

水稻组织半薄切片法

曹剑波, 程珂, 袁猛*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 曹剑波, 程珂, 袁猛. (2018). 水稻组织半薄切片法. *Bio-101* e1010142. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010142.

实验原理: 使用树脂包埋样品, 切成薄片的样品后能在光学显微镜下成像。

实验目的: 将树脂包埋的水稻材料切成 1-2 μm 的切片。

关键词: 半薄切片, 光学显微镜, 组织学

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. 吸管
3. 注射器
4. 牙签
5. 1 ml 加样器
6. 200 μl 加样器
7. 细毛笔
8. 滤纸
9. 戊二醛
10. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
11. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
12. 甲苯胺蓝
13. 乙酸
14. 滤纸
15. 伊红
16. 无水乙醇 (国药试剂)

17. Technovit 7100
18. 硬化剂 I
19. 硬化剂 II
20. 石蜡
21. 0.1 M PBS, pH 7.2 缓冲液 (见溶液配方)
22. 脱水剂 (见溶液配方)
23. 固定剂 (见溶液配方)
24. 渗透液 (见溶液配方)
25. 包埋剂 (见溶液配方)
26. 染色液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 烘箱 (温度范围 25-100 °C, 国产)
2. 磁力搅拌器 (国产)
3. 干燥器 (国产)
4. 玻璃刀制刀机 (Leica KMR3, Germany)
5. 钻石刀 (超薄级, DiTOME, Switzerland)
6. 超薄切片机 (Leica UC6, Germany)
7. 透射电子显微镜 (H-7650, Japan)
8. 用具: 手术剪刀、眼科镊子、量筒、烧杯、包埋模具、酒精灯、玻璃条

实验步骤

1. 取样: 目的水稻组织切成 6 mm³ 的小块, 每份样品至少取 20 个小块, 迅速置于 2.5% 戊二醛固定液中, 抽真空 2 h, 4 °C 或室温固定一周以内。
2. 梯度脱水: 依次更换 30%、50%、70%、80%、90%、100%、100% 乙醇溶液, 每个梯度室温放置 10min。
注: 更换 100% 乙醇时, 速度要快!
3. 树脂渗透: 室温下, 依次更换 3:1、1:1、1:3 的无水乙醇与 7100 包埋剂的混合液, 每个梯度作用 12 h。再更换纯包埋剂, 作用 12 h。

4. 包埋聚合：在包埋磨具中加入 0.5 ml 左右包埋剂，用干燥牙签将样品挑到包埋孔子并定位到合适的位置，缓缓注入包埋剂至包埋孔满。加入的包埋剂以包埋孔的液面凸起不溢出为准，并将样品拨正。加了硬化剂 II 的包埋剂极易凝固，室温下包埋操作可进行 5-7 min。样品在 38 °C 烘箱中聚合过夜。
5. 修块：用单面刀片切包埋块，使样品稍稍暴露，并使待切部位呈方形或长方形，最后用单面刀片将样品块的切面切平。
6. 玻璃刀的制备：玻璃条洗净，晾干。用玻璃制刀机将玻璃条对半切成两条等长的，再对半切，制成边长为 25 mm 的正方块，然后再将每个正方形按对角线切割，切成 2 把玻璃刀。玻璃刀现制现用较好。
7. 粘刀槽：将玻璃刀放在 Leica EMMP 展片台上预热，同时将塑料刀槽放在展片台的溶蜡区预热，以便沾上少许蜡，然后将刀槽固定在刀背上，并用石蜡密封刀槽底部和左右两边，避免漏水。
8. 固定样品块和玻璃刀：将样品包埋块固定在超薄切片机的固定器上，将有刀槽的玻璃刀固定在刀台上，调整刀的角度为 4 度，选择切片上下位置。
9. 切片：用吸管向水槽内加水，使在刀刃处有薄层液体并形成月形水面。粗进刀，靠近样品，然后选择切片厚度 1 μm ，切片速度 3-5 mm/sec，进行切片。
10. 捞片、展片、粘片：当刀槽水面上有完整的切片时，用头发丝或细铜丝绕成小圈，固定在手柄上捞片，并将切片转移到滴有蒸馏水的载玻片上，然后将载玻片放到展片台上展开，当载玻片上的水滴被蒸干后切片就被粘在载玻片上。
11. 染色：在载玻片的切片部位上加入 1 滴甲苯胺蓝染液，染色 2-5 min，用蒸馏水冲去多余的染液，滤纸吸干多余的水分，烘干。
12. 样品块的保存：固化好的样品块放在干燥器中 4 °C 保存，以免树脂变性。

溶液配方

1. 0.1 M PBS, pH 7.2 缓冲液

A 液：NaH₂PO₄·2H₂O 31.21 g 定容到 1,000 ml

B 液：Na₂HPO₄·12H₂O 71.64 g 定容到 1,000 ml

取 A 液 28 ml，B 液 72 ml 配制成 0.2 M PBS 缓冲液，然后用蒸馏水稀释成 0.1 M 的工作液

2. 脱水剂

30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇和无水乙醇

3. 固定剂

2.5%戊二醛 (进口品质试剂, 0.1 M PBS, pH 7.2 配制)

4. 渗透液

100 ml Technovit 7100 加入 1 g 硬化剂 I, 玻璃棒搅拌约 5 min, 至白色颗粒完全溶解

5. 包埋剂

按照 1 ml 硬化剂 II 加入 15 ml 渗透液的比例配制

6. 染色液

1) 1%甲苯胺蓝

甲苯胺蓝 1 g

95%乙醇 4 ml

10%乙酸 10 ml

搅拌后用滤纸过滤

2) 伊红乙醇溶液

伊红 0.5 g

95%乙醇 100 ml