

微波辐射固定对小麦秆锈菌体表抗 原位点保存作用的研究

STUDIES ON THE PRESERVATION OF ANTIGENIC SITES ON HYPHAL
SURFACE OF WHEAT STEM RUST BY MICROWAVE FIXATION

康振生 李振岐 商鸿生 R. Rohringer J. Chong
(西北农业大学) (加拿大农业部温尼泊研究所)

Kang Zhensheng Li Zhenqi Shang Hongsheng R. Rohringer J. Chong
(Plant Protection Department, (Agriculture Canada Research Station
Northwest Agric. Univ.) Winnipeg, Manitoba, Canada)

摘要 本文以感病小麦幼苗为材料,首次对植物材料的微波辐射固定技术进行了研究。结果发现,感病叶片与固定液一起被微波辐射 10 S,再在固定液中放置 10 min,即可完成前固定过程。该方法处理的样品,其超微结构的保存效果与常规固定法(3 h)相似,但对菌丝体表抗原位点的保存效果是常规法的 2 倍。

关键词 微波辐射;抗原位点;小麦秆锈菌;小麦;生物电镜技术

Key words Microwave fixation; Antigenic sites; Wheat; Wheat stem rust; Biological electron microscopy

近年来,微波辐射固定技术在动物组织固定中的应用已引起人们的极大关注。该技术不仅可完好地保存细胞的形态结构,而且对细胞或细胞中的大分子物质,如酶、抗原等都具较好的保存作用(Hopwood 等,1984, Leong 等,1985)。但是,关于植物材料的微波辐射固定的研究,目前尚无报道。为此,作者以感病小麦为材料,就植物材料的微波辐射固定方法及微波辐射固定对抗原位点的保存作用进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 植物材料

小麦品种 Little club 的幼苗接种小麦秆锈菌生理小种 C36 后,于 19℃ 下培养。

1.2 抽真空

接种后 5 天,将感病的叶片切成 2 cm 长的叶段。将叶段置于通堡试管中,并加入 10 ml 固定液(4%多聚甲醛+1%戊二醛)。在真空泵上抽气 5 min,随后在 4 min 内将试管中的气压回升到大气状态。经抽气的叶段均沉于试管底部。

1.3 微波辐射固定

将 3~5 个抽气后的叶段放入薄壁塑料小瓶中(高 5.2 cm,直径 1 cm),加入 2 ml 固定液。将小瓶迅速置入微波炉(Panasonic NN-7406, 700w, 2 450 赫芝)中,辐射 10 S。随后立即用热电偶温度计测定叶段的温度,标出 40℃, 45℃ 和 50℃ 的部位。然后将叶段在固定液中放置 10 min。固定处理共设两个对照,对照 I 的处理步骤与微波辐射固定一致,但叶段未经辐射处理,对照 II 与常规方法一致,前固定 3 h。前固定后,将上述处理样品切成

300 μm 宽的叶样。

1.4 抗原点的标记

首先将样品在抗 IWF (感染秆锈的小麦叶片细胞间液) 的抗体 (磷酸缓冲液 (PBS) 稀释 240 倍) 液中孵育 2 h, 经 PBS 洗 4 次, 最后在 A 蛋白-胶体金液 (光密度为 0.5) 中孵育 2 h。

1.5 样品的后固定、脱水和包埋

样品标记后, 经酸后固定, 系列乙醇脱水及树胶 Epon812 包埋均按常规方法进行。

1.6 镜检与胶体金数量的测定

样品切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 philips420 型电镜上观察。每一处理至少切 6 个包埋块, 每一铜网上随机拍照 5 张横截面的菌丝。借助图像分析仪统计菌丝体表金粒数。本试验共重复 5 次。

2 结果与讨论

经对不同处理的结果观察比较, 发现微波辐射固定 (40~50℃) 对小麦、锈菌细胞的整体结构和超微结构都保存完好, 其效果与前固定为 3 h 的常规方法 (对照 I) 相当。但在前固定仅为 10 min 的对照 I 中, 样品的细微结构保存较差。

在所有抗原标记的样品中, 其菌丝体表都可观察到分布有密度不同的金颗粒。经微波辐射固定 (40~50℃) 的样品, 菌丝体表每微米的金粒数为 12.6, 而对照 I 和对照 II 仅为 6.4 和 6.9。经统计分析, 置信度为 99.9% 时, 微波辐射固定的样品与对照 I 和对照 II 间的差异极为明显。同样, 微波辐射的不同温度对抗原位点的保存效果是有差异的。微波辐射固定的温度为 45℃ 时, 菌丝体表每微米的金粒数为 17.9, 40℃ 为 10.5, 50℃ 为 9.8。经统计分析表明, 45℃ 的样品对抗原的保存明显高于 40℃ 和 50℃ 的样品。

本文以感病小麦叶片为材料, 首次对植物材料的微波辐射固定方法进行了研究, 并摸索出适应植物材料的新方法。该方法不仅对样品的超微结构具较好的保存作用, 而且对抗原位点的保存具显著促进作用。这为植物材料的细胞化学研究提供了新的固定方法。然而, 本文仅以小麦和锈菌为试材, 至于该方法是否适于其它植物材料需进一步研究。



图版 1~3. 小麦秆锈菌菌丝 微波辐射固定样品 (图版 1. $\times 56\,380$) 上的金颗粒数目明显高于常规固定 (图版 2. $\times 49\,470$) 和前固定仅为 10 min 的样品 (图版 3. $\times 58\,750$)。