

水稻胚芽鞘树脂半薄大切片有效捞片和展片的方法探讨

吴佳楠[#], 魏潜[#], 孙莹璐, 张丽娜^{*}

(中国农业科学院作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100081)

摘要: 常规半薄切片均采用捞片环将切片从水槽中捞起置于在玻片上, 烤片后进行染色观察。但是对于水稻胚芽鞘组织大切片的半薄切片的制备, 因为切片面积较大和水的表面张力作用, 传统的捞片展片会造成切片褶皱和水印, 从而覆盖细胞结构, 影响观察。因此, 本实验从捞片方法和展片条件入手, 将捞片环改为捞片笔, 使用捞片笔将切片从槽液中捞出, 置于 0.001% Tween 20 和 0.0005% Tween 20 展片液上烤干后染色, 获得了平整无褶皱、无水印、无污染的切片, 完整的展现细胞结构。同时, 对比 Tween 20、Chaps 和 SDS 的展片效果, 发现 Tween 20 展片最平整无污染、SDS 展片存在褶皱和染液残留、Chaps 只能保证局部展片平整。

关键词: 水稻胚芽鞘; 树脂半薄切片; 捞片; 展片; 褶皱

Effective methods study of fishing and spreading the large resin semi-thin sections of the coleoptile tissue of rice

WU Jia-nan[#], WEI Qian[#], SUN Ying-lu, ZHANG Li-na^{*}

(Major Platform Center, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Beijing 100081, China)

Abstract: The conventional semi-thin sections were lifted from the water tank and placed on the glass slides by a scooping ring, and then stained and observed after baking the slices. However, for the preparation of semi-thin sections of large sections of the coleoptile tissue of rice, due to the large section area and the surface tension of water, the traditional extracting and spreading of sections will cause fold and watermark of sections, thus covering the cell structure and affecting the observation. Therefore, in this experiment, starting from the method of scooping and the conditions of spreading, the scooping ring was changed into a scooping pen, the scooping pen was used to

收稿日期: 2022-06-23; 修订日期: 2023-05-08

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务费专项 (No.Y2022PT18)。

#共同第一作者: 吴佳楠 (1989-), 女 (汉族), 河北石家庄人, 助理工程师. E-mail: wujianan1989@126.com

魏潜 (1988-), 女 (汉族), 河北辛集人, E-mail: weiqian1018@163.com

*通讯作者: 张丽娜 (1982-), 女 (汉族), 辽宁丹东人, 副研究员. E-mail: zhanglina@caas.cn

remove the slices from the grooving liquid, and the slices were placed on the scooping liquid of 0.001% Tween 20 and 0.0005% Tween 20 to dry, and then dyed, so as to obtain smooth slices without folds, watermarks and pollution-free, showing the cell structure completely. Meanwhile, by comparing the developing effect of Tween 20, Chaps and SDS, it was found that Tween 20 was the most flat and non-polluting, SDS had wrinkles and dye residue, and Chaps could only ensure the local developing flatness.

Keywords: Resin semi-thin sections; fishing sections; spreading sections; wrinkles

0 引言

半薄切片是以树脂作为包埋剂,用超薄切片机进行切片,切片厚度介于超薄切片和石蜡切片之间的一种用于光学显微镜进行较细微组织观察的方法^[1]。因半薄切片具有高分辨率,在成像效果上优于石蜡切片^[2],而相较于超薄切片又具有更广的视野^[3]。所以,半薄切片在一些组织形态学观察中,具有不可替代的作用^[4]。

水稻胚芽鞘细胞的数量、大小、形态的变化对于研究其生长发育具有重要的作用。通过水稻胚芽鞘半薄切片对其在不同生长条件下的细胞形态、大小、数量的变化进行统计分析,可以获得不同生长环境下生长发育变化的细胞形态数据。因此,一张切片上具备足够数量的细胞,才能保证实验数据的充足可靠性。所以,在取材时需要选取较大的组织,才能满足细胞数量的需求。

这种大组织切片,由于面积大,在载玻片上展片时受到的水滴的表面张力的影响较大,呈拱形展于水滴上;在烤干的过程中,由于水滴受热逐渐蒸发,切片边缘最先接触并贴合到载玻片上,而切片中间仍然有水滴,这就导致切片中间高于边缘,但已贴合的切片边缘失去延展空间,使未贴合的切片没有空间进行延展,最终在切片中间留下褶皱,同时还伴随着染液残留。所以,本实验从改善水的表面张力着手,采用表面活性剂 Tween 20 降低水的表面张力,并采用自制的捞片笔捞片减少槽液侵染。

为了进一步验证 Tween 20 良好的展片特性,依次采用阴离子表面活性剂 SDS 和两性离子型表面活性剂 Chaps,与本实验使用的非离子型表面活性剂 Tween20 对比展片效果,发现非离子型表面活性剂 Tween 20 的展片效果最优,阴离子表面活性剂 SDS 的展片效果最差,两性离子型表面活性剂 Chaps 展片效果可保证局部细胞结构平整无污染。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻胚芽鞘树脂包埋块、玻璃刀、捞片笔、睫毛笔、粘附性载玻片、10 μ L 移液枪、烤片机、徕卡 EM UC7 超薄切片机、蔡司 A2 荧光显微镜、三种展片液(见表1)、1%甲苯胺蓝染液。

表 1 展片液种类及浓度

Table 1 Type and concentration of spreading sections solutions

展片液名称	浓度 A (%)	浓度 B (%)	浓度 C (%)	浓度 D (%)
Tween 20	0.1	0.01	0.001	0.0005
Chaps	0.1	0.01	0.001	0.0005
SDS	0.1	0.01	0.001	0.0005

1.2 方法

为了保证实验结果的准确可靠性，本实验选取了水稻胚芽鞘同批次处理的三个包埋样品，按照展片液浓度从高到低的顺序分别测试捞片和展片效果并记录。

1.2.1 修整树脂包埋块

使用修块机修掉多余树脂，暴露水稻胚芽鞘中轴线纵切截面组织，在 EM UC7 超薄切片机上精修为梯形树脂切面，使用玻璃刀切片，厚度 300 nm 和 500 nm。

1.2.2 捞片笔制备

采用 Tween20 作为展片液直接滴在载玻片上，传统使用铂金捞片环捞片的方法无法将切片展于展片液上。通过借鉴石蜡切片展片时采用的毛笔将切片托起^[5]或者使用沾水木片沾取切片展于水面上^[6]的方法，自制捞片笔。捞片笔采用 10uL 的枪头作为底座，将坚硬条状物（本实验中采用的是仙人掌的针叶，也可以采用其它类似物质）从枪头的低端插入，从尖端拉出至无法拉动，滴加透明指甲油固定条状物和枪头尖端，防止松动；将组装好的枪头套在小木签上并用指甲油固定住，即完成捞片笔制备（见图 1）。

