

胡小芬 柯俐 曾志将. 蜜蜂卵 3 种组织切片制作方法比较 [J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(4): 729-733.

蜜蜂卵 3 种组织切片制作方法比较

胡小芬 柯俐 曾志将*

(江西农业大学 蜜蜂研究所, 江西 南昌 330045)

摘要: 本试验分别采用常规石蜡切片、脂肪包卵石蜡切片和冰冻切片 3 种方法对意大利蜜蜂卵进行切片 HE 染色和显微镜观察。结果发现: (1) 常规石蜡切片法难以制作出蜜蜂卵切片。(2) 冰冻切片法可以制作出清晰完好的蜜蜂卵组织切片, 对样本中的蛋白质和核酸保存较好, 但也有切片较厚, 难以连续切片, 保存时间短等固有缺陷。(3) 脂肪包卵石蜡切片制作法能制作出完整而清晰的蜜蜂卵组织切片, 且切片较薄, 卵切片组织的清晰度和完整度要优于冷冻切片, 该方法制作出的卵切片也利于切片的长期保存, 但卵的整体外观形态存在一定程度缢缩。

关键词: 蜜蜂; 卵; 组织切片

中图分类号: S892 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2016)04-0729-05

Comparison of Three Methods for Honeybee Egg Histological Section

HU Xiao-fen, KE Li, ZENG Zhi-jiang*

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In the present study, honeybee eggs were collected to make histological sections, three different methods were taken including normal paraffin production method, the method of paraffin production with fat enfolding, and the frozen section procedure. The sections were observed under microscope after finishing section procedure and dying by HE. The results showed that: 1) it was hard to successfully gain the paraffin sections for honeybee egg because of its tiny size; 2) it was suitable to produce honeybee egg sections using frozen section procedure, which was a common method to make sections for tiny tissue samples; however, there were some obvious shortages, such as short conservation time, likely damage to tissue structure; 3) paraffin production with fat enfolding could greatly help make clear, thin and intact honeybee egg sections, which were better than frozen sections and suitable for long time conservation and further usage. However, there was some extent of constriction along the shape of honeybee egg in the paraffin section.

Keywords: honeybee; egg; histological section

蜜蜂是一种对农业和生态环境有益的经济昆虫, 既能生产多种类型蜂产品, 又是农作物和野生开花植物的重要授粉者^[1]。蜜蜂在我国的养殖历史已有 3 000 余年, 为人类产生了很大的经济价值, 包括传授花粉、维持生态平衡以及生产各类蜂产品。同时, 蜜蜂具有高度社会性、世代周期短、繁殖力强、孤雌产雄、行为复杂以及易于人工大量饲养等特点, 蜜蜂也常被科研工作者作为一种新型的昆虫模式动物,

收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-03-24

基金项目: 国家蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12) 和赣鄱英才 555 工程资助项目

Project supported by the National Apiculture Technology System of China (CARS-45-kxj12) and the Jiangxi 555 Programme for Ganpo Talents

作者简介: 胡小芬(1975—), 女, 博士生, 主要从事蜜蜂研究, hxfen999@aliyun.com; * 通信作者: 曾志将, 教授, 博士生导师, bees1965@sina.com。

用于动物行为、免疫、发育、寿命及性染色体疾病等方面的研究^[2]。随着生物技术的深入发展,人们已对蜜蜂开展了分子生物学和发育生物学的研究,获得了大量科研成果,并取得了丰厚的经济效益。但目前针对蜜蜂胚胎内部结构形态研究相对较少,有关文献多集中在对蜜蜂胚胎活体形态的显微镜观察^[3-5],以及对蜜蜂胚胎时期发育的蛋白质组分析^[6-8]。组织切片的制作和观察是胚胎学研究最基础最直观的方法。为了制作出蜜蜂卵的组织切片,本研究比较了蜜蜂卵组织常规石蜡切片、脂肪包卵石蜡切片和冰冻切片 3 种方法,现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物是江西农业大学蜜蜂研究所饲养的意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)。试验使用卵是意大利蜜蜂蜂王在工蜂巢房中产的受精卵。蜂卵长 1.5~1.8 mm,直径 0.1~0.3 mm,质量约 0.3 mg。

