

氨银法的新改良——一种应用于海洋纤毛虫永久制片的新方法

宋微波

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

纤毛虫原生动物的大多数分类性状在活体观察或非染色状态下是不可见的,因而需借助各种染色技术加以显示。目前在纤毛虫的细胞学,遗传学,分类及形态学研究中应用的主要是一些特殊的银染法^[3,5],蛋白银染色法^{①②},以显示其银线系统,纤毛下器,核器,皮膜结构及其它胞器。干银法和湿银法仅用来显示银线系及表层的纤毛图式。应用最广也最重要的是蛋白银染色法,可惜后者存在着耗时多、过程复杂、掌握困难,对许多类群不适用的缺点。由于制片方法上的限制,使许多有关的工作难以进行。

氨银法^[4]突出特点是简便快捷(通常全部过程仅需10 min左右),显示能力强,可稳定地得到高质量的类似蛋白银染色效果的制片,尤其对许多不宜用蛋白银染色的种类如大部分的咽膜类(Peniculina),肾形目类(Colpodida)及篮环目种类(Nassulida)尤其突出。

迄今国外所采用的氨银法基本有3个“变式”^[2,8],这几种方法的共同问题是无法或不易得到满意的永久制片,另外也不能处理海洋种类,因海水中的Cl⁻会形成银沉淀。本人在对海洋纤毛虫的研究中对该方法进行了尝试与改进,对其中染色剂(显影剂)的组分配比做了变通,改变了固定方法,使之成为可应用于海洋纤毛虫染色的方法。

1 材料、方法和步骤

1.1 器皿、设备

恒温培养箱(调至60℃),透射光解剖镜(体视显微镜),凹玻片(孔深约3mm为佳),胚胎皿(凹玻砖),毛细吸管(先将玻璃管抽拉成普通型吸管,再在酒精灯上二次拉成孔径约100μm的毛细吸管)。

1.2 药品、染色剂配制

1.2.1 4%蛋白胨水溶液:以蒸馏水将蛋白胨粉配成4%浓度,加数滴甲醛液以防腐;

1.2.2 纯吡定,化学纯;

1.2.3 10%福尔马林(固定剂):将饱和甲醛水溶液(化学纯,约40%浓度)配成4%的水溶液;

1.2.4 Rio-Hortega溶液:混合50ml 10%的硝酸银溶液和150ml 5%的碳酸钠溶液;逐滴加入氨水至沉淀溶解;后以蒸馏水释至750ml。

1.3 制片步骤 I——应用于淡水及土壤生种类

1.3.1 滴一滴含虫体的培养液于凹玻片凹槽内,后加一滴10%福尔马林液,混合2~5min(皮膜薄的种类应短些);

1.3.2 加入一滴新配制的Fernandez-Galiano液(依次加入下列溶液配制而成:3份吡定,6份Rio-Hortega液,4份蛋白胨溶液,30份蒸馏水。此溶液可用数小时),摇匀;

1.3.3 将凹玻片于调至60℃的恒温箱底层铁板上加热,用手不断摇动直至溶液呈浅棕黄色,脱离热源以中止染色;

1.3.4 镜检合适后将标本转入盛有蒸馏水的胚胎皿中以洗去残液;

1.3.5 在干净的载玻片上加一小滴蛋白胶,移入标本并以细针搅匀,晾干后常规(酒精)脱水封片。

1.4 制片步骤 II——应用于海洋生种类

1.4.1 将上述标本固定在盛有10%福尔马林液的胚胎皿中(对皮膜薄的种类可适当提高固定剂浓度)约5min后改以蒸馏水置换掉福尔马林液(反复2~3次即可),可长期存放;

1.4.2 重复I中诸步骤,但无需在福尔马林液中停留,可立即进入下一步。

① 史新柏,1987.蛋白银染色法在纤毛虫研究中的改进.中国原生动物学会第四次学术讨论会论文摘要汇编.96~97.

② 宋微波,1985.缘毛类纤毛虫蛋白银染色方法的改进及对过染的补救.中国原生动物学会第三次学术讨论会论文摘要汇编.12.

2 制片结果与讨论

核器 浅着色情况下大核基质为浅棕黄色,染色质核仁小体为棕黑色,小核浅棕黑色。

分泌泡 刺丝泡顶器部为棕黑色,其余部位着色极浅,其它分泌泡着色较深,棕黄至棕黑。

纤毛 浅着色时不可见,正常染色时为浅黄至棕黄或棕黑色。

皮膜结构及纤毛下器 本方法对毛基粒(包括触毛、棘毛、各类膜结构)均具有良好的显示效果,在正常染色情况下毛基粒均呈深棕黑色。除外,本方法同时可显示与基粒相联的纤维系统,过染时尚可显示部分银线系统。

通过调整 Fernandez-Galiano 液各组分的比例,可以得到不同的染色效果,从而应用于不同的目的。适当减少吡定含量,会得到突出染分泌泡(含刺丝泡)的结果。而加大 Rio-Hortega 份量则会着色加深,这对某些不易着色的种类具有加强染色的作用。在制作永久封片时,一些皮膜薄的种类易于因收缩过程而变形,此时可相对减少一点用于粘贴标本的蛋白胶的剂量。对皮膜薄,不能耐受低浓度固定剂的种类可试用高浓度(如 20~50%)的福尔马林,但虫体在其内不易超过数 10s,随即应稀释至 10% 的浓度,并可适当缩短固定时间。

参考文献

- [1] 庞延斌、顾福康、邹士法,1983。应用于腹毛类纤毛虫的一种改进的蛋白银染色法。华东师范大学学报 4:87~

- [2] Augustin, H., Foissner, W. & Adam, H., 1984. An improved pyridinated silver carbonate method which needs few specimens and yields permanent slides of impregnated ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Mikroskopie* 41:134—137.
- [3] Corliss, J. O., 1953. Silver impregnation of ciliated Protozoa by the Chatton-Lwoff technic. *Stain Technol.* 28:97—100.
- [4] Fernandez-Galiano, D., 1976. Silver impregnation of ciliated Protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonated method. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95:557—560.
- [5] Foissner, W., 1976. Verfahren mit einer trochene Silber. imprägnations methode zur Darstellung argyrophiler Strukturen bei Protisten. *Verh. Zool. Bot. Ges.* 115:68—79.
- [6] Tuffrau, M., 1967. Perfectionnements et pratique de technique d'imprégnation au protargol des infusoriés ciliés. *Protistologica* 3:91—98.
- [7] Wilbert, N., 1975. Eine verbesserte Technik der Protargolimprägnation für Ciliaten. *Mikrokosmos* 6:171—179.
- [8] Wilbert, N., 1983. Eine neue Imprägnation der Basalkörper bei Wimpertieren. *Mikrokosmos* 7:193—197.