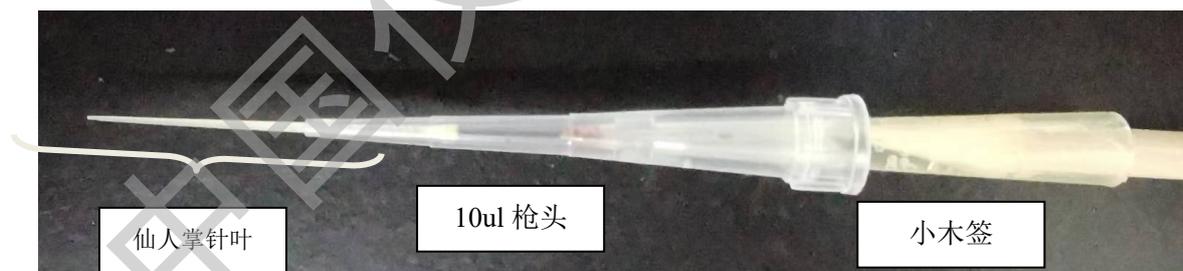


图 1 捞片笔。

Fig.1 Fishing pen.

1.2.3 捞片

设置对照组和实验组，对照组展片液为水，实验组展片液为不同浓度的三种展片液。

利用捞片笔的尖端将切片从槽液中挑起（图 2a，图 7b），不与捞片笔接触的切片部分在水的表面张力作用下向中间贴合，从而包裹住微量液滴（图 2c）；在将切片放于展片液上的瞬间，借由水的表面张力，切片内部包裹的微量液滴会与展片液进行融合（图 2d，2e），贴合住的切片会平整的展开于展片液上（图

2f)。

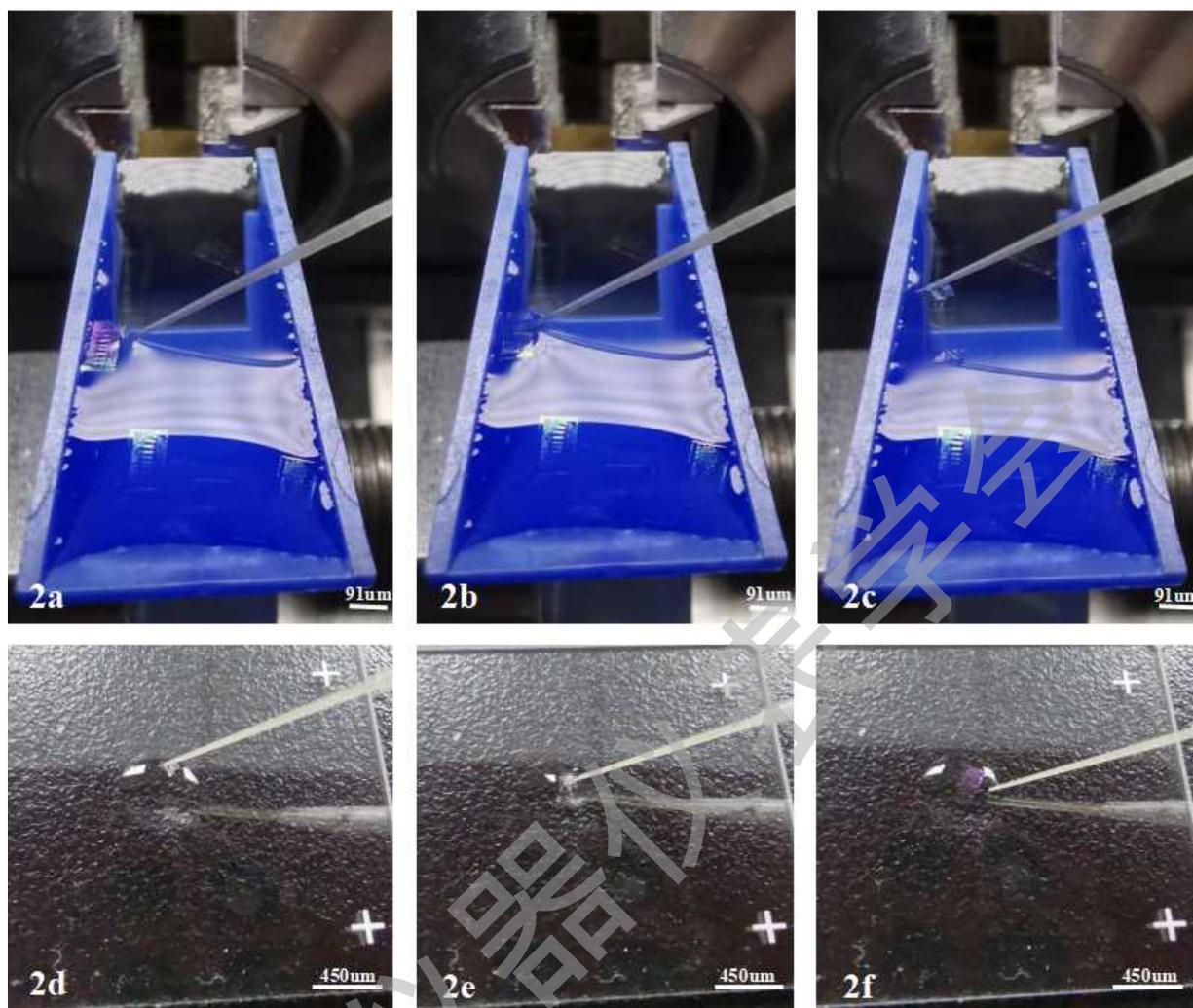


图 2 捞片笔捞片与展片的过程。

2a. 捞片笔以 45° 角至于切片下方；2b. 捞片笔以 45° 角向斜上方提起切片；2c. 切片在水的表面张力作用下向中间贴合并包裹微量液滴；2d. 切片至于展片液上（展片液为 0.001% tween20）；2e. 切片包裹的微量液滴与展片液融合；2f. 切片展于展片液上

Fig.2. The process of fishing and spreading sections by fishing pen.

