

用蔡司滑動操縱器作酵母菌單細胞分離 及子囊解剖並分離單孢子的方法

施 履 吉 吳 瓊 發*

(中國科學院實驗生物研究所北京實驗室)

酵母菌是工業上重要的微生物之一。我國在這方面的工作正在開展。在酵母菌的工作中如優良品系的選擇或品種間的雜交,常應用單細胞及單孢子分離的方法來培養。

酵母菌的分離方法,正如其他微生物一樣,大體上可分為兩種:“即稀釋平皿”和“懸滴顯微操縱法”。後者應用機械操作,在效果上有高度的準確性,尤其在雜交工作上用顯微操縱法更為必要。所以過去許多學者都廣泛採用這種方法。例如 Lindegren^[1] 就用 de Fonbrune 顯微操縱器作酵母的雜交工作; Косиков^[2] 就採用 Péterfi 顯微操縱器來作分離和雜交工作; Wingel^[3] 就用滑動型顯微操縱器作雜交工作。

我國實驗室的顯微操縱器大都是蔡司公司出品的滑動型 (Zeiss Gliding micromanipulator)。這種操縱器雖有一些現代操縱器的優點,例如具有單一的操縱桿,可是它原有的附件,有的不適用於我國大部分的情況,有的不適用於酵母的工作,而且缺少這類工作上某些必要的條件。然而如自製一些附件,它亦可有效地用於酵母菌的單細胞分離、子囊解剖、單孢子的分離、以及雜交的工作。本報告總結我們的一些經驗以供國內有關工作者參考。雖然這些技術是爲了操作酵母菌而設計的,但對於其他類似的工作,例如細菌的分離等也可直接適用或略經改變後即可適用。

附件及其製造方法

(一) 濕室 蔡司滑動操縱器附有的濕室很不適用於酵母的工作。它主要的缺點是可操作的範圍太小,和只能應用一塊蓋玻片。這在酵母的分離操作上會引起極大的不便。因此有設計一種適用的濕室的必要。我們設計成的濕室很爲適用。它是用玻璃片和加拿大膠製成的。它的形狀大小如圖 1 所示。它的頂部大小正適合於置放兩塊 22×22 mm 的蓋玻片,其底部大小正適合於蔡司公司出品的移動器 (Mechanical stage)。關於後一點是非常重要的,因爲在顯微操縱時移動濕室與移動微針的動作是同樣重要的。如濕室底部過大則濕室易於滑出移動器而造成種種工作中的事故,如底部過小則減少濕室頂部可作操縱的活動範圍。濕室的高度是根據一般顯微鏡聚光鏡而設計的。一般顯微鏡聚光鏡的數值口徑是 1.2 的。如除去聚光鏡上部的透鏡,再調節聚光鏡的位置 (上下移動) 可將光照的焦點照射在這種濕室上的蓋玻片上。