1.2 组织切片制作方法及 HE 染色

1.2.1 常规石蜡切片制作及 HE 染色 固定:用移卵器在意大利蜜蜂巢脾里移取蜂卵 10 粒,将其放置在含 4%多聚甲醛的 EP 管中固定 12 h。

冲洗:用干净自来水冲洗蜂卵,每隔 1 h 换一次水,换水时注意防止蜂卵丢失,总换水时间控制在 8 h。

脱水:对蜂卵进行乙醇脱水。采取乙醇浓度逐渐递增的处理方式,即 70%、80%、95%、100%无水乙醇处理蜂卵各 1 h,最后再 100%无水乙醇处理 1 h。

透明:脱水后进行脱水剂置换的透明过程。本试验采取的是二甲苯逐步置换乙醇的方法。无水乙醇:二甲苯(V:V为2:3)处理蜂卵 15 min,然后移除处理液;无水乙醇:二甲苯(V:V为1:3)处理 15 min,然后移除处理液;纯二甲苯处理 10 min,然后移除处理液;纯二甲苯再次处理 5 min,最后用移液枪移除二甲苯。

浸蜡和包埋:由于蜂卵小,整个浸蜡过程在 60℃恒温箱中进行。首先将 60℃的蜡液倒入到装有样本的 EP 管中,浸蜡 30 min;将此 EP 管放置到装有蜡的透明塑料烧杯中,用镊子轻搅 EP 管,保证 EP 管中的样本倒入,静置 10 min;将塑料烧杯中的蜡倒掉,防止样本被倒出,再加入 60℃的纯蜡液,再浸蜡约 20 min;最后将塑料烧杯移出恒温箱。由于样本小,无法将蜂卵样本移至包埋盒进行包埋,直接将恒温箱的塑料杯移出,静置直至冷却成蜡块,从塑料烧杯中取出,修整蜡块进行切片。

切片和贴片:在切片机上固定修整好的蜡块,将样本切成 5 μm 厚的切片,然后摊片、烤片和风干。

HE 染色:HE 染色共分为 3 步,包括脱蜡、脱二甲苯和染色。(1)脱蜡:首先用二甲苯 I 液处理风干切片 15 min,再用二甲苯 II 液处理 15 min。(2)脱二甲苯:用无水乙醇 I 液浸泡脱蜡切片 5 min,用无水乙醇 II 液浸泡 5 min,再依次用 95%、80%、70%和 60%的乙醇各处理 5 min,最后用蒸馏水冲洗 10 min。(3)染色:用苏木精对脱蜡脱二甲苯的水化切片进行 5 min 的染色,再用自来水浸泡洗涤 10 min,注意此过程要缓和,不要将样本冲洗掉。接着用盐酸:乙醇(V:V为1:99)分化 20~30 s,用自来水浸泡洗涤 2 h,蒸馏水浸泡洗涤 2 min,再用伊红染色 3 min,蒸馏水浸泡洗涤 3 min,再分别用 95%乙醇 I 处理 3 min,处理两次,用纯乙醇处理 5 min,也处理两次,最后用纯二甲苯处理 10 min,处理一次。

封片:将树脂胶滴在玻片中的已处理组织上,将盖玻片缓慢地从一端盖在树脂胶上,避免气泡产生,空气中晾干两天后显微镜下观察结果。

1.2.2 脂肪包卵石蜡切片制作及 HE 染色 脂肪包卵后进行固定:取新鲜的猪背部皮下脂肪组织块,切成长 1.5 cm,宽 1 cm,厚 0.5 cm 的小块。将此脂肪块横向切成一端连接的两个小片,在其中一片上挖一个整齐的长方形小室,小室宽度跟卵的长度尽量相等。另一片脂肪像盖子一样盖在小室的上方。这样处理,可使整个脂肪组织块在做固定和其他处理时,里面的卵不会掉出。最后,把卵整齐摆在小室里,卵纵轴与切片时的切面呈平行或垂直状态。要求蜂卵排列整齐,这样可获得整齐的纵向或横向切面的切片。将包好蜂卵的脂肪块放入包埋盒,然后投入到 4%多聚甲醛中固定 12 h^[9]。

