

透射电镜树脂包埋块中昆虫感受器的定位技术*

张燕如 任利利 骆有庆**

(北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083)

摘要 运用透射电子显微镜技术,可以对昆虫的不同器官上的感受器进行切片观察,以揭示感受器内部的清晰构造,为分析感受器功能提供依据。但目前切片技术中,准确定位不同类型的感受器存在困难。通过将莱卡 md2500 荧光显微镜与日立 S-3400N 扫描电镜结合,确定透射电镜树脂包埋块中的昆虫感受器位置,提高运用透射电镜观察昆虫感受器超微结构时切片的准确性。

关键词 昆虫感受器, 荧光显微镜, 扫描电镜, 透射电镜, 树脂包埋块

Microtomy of insect sensilla embedded in resin blocks for transmission electronic microscopy

ZHANG Yan-Ru, REN Li-Li, LUO You-Qing**

(The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Transmission electronic microscopy (TEM) can be used to examine micro-slices of sensilla located on different insect organs thereby revealing the ultrastructure of each type of sensilla and providing evidence for their function analysis. However, it's difficult to accurately locate different types of sensilla by microtomy for TEM. The precise location of insect sensilla embedded inside resin blocks was determined using both scanning electronic microscopy (HACHI S3400N) and fluorescent microscopy (Leica md2500). This new method of microtomy of insect samples in resin blocks can improve the accuracy of locating insect sensilla and save research costs.

Key words insect sensilla, fluorescence microscope, scanning electronic microscopy, transmission electron microscope, resin block

昆虫感受器是感受器官的结构和功能单位,是对周围环境和内部各种刺激产生反应的重要结构(许再福, 2009)。研究昆虫感受器的超微结构是探索昆虫行为的基础。常用的研究手段有扫描电镜和透射电镜。目前透射电镜的修块过程过于粗放,多在光学显微镜下“盲切”,导致无法准确观察到重要的感受器类型。作者经过探索,发现利用荧光显微镜可观察到树脂包埋块中昆虫感受器外观,根据扫描电镜图片与荧光显微镜图片对照,可定位树脂块中的昆虫感受器。

1 材料来源

技术演示均以采自宁夏灵武市郊区的柠条绿虎天牛 *Chlorophorus caragana* Xie & Wang 成虫作

为实验样品。操作时将所用触角和下颚须样品从活体取下后,经 2.5% 磷酸戊二醛(加入 0.06% 吐温)溶液固定 24 h,用磷酸缓冲液(pH7.2)冲洗后;再用 1% 酸 2 次固定,经磷酸缓冲液充分清洗后,再经过乙醇梯度(45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100%)脱水后;最后用国产环氧树脂 618 包埋(张善干等, 1995)。

2 技术与方法

2.1 定位昆虫肢体末端感受器(以柠条绿虎天牛下颚须末端感受器为例)

2.1.1 确定目标感受器位置 通过日立 S-3400N 扫描电镜确定目标感受器的种类和位置。柠条绿

* 资助项目:国家自然科学基金重点项目(30730075);“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD19B07)。

**通讯作者, E-mail: youqingluo@126.com

收稿日期:2013-09-01, 接受日期:2013-09-05

虎天牛下颚须末端呈凹陷状,其内着生有大量的末端感受器(Klowden,2007),并且这些感受器几乎垂直于凹陷表面,本实验以凹陷最前端的感受器群作为目标感受器(图1)。

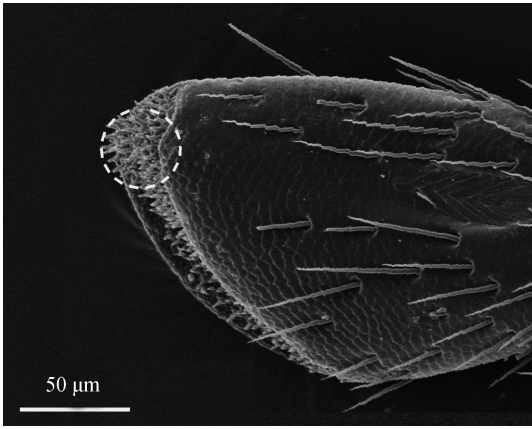


图1 柠条绿虎天牛下颚须第4节,示目标感受器(虚线圆圈内)(400×)

