

真菌前处理方法

真菌的菌丝很细，往往由单层细胞组成，且含水量很低，非常容易失水变形。配备冷冻传输系统的扫描电镜或环境扫描电镜，可以直接将新鲜真菌样品，上机观测。如果没有冷冻传输系统和环境扫描电镜的实验室，就需要自行制样。

具体方法有以下几种。

1、真菌爬片法：

在固体培养基表面，斜插一片盖玻片，如果有导电硅片更好，让真菌菌丝自然爬到玻片上。取下玻片用双面导电胶带固定于扫描电镜样品座上，离子溅射仪上喷金（Pt 或 Au）后，上机观测。一般老的菌丝会变形，新长出的菌丝比较饱满。

2、真菌锇酸熏蒸法：

真菌菌丝带培养基一起，放在一个密闭器皿中，用 2% 的锇酸溶液熏蒸 3-20 h 不等。熏蒸完毕后，粘样，喷金，扫描电镜观测。

3、附着在植物组织上的真菌，常规脱水观察法：

真菌附着在植物组织上会形成明显的病斑，将病斑部位切下，置于 2.5% 的戊二醛溶液中，室温固定 4-6 h，磷酸缓冲液冲洗 3 遍，每次间隔 30 min，丙酮系列脱水（体积分数为 30%，50%，70%，80%，90%，100%），每次 30 min，其中 100% 丙酮 2 遍，叔丁醇置换 2 次，每次 30 min，冷冻干燥仪冻干，粘样，喷金，上机观测。

4、玻片培养、扫描电镜观察法（一）^[1]：

将消毒的铜圈用石蜡固定于载玻片上，顶部固定一个消毒盖玻片，将熔化的玉米粉琼脂，通过小孔注入铜圈内，作成斜面，接种菌种，孵育一定时间（可在光学显微镜下观察菌丝生长状况）。

培养完成后，将附有真菌的盖玻片取下，浸入 2.5% 戊二醛固定液中，4°C 固定 2 h，磷酸缓冲液冲洗 2 遍，再浸入 1% 锇酸中固定 1-4 h。冲洗后系列丙酮或酒精梯度脱水，叔丁醇置换，冷冻干燥法冻干（方法同上）。粘样，喷金，上机观测。

5、玻片培养、扫描电镜观察法（二）^[2]：

将 PDA 固体培养基溶化，使之呈液体状态，并保持 50-60°C 的温度；用镊子

将无菌盖玻片夹起，轻轻浸入溶化的 PDA 培养基中，并迅速抽出，在盖玻片上就会粘一层很薄的培养基薄膜，片刻即凝固；将盖玻片水平移入含有无菌的 2% 固体琼脂的平板表面，在一个平板中最多可放置 4 块盖玻片，但要注意不要使它们相互叠压。2% 固体水琼脂可起“湿室”的作用，提供真菌生长期间所需的湿度。用接种针在附有培养基薄膜的盖玻片中央接种真菌。以上各步骤在无菌条件下进行。盖上皿盖，将平板倒置，28°C 恒温箱中培养。

菌种成熟后，取下盖玻片，在 4°C 冰箱中用 2% 戊二醛固定 2 h；PBS（磷酸缓冲液）洗 3 次，每次 10 min；再浸泡于 1% 铬酸溶液中，4°C 下 2 h 左右；用 50%、70%、95%、100% 系列乙醇脱水，各 10 min，其中 100% 乙醇 2 次，叔丁醇置换，冷冻干燥，粘样，喷金，上机观测。

参考文献：

- [1] 王端礼, 李若瑜, 王晓红, 王书合. 改进的扫描电镜真菌标本制作法. 北京医科大学学报. 1988. 20(1): 26-27
- [2] 韩利刚, 聂宏俊. 真菌的盖玻片培养就扫描电镜片的制作. 南京军医学院学报. 1999. 21(3): 165-167