

不同环氧树脂对水稻叶片超微结构的影响

吴佳楠¹, 张丽娜²

(中国农业科学院 作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100089)

摘要: 树脂包埋是制备超薄切片前的关键一步, 良好的包埋效果是保证超微结构真实的保证, 不同的包埋剂根据其自身特点对样品包埋过程产生不同的影响。本文以水稻超微结构为例, 对比实验室常用的两种环氧树脂 spurr 和 epon812 的包埋效果, 发现 spurr 的包埋效果整体上要优于 epon812, 但是在干燥的环境下, epon812 包埋效果较好。

关键词: 树脂; spurr; epon812; 水稻叶片

实验室常用环氧树脂 spurr 和 epon812 均可以用于制备水稻叶片超薄切片, 其中 spurr 树脂的流动性好、黏度小, 常用于植物组织的包埋; epon812 由于黏度大、易吸潮, 较少的用于植物组织。但因为 epon812 具有高度反差和良好的切割性能, 在保证环境湿度的前提下, epon812 也可以用于植物组织的渗透包埋。本文以水稻叶片为例, 通过相同的样品制备流程, 对比 spurr 和 epon812 在不同环境条件下的包埋效果, spurr 树脂的整体包埋效果, 如切片的平整度和衬度要优于 epon812, 但是在干燥环境中 epon812 包埋的样品, 其切片的平整度和衬度要优于 spurr, 并且在切片的时候无需采用氯仿薰片, 即可获得平整的超薄切片。

1 实验方法

1.1 取材

取新鲜的水稻叶片, 蒸馏水清洗表面杂质, 用干净的双面刀片切成 1mm^3 大小的组织块, 立即投入 2.5%戊二醛+4%多聚甲醛固定液中抽真空固定 24h^[1]。

1.2 清洗、脱水

固定完成的水稻叶片经 0.1mol PB 清洗后采用 30%、50%、70%、90%、100%、100% 丙酮依次脱水 10min。

1.3 树脂渗透

分别配置 spurr 和 epon812 树脂, 具体配方见表 1 和表 2。采用丙酮: 树脂为 1: 1 和 1:3

1 作者简介: 吴佳楠, (1989-), 女 (汉族), 河北石家庄人, 工程师. E-mail: wujianan1989@126.com

2 通讯作者: 张丽娜, 女 (汉族), 辽宁丹东人, 副研究员. E-mail: zhanglina@caas.cn

的比例配置 spurr 和 epon812 的树脂渗透液，每个梯度渗透 12 小时。纯树脂渗透 2 次，每次 24 小时树脂渗透过程需辅助旋转装置，保证渗透完全^[2]。

表 1 spurr 树脂配方

树脂单体	质量 (g)
ERL-4221	10
DER-736	4
NSA	26
DMAE	0.4ml

表 2 epon812 树脂配方 (Luft 配方, 1961)

	树脂单体	质量 (ml)
A 液	Epon812	62
	DDSA	100
B 液	Epon812	100
	MNA	89
根据湿度将 A 和 B 液在使用前混合： 夏季 A:B=1:4；冬季 A:B=1:9 混合后滴加催化剂 DMP-30		

1.4 包埋聚合

spurr 和 epon812 渗透的水稻组织均采用包埋板包埋（包埋板使用之前需在 70°C 烘箱中过夜，去除微滴水分），其中 spurr 70°C 聚合 48h，epon812 40°C 聚合 6h 后 60°C 聚合 42h。

