和不同部位细胞原生质体的细微差别,在扫描电镜下观察则可以分辨。

图1为马铃薯幼叶细胞原生质体。

图2为两个自发融合的木薯幼叶原生质体。两个细胞之间的融合连接带清晰可辨。

扫描电镜景深大,图象富有立体感,能从样品表面获得多方面的信息。如与透射电镜观察结合,进行细胞融合、杂交、生长动态等方面的研究,将起重要作用。

2. 常规电镜制样的戊二醛固定剂不能直接用来固定原生质体。由于溶液的渗透压不合

适, 会使十分脆弱的原生质体变形, 破裂甚至崩解, 结果只能观察到大量破损的细胞, 如图 3 所示。如果在固定剂中添加 0.5~0.8M 的甘露醇作为渗透压稳定剂, 或者用相应的原生质体培养液配制固定剂, 均可获得较好的结果(图 1、2 所示)。从多次试验观察结果看, 还是以培养液为稀释剂配制的戊二醛固定液效果最好。其原因可能是: 对于不同的原生质体来说, 相应的培养液具有最适其存在的环境条件。这样的条件下进行固定有利于保持它自然的形貌和超微结构。

3. 对比了室温下的快速脱水方案和冰浴下的常规脱水方案。结果表明二者并无差异。由于室温下的快速脱水方案简化了操作条件, 脱水时间缩短为常规法的五分之一, 不失为一种简便可行的方法。

4. 经大量观察, 在完整的原生质体表面常常见到许多清晰的小孔(见图 2) 些小孔多数出现在原生质体凹陷的部位, 大小约为 100~200 毫微米(nm)。这些小孔可能是原生质膜在脱水剂(乙醇或丙酮)的作用下, 局部薄弱位点出现的孔洞。这些位点, 在原生质体代谢过程中的作用有待深入研究。这将是一个有意义的问题。

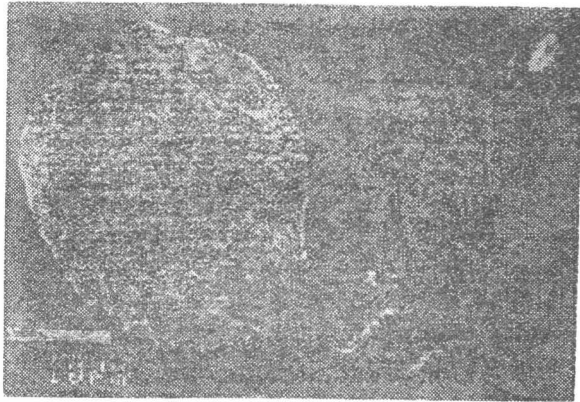


图 3. 常规固定剂制备的原生质体

整个细胞变形失真, 外膜破裂。1500×

Fig. 3. Protoplast prepared by conventional fixing agent. The cell was out of shape and its membrane has burst, ×1500

主要参考文献

- 〔1〕汪德耀主编, 1984: 细胞生物学实验指导。p172—201, 高等教育出版社, 北京。
- 〔2〕L.C.Fowke, 1980, “原生质体的电子显微镜检”《植物组织培养方法》。p78—84, 科学出版社。
- 〔3〕田中敬一(李文镇等译), 1984年: 图解扫描电子显微镜——生物样品制备。科学出版社。

STUDY ON THE MODIFIED METHOD FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATION OF PROTOPLAST

Zhong, Rong Liang

(Guangxi Agricultural College)

Abstract A scanning electron microscope study about protoplast observation was presented. Three different fixing agents were compared and rapid dehydration method was tested. Microholes between 100—200 nm (diameter) on surface of protoplast were observed distinctly.

Key words protoplast; scanning electron microscope