2a. The fishing pen at a 45° angle to the bottom of the section; 2b. The fishing pen lifts the section diagonally at a 45° angle; 2c. Sections were attached to the center and encapsulated with trace droplets under the action of surface tension of water; 2d. The sections were placed on 0.1% tween20 spreading sections solutions; 2e. The droplet wrapped in section was fused with spreading solution; 2f. Sections were spread on spreading solution

具体流程如下：

先在载玻片上加 $5 \mu\text{L}$ 展片液，用捞片笔从切片的下方挑取切片后置于展片液上，利用液体的表面张力将切片展开，于烤片机上 60°C 烤干液体，捞片具体流程如下（以 0.001% Tween 20 为例）：

- (1) 配制 0.1% tween20 作为母液，稀释 100 倍至终浓度为 0.001%的 Tween20 展片液；
- (2) 在载玻片上滴加 1 滴 0.001% tween20 展片液，和 1 滴水作为对照组，每滴 5 μ L；
- (3) 使用以水为槽液的玻璃刀制备树脂半薄切片，厚度 300nm，使用睫毛笔将连在一起的切片分开；
- (4) 以 45°角将捞片笔深入槽液中，移至待捞起的切片下方；
- (5) 45°角向上提起捞片笔，使得切片的一边落在捞片笔尖端上，顺势将切片提起离开槽液；
- (6) 将捞片笔挑起的切片置于载玻片的展片液上，展开切片。

1.2.4 染色

待载玻片上的液体烤干后，于切片上滴加 5 μ L 的甲苯胺蓝染液，60 °C染色 30 s，待染液周边出现金色圆圈后，用蒸馏水冲洗染液，冲洗干净后在烤片机上烤干^[7]。

1.2.5 镜检

使用蔡司 A2 荧光显微镜明场模式观察并进行拍照记录。

2 结果与分析

2.1 水和 Tween20 展片液展片结果

切片在水中展片会产生水印和褶皱，且 500nm 切片（图 4m-4o）褶皱和水印的程度与数量比 300nm 切片（图 3m-3o）多。

分别以 0.1% Tween 20、0.01% Tween 20、0.001% Tween 20、0.0005% Tween 20 作为展片液对比同一厚度切片 300nm 或 500nm 在不同展片液中的展片效果以及不同厚度的切片在同一浓度展片液中的展片效果。

发现 300nm 的切片在 0.1% Tween 20、0.01% Tween 20 中均有较严重的褶皱和染液残留，且在 0.1% Tween 20 中展片比 0.01% Tween 20 展片产生的褶皱和染液残留多（图 3a-3c 和图 3d-3f）；而在 0.001% Tween 20、0.0005% Tween 20 展片液中可以获得平整无污染的切片（图 3g-3i 和图 3-3l）。

500nm 的切片在 0.1% Tween 20 中均有密集的褶皱和染液残留（图 4a-4c），在 0.01% Tween 20 中褶皱和染液残留明显减少至切片两端（图 4d-4f）；而而在 0.001% Tween 20、0.0005% Tween 20 展片液中可以获得平整无污染的切片（图 4g-4i 和图 4j-4l）。

对比同一浓度 Tween 20 展片液对 300 nm 和 500 nm 切片的展片效果发现，0.1% Tween 20 均会造成两种厚度切片褶皱和污染，但是 0.01% Tween 20 对 500 nm 切片的展片效果优于 300 nm 切片，褶皱和染液残留明显减少；0.001% Tween 20、0.0005% Tween 20 对于 300 nm 和 500 nm 切片的展片效果均良好。

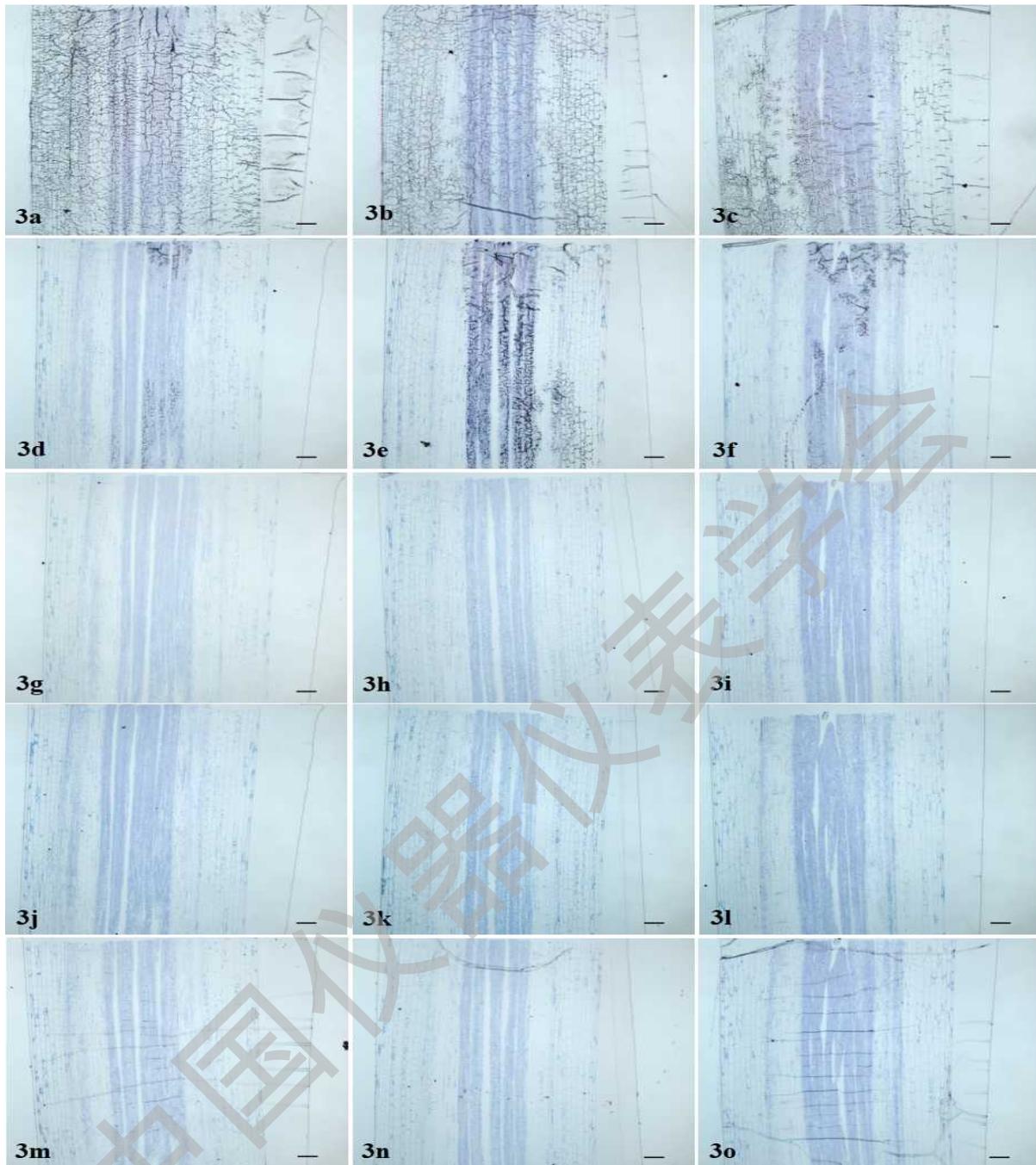


图3 水稻胚芽鞘 300 nm 切片在不同浓度 Tween 20 展片液中的展片结果。Bar=100 μm

3a-3c. 以 0.1% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;3d-3f. 以 0.01% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;3g-3i. 以 0.001% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;3j-3l. 以 0.0005% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;3m-3o. 以水为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图

