

# 动物寄生螨类透射电镜样品制作的改进\*

潘雅玲 陈克强

(上海农学院电镜室、动物科学系, 201101)

**摘要** 本文根据动物寄生螨类特点,改进了常规透射电镜样品制作方法。对不同螨,采用不同的采样和固定方法。对个体较大的种类,先用针在螨体上刺1至若干小孔,以便固定液能较快地进入螨体内部,固定内部组织,以免细胞变性与自溶。同时,还提出用推取捞片法改进常规的贴取捞片法和金属环水面张力引取法,可以得到满意的,无皱折,平坦的大切片。

随着电子显微镜的应用,对寄生螨类的研究已从光学显微镜下研究其形态和组织解剖学进入了电镜下研究其超微结构的阶段。据已发表的资料。扫描电镜观察寄生螨类外部形态超微结构的应用比较广泛,但以透射电镜观察其内部超微结构的报道很少。所以作者从1988年2月开始本研究工作。

在研究工作中,发现按常规透射电镜样品制备方法和程序制作寄生螨类的样品,往往得不到满意的结果。用电镜观察,往往只能看到螨的表皮,而皮层细胞及内部其它结构都看不到。即使有时勉强能看到,也常移位或变形,且污染现象比较严重,故严重影响研究工作的开展。为此,本文对动物寄生螨类透射电镜样品制作方法作了改进,并取得了较好的结果,现报道如下。

## 一、样品采集与制作程序

(一) **采集** 根据动物寄生螨类生活习性的不同,采用不同的采集方法。如疥螨,可刮取病变与正常皮肤交界处的皮屑;耳痒螨,可取含螨叮聆,足螨和痒螨,可取含螨痂皮,均可用培养皿内加温法分离虫体。突变膝螨和苍白膝螨的分离是取下含螨痂皮,浸泡在生理盐水中,在解剖镜下,用小镊子分离,亦可根据研究目的不同,取下含螨痂皮后,直接进入下一步骤。鸡新肋恙螨,可从鸡体上直接取下含螨的痘疹状病灶皮肤。蠕形螨一般直接取病变皮肤即可。

(二) **固定** 把分离出的疥螨、耳痒螨、足螨、痒螨、膝螨等虫体,在解剖镜下,必要时可在

\* 本文完成过程中,受到本院樊培方教授和陆雅君讲师的热情帮助,特此致谢。

表1 鸡突变膝螨的常规法和针刺法比较

	固定		漂洗 PBS, pH7.2	脱水 乙醇, 无水丙酮	渗透与包埋 <sup>[注]</sup>				图像结果
	pH7.2 2.5% 戊二醛	1% 氯酸			环氧树脂 618	无水 丙酮	时间 (小时)	温度	
常规制样	活螨 2天	1.5小时	10分钟/每次 共三次。	乙醇: 10分钟/每级。 无水丙酮: 10分钟/每次 共三次。	1:3 1:1 3:1 纯0 包埋0	2 2 3 6 48	室温 室温 室温 室温 60℃	表皮层清楚表皮层内组织已分离变性。	
针刺改进法	活螨预固定 1小时,再针刺虫体若干小孔。	2小时	20分钟一次, 15分钟/每次 共二次。	乙醇: 15分钟/每级。 无水丙酮: 15分钟/每次 共三次	1:3 1:1 3:1 纯0 包埋0	2 3 12 6 48	37℃ 37℃ 37℃ 37℃ 60℃	表皮层,真皮及真皮细胞核、肌内层均保持生活状态。	

[注] 包埋液配方选用上海第二医科大学<sup>[1]</sup>。

显微镜下区分雌、雄虫体和各期未成熟虫体,分别进行固定。

用含膝螨的痂皮固定时,应从痂皮内侧面突起尖端(该处为膝螨寄生处)为中心,切成1—2平方毫米进行固定。

含鸡新肋恙螨的皮肤切成1立方毫米大小,上含1—2只螨,含蠕形螨的病变皮肤也要切成1立方毫米大小,但略长一点,可达2—3毫米,应注意保留毛囊与皮脂腺。

(三) 穿刺 疥螨、耳痒螨等虫体,可根据大小选用0—4号昆虫针作为穿刺工具。在解剖镜下,一手拿镊子轻轻固定虫体,另一手拿适宜的昆虫针,从虫体的腹面刺入至背侧贯穿。个体大的螨,应在不同部位穿刺若干个孔。