冲洗:将固定好的组织块连同包埋盒,一起放入烧杯中进行细微流水冲洗 12 h,冲洗的水流强度以包埋盒微微抖动为宜,幅度过大会引起蜂卵遗失或移位。

脱水:对蜂卵进行乙醇脱水。采取乙醇浓度逐渐递增的处理方式,由于脂肪含水量高,为了脱水完

全将样本放置于70%乙醇中12 h,然后用80%、95%、100%无水乙醇处理样本各1 h,最后再用100%无水乙醇处理1 h。

透明:本试验采取的是二甲苯逐步置换乙醇的方法,透明步骤为:无水乙醇:二甲苯(V:V为2:3)处理样本20 min;无水乙醇:二甲苯(V:V为1:3)处理20 min;二甲苯I处理10 min;纯二甲苯II再次处理一次,这次处理的时间以样本彻底透明即止,最后取出样本进行浸蜡。

浸蜡和包埋:在60℃恒温箱里放置两个装有适量石蜡(约2/3烧杯体积)的烧杯,将烧杯中的石蜡加热至60℃,用镊子将透明好的组织连同包埋盒一起放入其中一个烧杯中,浸泡1 h,将包埋盒移入另一个装有石蜡的烧杯中作用1 h^[10],再将包埋盒打开,对样本进行包埋。包埋时注意将离蜂卵比较近的一端朝下作为切面。

切片和贴片:将修整好的蜡块固定在切片机上,进行切片,切成3~5 μm厚的切片。然后摊片,烤片,风干。

HE染色和封片:染色和封片过程与常规石蜡切片制作的HE染色方法相同。空气风干后显微镜下观察。

1.2.3 蜂卵的冷冻切片制作及HE染色^[11] 蜂卵的固定:将蜂卵放入4%多聚甲醛中,固定12 h。

脱水:将卵移入20%蔗糖溶液,4℃下脱水12 h。

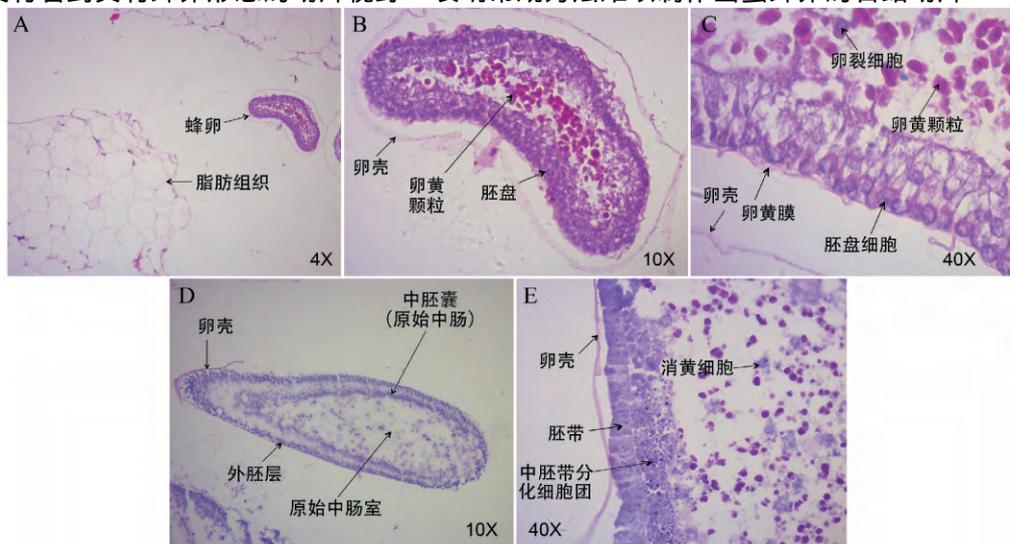
冷冻切片的制作:在包埋盒里用OTC包埋剂将蜂卵包埋,将包埋盒放入预冷至糊状的异戊烷中直至冷冻,即可切片。以异戊烷作为媒介的目的是防止蜂卵内形成冰晶。使用冷冻切片机对包埋块进行切片,切出5~7 μm厚的切片,空气风干备用。

HE染色和封片:用苏木精对切片进行5 min的染色,再用自来水浸泡洗涤10 min,接着用盐酸:乙醇(V:V为1:99)分化20~30 s,用自来水浸泡洗涤2 h,蒸馏水浸泡洗涤2 min,伊红染色3 min,蒸馏水浸泡洗涤3 min,再分别用95%乙醇I和II处理两次,每次3 min,用纯乙醇I和II也处理两次,每次5 min,最后用纯二甲苯处理10 min,处理一次。按前述相同的方法进行封片。