Fig3. Rice coleoptile 300nm slice results in different concern Tween 20 spreading sections solutions

3a-3c. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.1% Tween 20;3d-3f. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.01% Tween 20;3g-3i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001% Tween 20;3j-3l. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.0005% Tween 20;3m-3o. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in water

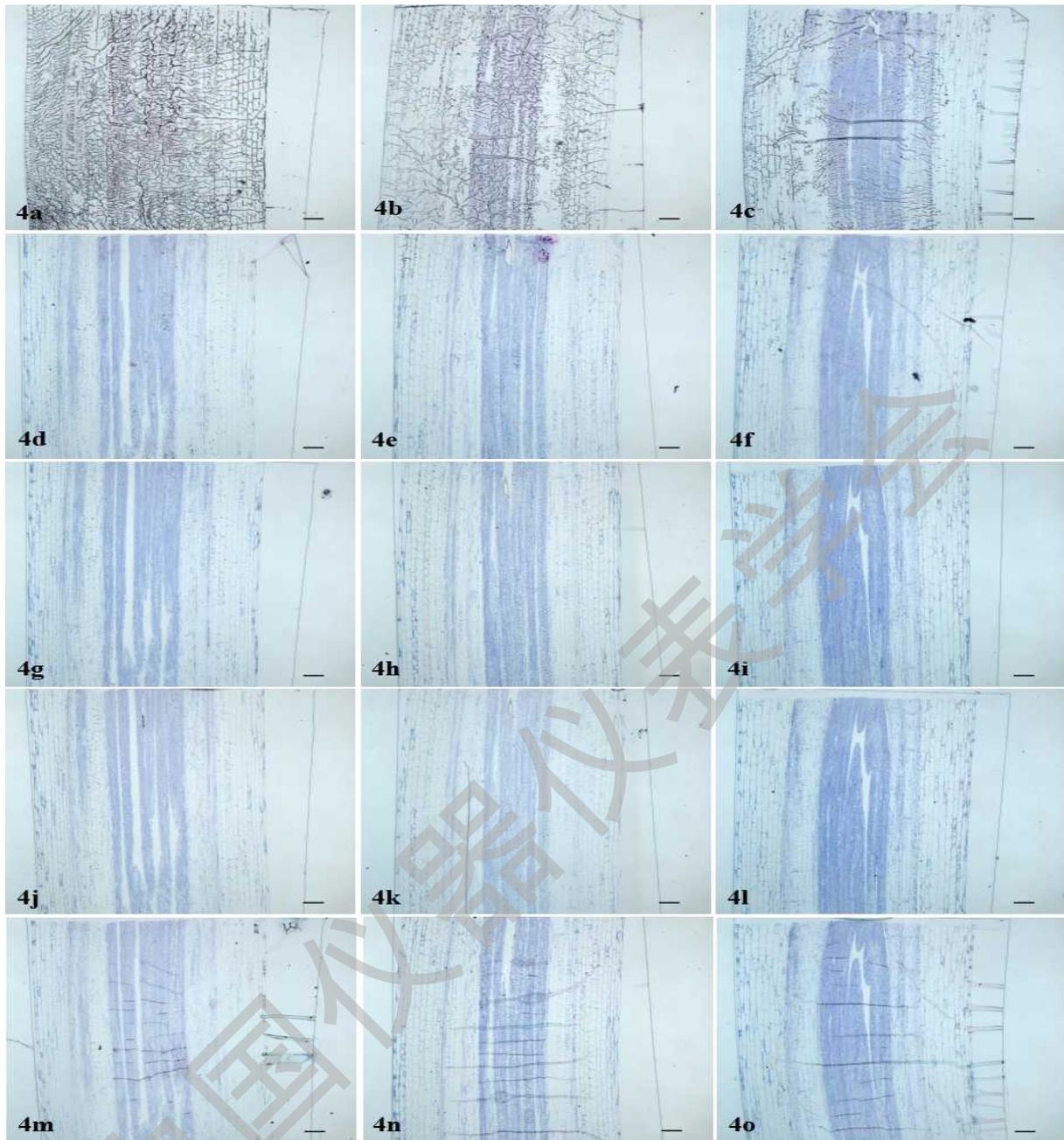


图4 水稻胚芽鞘 500 nm 切片在不同浓度 Tween 20 展片液中的展片结果。 Bar=100 μm

4a-4c. 以 0.1% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;4d-4f. 以 0.01% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;4g-4i. 以 0.001% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;4j-4l. 以 0.0005% Tween 20 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;4m-4o. 以水为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图。

Fig.4 Rice coleoptile 500 nm slice results in different concern Tween 20 spreading sections solutions.

4a-4c. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.1% Tween 20; 4d-4f. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.01% Tween 20; 4g-4i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001% Tween 20;4j-4l. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.0005% Tween 20;4m-4o. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in water.

2.2 Chaps、SDS 展片液展片结果

为了进一步证明 Tween 20 在切片展片中的作用，本实验引入了另外两种表面活性剂 Chaps、SDS，与 Tween 20 分别代表两性离子表面活性剂、阴离子表面活性剂和非离子型表面活性剂。

2.2.1 水稻胚芽鞘切片在 Chaps 展片液中展片结果

从 300nm 切片的展片结果发现 0.1% Chaps 造成切片微小褶皱和少量的染液残留（图 5a-5c）；在 0.01% Chaps 展片液中，切片的褶皱和染液减少，褶皱可以忽略不计（图 5d-5f）；在 0.001% Chaps 和 0.0005% Chaps 展片液中（图 5g-5i 和图 5j-5l），切片无褶皱、无染液残留，但是存在水印，且水印随着 Chaps 浓度降低而减少，但肉眼仍可见。

500 nm 切片在 0.1% Chaps 中产生较多的褶皱和染液残留（图 6a-6c）；在 0.01% Chaps 展片液中切片平整但是染液残留仍明显（图 6d-6f）；在 0.001% Chaps 和 0.0005% Chaps 展片液中（图 6g-6i 和图 6j-6l），切片无褶皱、无染液残留，但是存在水印，且水印随着 Chaps 浓度降低而增多。

对比同一浓度 Chaps 展片液对 300 nm 和 500 nm 切片的展片效果发现，0.1% Chaps 均会造成 300 nm 和 500 nm 切片褶皱和污染，但 300 nm 切片较少；0.01% Chaps 明显减少切片褶皱，但仍存在且 500 nm 切片的残留较多；0.001% Chaps 和 0.0005% Chaps 会引起切片产生水印，但是 500 nm 切片在 0.001% Chaps 中水印较少，而 300 nm 切片则在 0.0005% Chaps 中较少。

