

水稻细胞超微结构的透射电镜观察

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). 水稻细胞超微结构的透射电镜观察. *Bio-101*. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010145.

实验原理: 根据固定剂和包埋剂对水稻细胞结构的原位固定和保存, 利用高分辨率的透射电子显微镜对水稻细胞进行成像和观察。

实验目的: 可以观察水稻细胞的超微结构、亚细胞器 (细胞核、叶绿体、线粒体、内质网、过氧化酶体及其他质体) 的结构。

关键词: 透射电镜, 超微结构, 水稻细胞

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. 吸管
3. 注射器
4. 牙签
5. 细毛笔
6. 滤纸
7. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
8. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
9. 戊二醛
10. 锇酸
11. Epon812 (SPI, USA)
12. DDSA
13. NMA
14. DMP-30
15. 醋酸铀

16. 硝酸铅 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
17. 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
18. 氢氧化钠
19. 丙酮 (国药试剂)
20. 固定剂 (见溶液配方)
21. 0.1 M pH 7.2 PBS 缓冲液 (见溶液配方)
22. 脱水剂 (见溶液配方)
23. 包埋剂 (见溶液配方)
24. 染色液 (见溶液配方)
 - 1) 醋酸铀染液
 - 2) 柠檬酸铅染液

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. 冰箱
5. 玻璃刀制刀机 (Leica KMR3, Germany)
6. 钻石刀 (超薄级, DiTOME, Switzerland)
7. 超薄切片机 (Leica UC6, Germany)
8. 透射电子显微镜 (H-7650, Japan)
9. 用具: 手术剪刀、眼科镊子、量筒、烧杯、包埋模具、酒精灯、玻璃条、铜网、铜网镊子

实验步骤

1. 取样: 将水稻组织切成 1 mm^3 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, 抽真空至样品沉底后再继续抽 2 h, 4 °C 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 $1 \times 1 \text{ mm}$ 小块, 花药两端剪开, 幼嫩组织取大些但不能超过 3 mm^3 , 其他含硅的组织剪的越小越好。

2. 清洗: 将样品块 0.1 M PBS 洗 3 次, 每次 30 min。
3. 后固定: 将样品块放入 1% 锇酸溶液, 室温固定 2 h。
注意: 锇酸剧毒! 一定要在通风橱内操作。以下所有步骤都要在通风橱内操作。
4. 清洗: 0.1 M PBS 洗 3 次, 每次 30 min。
5. 梯度脱水: 依次更换 30%、50%、70%、80%、90%、100%、100% 丙酮溶液, 每个梯度室温放置 30 min。
注意: 更换 100% 丙酮时, 速度要快!
6. 树脂渗透: 室温下, 依次更换 5:1、3:1、1:1、1:3、1:5 的纯丙酮与 Epon812 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。
7. 包埋聚合: 在包埋磨具中加入 0.5 ml 左右包埋剂, 用干燥牙签将样品块放入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。然后放入烘箱进行聚合(使包埋剂固化), 温度及时间依次为: 45 °C 12 h; 60 °C 24-72 h。
8. 超薄切片: 将包埋块粗修暴露出样品, 再用玻璃刀细修成梯形; 安装钻石刀, 对刀, 进刀进行切片, 将样品切成厚度为 60-80nm 的切片, 铜网捞片, 自然晾干。
9. 染色: 在干净的培养皿内放置蜡板, 把醋酸铀液滴到蜡板上, 将铜网覆于染液上 30 min, 然后用双蒸水冲洗、吸干。再将铜网覆于柠檬酸铅染液上 10 min。再用双蒸水冲洗, 吸干。
10. 透射电镜观察: 将铜网固定于样品杆上, 样品杆插入透射电镜, 加高压, 同时打开 CCD 成像系统。低倍找到切片上的样品, 选择感兴趣的区域进行聚焦成像, CCD 成像系统获得相应的数码照片。

溶液配方

1. 固定剂

2.5% 戊二醛

1% 锇酸 (0.1 M PBS, pH 7.2 配制)

注意: 锇酸剧毒!

2. 0.1 M PBS, pH 7.2 缓冲液

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

B 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64g 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

3. 脱水剂

丙酮的水溶液 (30%、50%、70%、80%、90%、100%)

4. 包埋剂 (10 个样品的用量)

DDSA 1 g

NMA 6 g

Epon812 7 g

磁力搅拌 8 h (注意勿产生气泡)

再加入 DMP-30 2.5 ml 继续搅拌 8 h, 干燥器内室温保存

5. 染色液

1) 醋酸铀染液

使用双蒸水将醋酸铀配成 0.5% 的水溶液, 醋酸铀溶解需 15-30 min

2) 柠檬酸铅染液

硝酸铅 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1.33 g

柠檬酸三钠 $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76 g

去二氧化碳的双蒸水 30 ml

上述成分混合于 50 ml 的容量瓶中, 用力震荡 1 min 后, 间歇震荡 30 min, 当溶液出现均匀的乳白色悬浮液时, 加入 1 M 氢氧化钠 8 ml, 溶液变成无色透明, 再加水至 50 ml。紧塞瓶口, 4 °C 冰箱保存, 如出现浑浊沉淀即不能使用