

# 一种简单快速植物组织冰冻切片方法

宁代锋, 尹增芳\*, 张菁, 孙海燕

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

**摘要:** 比较不同冷冻方法对植物细胞超微结构的影响, 结果表明: 直接包埋法处理的植物细胞超微结构保存较好, 而液氮冷冻处理的植物细胞内膜系统损伤严重。建立了一种直接包埋冷冻和适当回温相结合的方法, 不仅可以制作出植物细胞基本结构保存完整的组织切片, 而且避免了使用冰冻保护剂的弊端。其操作程序是: 样品固定→冰冻与包埋→适当回温→快速切片→展片→染色。此法制作的切片可进行不同的染色和组织细胞化学测定, 具有操作简便, 易于推广的特点。

**关键词:** 冰冻切片; 直接包埋法; 液氮冷冻; 回温; 超微结构

中图分类号: Q94-336

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)04-0386-04

## A Simple and Rapid Cryo-sectioning Method in Plant Tissue

NING Dai-feng, YIN Zeng-fang\*, ZHANG Jing, SUN Hai-yan

(College of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** The effects of different freezing treatments on ultrastructure of plant cells during cryo-sectioning were compared. The results shown that the cell ultrastructure was well preserved with direct cryoembed method, while the endomembrane system in the cell was injured severely with liquid nitrogen cryopreservation. We proposed a method combining with cryoembed and modest thawing, by which not only could get integrated sections with the basic structure preserved, but also could avoid the abuse of using cyro-protected reagent. The procedure consisted of several steps as follows: fixing → refrigeration and embedding → modest thawing → rapid sectioning → section flattening → staining. The sections made by direct cryoembed with modest thawing could be stained and chemical determined in different ways. Besides, the characteristic of this procedure is simple and easy to be promoted.

**Key words:** Cryosectioning; Cryoembed; Liquid nitrogen cryopreservation; Thawing; Ultrastructure

植物组织冰冻切片作为一种快速、简便、高效、易操作的技术, 可以缩短常规石蜡切片缓慢而复杂的处理过程, 减少对样品组织结构的损伤。在细胞免疫化学和原位杂交等研究中, 冰冻切片能更好地保存细胞内生物分子的活性, 显示出独特作用。冰冻切片技术在动物和人体的组织研究中已广泛应用<sup>[1-3]</sup>, 但由于植物细胞含水量大, 在低温冰冻过程中容易形成冰晶, 硬度变大, 难以切出结构完整的组织切片, 而且细胞内产生的冰晶会损伤细胞的内

膜系统, 影响其在植物细胞学研究中的应用。为了解决上述植物冰冻切片中存在的问题, 本文采用直接包埋冷冻和适当回温相结合的方法, 取得了较好的切片效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料选取南京林业大学校园苗圃内南林95杨(*Populus × euramericana* 'Nanlin95') 1 a 生茎。

收稿日期: 2007-08-13

接受日期: 2007-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671657); 江苏省自然科学基金项目(BK2005132)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

## 1.2 植物材料的冰冻处理方法

**直接包埋法** 启动切片降温开关,使箱温降低并维持在 $-20^{\circ}\text{C}$ ,冰冻台温度降低到 $-20^{\circ}\text{C}$ 。将经过预处理的材料包埋,然后转入冰冻切片机的样品台上,使材料迅速冷却并固着在样品台上。

**液氮冷冻法** 液氮冷冻法是将材料经常规方法固定和清洗后,先用包埋剂包裹在适当大小的盒内,再用液氮迅速冷冻。冷冻时间约为20 s,随后尽快将样品移至冰冻切片腔内,样品经1 h左右的回温后再用包埋剂粘在样品台上进行冰冻切片。

## 1.3 电镜制样观察

将直接包埋和液氮冷冻的材料回温后分别进行常规电镜制样,超薄切片切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,H-600型透射电镜观察拍照。

## 1.4 冰冻切片的制作流程

样品固定 → 冰冻与包埋 → 适当回温 → 快速切片 → 展片 → 染色观察

**样品固定** 将切取的杨树茎立即投入含4%多聚甲醛、100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)的固定液中, $4^{\circ}\text{C}$ 下固定2~3 h,100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)浸洗2~3次后备用,也可不固定直接将新鲜组织进行包埋。

