

应用于纤毛虫银线系染色的干银法新改良

宋 微波

王 梅

(青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

(青岛第 47 中学生物组)

摘要 对 Klein 氏硝酸银染色法做了改良:使之成为适合海水、淡水及土壤中多种类型纤毛虫染色的简便快捷制片方法。

关键词 纤毛虫 染色技术 新改良 银线系

纤毛虫的现代分类学对形态描述提出了新的要求,即不仅需要详细的活体观察以及许多经典的诸如大小、外形、可见结构的描述及核器显示,同时还应提供纤毛图式(Infraciliature)以及银线系(Silveline system)的资料。对于显示纤毛图式的方法,国内外已有许多报道^[1-8]。有关银线系,目前人们主要采用 Chatton-Lwoff 浸染法^[9,10],该方法的主要缺陷是耗时多,制片步骤繁杂,掌握较困难且不能显示间接银线系统。Klein^[11]在 20 年代首先应用“干银法”来显示某些淡水及土壤生种类的银线结构。这种方法简单易学,如应用得当可获得高质量的制片。但该法的主要缺点是需要强光(日光)显影,仅适用于少数中小型皮膜较厚的种类,且对海水种无效(由于海水中的 Cl^- 离子可使银沉淀从而干扰染色)。Foissner^[12]1976 年将 Klein 的方法做了改进,应用新鲜蛋清作“媒染物”,在滴加硝酸银后改在灯光下显影(后加显影剂)。他的方法证实对更多的皮膜较厚的种类都有效,制片质量也有所提高,但仍无法解决海洋种类的问题,因虫体干燥后如水洗去除盐分虫体会因渗透压的问题而破碎。此外,该方法对蛋清要求苛刻(需用前先行在空气中曝露 24 小时而又无法保存),蛋清层涂布不易恰如其分地掌握(厚了会淹埋虫体,过薄则不能起作用),尤其在虫体数量少时,对初学者来讲,这一步是常见的导致失败的原因所在。

作者在 Klein 和 Foissner 方法的基础上

加以改变,使得一些皮膜较薄的种类也可应用此法且大大简化了制片过程,另外,为使清洗盐分时虫体不致于溃解,在制片初始引入“蛋白水”^[1]做媒染剂,使该方法成为可广泛应用于海、淡水种类的制片方法(图 1—6 见封 3)。

1 染色用试剂及其它物品

1.1 显影液 对苯二酚在 5% 的 Na_2SO_3 水溶液中配成 1% 浓度(比液为无色,可在冰箱内保存 1—2 周,至呈浅棕黄色时仍可使用)。

1.2 蛋白水 蛋清:水约 1:10,过滤后加少许麝香草酚以防霉,入冰箱内保存,可长期使用(注意不要冰冻)。

1.3 硝酸银溶液 于蒸馏水中配成 3% 浓度,注意避光,在冰箱中可长期保存。

1.4 微吸管 由普通吸管在酒精灯上二次抽拉而成。为使用方便,应备用大、中、小口径各一支(分别约为 $150\mu\text{m}$, $80\mu\text{m}$ 和 $40\mu\text{m}$);吸管在使用数次后会沾附过多的污物,此时可在洗液中浸泡数分钟以清除污物。

1.5 解剖针 可用针灸用银针替代(用于水分将干时调整虫体体位及清除大的异物)。

1.6 台灯 60W 白炽灯泡;如条件许可,则紫外灯最佳(5—10W 即可),其制片质量明显优于前者。

2 制片

2.1 置微量的蛋白水(约 1/5 滴)于载玻片上

1) 此名词及配制方法均源自史新柏(未发表)。

(对淡水及土壤中生活的小型皮膜较厚的种类如盾纤目种类,肾形虫类等可省略此步,直接由下一步开始)。

2.2 以微吸管将虫体连同与上述蛋白水同量的培养液一起滴在蛋白水滴上,以解剖针(小心地!)搅匀后吸除多余水分。

2.3 在空气中干燥(切勿干燥);接近干涸时可用手在玻片上方扇动以加速干燥并阻止虫体变形溃破。

2.4 加一滴硝酸银覆盖于虫体上,在台灯(45—60 W 白炽灯泡)下相距约 2—3 cm 曝照 15—30 分钟¹⁾(如用紫外灯则可近至 1—2cm),视需要可补加一滴硝酸银以防干燥。