1.5 切片染色观察

聚合好的叶片经超薄切片机切片 70nm，捞于铜网上干燥后染色，于 HT7700 透射电子显微镜下观察，记录实验结果。

2 实验结果与讨论

2.1 干燥环境下两种环氧树脂渗透的水稻叶片及叶绿体

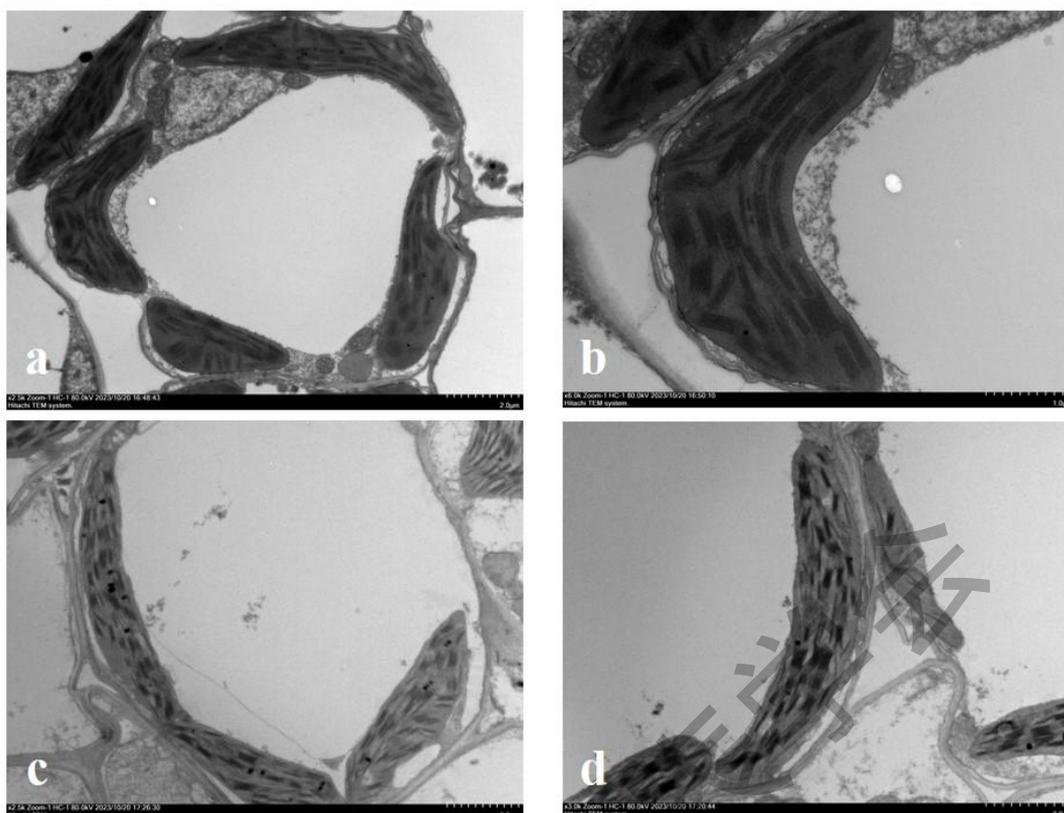


图1 干燥环境（北京4、5月份）下 spurr 树脂和 epon812 树脂渗透的水稻叶片和叶绿体

a 和 b 为 spurr 树脂渗透包埋的水稻叶片及叶绿体；

c 和 d 为 epon812 树脂渗透包埋的水稻叶片及叶绿体

图1 为干燥环境下 spurr 树脂和 epon812 树脂渗透的水稻叶片及叶绿体，从图中可以看出，干燥环境下，两种环氧树脂渗透的水稻叶片切片的平整度和均一性良好，细胞结构清晰、细胞膜完整，叶绿体类囊体层次清晰；且 epon812 树脂渗透的水稻叶片及叶绿体的衬度较高。

