

氚标记蜜环菌的研究

兰 进 徐锦堂

(中国医学科学院药用植物资源开发研究所 北京 100094)

李京淑

(中国农业科学院原子能利用研究所 北京 100094)

对蜜环菌进行氚标记、放射性测量和放射自显影结果显示,³H-标记物分布于菌体的各个部位,在培养基中加入³H-葡萄糖标记蜜环菌的方法是可行的。

关键词: 蜜环菌 氚标记 放射自显影

前 言

蜜环菌(*Armillaria mellea* Fr.)属担子菌纲,白蘑科,蜜环菌属,是一种广泛分布的真菌,是天麻生长发育过程中营养来源的主要供给者。应用光学显微镜和电子显微镜研究天麻与蜜环菌的关系已有许多报道,但多限于双方相互作用的形态和解剖特征,对作用双方物质交换尚缺乏深入的研究。为此,我们应用³H-葡萄糖配制培养基标记蜜环菌,通过显微放射自显影观察,分析³H-标记物在蜜环菌中的分布与积累,为进一步研究天麻与蜜环菌的营养关系提供新的研究手段。

材 料 与 方 法

氚标记化合物 ³H-葡萄糖[D-(6-³H)],由中国科学院上海核技术开发公司提供,比活度30Ci/mmol。

菌种标记培养 标记蜜环菌:配制PDA培养基^[3]1000ml,pH5.5,高压灭菌后,在超净工作台上,将培养基分装试管中,每管3ml。25℃放置2d,无菌条件下融化后,加入³H-葡萄糖,分别为50μCi/ml和100μCi/ml,摇匀。用⁶⁰Coγ射线辐照灭菌。25℃再放置2d,确认无杂菌污染。在无菌条件下,用接种铲将蜜环菌菌种接入试管中,25℃条件下培养,20d后转接入树枝培养基。

接种树枝培养基:将1.5~2.5cm粗青杠树枝切成15cm长,上砍鱼鳞口,放入克氏瓶中,每瓶2根,再放15×2.5×2.0cm海棉一块,保湿,加水200ml,高压灭菌后,在无菌条件下,接入³H-标记的蜜环菌,在25℃条件下培养20d后取样。

样品预处理:切取树枝培养的蜜环菌菌索,用流水反复冲洗,用5%EDTA浸洗2min,再

此文于1992年6月20日收到。

用流水冲洗。

放射性活度测量 分别取 2 种剂量标记的菌索,约 1cm 长,加到有二氧六环助闪剂的闪烁瓶中,用 LKB1217 型液体闪烁仪进行悬浮法相对测量。

光镜、电镜样品制备 电镜样品制备:切取数条菌索,长 4mm 左右(^3H -葡萄糖比活度 $100\mu\text{Ci/ml}$),用 0.1mol/L 磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛液固定,在 4°C 条件下固定 24h,用同样缓冲液冲洗 4 次,每次 15min,用 50% 起的系列浓度酒精脱水,在每种浓度中脱水 30min,丙酮过渡。最后用 Epon812 树脂包埋,聚合 72h,聚合温度 $38^\circ\text{C}-45^\circ\text{C}-60^\circ\text{C}$ 。包埋块用 LKB-2088V 型超薄切片机切片,切片厚度为 50nm 左右。

光镜样品制备:切取 $100\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -葡萄糖标记的蜜环菌菌索,长 0.5cm 左右,FAA 固定 24h,常规石蜡切片,切片厚度 $7\sim 8\mu\text{m}$ 。将切片小心地平展于充分洗净的载片上,将载片放入二甲苯溶液中脱蜡,再将脱蜡后的载片经过梯度浓度酒精(由高浓度至低浓度)水化。

放射自显影 电镜放射自显影:先将载有样品的铜网小心地用透明胶条沿铜网边粘贴在小玻璃棒顶端,样品面向上。在暗室红灯下,取定量国产 H_w 乳胶置于经无离子水冲洗过的 25ml 小烧杯中,用无离子水按 1:2~3 比例稀释,并加水杨酸钠溶液(无离子水配制)稀释至乳胶液中水杨酸钠浓度为 0.1%,作为增感剂。在 42°C 恒温水浴中溶化,缓慢搅拌,15min 后,置于冰浴中 3min。取出,在 25°C 条件下,静置 20min。于乳胶涂布箱中,采用金属环法,把液体乳胶轻轻拉成均匀薄膜,套在置于玻璃棒顶端的铜网上,黑暗中晾干,放到备有干燥剂的暗盒内, 4°C 以下曝光 30d。从乳胶配制到乳胶涂布的整个操作过程,均在暗室的安全红灯下进行,严格防止乳胶意外曝光^[1]。