Fig.1 The 4th sub-segment of maxillary palp of *Chlorophorus caragana*, dashed circle shows sensilla twig basiconica (400×)

2.1.1.2 粗修树脂包埋块 在LEICA EZ4D体视镜下用尺子和昆虫针在包埋于树脂块中的样品前划痕,痕迹不可超过或者覆盖目标感受器(图2)。按照划痕进行粗修,将树脂包埋块夹于修块夹上修成平顶的金字塔形,其4个斜面坡度约为45°(陈柏林等,1996)。顶部修成正方形或梯形,使表面光滑平整,修到划痕的后边界,尽量不要超过划痕。

2.1.1.3 荧光显微镜观察拍照 将粗修后的树脂块转移到LEICA md2500荧光显微镜下,进行蓝光拍摄(图3)。调整荧光显微镜的光源从上方照射至样品上,使感受器能够被清晰的观察到,蓝光激发出的绿光更加有利于观察。

2.1.1.4 精确定位目标感受器方法 利用ImageJ(U.S. National Institute of Health)软件测量扫描电镜图片中柠条绿虎天牛下颚须末端第4节宽度(图4:A中双向箭头所示),重复30个,测量平均值为143 μm,从而确定荧光显微镜图片中下颚须宽度(图4:B),利用Adobe Photoshop CS5(Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA)软件制作标尺,计算比例尺。根据公式:目标距离=图上距离

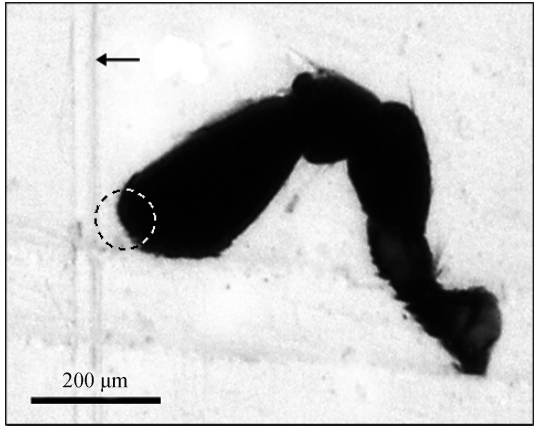


图2 体视镜下位于树脂包埋块中的柠条绿虎天牛下颚须,示样品前划痕(箭头所指)和目标位置(虚线圆圈内)(167×)

Fig.2 Maxillary palp of *Chlorophorus caragana* embedded in resin, black arrow shows the front cut line and dashed circle shows the targeted area (167×)

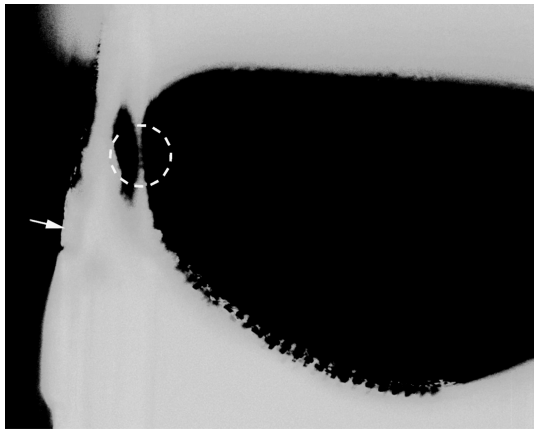


图3 荧光显微镜下树脂包埋块中的柠条绿虎天牛下颚须第4节,示粗修后的树脂包埋块边缘(箭头所指)和目标位置(虚线圆圈内)(400×)

Fig.3 The 4th sub-segment of maxillary palp of *Chlorophorus caragana* under fluorescence microscope, white arrow shows the roughly cut edge of the resin block, dashed circle shows the accurate location (400×)