2 试验结果

2.1 常规方法制作石蜡切片

利用常规的制作方法进行蜜蜂卵石蜡切片的制备,共进行了4次制作,每次观察了5张切片,在切片中均没有看到具有蜂卵形态的切片视野。表明常规方法难以制作出蜜蜂卵的石蜡切片。



A、B和C均为脂肪包卵石蜡切片法制作的蜂卵切片,D和E为冷冻切片法制作的蜂卵切片。

A、B and C indicate Honeybee egg paraffin sections made by pig fat enfolding.

D and E indicate honeybee egg sections by frozen section procedure.

图1 脂肪包卵石蜡切片法与冷冻切片法制作的蜂卵切片

Fig.1 Honeybee egg sections made by the methods of paraffin enfolding with pig fat or frozen section procedure

2.2 脂肪包卵方法制作石蜡切片

从图 1A 和 B 中可以看到完整的蜂卵纵切面。从图 1A 中可以看到包裹在蜂卵周边的脂肪组织,并且脂肪组织的组织结构与蜂卵能明显地区分开来。从图 1B 和 C 中可以观察到蜂卵内部有大量染成红色的卵黄颗粒,卵周边的卵壳膜结构、胚盘细胞以及卵内大量卵液营养物质清晰可见。

2.3 冷冻法制作蜂卵切片

从图 1D 和图 1E 中可以看出冷冻切片中的蜂卵整体形态完整,未发生缢缩现象,HE 染的颜色相对较浅,蜂卵中部出现一些空隙,发生了部分卵液的丢失。

3 结论与讨论

经过常规石蜡切片、脂肪包卵石蜡切片和冰冻切片三种方法比较发现,脂肪包卵石蜡切片法能成功地制作出清晰的具有完整形态的蜜蜂卵石蜡组织切片,是一种值得借鉴的适合微小样品的石蜡切片制作方法。

从三种制作蜜蜂卵组织切片方法的结果来看,用常规的石蜡组织切片的制作方法是很难制作出蜜蜂的卵的组织切片的,即使作者想了很多的方法和尝试也很难做到,可能原因有下面几个:(1)蜂卵个体太小,密度低,在常规石蜡切片制作过程中容易漂浮在冲洗液或处理液的表面,而且非常容易被冲洗掉;(2)蜂卵内部卵黄组织多,而且蜂卵的外周壳易破,卵黄组织容易溢出,蜂卵易碎片化;(3)包埋的腊块相对单个蜂卵来说太厚太大,不易切出。

从脂肪包卵法切片的三张图片(图 1A、B 和 C)中,可以看出该方法制作出的切片的组织结构是最清晰的,但是均可以看到蜂卵外壳有一些缢缩现象,这是石蜡组织切片较常见现象^[12-13]。这种缢缩可通过多次试验或操作技术改良,得以改善。此外,小的缢缩不会改变组织内部的形态结构,基本上不影响蜂卵内部组织结构的观察。脂肪包卵石蜡切片法克服了蜂卵微小且易碎裂这样一个较难逾越的障碍。在这个方法中,选择猪脂肪块作为包裹介质,主要有以下几个原由:首先,脂肪块的组织结构非常简单,主要是空泡结构,因此能很容易将包裹其中的卵的组织结构区分开来;其次,脂肪块质地均匀,并具有适度的硬度,在制作装卵的小室时非常容易,能将小室切得比较整齐;再次,脂肪块的抗腐能力也很强,可以为取材争取更多时间;最后,选择猪的背部脂肪主要是因为猪的脂肪层很厚,背部脂肪基本上是均匀的脂肪颗粒和脂肪细胞,肌肉、血管和神经等干扰组织非常少。基于以上的优点,作者选择猪背部脂肪作为脂肪包卵的包裹介质。

冰冻切片可以制作出非常优良的蜜蜂卵的清晰组织切片,并且组织结构也相对比较的完整,相对于石蜡切片的制作而言,冰冻切片的制作非常的简便,不需要对组织进行透明、包埋等手续即可进行切片,减少了一些中间环节,同时很快速,用时短,能够较完好地保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性以及抗原的免疫活性,抗原丢失最少,适合于做免疫组化和常规的切片染色等。但切片较厚,难以连续切片,保存时间短。