光镜放射自显影的制备:取定量国产核-4 乳胶,置于用无离子水冲洗过的小烧杯中,按比例加入水杨酸钠溶液增感,在 40°C 恒温水浴中搅拌 15min,静置片刻。在恒温恒湿的乳胶涂布箱中,用涂布法加核乳胶膜,黑暗中晾干,置切片于暗盒中,加硅胶干燥剂,密封,置 4°C 冰箱中曝光 15d^[2]。

显影、定影:电镜、光镜切片曝光完毕后,在暗室安全红灯下,用 D-19b 显影液(20°C)显影 3min,水洗,用 F-5 定影液(20°C)定影 15min,再用流水冲洗。

显影后的电镜切片用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,供电镜观察。显影后的光镜切片,用番红-固绿二重染色,加拿大树胶封片。

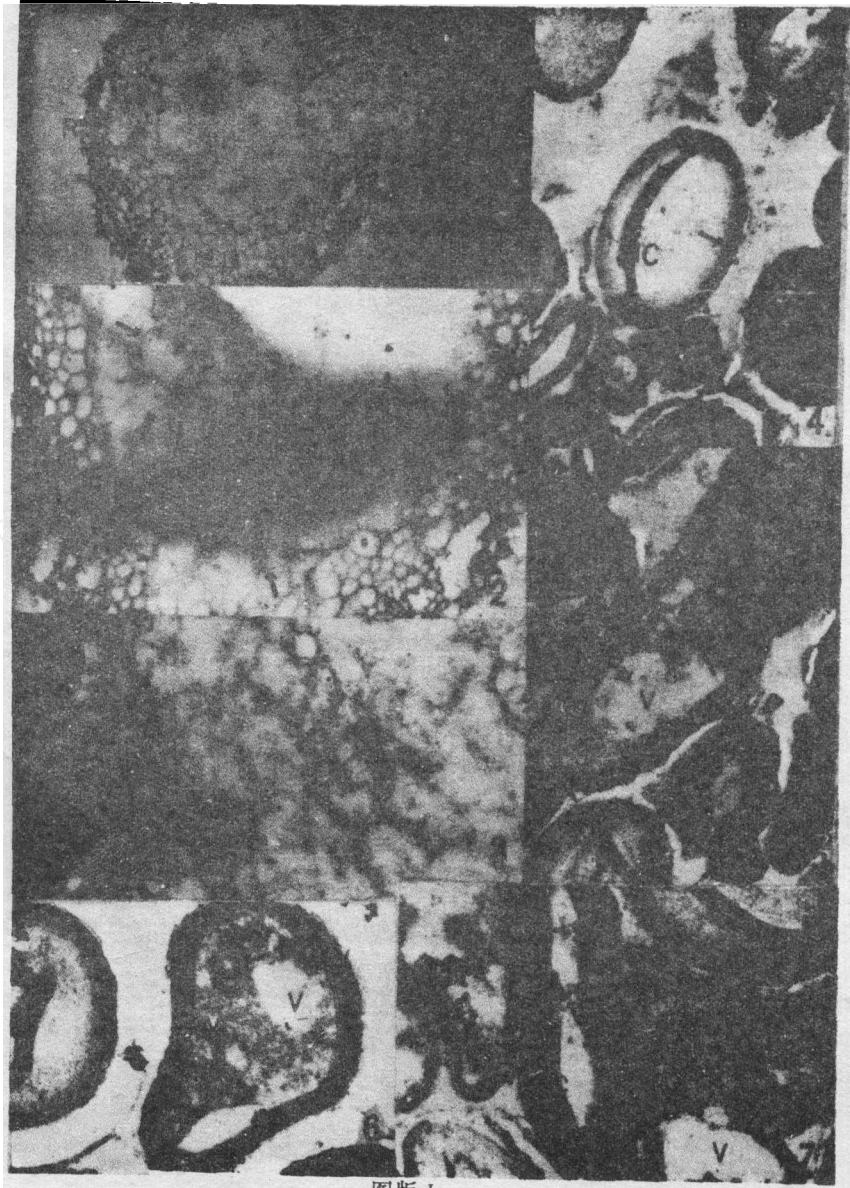
结果与分析

(一) ^3H -葡萄糖标记蜜环菌

不同比活度 ^3H -葡萄糖($50\mu\text{Ci/ml}$ 及 $100\mu\text{Ci/ml}$)标记的蜜环菌菌索,取约 1cm 长测量,结果分别为 680 和 1420cpm,可见蜜环菌能从培养基中吸收 ^3H -葡萄糖,从而使蜜环菌被标记,标记菌索的放射性活度与所用标记物的比活度呈正相关性。实验中采用比活度 $100\mu\text{Ci/ml}$ H -葡萄糖标记的蜜环菌伴栽天麻,蜜环菌侵染天麻后,光镜和电镜放射自显影结果显示,能清晰观察到标记物在天麻体中的分布(试验结果另文发表)。实验证明,在含 ^3H -葡萄糖的培养基中培养蜜环菌,可得到 ^3H 标记的蜜环菌, ^3H -葡萄糖的比活度以 $100\mu\text{Ci/ml}$ 为宜。

(二) ^3H -标记物在蜜环菌菌索中的分布

显微放射自显影结果表明,在菌索的皮层、髓部均有 ^3H -标记物的踪迹(图版 I -1),特别在髓部的疏松菌丝中布满银粒(图版 I -2,3)。在由数层排列较紧密的似植物外皮层的菌索鞘细胞中,银粒较少(图版 I -1 RS 部分),可能由于多数已木质化的菌索鞘细胞把原先积累的同化物以及细胞的内含物转给了生活力旺盛的疏松菌丝。电镜放射自显影观察,可见在菌丝细胞中的线粒体、内质网等细胞器上均有银粒分布(图版 I -4,5,6,7),说明标记物已参与了蜜环菌的生物代谢过程, ^3H 标记物已被带到菌体的各个部位。



图版 I

Plate I

图版 I 说明

1. ^3H -标记物在蜜环菌菌索(R)中的分布:疏松菌丝(LH),菌丝皮层(CO),菌索鞘(RS)。
 2. 图 1 的放大。
 3. 疏松菌丝(LH)的放大。
 4. 疏松菌丝细胞的电镜放射自显影: ^3H 标记物在厚壁细胞(TC)和薄壁细胞(PC)中。