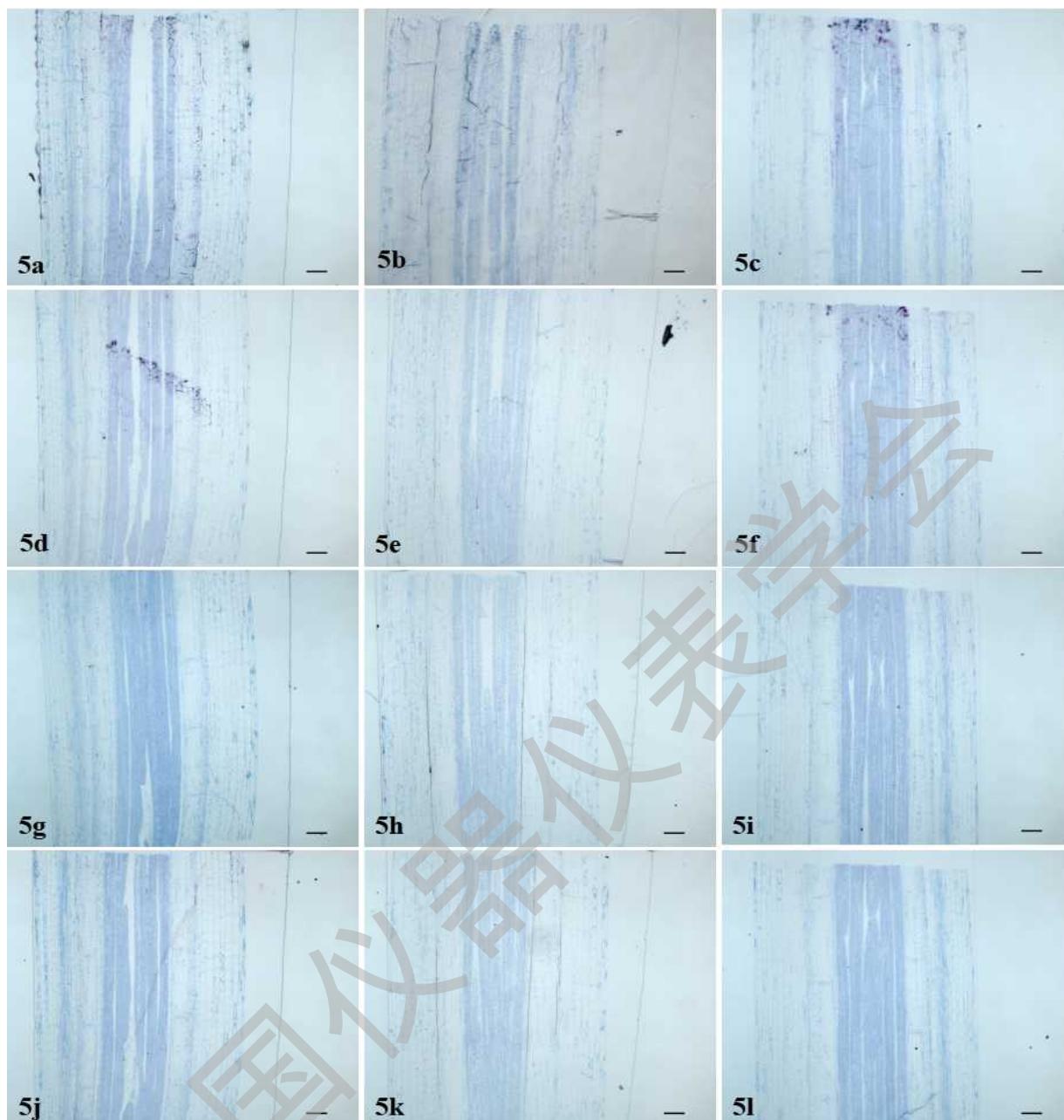


图5 水稻胚芽鞘 300 nm 切片在不同浓度 Chaps 展片液中的展片结果。 Bar=100 um

5a-5c. 以 0.1% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;5d-5f. 以 0.01% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;5g-5i. 以 0.001%Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;5j-3l. 以 0.0005% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图。

Fig.5 Rice coleoptile 300 nm slice results in different concern Chaps spreading sections solutions.

5a-5c. Rice coleoptile1,2,3 spreading result in 0.1% Chaps; 5d-5f. Rice coleoptile1,2,3 spreading result in 0.01% Chaps; 5g-5i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001% Chaps; 5j-5l. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.0005% Chaps.