**冰冻包埋** 启动切片降温开关,把箱温降低并维持在 $-20^{\circ}\text{C}$ ,冰冻台温度降低到 $-20^{\circ}\text{C}$ 。待冰冻切片机的温度合适时,把经过预处理的样品或新鲜组织直接用包埋剂包裹在样品台上,使材料迅速冷却并固着在样品台上。包埋时选用进口包埋剂OCT(Optimum cutting temperature compound),涂抹均匀,使样品深埋其中。

**回温处理** 把样品台连同已经冷却的材料移至切片机的机头,拧紧机头的螺丝,摇动机身外的旋转杠杆进行修块切片,直到切到自己需要的部位,此时的切片大部分都是破碎的,然后将样品台连同包埋块拿出切片机箱,室温下放置20~30 s,进行回温处理,使包埋块变软。

**切片** 将回温处理后的样品包埋块迅速放入切片机箱进行切片,这样处理可切出较完整的切片,切片厚度为10~20  $\mu\text{m}$ ,但切片过程必须在15~20 s内完成,超过这一时间,材料会冻硬,切片易碎。

**展片** 用解剖针轻轻地碰触切片周围的包

埋剂,切片即刻附着在解剖针上,随后用解剖针将切片转移到机箱外的载玻片上展片。

**染色** 待切片完全展开时,一般不需要特殊处理就可以直接在切片上进行染色或组织化学分析。如图版I:1所示,杨树茎横切面结构完整,未出现细胞结构破损的现象。图版I:2显示杨树茎细胞壁自发荧光的冰冻切片图像,杨树茎导管、木纤维细胞、韧皮纤维细胞及髓部薄壁细胞结构清晰。

## 2 结果

在电镜下观察不经过冷冻处理、液氮冷冻处理和直接冷冻包埋的杨树1 a生茎薄壁细胞的超微结构,结果表明不经过冷冻处理的杨树茎薄壁细胞结构完整,可以观察到细胞内清晰的液泡膜,以及细胞核、线粒体、质体、内质网等细胞器的膜结构(图版I:3)。

液氮冷冻处理后的杨树茎薄壁细胞的超微结构显示内膜系统损伤较为严重,由图版I:5可以看出薄壁细胞质壁分离现象严重,细胞内质体外膜解体,质膜及部分细胞器的膜上出现嗜银颗粒。观察中还发现部分细胞损伤极为严重,表现在质膜结构不清晰,细胞器解体,表明细胞膜系统受到严重的破坏(图版I:6)。

与液氮冷冻的材料相比, $-20^{\circ}\text{C}$ 条件下直接冷冻包埋的杨树茎薄壁细胞损伤程度明显较轻,液泡膜结构清晰,细胞器结构完整,内膜系统上无嗜银颗粒出现,但局部内质网库槽膨胀,部分细胞出现轻微的质壁分离现象(图版I:4)。

## 3 讨论

植物细胞有细胞壁和大液泡,含水量大,在低温冰冻过程中容易形成冰晶,硬度变大,难以切出结构完整的组织切片。材料硬度太大是造成组织切片破碎的主要原因。我们采用直接包埋和适当回温相结合的方法,有效地解决了这一问题,关键是把握最佳切片温度。张建国<sup>[4]</sup>认为最好是表面尚有小部分组织未冰冻发硬时开始修出切片平面,试切数下,见切出最佳切片时即用载玻片吸贴(最佳切片温度为 $-23^{\circ}\text{C}$ ~ $-20^{\circ}\text{C}$ ),大约只有10 s,低于该温度切片易碎。我们曾实验切未完全冻硬的组织也可切出比较完整的切片,不过这种临界状态难以把握,不便操作。

另外,植物组织低温冰冻会不可避免的造成冰晶损伤,而冰晶损伤会明显影响植物细胞的超微结构。孙龙华<sup>[7]</sup>等用电镜观察了红豆草(*Onobrychis viciaefolia*)采用不同降温方法保存后的超微结构,发现用快冻法保存的细胞存活率为零,其结构变化很大,而采用慢冻法保存后存活率为 66%,其细胞结构变化较少。曾继吾<sup>[8]</sup>等认为细胞严重伤害主要发生在液氮冷冻的降温及解冻的过程中。这与本实验的结果相似,用液氮冷冻植物材料细胞超微结构损害严重,而直接包埋法对细胞膜系统的保存相对较好。