 5. 皮层菌丝细胞的电镜放射自显影:菌丝细胞核(N),线粒体(M),液泡(V)。
 6. ^3H 标记物在薄壁细胞(PC)和细胞壁(CW)中的分布。
 7. ^3H -标记物在疏松菌丝中的分布:内质网(ER)、线粒体(M)、液泡(V)。
1. Tracers distributed in rhizomorph (R) of *A. mellea*: loose hyphae (LH), cortical hyphae (CO), rhizomorphal shell (RS).
 2. Enlarged view of a part of 1-1.
 3. Enlarged view of a part of loose hyphae (LH).
 4. Electron microscope autoradiography of loose hyphae. ^3H -labelled assimilates appeared in sclerenchmatous cell(TC) and thin-walled cell(PC).
 5. Electron microscope autoradiography of cortical hyphae. Nucleus of hyphae (N), mitochondrium (M), vacuole (V).
 6. Tracers distributed in the thin-walled cell (PC).
 7. Tracers was found in loose hyphae. Silver grains appeared in endoplasmic reticula (ER), mitochondrium (M) and vacuoles (V).

参 考 文 献

- 1 刘鼎新.放射自显影技术.北京:科学出版社,1986
- 2 李京淑等.植物显微自显影及双标记彩色自显影技术的应用研究.植物学通报,1988,5(3):187~191
- 3 杨云鹏等.中国药用真菌.哈尔滨:黑龙江科技出版社,1981,94

STUDIES ON *Armillaria mellea* Fr. LABELLED WITH ^3H -GLUCOSE

Lan Jin Xu Jintang

(Institute of Medicinal Plant Development,
Chinese Academy Medical Sciences, Beijing, Beijing 100094)

Li Jingshu

(Institute for Application of Atomic Energy,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)