

水稻细胞表面和截面的扫描电镜观察

Observation of Cell Surface and Cross-sectional Structure of Rice Tissue by Scanning Electron Microscopy

曹剑波, 都浩, 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, 都浩, 袁猛. (2018). 水稻细胞表面和截面的扫描电镜观察. *Bio-101* e1010144. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010144.

How to cite: Cao, J. B., Du, H. and Yuan, M. (2018). Observation of cell surface and cross-sectional structure of rice tissue by scanning electron microscopy. *Bio-101* e1010144. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010144. (in Chinese)

实验原理: 根据固定剂对水稻细胞结构的原位固定和保存, 利用临界点干燥对样品的无损脱水干燥, 达到扫描电镜的观察条件后, 对组织表面和截面进行观察。

实验目的: 可以观察水稻组织表面的特殊结构(气孔、硅突等)、细胞表面结构及细胞大小。

关键词: 扫描电镜, 表面结构, 水稻组织

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. 吸管
3. 注射器
4. 牙签
5. 滤纸
6. 水稻组织
7. 无水乙醇 (国药试剂)
8. 醋酸异戊酯 (国药试剂)
9. 液态二氧化碳 (国药试剂)
10. 戊二醛 (进口品质试剂)

11. 0.1 M PBS, pH 7.2 缓冲液 (见溶液配方)
12. 脱水剂 (见溶液配方)
13. 固定剂 (见溶液配方)

仪器设备

1. 通风橱
2. 干燥器 (国产)
3. 冰箱
4. 临界点干燥仪 (HITACHI HCP-2, Japan)
5. 离子溅射仪 (JEOL JFC-1600, Japan)
6. 扫描电镜 (JEOL JSM-6390/LV, Japan)
7. 用具: 手术剪刀、眼科镊子、量筒、烧杯、小笼子

实验步骤

1. 取 样: 目的水稻组织切成 9 mm^3 的小块, 每份样品至少取 10 个小块, 迅速置于 2.5%戊二醛固定液中, 抽真空 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或室温固定一周以内。不同水稻组织取样要求: 组织要在固定液中剪切。叶片切成 $3 \times 3\text{ mm}$ 小块; 观察花粉粒直接取花药进行固定, 粘样后再将花粉粒拨出; 观察花原基或叶原基最好是将花序或叶序固定后再拨出原基。
2. 脱 水: 依次通过乙醇梯度 30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%逐级脱水每级 10 min, 样品块大的应适当摇动, 保证脱水干净。70%乙醇中可以放过夜。
3. 醋酸异戊酯替换: 醋酸异戊酯:乙醇=1:1 的混合液浸泡样品 10 min, 再用纯醋酸异戊酯浸泡 10 min, 适当摇动。将样品按照不同的编号转入对应编号的小笼子。醋酸异戊酯有刺激性气味, 此步要在通风橱内操作。
4. 临界点干燥: 提前打开临界点干燥仪预冷 1 h 以上。将装有样品的小笼子放进预冷的临界点干燥仪样品室内, 充分拧紧样品室盖子后注入液体二氧化碳至淹没样品为准, 先升温至 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加温 10 min, 再升温至 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 让二氧化碳气化, 观察液体全部气化后慢慢放气。放气速度一定要慢, 放气过程至少要持续 3 h 以上。必须等气体放净后才能开盖取出样品。

5. 粘样: 样品台上粘双面的导电胶, 将要观察的样品表面向上粘在导电胶上。粘样时, 不能碰到要观察样品的表面。要观察截面的样品, 用双面剃须刀片滑切出样品截面, 截面向上将样品薄片粘在导电胶上。
6. 喷金: 将样品台放在离子溅射仪中, 打开仪器开始抽真空, 当真空达到 5.0 Pa 后, 点 start 按钮进行喷金。
7. 扫描电镜观察: 样品台固定在样品座上, 放入扫描电镜样品仓, 抽真空待 HT 变蓝后, 加高压, 选择感兴趣区域放大聚焦, SCAN3 慢扫获得照片。

注意事项

1. 水稻叶片正面反面有较大差异, 粘样时注意正反。
2. 观察水稻叶片气孔取样植株最好在苗期, 较老植株微管组织发达, 气孔内陷及表面附属物很多不易观察气孔开闭。
3. 水稻叶片抽真空不易下沉, 可先用纱布塞在上面将叶片在液面以下, 再反复抽真空几次直至叶片自然沉入管底。
4. 观察水稻茎端分生组织, 剥去外面叶片及叶鞘时应非常细心, 极易破损或剥离不完全。

溶液配方

1. 0.1 M PBS, pH 7.2 缓冲液

A 液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 g 定容到 1,000 ml

B 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 g 定容到 1,000 ml

取 A 液 28 ml, B 液 72 ml 配制成 0.2M 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)