国内有关冰冻切片技术的报道普遍采用冰冻保护剂的方法,陈丹<sup>[5]</sup>等用蔗糖保护-液氮速冻法,从而获得薄而且结构完整的切片;林月惠<sup>[6]</sup>等用甘油作冷冻保护剂对高度木质化的材料进行冰冻切片。采用冰冻保护剂是为了脱去细胞内一部分自由水,降低其冰点,提高其重结晶点,以尽快越过冰晶形成期,使细胞在快速冷冻时进入玻璃化态而减少冰晶形成。然而,冰冻保护剂本身也会对材料造成伤害,脱水会使细胞发生质壁分离,细胞膜和一些细胞器发生不可逆变化,给细胞带来损伤<sup>[8]</sup>。用直接包埋冷冻-适当回温法没有加入任何冷冻保护剂处理,避免了冷冻保护剂对植物细胞生理状态的影响。

冰冻切片法相对于其他切片法而言,适于开展细胞免疫化学和原位杂交等研究。这类研究工作除了要求实验样品尽可能的保持结构原状外,还应使待测分子保持免疫原性,不发生流失或漂移,力求“原位原量固定”。冰冻切片法不需要样品经过长时间的脱水包埋,能更好地保证抗原分子的稳定性<sup>[5]</sup>。

总之,冰冻切片是植物细胞学研究的一种简便有效的方法,我们在实验中摸索的直接包埋冷冻-适当回温的冰冻切片方法,取得了良好的效果,希望能促进植物冰冻切片技术的发展和推广。

## 参考文献

- [1] Sandy D, Peter K. Visualisation of mycorrhizal fungal structures and quantification of their surface and volume using laser scanning confocal microscopy [J]. *Mycorrhiza*, 1999(9): 205-213.
- [2] Sathyanesan S N, Antonia D, Rose T, et al. A simplified method for combined immunohistochemistry and *in situ* hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections [J]. *Brain Res Protocols*, 2002 (9): 214-219.

- [3] Ulrike L, Albrecht F K. Detection of parasites with DNA-binding bisbenzimidazole H33258 *Pneumocystis carinii* and *Leishmania* containing materials [J]. *Parasitol Res*, 1998, 84: 559-564.
- [4] Zhang J G(张建国). A new cryo-sectioning method [J]. *Chin J Clin Exper Pathol(临床与实验病理学杂志)*, 1994, 10(2): 177-178. (in Chinese)
- [5] Chen D(陈丹), Zhao J(赵洁). Suitable cryo-sectioning technique in floral organs of plant [J]. *J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究)*, 2005, 23(3): 285-290. (in Chinese)
- [6] Lin Y H(林月惠), Li H B(李寒冰), He X Q(贺新强). Application of cryo-sectioning technique in highly lignified tissue [J]. *Chin Bull Bot(植物学通报)*, 2001, 18(1): 118-120. (in Chinese)
- [7] Sun L H(孙龙华), Jian L C(简令成). Cryopreservation of sainfoin tissue cultures and their ultrastructural observation [J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 1990, 32(4): 262-67. (in Chinese)
- [8] Zeng J W(曾继吾), Yi G J(易干军), Zhang Q M(张秋明), et al. Cell ultrastructure of papaya shoot-tip during cryopreservation [J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 2005, 32(1): 15-19. (in Chinese)

## 图版说明

CW: 细胞壁 Cell wall; Ch: 叶绿体 Chloroplast; N: 细胞核 Nucleus; M: 线粒体 Mitochondria; V: 液泡 Vacuole; Pm: 质膜 Plasmalemma; OG: 嗜锇颗粒 Osmiophilic globule.

