



茯苓单孢子分离技术*

余元广 胡廷松 梁小苏 潘素芬

(广西壮族自治区医药研究所, 南宁)

真菌的单孢子分离和培养是菌种纯化、定向培育和细胞杂交的重要手段。单孢子分离方法很多, 有的方法比较准确和现代化, 但设备要求较高, 如使用显微操作器, 价钱昂贵且尚需进口。而另一些方法如稀释法、滴定法等较简单, 但其准确性常因使用者的习惯和熟练程度而异。我们在茯苓单孢子培养和交配试验中, 采用的微型玻璃毛细管针吸孢法, 具有分离单孢子选择性强、避免盲目性、速度快的优点, 熟练者每小时可挑选 20—35 个单孢子。

改制的单孢分离器主要由操作器和微型毛细管针两个部件组成(图 1)。现将制作和操作方法介绍如下。

上烧灼和封口, 然后吹薄并拉长至 6—7 厘米。玻管在口中缓慢转动, 吹出一个玻璃壁厚薄一致的玻璃球, 再用镊子均匀拉成口径 2 毫米粗细的针管。

2. 细拉: 把口径 2 毫米粗的玻璃管再吹拉成径粗 0.5 毫米至 0.1 毫米的微型薄壁毛细管针(管尖口径约 30—40 微米, 管壁厚 1—2 微米)。欲达此目的, 需具备一盏灯芯很细的小酒精灯, 灯芯由 1—2 根棉纱线组成。火焰浅蓝色, 小如芝麻。先将粗拉成的针管在火焰上封闭管口, 边吹气边在口中缓慢转动玻管, 然后用烧灼的小玻璃针粘着毛细管球末端, 离开火焰迅速拉成丝, 成纺锤丝状(图 2)。

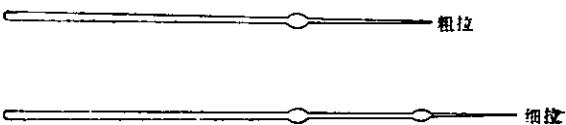


图 2 毛细管针示意图

3. 弯针: 在针尖 5 毫米处于小火焰 3—4 厘米上方略微加热, 针头变软, 利用重力作用弯成 90° 即成。

二、单孢分离器

把一台普通显微镜的镜筒拆去, 留下底座和聚光器调节升降螺旋, 装上略加改进的纵向和横向移动尺。移动尺的另一端装上固定玻管的圆柱体, 可作圆周转动, 以便装卸管针。

三、湿室制备

把口径 22 毫米粗的试管截成长 18 毫米的

* 彭治章同志绘图, 特此致谢。

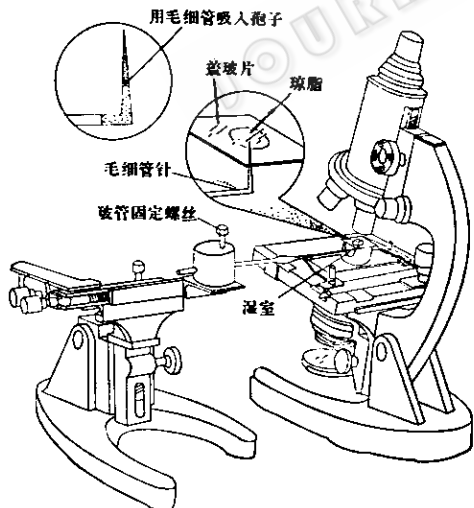


图 1 改制的单孢分离器示意图

一、吹拉毛细管针

1. 粗拉: 把一支长约 12 厘米, 径粗 6—7 毫米的空心玻璃管的一端(约 2 厘米), 在喷灯

环圈,放在载玻片中央,用蜂蜡固定(图 3)。

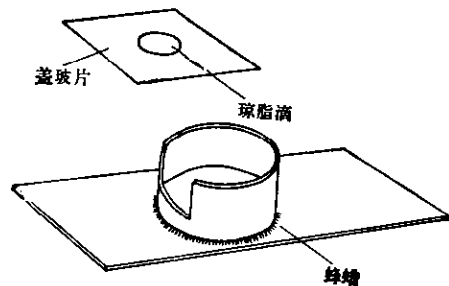


图 3 人工湿室示意图

四、制备孢子悬浮液

在无菌室内,将收集的孢子堆用无菌水稀释成每视野 5—10 个孢子左右(150 倍显微镜)浓度的悬浮液备用。

五、操作步骤

1. 调整单孢分离器与显微镜间的距离。在圆筒柱装上毛细管玻璃针并调节至以能灵活进

出湿室为度,把针头对正视野。

2. 将 1.8% 琼脂液滤去杂质,经高压灭菌后放在 80℃ 热水浴中备用。将琼脂液滴在盖玻片上略加展开,凝固后,在琼脂层上滴孢子悬液,倒置于湿室上。

3. 滴孢子液后 1—2 分钟,琼脂把一部份水分吸收,孢子被吸附在琼脂表层的水膜中,这样,孢子不容易流动,当毛细管吸入一个孢子时,相邻的孢子不会被一同吸入毛细管口。操作时先把要挑取的孢子对正视野,先在 5 倍接物镜(75×)视野下调节针口与欲挑取的孢子同位,然后在 10 倍接物镜(150×)视野下吸单孢。吸单孢时动作要轻巧,以免针口陷入琼脂层而被堵塞。吸入单孢,立即小心旋出毛细管针。

4. 取下吸有单孢的毛细管针,用 5 毫升注射器挤出毛细管内的单孢。针头基部垫胶片,以防漏气。注射挤出单孢时,要轻推注射筒,把单孢悬液注在琼脂圆块表面,然后用不锈钢小铲将琼脂块移入试管斜面培养。