文章编号:1000-5404(2009)18-1811-02

技术方法

粘孢子虫孢子期扫描电镜样品制备方法的比较

路 菊,陶忠芬,李 飞 (第三军医大学基础医学部中心实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨粘孢子虫成熟孢子扫描电镜样品制备新方法。**方法** 通过常规方法和改进方法制备粘孢子虫孢子扫描样品。**结果** 改进方法后观察结果显示虫体脱落少,结构清晰,立体感强,能够达到理想的效果。**结论** 改进方法解决了粘孢子虫在制作扫描电镜样品时的几个问题,是一种切实可行的方法,值得推广应用。

粘孢子虫是寄生于淡海水鱼的一大类原生动物寄生虫的统称,种类多、体型小。通常应用光镜观察形态来进行分类。但光镜放大倍数低、景深差、无立体感,一些细微结构不易看清,如碘泡虫体壁上的"鞘"和"条纹"结构[1]。因此,可以用扫描电镜观察作为分类的一种辅助手段,来弥补通过光镜下观察虫体形态这一经典分类的不足。在国外应用扫描电镜对粘孢子进行分类的比较多[2,3];国内一般还是通过光镜观察来进行分类,一方面是因为电镜设备价格昂贵,另一方面是样品制备方法对于非专业人员来说是难以完成的。本文在研究碘泡虫超微结构的过程中,应用扫描电镜对其表面形貌进行观察,以瓶囊碘泡虫(myxobolus ampullicapsulatus)[4]为例介绍粘孢子虫孢子扫描电镜样品制备的常规方法和改进方法,并比较了2种方法的成像效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

寄生有瓶囊碘泡虫的病鱼于2007年8月购于重庆陈家湾菜市场,鳃组织中有很多孢囊,内含大量成熟的瓶囊碘泡虫孢子。

1.2 方法

1.2.1 防脱玻片的处理 把1块通过多聚赖氨酸处理的载玻片(防脱玻片,市场上有商品)裁成近似正方形的3块备用。

1.2.2 常规方法 从鱼鳃上剥离圆形孢囊,保存于蒸馏水中,使用时从新鲜孢囊中吸取白色液体(内有瓶囊碘泡虫孢子)滴于防脱普通玻片(5 cm×5 cm)上,待干后,放入6孔板内,2.5%戊二醛固定2 h,用0.1 mol/L PBS缓冲液清洗2次,乙醇梯度脱水后经叔丁醇梯度置换,临界点干燥仪干燥,最后导电镀膜。Hatchi S-3400NⅡ扫描电镜对样品进行观察[3,5,6]。

1.2.3 改进方法 从新鲜孢囊中吸取液体0.3~0.5 ml,放入2 ml大小的PE管中,加入2.5%戊二醛固定2 h,0.1 mol/L PBS缓冲液清洗2次,匀浆器匀浆,1 000 r/min离心5 min,吸去上清液,再加入0.1 mol/L PBS缓冲液离心,如此反复3次即可得到较纯净、浓缩的孢子悬液。取瓶囊碘泡虫孢子悬液1滴,滴于防脱玻片中央,用滴管吹散,待干。乙醇梯度脱水后经叔丁醇梯度置换、干燥、镀膜,Hatchi S-3400NⅡ扫描电镜观察。