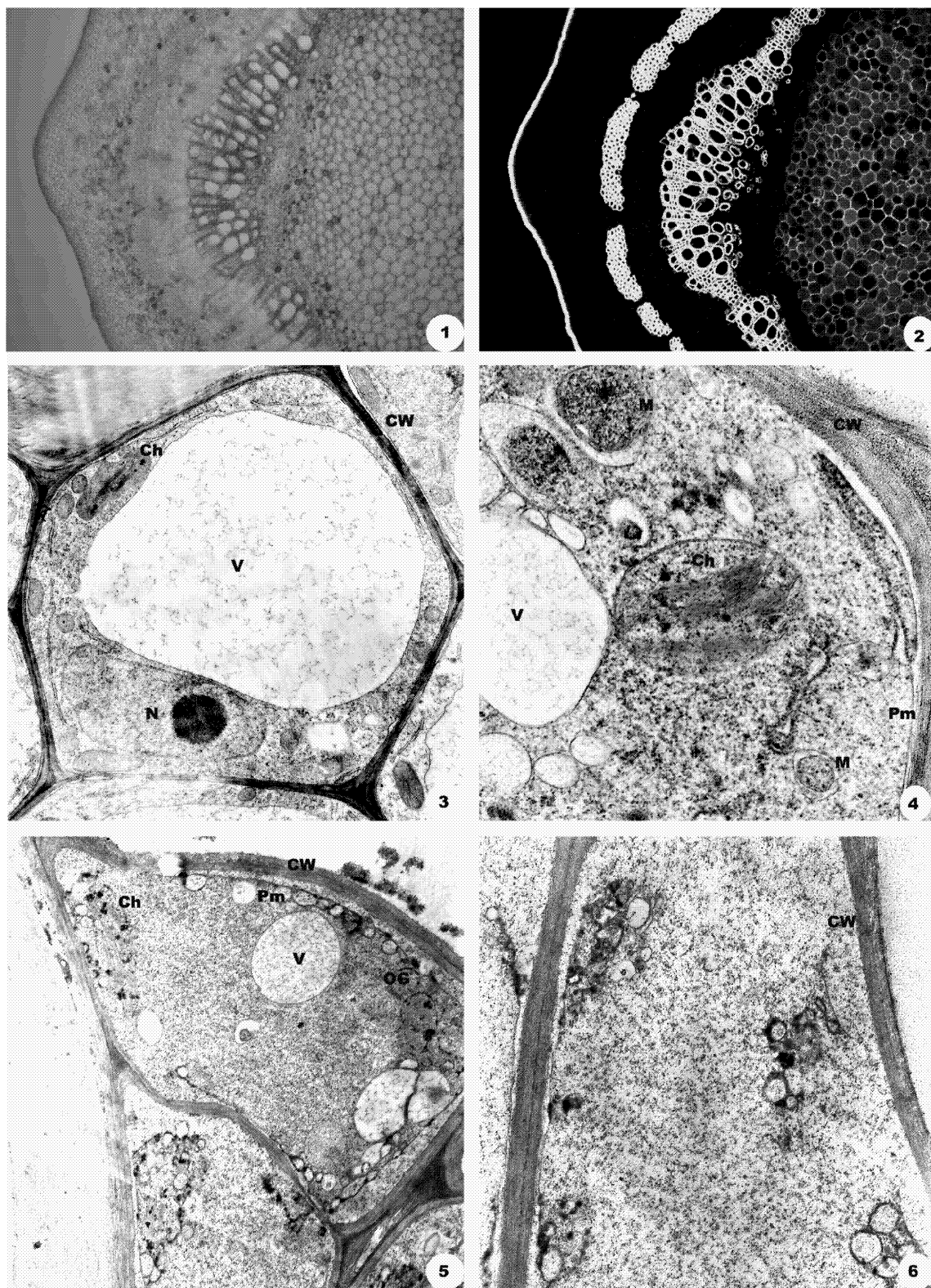
### 图版 I

1. 未染色处理的冰冻切片; ×100
2. 冰冻切片的荧光图像, 示细胞壁自发荧光; ×100
3. 对照薄壁细胞的超微结构, 示液泡、细胞膜、细胞核、质体; ×6000
4. 直接包埋法冷冻处理薄壁细胞的超微结构, 示液泡、细胞膜、质体; ×17 000
5. 液氮冷冻处理薄壁细胞的超微结构, 示液泡、细胞膜、质体; ×8 000
6. 液氮冷冻处理薄壁细胞的超微结构, 细胞膜破裂, 细胞器分散。×10 000

## Explanation of plate

### Plate I

1. None stained sections; ×100
2. Fluorescence in the section, showing cell wall autofluorescence; ×100
3. The ultrastructures of normal parenchyma cells, showing vacuole, plasmalemma, nucleus, chloroplast; ×6 000
4. The ultrastructures of parenchyma cells with direct cryoembed, showing vacuole, plasmalemma, chloroplast; ×17 000
5. The ultrastructures of parenchyma cells with frozen in liquid nitrogen, showing vacuole, plasmalemma, chloroplast; ×8 000
6. The ultrastructures of parenchyma cells with frozen in liquid nitrogen, showing cell membrane broken and organelles dispersed. ×10 000



宁代锋等: 图版 I

NING Dai-feng et al.: Plate I