2.2 干燥环境下两种环氧树脂渗透的水稻叶片及叶绿体

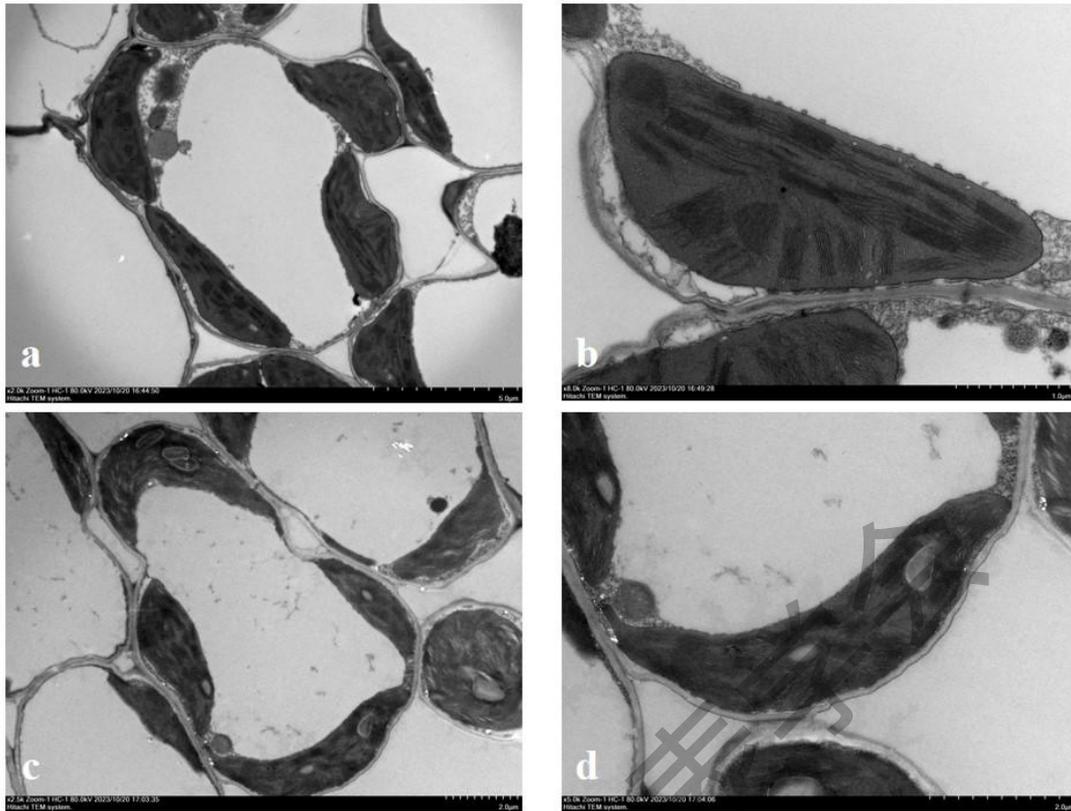


图2 潮湿环境（北京6、7月份）下 spurr 树脂和 epon812 树脂渗透的水稻叶片和叶绿体

a 和 b 为 spurr 树脂渗透包埋的水稻叶片及叶绿体；

c 和 d 为 epon812 树脂渗透包埋的水稻叶片及叶绿体

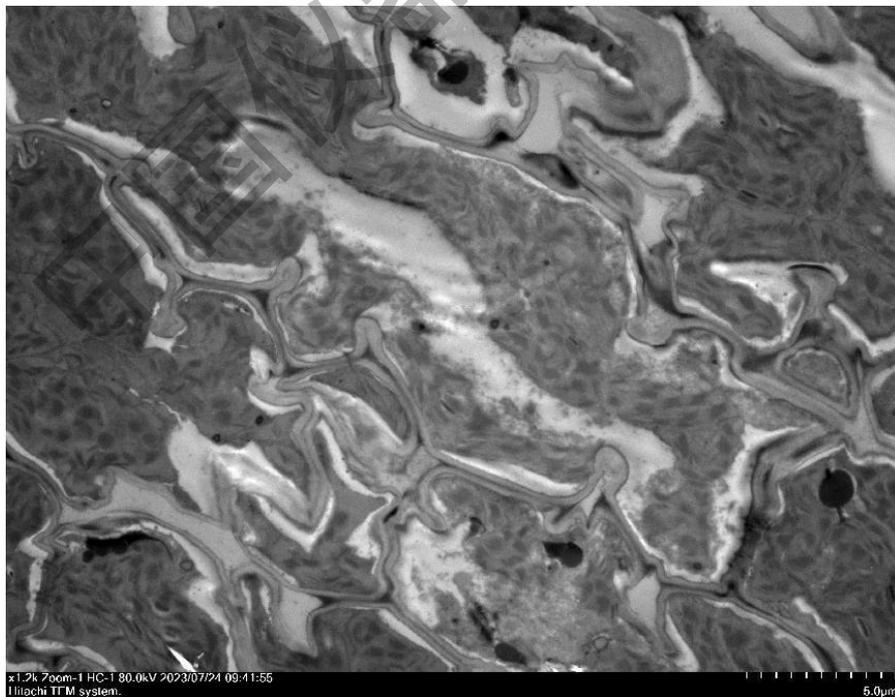


图3 潮湿环境（北京6、7月份）下 epon812 树脂渗透的水稻叶片和叶绿体

图2 为潮湿环境下 spurr 树脂和 epon812 树脂渗透的水稻叶片及叶绿体，从图中可以看

出，潮湿环境下，spurr 树脂渗透的水稻叶片及叶绿体结构完整、清晰，叶绿体类囊体层次清晰。而图 2 中 epon812 树脂渗透的水稻叶片及叶绿体结构模糊，衬度明显下降；在图 3 中可以看到叶片呈现“磨砂玻璃”状形态，提示严重吸潮。

2.3 讨论

从实验结果中我们发现，spurr 树脂在干燥（本文选择的是北京 4.5 月份）和潮湿（本文选择的是北京 6、7 月份）的环境中均能获得良好的切片效果，切片的平整度和均一性较高，切片衬度良好。这是因为 spurr 树脂的黏度较低（60CPS）^[3]，对于有细胞壁限制的植物细胞较友好，容易渗透；而且不易吸潮，即使环境潮湿，也可以获得良好的细胞结构。

epon812 树脂在潮湿环境下（北京 6、7 月份）渗透的组织，其切片平整度和衬度较差。主要在于 epon812 配方中使用的 NMA 和 DDSA 均为酸酐，极容易吸潮^[4]，而且催化剂 DMP-30 可以溶于水，尤其是相对湿度在 35% 以上的环境，会将水分子引入已脱水的组织中，导致组织渗透聚合不良，影响交联反应的均一度和完整度^[5]，最终降低切片质量。树脂受到水分子的干扰，切片会呈现出一种被“磨砂玻璃”覆盖的状态，显示出细胞结构模糊不清，对比度下降；树脂渗透不良，会造成细胞结构出现空洞并造成切片的整体支撑度不均一，致使切片出现长条形的褶皱。此外，吸潮的 epon812 树脂发脆，切片修块时，容易崩断或呈现粉末状态，严重影响切片操作。