痂皮上的膝螨,鸡皮上的新肋恙螨亦可用上述方法逐只依次进行。

蠕形螨和一些螨的幼虫(如疥螨),因个体小,表皮角化程度弱,而且也不易穿刺,可以不穿刺。

(四) 制作程序 螨类制样程序,本文采用鸡突变膝螨进行常规制样和针刺改进方法作了图象比较,明显地发现,前者仅能看到表皮层与细胞自溶变异现象,而后都能看到表皮、真皮细胞核、肌肉均为生活状态(见表1及图1、2)。

#### (五) 超薄切片

1. 包埋块的修整 由于螨类本身组织比较

脆,在修块过程中很容易受损,故采用手工和切片机结合的方法进行修块。首先用手工粗修,除去组织周围多余和无关介质,尽量朝虫体靠近,再把包埋块在切片机样品臂上夹紧,把玻璃刀(只需用旧的玻璃刀)在刀台上也夹紧,用左手握住样品臂,上下刮面,同时在切片机的立体显微镜下观察样品的切面,直至到位,再把包埋块从臂上取下,用手工修成四周为金字塔,顶端为等腰梯形。梯形方向根据包埋在树脂中的虫体方位而定。只要梯形上下端与刀口平行,很容易得到虫体的连续切片。

2. 切片和捞片 由于螨的研究尽量保存虫体的整个切面,以便分析和研究,所以要求切片面积较大。根据以下经验能切出截面为 $0.5 \times 1$ 平方毫米,甚至更大的片子。首先切片室内温度为 $20^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 $65\%—70\%$ ,切片速度为 $2—5$ 毫米/秒,切片厚度 $700 \text{ \AA}—800 \text{ \AA}$ 之间,眼观为深金黄色。槽中有了足够的连续片,用眼毛拨针分为几段,划入水槽中央,尽量使每条切片带靠扰,再用氯仿展开,这时候片子之间靠得很紧不容易散开,然后用镊子尖端夹住有膜载网,膜面朝上,用左手拿住有载网镊子,把载网斜插入水槽中央,右手用眼毛拨针慢慢地把片子朝载网中央推进至合适的网位上轻轻提起有片载网,用滤纸在无膜面上吸干水分,即成无皱褶,平坦的好片子。

(六) 染色 采用滴液染色法。为了减少铅对切片的污染,采取了以下几项措施,效果较为满意。

1. 染色前用脱排油烟机抽出室内的混浊空气,并同时使室内温度保持 20℃,湿度 70% 左右,并将所需的镊子、滴管、小烧杯等用品彻底洗净烘干后,方可使用。接触过铀与铅试剂的镊子不能混用。

2. 用于配制铅染液或是染色铅冲洗用的蒸馏水,临用前均煮沸,驱除二氧化碳,冷却后方可使用。

## 二、结果与讨论

(一) 按照本文介绍的透射电镜样品制备方法可以得到较满意的结果。未经穿刺等处理制作的样品,镜下仅能见到表皮(E),真皮和体内其它组织都变性和自溶并与表皮分离(T) (图 1)。而用改进方法制作的样品,在镜下从外层到里层依次(见图 2): 表皮(E),真皮及真皮细胞核(N),肌肉(M) 等结构。