2.5 以蒸馏水冲洗 3—5 秒钟,倾去多余水分,后滴加一滴显影液,镜检至银线结构清晰显现(呈深棕黑色,约 1—3 分钟)。

2.6 在自来水中漂洗数秒钟,后空气中倾斜放置(可于温箱中适当加温以利干燥)。

2.7 直接滴加封片用中性树胶并复以盖玻片封片。

如所涉虫体为海洋种类,在第 3 步后以蒸馏水冲洗 5—10 秒钟后直接转入下一步即可。

3 讨论与结语

在上述的经过改良的制片中,全部过程约需 30—45 分钟。结果可显示直接与间接银线系统以及毛基体和相关的纤毛小器官。影响制片结果的主要因素有下列几点: 1. 曝光时间,在不同种类常有所不同,这尤其在以台灯为光源的情形下。2. 培养液的剩余数量,通常原则是,在与蛋白水相混后,尽可能吸除不必要的水分,此步骤的另一个意义还在于可借此维持虫体表面的清洁,因残液愈多,非结构性银沉淀也越多,假染色也愈严重。3. 硝酸银后的水洗时间(第五步),作者提议以滴管直接造成水流冲

洗虫体,以求时间尽可能短而又要比较彻底地清除外表的多余银沉淀。

本方法对于中小型动基片纲、寡膜纲种类(尤其皮膜较厚者)通常具良好的显示能力。如裂口科的许多小型种类之左侧纤毛图式通常极难显示(蛋白银染色也很困难),但应用此法可获得大略的结构和纤毛图式。

综上所述,本方法具有下列特点及优点:

(1) 改用台灯或紫外灯做光源以弥补日光照射受制于天时的缺陷。

(2) 利用蛋白水以防止海洋种类水洗时的虫体溃破现象以及 Foissner 氏方法中的蛋清配制及保存上的问题,同时也避免了因涂布不均匀而产生的其它负影响。

(3) 显影后直接在空气中干燥并封片,大大缩短了制片周期,简化了操作手续。

参 考 文 献

- 1 史新柏. 黑色素技术在纤毛虫形态学研究中的改进. 中国原生动物学会第二次学术讨论会论文摘要汇编. 1983, 27.
- 2 宋微波. 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. 1985, 12.
- 3 宋微波. 海洋科学, 1992, 6: 43—45.
- 4 庞延斌, 顾福康, 邹士法. 华东师范大学学报, 1983, 4: 87—93.
- 5 Augustin, H., W. Foissner, & H. Adam, *Mikroskopie* 1984, 41:134—137.
- 6 Fernandez-Galiano, D. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1976, 95:557—560.
- 7 Tuffrau, M. *Protistologica* 1967, 3:91—98.
- 8 Wilbert, N. *Mikrokosmos* 1975, 6:171—179.
- 9 史新柏. 哈尔滨师范学院学报(自然科学版), 1963, 1: 79—83.
- 10 Corliss, J.O. *Stain Technol.* 1953, 28:97—100.
- 11 Klein, B.M. *Arch. Protistenkd.* 1926, 56:243—279.
- 12 Foissner, W. *Verh. Zool. Bot. Ges.* 1976, 115:68—79.