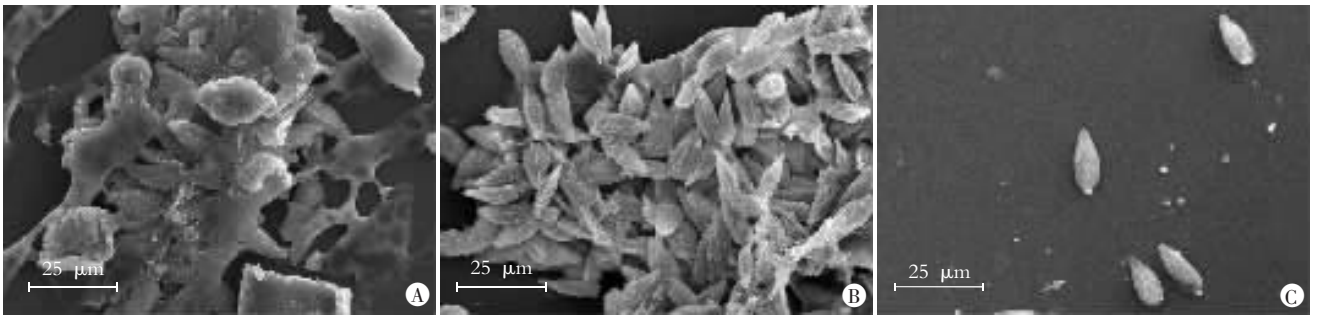
1.2.4 再次改进方法 在以上改进方法的基础上,取1滴浓缩的瓶囊碘泡虫孢子悬液滴于处理过的防脱玻片边缘,用1张干净的盖玻片轻轻推片,使悬液能均匀的涂在玻片上面,其余步骤同改进方法。

2 结果

常规方法扫描电镜下观察到虫体孢子成团聚集,部分孢子散布在大量黏液与细碎的组织中间,孢子表面结构模糊(图1A)。

改进方法后,观察到图像较清晰,孢子表面无黏液覆盖,有少量杂质,能看到一个个的孢子,孢子失水相对较少。该方法的缺点是虫体密集,相互重叠,细微结构辨别困难(图1B)。

再次改进方法后,虫体分布均匀,相互之间很少重叠,虫体表面无黏液覆盖,表面"沟回"结构清晰可见(图1C,图2)。

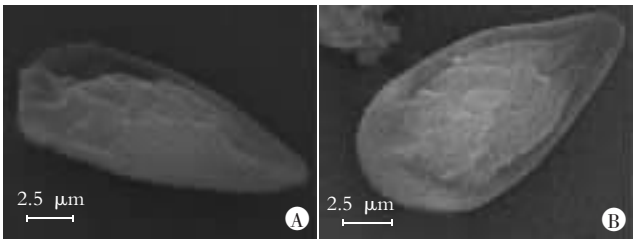


A:常规方法; B:改进方法; C:再次改进方法

图1 瓶囊碘泡虫各种方法处理后的扫描电镜观察

作者简介:路 菊,女,安徽省安庆市人,高级实验师,主要从事扫描电镜方面的研究。电话:(023)68752350

收稿日期:2008-12-19;修回日期:2009-05-26



A:缝面观;B:壳面观

图2 单个瓶囊碘泡虫再次改进方法处理后的扫描电镜观察

3 讨论

粘孢子虫孢子表面有比较硬的几丁质外壳,扫描电镜样品制备时不易附着于玻片上,为了防止在处理过程中孢子脱落,常使用防脱玻片,孢子黏附牢固,在固定、脱水过程中孢子很少脱落。

常规方法:瓶囊碘泡虫孢子由于没有经过稀释、离心的处理,样品没有充分清洗、提纯,造成镜下观察虫体孢子成团聚集,并附有大量黏液与杂质,影响观察结果。

改进方法:先固定,再匀浆和离心,能够保证孢子的原始形貌,同时将孢子上覆盖的黏液及细碎的组织清洗、分离干净。经后续常规处理,镜下看到的孢子形态饱满、真实,但孢子仍然聚集成团,难以分散,影响对孢子的单个观察与分析。

为了解决孢子聚集成团的问题,在以上改进方法的基础上,再次改进方法。将处理好的孢子悬液滴在防脱玻片边缘,用清洁的盖玻片轻轻推片,推出的样品能均匀地涂在玻片上面,经后续常规处理,镜下观察显示,孢子分散,每个孢子的细微结构清晰可辨。