脂肪包卵制作石蜡切片的方法,在以前的文献报道中从未见过,是一种良好的新型改良的针对细小样本进行石蜡切片制作方法的尝试,相信对其他微小样品的组织学研究有很好借鉴意义。

参考文献:

- [1] 曾志将.养蜂学 [M].2 版.北京:中国农业出版社,2009:1-5.
Zeng Z J, Apiculture [M].2nd ed.Beijing: China Agriculture Press, 2009: 1-5.
- [2] 郭冬生.蜜蜂应用的相关进展 [J].中国蜂业, 2010, 61(8): 43-47.
Guo D S.Advances in the application of bee [J].Apiculture of China, 2010, 61(8): 43-47.
- [3] Dupraw E J.The honeybee embryo [J].Methods of the developmental biology, 1967: 183-217.
- [4] Fleig R, Sander K.Blastoderm development in honey bee embryogenesis as seen in the scanning electron microscope [J].International journal of invertebrate reproduction and development, 1985, 8(4/5): 279-286.

- [5] Milne Jr C P ,Phillips J P ,Krell P J.A photomicrographic study of worker honeybee embryogenesis [J].Journal of apicultural research ,1988 27(2) : 69-83.
- [6] 张兰 李建科 吴黎明.王浆高产蜜蜂(*Apis mellifera* L.) 卵期发育蛋白质组分析 [J].中国农业科学 2007 40(6) : 1276-1287.
Zhang L ,Li J K ,Wu L M.Profile analysis of the proteome of the eggs of the higher royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) [J].Scientia Agricultura Sinica 2007 40(6) : 1276-1287.
- [7] 房宇 李建科.王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂雄蜂卵期发育蛋白质组分析 [J].中国农业科学 2009 42(7) : 2552-2563.
Fang Y ,Li J K.Comparative analysis of proteome between drone eggs of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) and native italian bees (*Apis mellifera* L.) [J].Scientia Agricultura Sinica 2009 42(7) : 2552-2563.
- [8] 房宇 李建科.意大利蜜蜂(*A. m. ligustica*) 雄蜂卵期发育蛋白质组分析 [J].中国农业科学 2008 41(11) : 3793-3800.
Fang Y ,Li J K.Analysis of developmental proteome at egg stage of drone honeybees (*A. m. ligustica*) [J].Scientia Agricultura Sinica 2008 41(11) : 3793-3800.
- [9] 魏艳华 曾铮.脂肪组织常规切片的改进 [J].临床与实验病理学杂志 2015 31(4) : 467.
Wei Y H Zeng Z.Improvement of normal paraffin section for adipose tissue [J].Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology 2015 31(4) : 467.
- [10] 甘海燕 田柳青 颜伟玉.蜂王卵巢切片及染色技术 [J].蜜蜂杂志 2012 32(2) : 9.
Gan H Y ,Tian L Q ,Yan W Y.The production and dyeing technology of queen bee ovarian sections [J].Journal of Bee , 2012 32(2) : 9.
- [11] 余合林 余晗 杨湘伟 谭云艳.人体体液脱落细胞冷冻切片的可行性分析与临床应用 [J].临床与病理学杂志 2014 , 30(11) : 1311-1312.
Yu H L ,Yu H ,Yang X W ,Tan Y Y.Feasibility analysis and clinical application of frozen section for human body humoral exfoliated cells [J].Journal of Clinical and Experimental Pathology 2014 30(11) : 1311-1312.
- [12] 李璐 李琛.制作小肠组织石蜡切片的改进方法 [J].解剖学杂志 2014 37(2) : 263-264.
Li L ,Li C.Improved method of paraffin section for small intestine [J].Chinese Journal of Anatomy 2014 37(2) : 263-264.
- [13] 蔡新华 郭志坤.石蜡包埋对心、肺和脾组织的收缩影响 [J].解剖学杂志 2002 2(2) : 198-199.
Cai X H ,Guo Z K.Contraction effect on the tissues of heart ,lung and spleen using the method of paraffin embedding [J]. Chinese Journal of Anatomy 2002 2(2) : 198-199.