×比例尺(目标距离为树脂包埋块边缘到达目标感受器的实际距离,图中距离是通过图片测量的像素距离),计算出树脂包埋块边缘到达目标位置

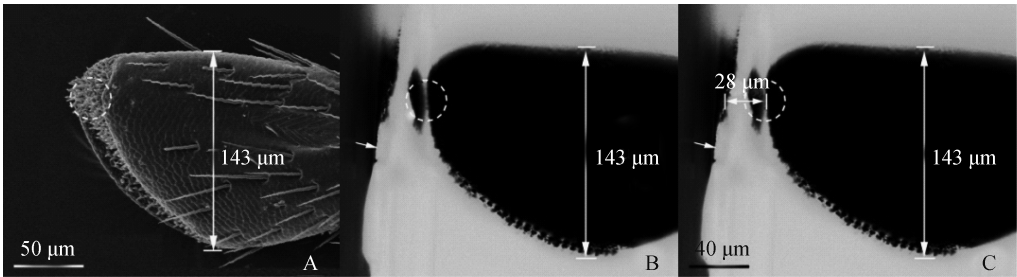


图 4 精确定位目标感受器过程图

Fig. 4 Procedures of the precise sensilla location method

A. 测量扫描电镜图片中下颚须第 4 节宽度 measure the width of the maxillary palp with scanning electronic microscopy image(400 ×);B. 标记荧光显微镜图片中下颚须第 4 节宽度 measure the width of the maxillary palp with fluorescence microscope image(400 ×);C. 测定树脂包埋块边缘到目标位置的距离 mark the distance from the edge of the resin block to the targeted location of maxillary palp sample(400 ×)

注:虚线圆圈位置为目标位置,箭头所指为树脂包埋块边缘。Dashed circles show the targeted location and white arrows point the edge of the resin block.

的距离,为 28 μm(图 4:C)。在超薄切片机中从树脂块边缘开始,连续切割 24 μm 即可到达目标感受器。

2.1.5 效果图 经过精确定位后,得到理想的下颚须末端感受器横切图片,使用日立 H-7500 型透射电子显微镜进行拍摄,从图 5 中可见不同类型感受器的横切面。

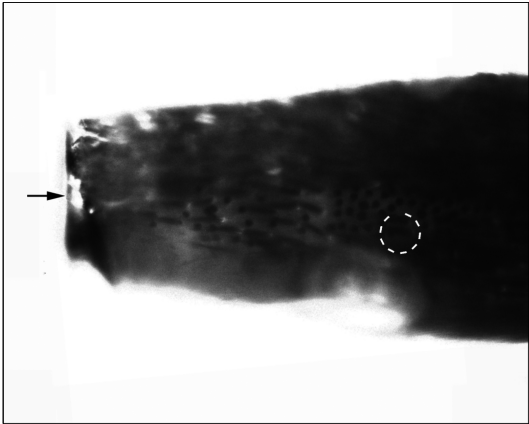


图 7 荧光显微镜下树脂包埋块中的触角鞭节第 9 节内侧面,示腔锥感器所在区域(虚线圆圈内),箭头所指为树脂包埋块边缘(200 ×)

Fig. 7 Surface of the 9th antennal flagellomere under fluorescence microscope, dashed circle shows the targeted location with sensilla coeloconica and black arrow shows the edge of resin block (200 ×)

2.2 定位昆虫肢体上感受器(以柠条绿虎天牛触角上的腔锥感器为例)

2.2.1 确定目标感受器位置 柠条绿虎天牛触角为线形,由柄节、梗节和 9 个鞭节组成。拍摄雌雄虫触角背面、腹面、内侧面、外侧面四个面的扫描电镜图片并进行观察统计。腔锥感器 sensilla coeloconica (SCO)在柠条绿虎天牛雌虫触角上的数量比雄虫多,从鞭节第 5 节到第 9 节均有分布,分布较随机,数量很少,平均每节 5 ~ 8 个。鞭节第 9 节较多,集中分布在触角的内侧面。选取柠条绿虎天牛雌虫触角鞭节第 9 节内侧面中上部的腔锥感器集中分布区为目标位置区域(图 6)。

2.2.2 制作树脂包埋块以及粗修 通过扫描电镜确定目标感受器位置后,在包埋过程中,将目标感受器所在的触角的一侧(柠条绿虎天牛触角的内侧面)向上放入包埋树脂内。在粗修树脂包埋块的过程中,应避免在树脂块上划痕,以免阻碍荧光显微镜观测,根据扫描电镜图像适量粗修树脂块。

