

培养真菌的扫描电镜样品制备体会

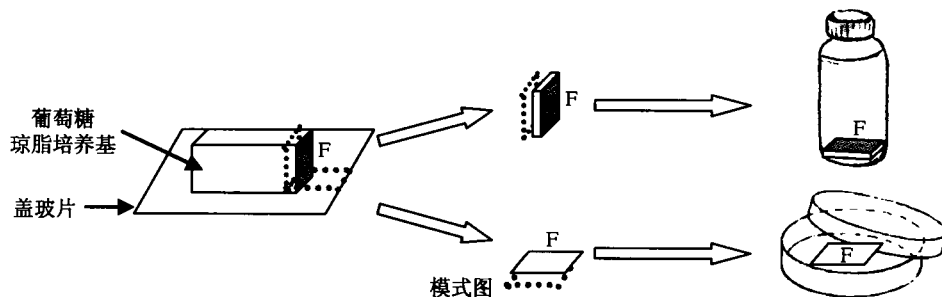
崔芳¹, 黄攀登², 胡丹丹², 王丽^{1*}, 林元珠²

(河北医科大学 1. 电镜实验中心, 河北 石家庄 050017; 2. 第四附属医院皮肤科, 河北 石家庄 050000)

近年来真菌感染的发病率日益增多, 早期快速的鉴别对临床诊断、治疗具有重大意义。扫描电镜作为形态学研究的一项重要观察方法, 但常规制样有时很难达到观察目的。为此根据工作实践, 不断改进技术方法, 采用菌块和盖玻片相结合的形式制备样品, 取得较为满意的结果。现将具体的制样技术进行介绍, 以供同行参考。

方法: 无菌条件下刮取患者病变处坏死组织, 接种在葡萄糖琼脂培养基, 置 37℃ 常规培养 7 天, 逐日观察见同样镰刀菌 (*Fusarium*, F) 菌落生长。切割适宜大小的葡萄糖琼脂培养基放在盖玻片上, 挑取培养成功的菌落转种于盖玻片与培养基的交界处, 置于 37℃ 同样培养 7 ~ 14 天, 待到对数生长期

病菌最为旺盛时, (1) 用双面刀片在培养基与盖玻片交界处切下带菌落的 3 mm × 3 mm 见方的小块, 投入装有 1% 戊二醛固定液的小瓶固定 20 min 后, 双蒸水清洗 2 次, 15 min/次 → 浓度为 50%、70%、80%、90%、100% I、100% II 的乙醇梯度脱水, 各 15 min/次 → 75% 叔丁醇 15 min → 100% 叔丁醇冷冻抽真空; (2) 剩余培养基轻轻撕下, 在菌丝分布均匀的盖玻片上, 用金刚笔切下约 5 mm × 5 mm 见方的小块, 置于培养皿中滴加 1% 戊二醛固定 10 min → 双蒸水清洗 2 次, 5 min/次 → 同样浓度乙醇梯度脱水, 各 5 min/次 → 空气自然干燥。两种方法处理的样品都粘在样品台上, IB-3 离子镀膜仪喷金, 日立 S-3500N 型扫描电镜观察 (模式图)。



结果与讨论: 方法 1: 可见许多孢子团聚在一起, 以大分生孢子居多, 呈镰刀形或纺锤形, 两端较尖, 稍弯曲, 表面光滑, 有 3 ~ 5 个环状竹节样膨隆, 其中又以 4 个环状竹节样膨隆居多; 偶见菌丝穿行, 孢子与之有接触, 但无法分辨其来龙去脉, 且孢子之间交叉较严重, 较少有形态完整的孢子可供拍照 (图 1、2)。方法 2: 低倍镜下能清晰地分辨出菌丝、大分生孢子和小分生孢子, 菌丝间盘根错节, 相互连接沟通 (图 3), 高倍镜下可见大、小分生孢子依附在菌丝上, 有的是孢尖端与其相连, 有的是孢体与之贴合, 形态各异, 大分生孢子较稀疏, 呈镰刀形或纺锤形, 两端较尖, 稍弯曲, 表面光滑, 也可见 2 ~ 5 个环状竹节样膨隆, 甚至可见侧壁出芽, 小分生孢子较聚集, 形态及大小多变, 多呈卵圆形、梨形或纺锤形 (图 4 ~ 6)。由此可看出两种方法各有利弊, 固体培