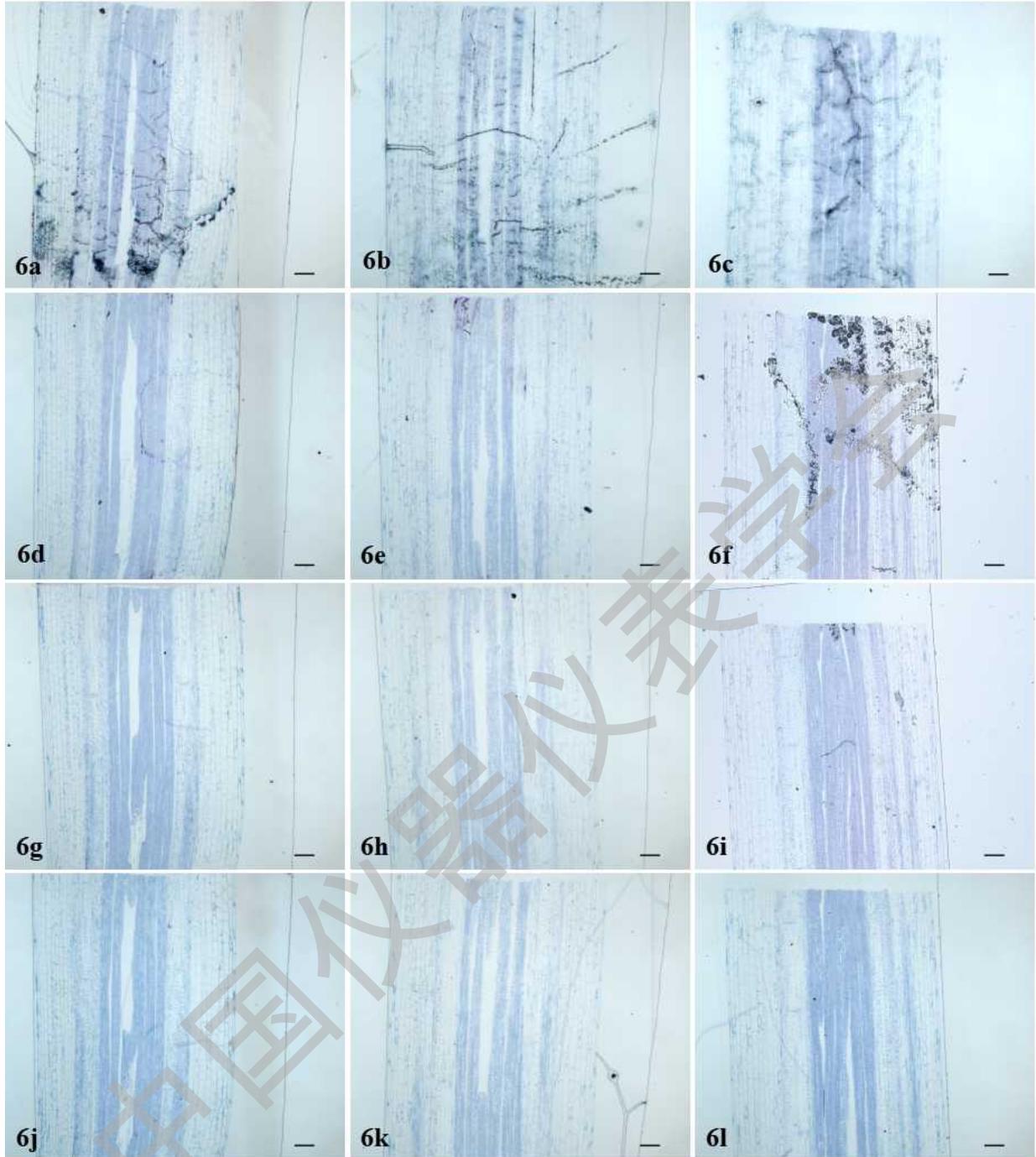


图6 水稻胚芽鞘 500 nm 切片在不同浓度 Chaps 展片液中的展片结果。 Bar=100 um

6a-6c. 以 0.1% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;6d-6f. 以 0.01% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;6g-6i. 以 0.001%Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;6j-6l. 以 0.0005% Chaps 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图。

Fig.6 Rice coleoptile 500 nm slice results in different concern Chaps spreading sections solutions.

6a-6c. Rice coleoptile 1,2,3 spreading result in 0.1% Chaps;6d-6f. Rice coleoptile 1,2,3 spreading result in 0.01% Chaps; 6g-6i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001% Chaps;6j-6l. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.0005% Chaps.

2.2.2 水稻胚芽鞘切片在 SDS 展片液中展片结果

分析 300 nm 切片在 SDS 展片液中的展片结果，发现低浓度 SDS 展片时切片有少量褶皱，随着浓度增加，切片的平整度提高，但是染液残留也随之增加，到 0.1% SDS 时，切片较其余三个浓度最平整但是染液残留已经覆盖整张切片。

500 nm 切片整体的展片结果与 300 nm 相近，切片水印随 SDS 浓度增加减少，但是染液残留却随之增加。

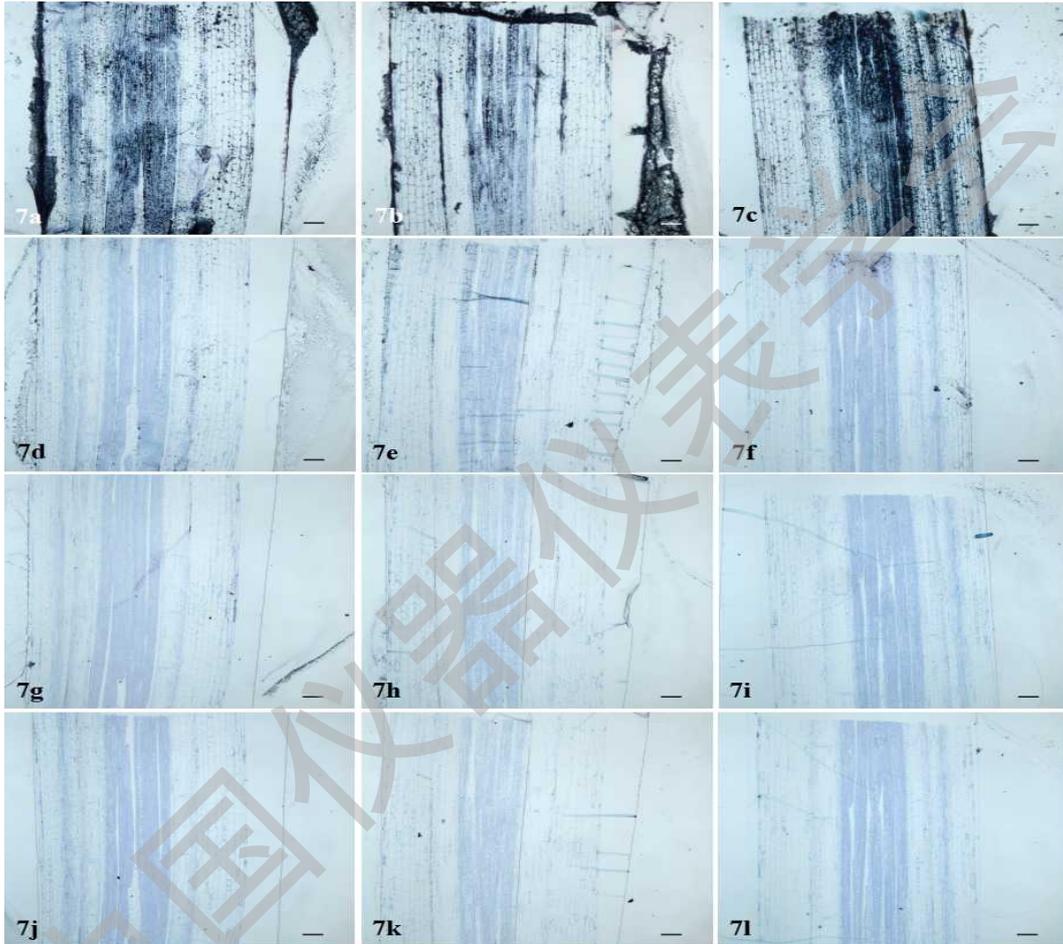


图 7 水稻胚芽鞘 300 nm 切片在不同浓度 SDS 展片液中的展片结果。 Bar=100 μ m

7a-7c. 以 0.1% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;7d-7f. 以 0.01% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;7g-7i. 以 0.001% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;7j-7l. 以 0.0005% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图。

Fig.7 Rice coleoptile 300 nm slice results in different concern SDS spreading sections solutions.

7a-7c. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.1% SDS;7d-7f. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.01%SDS; 7g-7i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001%SDS;7j-7l. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.0005% SDS.