(二) 螨的采集与分离速度要快,尽量在螨活着时进行固定,否则会引起超微结构的变化。

(三) 螨的体壁较厚,有上表皮、内表皮、外表皮、斯氏层及真皮层组成。上表皮的粘质层,

盖质层(蜡层)有防止水份过分进入体内和体内水分过度损失的作用。外表皮较厚,可分为数层。这些结构,使固定液不易透入。另一方面,戊二醛、锇酸的穿透力弱,从而使螨体内部组织因得不到及时固定而发生细胞变性与自溶。为了加快试剂渗透速度, Kuo 等(1978)用去掉螨的四对足方法,使固定液尽快进入食菌嗜木螨体内部,从而获得较好的效果。 Tongu 等(1986)对粉尘螨和屋尘螨的样品制作,先用针在螨体上刺 1 至若干小孔,然后再用 PBS 配制的 2.5% 戊二醛在室温下固定 1 小时,再换新鲜戊二醛溶液,在冰箱内过夜。从而使固定液能较快地进入螨体内部达到固定内部组织的目的。本文采用先用 pH7.2, 2.5% 戊二醛对螨虫先固定 1 小时然后再针刺固定达 2 天。目的是使固定液先对体腔液进行固定,减少在穿刺时,体液流失和尽可能地保持螨体原来状态。对于螨的人工损伤部分,可在电镜下区分出来,但为了解这部分结构与周围的关系,还应对同一种类,同一虫期,不同个体的螨,在不同部位穿刺,从而可以加以对比,得出正确结论。

(四) 针刺螨类制样的改进,延长了固定、漂洗和脱水时间,在环氧树脂和丙酮 3:1 渗透 12 小时并在 37℃ 恒温中进行,使细胞结构保

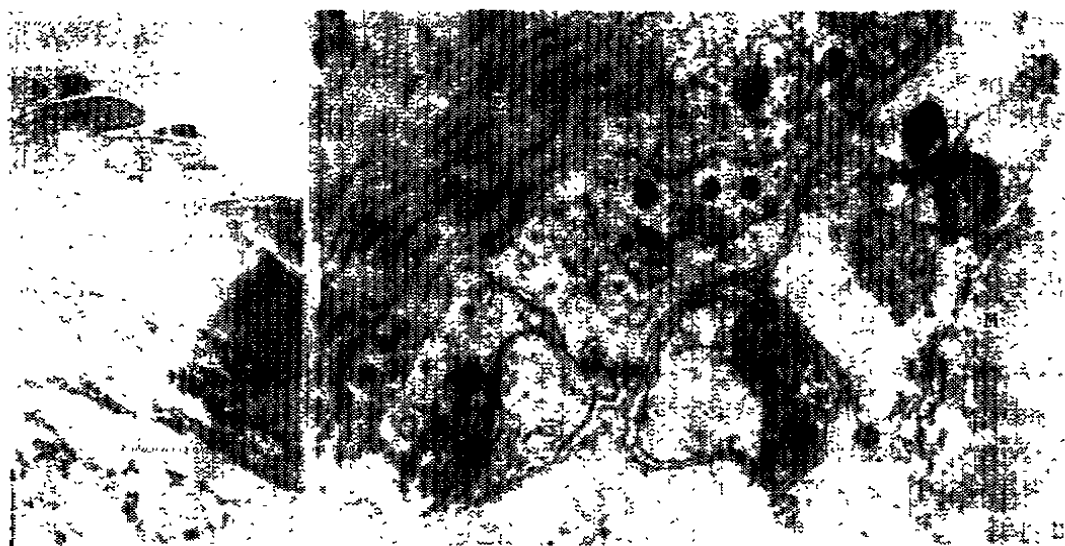


图 1 常规方法制作的样品,图为样品的横断面  $\times 6000$ , E. 鸡突变豚螨表皮, T. 鸡突变豚螨变性组织。

图 2 改进方法制作的样品,图为样品的横断面  $\times 10000$ , E. 鸡突变豚螨表皮, N. 真皮细胞核, M. 肌肉组织。

持完整。

(五) 为了了解螨类内部结构之间的相互关系, 应尽可能采用大切片。但大切片进行捞片时, 如果采用贴取捞片法不能使有膜载网和片子之间贴紧而出现皱褶和裂痕。如果用金属环的水面张力引取, 也易分散连续片。但采用了本文提出的方法, 则能取得较为满意的效果。再大一些的切片(一只载网只能放满 2 片)也能取得满意的效果。

## 参 考 文 献

- [1] 上海第二医科大学 1984 电镜技术与细胞超微结构 21—28 上海第二医科大学出版。
- [2] 折介六 1983 蝉蟻学纲要 5—6 高等教育出版社。
- [3] Kuo, J. S. & McCully, M. E. : Fine structure of the integument and associated structures of *Caloglyphus mycophagus*. *Acarologia*, 1978, **20**: 572—589.
- [4] Tongu, Y. et al: Ultrastructure of housedust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. *Jap. J. Sanit. Zool.*, 1986, **37**: 237—244.