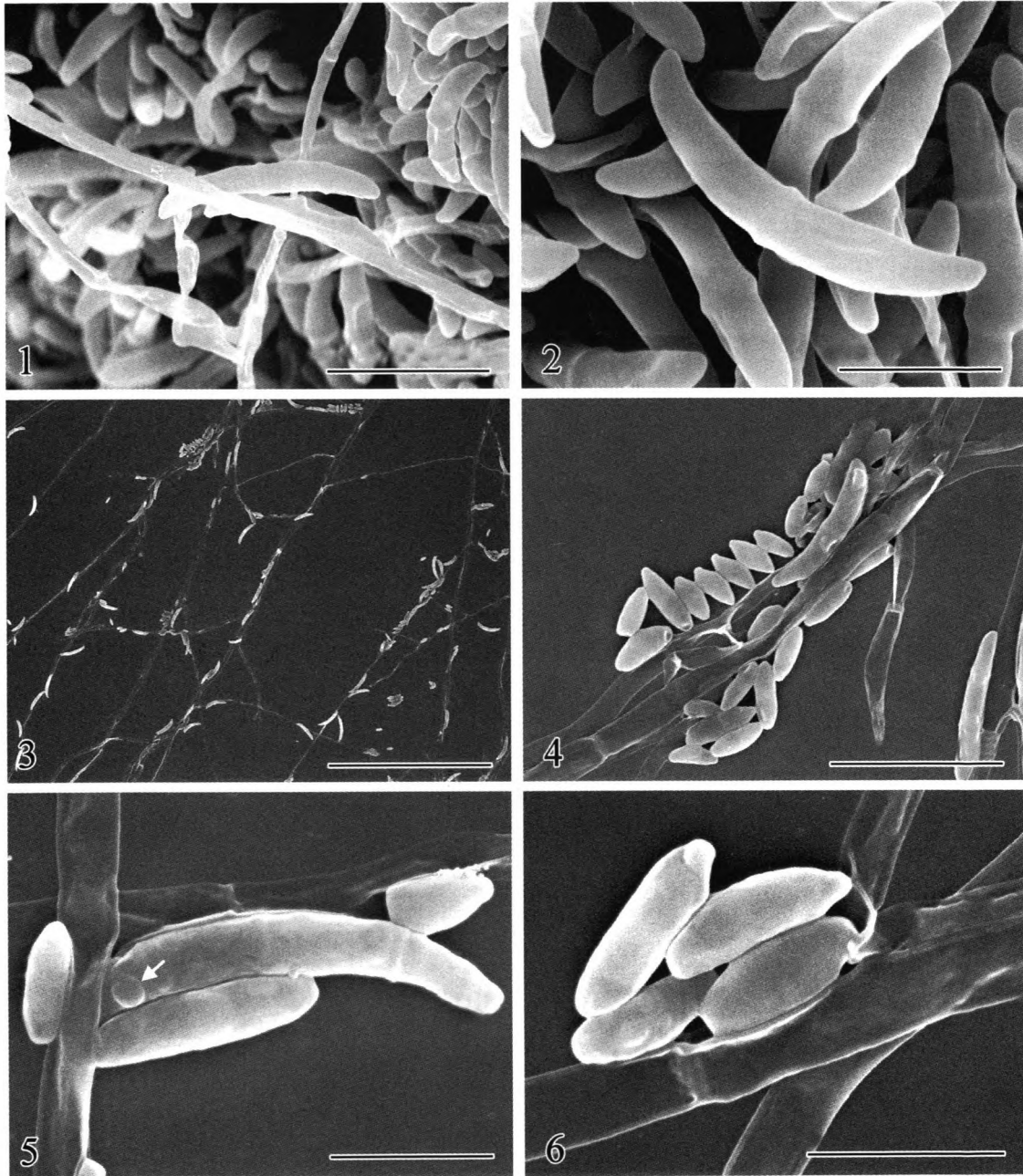
养基上的菌丝团立体感较强, 菌丝孢子虽清晰可见, 但过于密集, 不易单独观察, 且分不清菌丝的来龙去脉以及菌丝和孢子之间的关系; 而盖玻片上生长的菌丝立体感虽欠佳, 但可以很清晰地观察到菌丝与孢子间的关系, 甚至能明显的区分出大、小分生孢子以及侧壁出芽等形态。所以固体培养基培养的真菌, 可以取培养基和盖玻片两者同时做, 既不需额外培养真菌, 也可菌丝、孢子及相互关系都兼顾, 得到更多的观察信息。还要指出的是, 此方法有些注意要点: 1. 固体培养基上真菌, 由于菌块较轻、易漂浮, 需用注射器从橡胶瓶塞刺入, 抽出空气, 使样品沉下, 达到固定清洗等操作步骤更彻底的目的; 2. 样品在操作中时动作要轻柔, 特别更换药液时, 由于液体的冲刷, 极易造成孢子的流失, 所以尽量避免在样品上直接加取药液, 可为观察者提供较大的选择余地。

* 通讯作者: 王丽 E-mail: wl601021@yahoo.cn

3. 由于真菌多为单层细胞壁, 尽管已进行固定、脱水、干燥处理, 但样品仍然极易变形, 故制作完毕要

尽快观察。

参考文献(略)



图片说明(图1,2:方法1;图3~8:方法2)

图1 固体培养基的许多孢子团聚在一起,菌丝从上面穿行,虽孢子与之有接触,但不易分辨菌丝的来龙去脉,以及与孢子之间的关系;图2 镰刀形或纺锤形的大分生孢子,两端较尖,稍弯曲,光滑,有3~5个环状竹节样膨隆,其中又以4个环状竹节样膨隆居多,但由于孢子聚集,相互挤压较少有完整的形态;图3 低倍镜能清晰地分辨出菌丝、大分生孢子和小分生孢子;图4 大、小分生孢子紧密依附在菌丝上,有的是孢尖与其相连,有的是孢体与之贴合,大分生孢子较稀疏,小分生孢子较聚集;图5 环状竹节样膨隆的大分生孢子,大小约20~30 μm ,与菌丝贴合,可见侧壁的出芽(\uparrow),小分生孢子个头较小,大小约7~10 μm ,呈卵圆形、梨形或纺锤形;图6 小分生孢子平铺聚集在一起,其孢尖或孢体与菌丝相连接。

图1~6; Bar = 20 μm , 10 μm , 200 μm , 30 μm , 10 μm , 10 μm