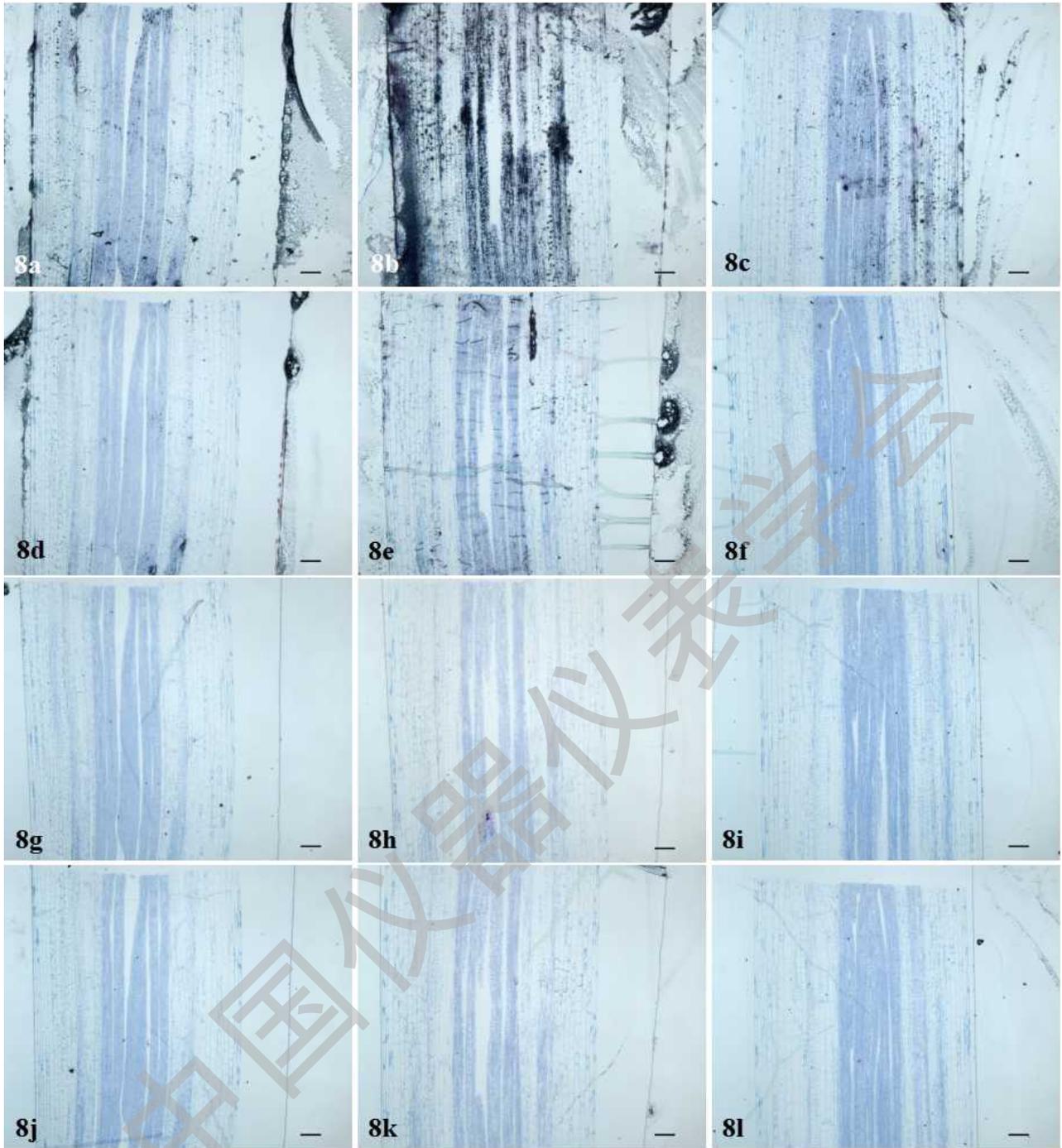


图8 水稻胚芽鞘 500 nm 切片在不同浓度 SDS 展片液中的展片结果。 Bar=100 um

8a-8c. 以 0.1% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;8d-8f. 以 0.01% SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;8g-8i. 以 0.001%SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图;8j-8l. 以 0.0005%SDS 为展片液的水稻胚芽鞘 1、2、3 展片结果图。

Fig.8 Rice coleoptile 500 nm slice results in different concern SDS spreading sections solutions

8a-8c. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.1% SDS; 8d-8f. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.01%SDS; 8g-8i. Rice coleoptile 1、2、3 spreading result in 0.001%SDS;8j-8l. Rice coleoptile1、2、3 spreading result in 0.0005% SDS.

2.3 三种展片液展片结果分析

从展平整度来看，非离子型表面活性剂 Tween20 中 0.001%和 0.0005%Tween20 的展片效果最好，浓度增加后会导致切片褶皱；两性离子型表面活性剂 Chaps，低浓度展片时会在切片上产生水印，增加浓度会在切片上产生褶皱；阴离子表面活性剂 SDS 在 0.001%展片较平整，其余三个浓度均有不同程度的水印和褶皱。

产生上述结果的原因在于不同的表面活性剂对表面张力的降低程度不同。表面活性剂由亲水疏油的极性基团和疏水亲油的非极性基团组成，这种两性分子不对称结构使得表面活性剂表现出两亲性的特征。在水混溶的过程中，极性基团趋近于水而非极性基团逃逸于水，两性基团的作用力使表面活性剂分子立于界面上，形成一层疏水层，降低原有水相的表面能，从而降低表面张力^[8]。

由于表面活性剂的亲水基团和疏水基团不同，其对表面张力的降低程度也不同，主要在于亲水基团的极性强弱和疏水基团的构象排列，Tween20 的亲水基团是聚氧乙烯基，其亲水性极强；SDS 亲水基团为硫酸基，亲水能力较聚氧乙烯基弱，同时疏水端烷烃链比 Tween20 有效长度短^[9]，需要更多的疏水基团才能获得与 Tween20 形同的疏水层级，所以相同浓度的 SDS 对表面张力的降低不如 Tween20；Chaps 具有两性亲水基团，且在疏水端类固醇的凹面具有一些亲水羟基^[10]，因此它的亲水性比 SDS 强，却比 Tween20 弱，当其疏水端类固醇结构排列在液层表面时，其疏水有效面积大于 SDS 的烷烃链，同浓度的 Chaps 对表面张力的降低能力优于 SDS；虽然类固醇结构在排列时会增大有效面积，但是与 Tween20 长烷烃链疏水端相比，-CH₃ 密度低，相互作用能力弱^[9]，表面张力的降低能力次于 Tween20。因此，对表面张力的降低能力上，Tween20 最好，Chaps 次之，SDS 最弱，这就形成在展片时，0.0005% Tween20 即可满足平整展片的需要，低浓度的 SDS 和 Chaps 均会产生切片水印和褶皱，0.1%SDS 也可以获得平整的切片。

从切片染液残留来看，Tween20 的染液残留最少，因为甲苯胺蓝的染色基团呈现阳离子特性^[11]，非离子表面活性剂不会增加染料的电荷特性^[12]；而 SDS 中起表面活性成分的阴离子基团与染液中的阳离子染色基团结合，形成不溶于水的沉淀，在切片上呈现染液污染；随着 SDS 浓度增加，阴离子活性基团增多，甲苯胺蓝中的阳离子染色基团结合的数量增多，致使沉淀增多，染液残留增加。