2.2.3 荧光显微镜观察拍照 将粗修后的树脂块转移到 LEICA md2500 荧光显微镜下,进行蓝光拍摄,从荧光显微镜图片中找到腔锥感器所在的区域(图 7)。

2.2.4 精确定位目标感受器 利用 ImageJ (U. S. National Institute Of Health)软件测量扫描电镜图片中腔锥感器所在处触角宽度(图 8:A 中双向

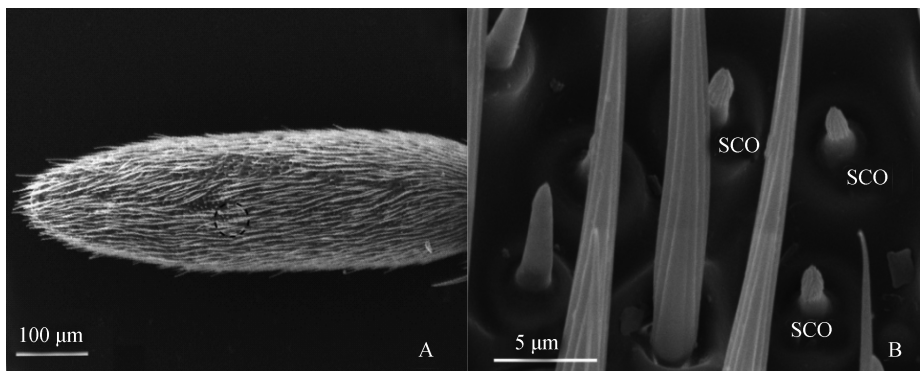


图6 柠条绿虎天牛触角鞭节第9节内侧面腔锥感器(SCO)

Fig.6 Sensilla coelocnica (SCO) on interior side of the 9th flagellomeres of *Chlorophorus caragana*

A. 柠条绿虎天牛触角鞭节第9节内侧面,示目标位置(圆圈内) interior side of the 9th antennal flagellomeres of *Chlorophorus caragana*, white circle shows the targeted area (130 ×); B. 腔锥感器 sensilla coelocnica (SCO) observed under scanning electronic microscopy (5 000 ×).

锥感器的纵切图(图9)。

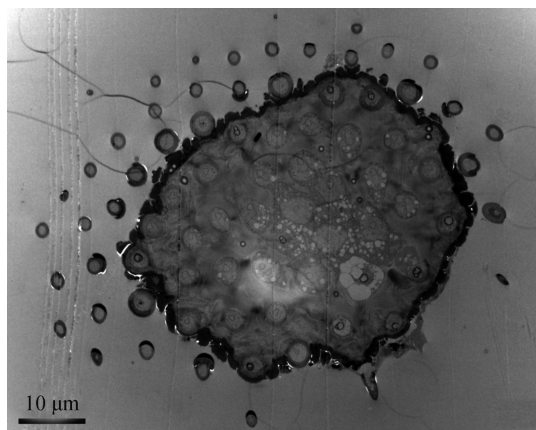


图5 柠条绿虎天牛下颚须末端横切面(1 800 ×)

Fig.5 Cross section of the distal region of *Chlorophorus caragana*'s maxillary palp (1 800 ×)

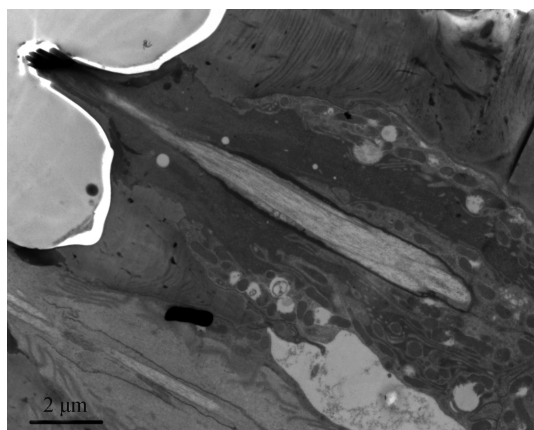


图9 柠条绿虎天牛雌虫触角第九鞭节上的腔锥感器(SCO)纵切面(8 000 ×)

