

研究简报

## 关于孢子虫类透射电镜样品包埋方法的改进

周炳升 吴国樵

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### AN IMPROVED METHOD OF EMBEDDING OF SPOROZOA FOR TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS

Zhou Bingsheng and Wu Guoqiao

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**关键词** 孢子虫, 再包埋, 超微结构

**Key words** Sporozoa, Re-embedding, Ultrastructure

国内曾有人以二次包埋法用于补救由于脱水不完全的透射电镜样品的报道<sup>[1]</sup>。寄生于鱼类鳃、皮肤、肌肉、肾脏等组织中的孢子虫, 有较厚的孢囊, 坚固的孢壁和电子致密的结构等, 在制备这类透射电镜样品的过程中不易脱干水分, 树脂浸透不良是制备电镜样品失败的主要原因。作者在工作中摸索出用两次甚至三次重浸透包埋法, 基本解决了孢子虫类样品制备中浸透不良现象, 获得了较好的观察效果。

#### 材料和方法

1. 草鱼肌肉内寄生的微孢子虫, 鳗鲡肾脏寄生的两极虫, 鲤鱼肾脏内寄生的球虫等, 取以上组织先用 2.5% 戊二醛 (0.1mmol/L 磷酸缓冲液配制, pH7.2) 至少固定 12h, 其间换 1 次固定液, 0.1mmol/L 磷酸缓冲液浸洗 2 次, 再经 1% 铁酸固定 4h, 0.1mmol/L 磷酸缓冲液浸洗, 丙酮脱水, Epon812 树脂浸透, 包埋, 于 60℃ 烤箱中聚合。

2. 样品先用切片机切出 1—2μm 厚的半薄切片, 在光镜下确定寄生虫部位。

3. 然后用单面刀片切下大约厚 40—60μm 的切片, 放在载玻片上, 滴 3 滴蒸馏水, 小心在酒精灯上加热, 待蒸馏水快要蒸干时, 再滴加 3 滴, 反复 3 次, 再将切片放在 60℃ 烤箱中烤干水份。

4. 切片放在新配制的 Epon812 树脂中浸透 12h, 再置于 60℃ 烤箱中聚合。

5. 聚合完毕, 于 LKB-V 切片机下切出 1—2μm 切片, 用 0.1% 甲苯胺蓝 (1% 硼砂配制, pH10.5) 染 15S, 用滤纸吸去多余染料, 蒸馏水洗 2 次, 盖上盖玻片, 直接在光镜下检查。

6. 如果制样较为满意, 再切出 500μm 左右厚的超薄切片, 经醋酸铀、柠檬酸铅染色后, 日立 H-300 电镜观察。

#### 结果与讨论

经过二次浸透包埋的孢子虫样品浸透良好, 没有空洞, 并且较好地保持了孢子虫固有的结构,

本文承李连祥教授审阅, 特致谢

1992 年 4 月 27 日收到

反差良好。若只经过一次包埋,电镜下一般只能观察到孢子虫的孢壁,其内部结构是无树脂的电子空白区域,因而无法观察其内部结构。作者曾用低粘度 Spurr 树脂<sup>[2]</sup>和 Spurr 与 Epon812 混合树脂来包埋孢子虫类样品,辅之减压浸透,延长浸透时间等手段,都未达到理想效果。又环氧丙烷能很好地与丙酮及环氧树脂相溶,因此用环氧丙烷作为丙酮和环氧树脂的中间溶剂也有利于树脂的浸透<sup>[3]</sup>。多次实验表明:二次包埋法能较好地解决树脂浸透不良现象,不仅适合于孢子虫样品,同样适合某些个体在 300μm 的纤毛虫以及具有坚固细胞壁,树脂难以浸透的藻类。这种方法也适用于由于脱水不完全,脱水剂中含有水份,树脂吸潮等原因造成的树脂浸透不良的样品补救,但所有样品

必须固定良好为前提,否则,虽经过二次包埋后,其结构也会发生较大改变。另外,应根据工作需要,切出不同厚度的超薄切片。

## 参 考 文 献

- [1] 石洪波,武忠弼. 电镜标本包埋中几种常见问题的处理. 电子显微学报, 1989, 8(3): 77—78.
- [2] Spurr A R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 1989, 26: 31—43.
- [3] William, L K. Fine structure of the sporogonic stages of *Nosema parkeri*. *J. Protozool.*, 1978, 25: 177—186.