多次实验证明,再次改进方法后观察样品,结果显示孢子均匀分散,单个孢子外部"鞘"和"条纹"结构清晰,立体感强,能够达到理想的观察、分析效果,此方法也适用于其他淡水粘孢子虫。总之,经过改造后的方法,解决了粘孢子虫在制作扫描电镜样品时出现的几个问题,是一种切实可行的方法,值得推广应用。

关键词:粘孢子虫;扫描电镜;样品制备
中图法分类号:R382.3 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 吴英松, 汪建国. 圆形碘泡虫和关桥碘泡虫孢子的光镜及扫描电镜观察[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 264-268.
[2] Lom J, Hoffman G L. Morphology of the spores of Myxosoma cerebralis (Hofer, 1903) and M. cartilaginis (Hoffman, Putz, and Dunbar, 1965)[J]. J Parasitol, 2003, 89(4): 653-657.
[3] Azevdo C, Matos E. Fine structure of the myxosporean, Henneguya curimata n. sp., parasite of the Amazonian fish, Curimata inormata (Teleostei, Curimatidae)[J]. J Eukaryot Microbiol, 2002, 49(3): 197-200.
[4] Zhao Y J, Sun C Y, Kent L M, *et al*. Description of a new species of Myxobolus (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data[J]. J Parasitol, 2008, 94(3): 737-742.
[5] 赵元莙, 马成伦, 宋微波. 海水养殖中原生动物病原虫的鉴定——Ⅱ 粘孢子虫的研究及鉴定方法[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 681-688.
[6] 李 蕾, 刘奇志, 王玉柱, 等. 线虫扫描电镜样品制备技术的比较[J]. 电子显微学报, 2008, 27(3): 255-260.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)18-1812-01

阴式子宫肌瘤剔除术54例临床观察

王莉芳 (陕西省榆林市神木县第二人民医院妇产科,陕西 榆林 719300)

子宫肌瘤是妇科多发病,严重影响妇女身体健康和正常生活[1]。2006年5月至2008年10月,我院成功施行经阴道子宫肌瘤剔除术54例,效果满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

子宫体积<14孕周、无盆腔黏连、子宫活动度好、自愿并予以知情告知行阴式子宫肌瘤剔除术者54例作为观察组:其中经产妇50例,未产妇4例;年龄28~46岁,平均36岁;单发肌瘤32例,2个肌瘤17例,3个肌瘤5例;浆膜下肌瘤17例,肌壁间肌瘤32例,宫颈肌瘤5例。另选取同期54例确认按常规经腹子宫肌瘤剔除术病例作为对照组:其中经产物47例,未产妇28例;年龄25~48岁,平均35岁;单发肌瘤34例,2个肌瘤16例,3个肌瘤4例;浆膜下肌瘤18例,肌壁间肌瘤32例,宫颈肌瘤4例。2组年龄、症状、肌瘤情况差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 手术方法

1.2.1 阴式子宫肌瘤剔除术 采用持续硬膜外麻醉或腰麻,患者取膀胱截石位。肌瘤在前壁的取阴道前穹隆切口,肌瘤在后壁的取阴道后穹隆切口。暴露肌瘤,纵行切开瘤壁,钳抓肌瘤或用肌瘤剥离器沿分界处进行钝性剥离,直至挖出肌瘤,一次剔除肌瘤或经碎瘤后剔除肌瘤。缝合子宫肌层及浆膜层,还纳子宫入腹腔,缝合关闭阴道切口,放置引流管(一次性导尿管)。术毕,常规给予缩宫素10 U肌肉注射,3次/d,连用2~3 d,以减少出血量。

1.2.2 腹式子宫肌瘤剔除术 按腹式子宫肌瘤剔除术的常规手术方法进行。

(下转1814页)

作者简介:王莉芳,女,陕西省榆林市人,主治医师,主要从事产科、剖宫产方面的研究。电话:(0912)8324139
收稿日期:2009-06-05;**修回日期**:2009-06-16