综上所述，Tween20 具有较低的表面能，低浓度的 Tween20 即可有效降低表面张力，获得平整的树脂切片；同时，由于非离子型表面活性剂在染色时不会增加甲苯胺蓝的电荷特性，可以获得无染液残留的切片。所以在水稻胚芽鞘树脂大切片的展片中 Tween20 效果最好，优于以阴离子表面活性剂 SDS 和两性离子型表面活性剂 Chaps。

2.4 Tween20 展片液的作用及浓度的选择

水稻胚芽鞘树脂切片较大，展于载玻片上时，受到切片下方水滴表面张力的作用增强，呈拱形展于水滴上，而较小的树脂切片则近于水平状态展于水滴上。在烤干过程中，水滴受热逐渐蒸发，大切片边缘贴

合在载玻片上时，载玻片上残余的水滴较多，且大部分贮存在切片下方，形成切片边缘已经固定不可移动，但切片中心部分却受到水滴表面张力的作用下向上凸起的形态。由于已经贴合的切片边缘失去延展性且限制了切片在载玻片上展片的面积，比切片实际面积小，所以当水滴蒸发后，无法延展的切片中间部分就形成了褶皱。

因此，我们借鉴了在超薄切片中引入 Tween20 作为展片液的方法^[13]，对其进行改进，用于树脂半薄大切片的捞片展片。

Tween20 是一种非极性的表面活性剂，在载玻片上滴加 Tween20，可以有效的降低水滴的表面张力，使切片的拱形状态趋于水平并维持这种状态直至切片烤干；在增加载玻片的亲水作用的同时，也不会影响载玻片的粘附效果。在超薄切片中常用 0.1% 的 Tween20 稀释 300 倍作为槽液，增加超薄切片与载网、方华膜之间的亲和性^[13]。由于水稻胚芽鞘树脂半薄切片的厚度和面积均超过超薄切片，所以在 Tween20 浓度的选择上，以 0.1% Tween20 稀释 200 倍作为最低浓度，以 0.1% Tween20 作为最高浓度，并在二者之间再设置两个浓度，总共设置四个浓度依次测试其对于树脂半薄大切片的展片效果。

但是，在实际的操作过程中，我们发现若以四种浓度的 Tween20 直接作为槽液进行切片，树脂块亲水严重，切面被槽液浸没，切片难以进行。因此，我们改用以水作为槽液进行切片，将四种浓度的 Tween20 作为展片液滴在载玻片上。

通过实验结果可以清楚的发现，以 Tween20 作为展片液的实验组比以水作为展片液的对照组，其切片的平整性得到了很好的改善；对比以不同浓度的 Tween20 作为展片液的实验组还可以发现，0.001% Tween20 和 0.0005% Tween20 对于 300nm 和 500nm 切片的展片效果均良好，而随着浓度的增加，切片的褶皱也明显增多，这是因为随着 Tween20 浓度的升高，展片液的表面张力降低、亲水性增加，在载玻片上的延展性也随之增加，无法以液滴的形式存在，能够承载切片及其包裹的微量液滴的展片液的体积变小。当切片放在展片液上时，没有足量的展片液可以充分融合切片内部包裹的水分；同时，由于展片液的表面张力下降和延展性增加，其在烤片机上挥发的速度也随之加快造成切片下方展片液浓度不均一；再加上亲水性的增强，会增加切片和捞片笔这些疏水物质之间的亲和力，就需要通过左右频繁的晃动捞片笔的方式才能使切片和捞片笔分离，放下切片，切片的褶皱也随之越多。

3 讨论

具备一定细胞数量的水稻胚芽鞘大切片可以反映其生长发育状态，常规采用的石蜡切片虽然可以获得面积较大的切片，但是切片的分辨率和完整度受到严重限制，所以本实验采用树脂作为支撑载体，制备树脂半薄大切片，提高切片的分辨率和完整度。然而，大切片展片时会在水的表面张力的作用下产生褶皱并伴生染液污染，通常的做法是修小切片或者采用亲水性强的载玻片展片，降低表面张力的影响，但是这会

严重影响细胞数量和形态的观察，甚至造成染色后冲洗时掉片。所以本实验仍然保留原始切片大小，引入表面活性剂 Tween20，在保证细胞数量不变的前提下，充分有效地降低水的表面张力，提高展片的平整无污染性。但在实际操作中发现，使用较高浓度的 Tween20 作为槽液会侵染包埋块，所以本实验采用自制的捞片笔代替传统的捞片环捞片，采用 Tween20 水溶液作为展片液直接滴加在载玻片上进行展片，有效地杜绝槽液污染包埋块的问题，充分保证细胞数量不减少的同时获得平整无污染的水稻胚芽鞘半薄大切片。

参考文献：

- [1] 王伟,朱佩燕.利用 Spurr 树脂包埋制备植物半薄切片方法研究[J].安徽农学通报,2014,20(16):130-131.
- [2] 王博,关旻,王林燕.制样方法改进下的肾组织微结构成像方法研究[J].电子显微学报,2021,40(3):301-306
- [3] GORDON R E.Electron microscopy:a brief history and review of current clinical application[M].Germany: Method Mol Biol,2014,1180
- [4] 黄静,彭彬.环氧树脂半薄切片制备技术改良[J].解剖学研究,2022,44(3):269-270.
- [5] 谢建英,杨柳柳,居根吕,等.脑组织标本病理大切片的制作方法及其质量流程改进[J].临床与实验病理学杂志,2019,35(7):866-867.
- [6] 于洁,季昌华,管冰心,等.病理大蜡块及大切片的制作[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(3):345-346.
- [7] 崔新明,李爽,董超,等.不同包埋剂对半薄切片甲苯胺蓝染色效果的影响[J].电子显微学报,2018,37(1):91-93.
- [8] 考菲菲.阴离子表面活性剂混合体系表面活性及分子间相互作用的研究[D]. 山东： 山东师范大学, 2012.
- [9] 李高占,焦提留,霍月青,等.几种磺酸盐类阴离子表面活性剂的性能[J].印染助剂,2021,38(11):45-47.
- [10] 秦显国.两性增溶剂 CHAPS 聚集性质及其与 Triton X-100 相互作用的 NMR 研究[D].武汉:华中科技大学, 2011.
- [11] 刘冬娟,祝素文,李艳杰.硼砂甲苯胺蓝染液在半薄切片染色上的应用[J].中国医科大学学报, 2004, 33(1):33.
- [12] 董书魁,姚辉,李丽华,等.非离子型表面活性剂在细胞染色中的应用[J].中华检验医学杂志, 1998, 21(3):174.
- [13] 金立强,张东生,林陵,等.Tween-20 在超薄切片刀槽液中的应用[J].临床与实验病理学杂志,2007,23(1):95-96.