Fig.9 Longitudinal section of sensilla coelocnica (SCO) located on the 9th flagellomere of female antenna (8 000 ×)

箭头所示),重复30个,测量平均值为198 μm,从而确定荧光显微镜图片中腔锥感器所在处触角宽度(图8:B),利用 Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) 软件制作标尺,计算比例尺,利用公式:目标距离=图上距离×比例尺(目标距离为树脂包埋块边缘到达目标感受器的实际距离,图中距离是通过图片测量的像素距离),计算出到达目标位置的距离(252 μm)(图8:C)。在超薄切片机中从树脂块边缘连续切割252 μm可到达目标感受器。

2.2.5 效果图 在精确定位并切片后,使用日立H-7500型透射电子显微镜进行拍摄,顺利得到腔

3 讨论

传统的透射电镜修块方法粗放,多在光学显微镜下“盲切”。作者借助荧光显微镜对树脂包埋块中昆虫感受器定位技术进行了首次探索,较传统透射电镜修块方法,能更加精确的定位目标感受器,减少制样中因无法确定目标位置而增加的工作量,从而降低制样成本。此方法在操作时一定要认真细致。在利用扫描电镜图片中的标尺标

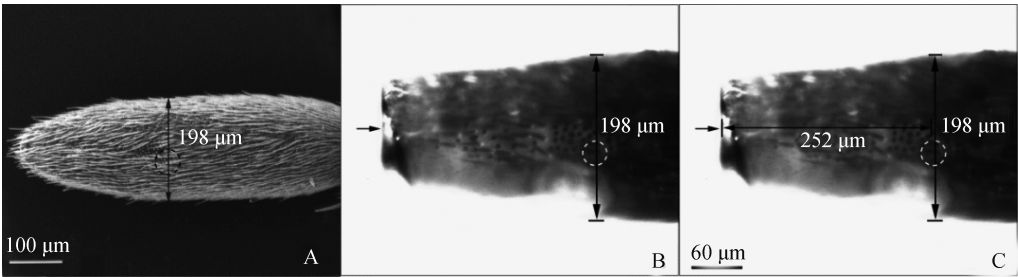


图 8 精确定位目标感受器过程图

Fig. 8 Procedures of the precise sensilla location method

A. 测量扫描电镜图片中腔锥感器所在处的触角宽度 measure the width of the 9th antennal flagellomere with scanning electronic microscopy image (130 ×); B. 标记荧光显微镜图片中腔锥感器所在处的触角宽度 measure the width of the 9th antennal flagellomere with fluorescence microscope image (200 ×); C. 测定树脂包埋块边缘到目标位置的距离 mark the distance from edge of the resin block to the target sensilla location (200 ×).

注:虚线圆圈位置为目标位置,箭头所指为树脂包埋块边缘。Dashed circles show the targeted location and black arrows point the edge of the resin block.

定荧光显微镜下的树脂包埋块时,因不是同一个样品会造成一定误差,因此需要重复测量,提高试验结果的准确性。另外,在超薄切片机中还可边切边在荧光显微镜下查看,渐渐接近目标位置。

建议使用荧光显微镜自带的正版测量软件能够更加便捷的测量目标距离,不需要通过扫描电镜进行数据的转化。另外在没有荧光显微镜测量软件的情况下,可在拍摄视野里放置带刻度的尺子,从而大致测量目标距离。若未来可以将超薄切片机与荧光显微镜结合,我们将实现清晰观察

切割过程,真正做到准确切割目标感受器。

参考文献 (References)

Klowden MJ, 2007. Physiological Systems in Insect, Second Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier. 552 – 553.

陈柏林,洛向玉,王萃,1996. 玻璃刀制备木材超薄切片的研究. 东北林业大学学报,24(3):84 – 89.

许再福,2009. 普通昆虫学. 北京:科学出版社. 75 – 77.

张善干,马淑芳,付宏兰,陈德明,1995. 马尾松毛虫雄蛾触角毛状感受器的细微结构. 昆虫学报,38(1):8 – 12.