但是在干燥环境下（北京 4.5 月份），spurr 和 epon812 树脂渗透的组织切片平整度无较大差异，并且 epon812 的衬度要优于 spurr，这主要是因为 epon812 分子量和黏度均较大，可以提高切片的整体支撑度，并且 epon812 中包含两种酸酐成分，与环氧集团的交联反应优于 spurr。Epon812 树脂的这种特性也决定切片时，epon812 不用采用氯仿薰片即可获得平整的切片，减少了氯仿的使用，节约了切片时间^[6]。

3 结论

本文对比组织切片中常用的两种环氧树脂在水稻叶片的渗透和包埋效果，发现在保证环境湿度的情况下可以优先考虑使用 epon812 树脂，但是对于密度较高、结构坚硬的组织或者环境湿度较大的情况下，则优先考虑 spurr 树脂。也有文章指出，可以将两者进行混合使用，根据组织的特点选择不同的比例进行渗透聚合，也可以很好的正好两种树脂的优点^[3]。

参考文献：

[1] 黄吉雷, 伦璇, 刘传荷. 水稻叶片透射电镜制样方法探讨[J]. 电子显微学报, 2018, 37(4):4..

[2] 曹媛,陈家宝,殷亚方.通过改良超薄切片制样法观察汉代饱水考古木材细胞壁的超微构造[J].电子显微学报, 2022(003):041.

[3] 杨慧,金良韵,姬曼,等.不同树脂对特殊生物样品包埋效果的比较[J].分析仪器, 2019(5):46-51.

[4] 吴丽莉,颜永碧,陆月良.使用 Epon-812 包埋剂的体会[J].解剖学杂志, 1998, 21(06):521.

[5] 刘庆宏,何幼英.不同湿度下 Epon812,Epon618 对电镜制样的影响[J].临床与实验病理学杂志, 2015, 31(7):824-825.

[6] Finck.H.Epoxy resin in electron microscopy.J Biophys Biochem Cytol,1960,7(2):27-30

中国仪器仪表学会