1) 以台灯曝照时在显影前无明显的颜色变化, 此点有别于以紫外灯曝照。

《应用于纤毛虫银线系染色的干银法新改良》

一文之附图(正文见第 38 页)

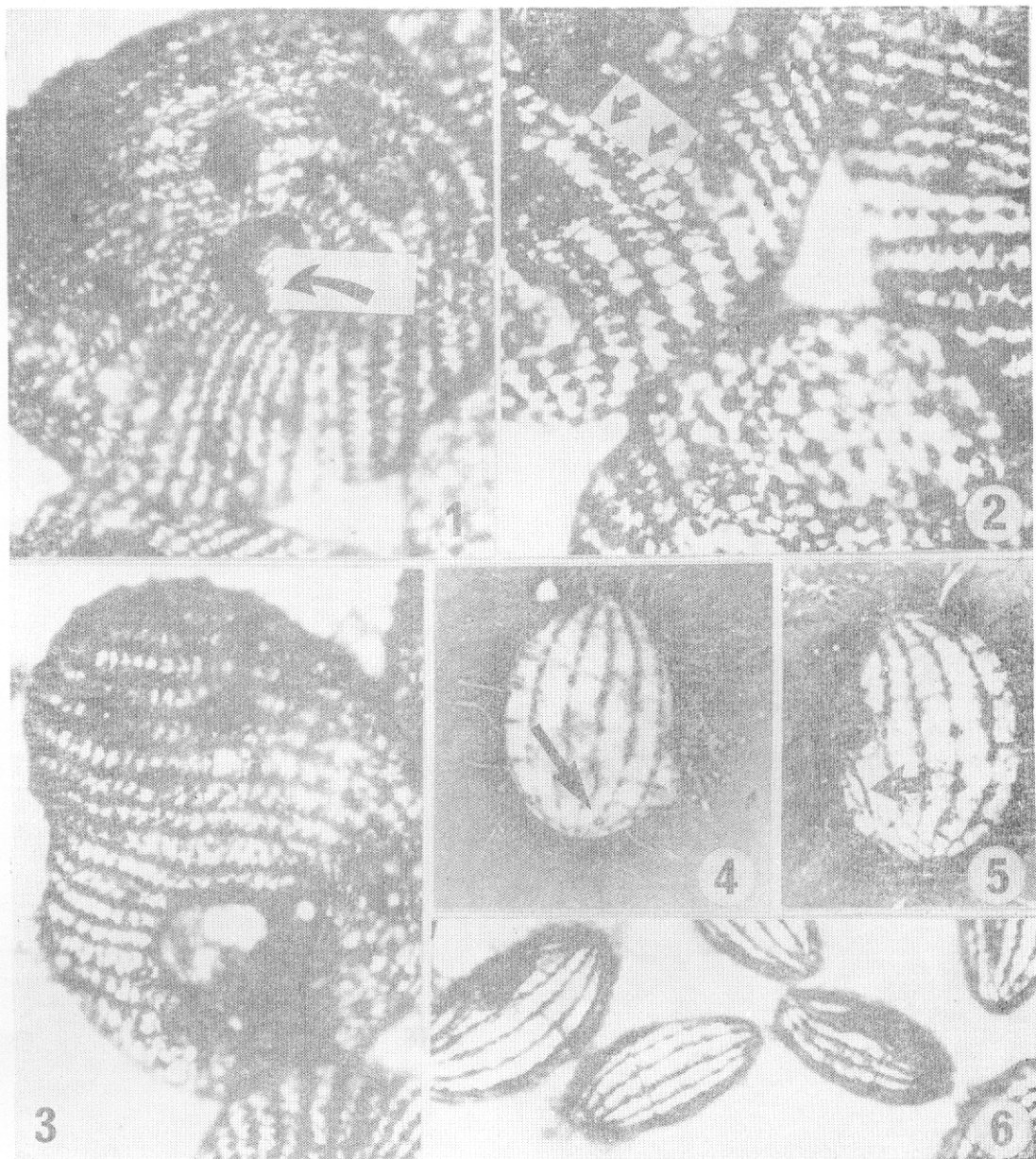


图1—6 干银法制片结果显示

图1 肾形虫腹面观,箭头示口内膜; 图2 示肾形虫银线系局部,箭头示分泌泡开孔; 图3 肾形虫左侧面的银线系整体观; 图4 示膜袋虫右侧面,箭头所指为伸缩泡开孔; 图5 膜袋虫的左腹侧观,箭头示胞肛; 图6 未使用“旦白水”制片后的膜袋虫,虫体周围不见纤毛(对比图4、5)。