1957 年 5 月 20 日收到。

* 從中國科學院菌種保藏委員會來本所進修的同志。

濕室兩側底部的橫條(c)的高度約1毫米。它們是用來防止濕室內水分外溢的。在必要時,如蓋玻片上懸滴容易蒸發乾燥時,可在這兩橫條間加入蒸餾水。

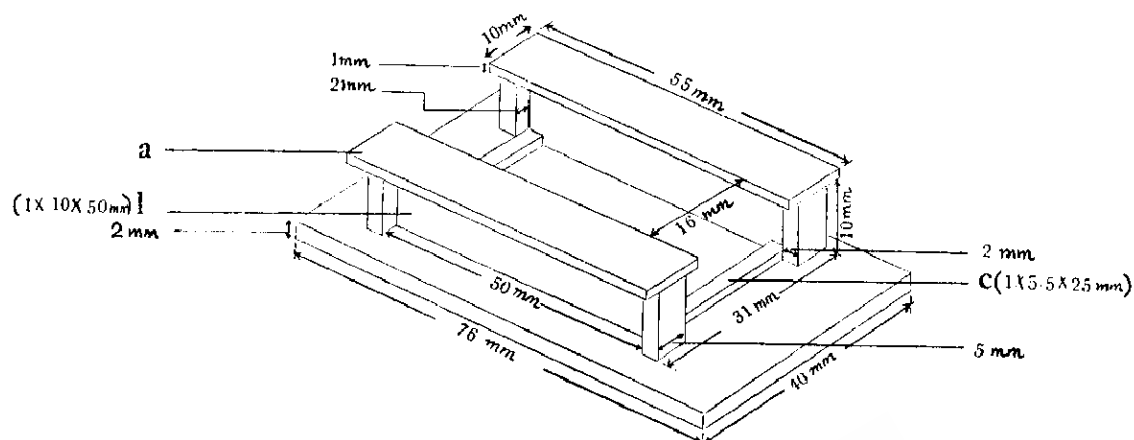


圖1 濕室的構造。

a, 頂部橫條; c, 底部橫條; l, 兩側縱條。

濕室兩側的縱條(l)與濕室頂部橫條(a)形成兩片空間。這是預備置放濾紙條的。在操作時在此部分置放濾紙條並加入蒸餾水使它們飽含水分。這樣可以保持濕室的濕度免得懸滴太易乾燥。

(二) 製針的附件

1. 微燈 我國的都市大多沒有煤氣的供應。蔡司的微燈是用煤氣的,因此很不合我國一般的條件。而且蔡司微燈非常高,製針時很不方便。我們設計了一種小型酒精燈,經一年多的應用,感到非常滿意。它的形狀和大小如圖2所示。這種微燈高度不可太大。過高酒精不易上昇。微燈的燈蕊是由一根細棉綫穿在一根毛細管內構成的。毛細管插在軟木燈塞上。燈塞的一邊須要一個缺口通入酒精燈內。這缺口非常重要,否則容易造成事故。這種微燈的火焰非常細小,可以供作製造極為纖細的微針之用。

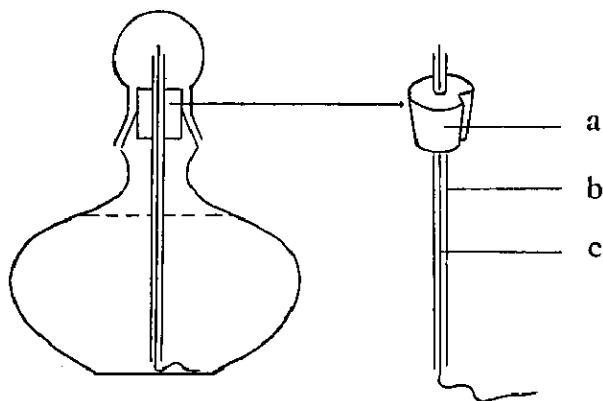


圖2 微燈的原形和大小。

a, 軟木燈塞; b, 毛細管(稍為放大); c, 棉綫。

2. 電熱器 電熱器的構成部分有以下各種:(1)白金絲(直徑約0.3毫米,長約3厘米);(2)解剖針幹(或稱骨髓針柄)兩根(北京中國醫藥公司出品);(3)橡皮管套條。每條長約4.5厘米,內直徑約6毫米;(4)蔡司針頭負載棒一根;(5)變壓器(由220 V.A.C.到0—8 V.A.C. 3—5 A可調變壓器)。

由熱器的裝置如圖3所示。在裝置時將兩根解剖針幹電木部分的後端套上橡皮管。蔡司針頭負載棒的前端亦套上橡皮管。然後如圖3所示,用細鉛絲將解剖針幹和蔡司針

頭負載棒在橡皮管部位一道捆紮。再將解剖針幹的金屬部分各結紮一根絕緣電綫。電綫的另一端則聯接在變壓器的 0—8 V. A. C. 的一端。如是電熱器的主要部分已大致就緒，所剩的就是加熱的白金絲。

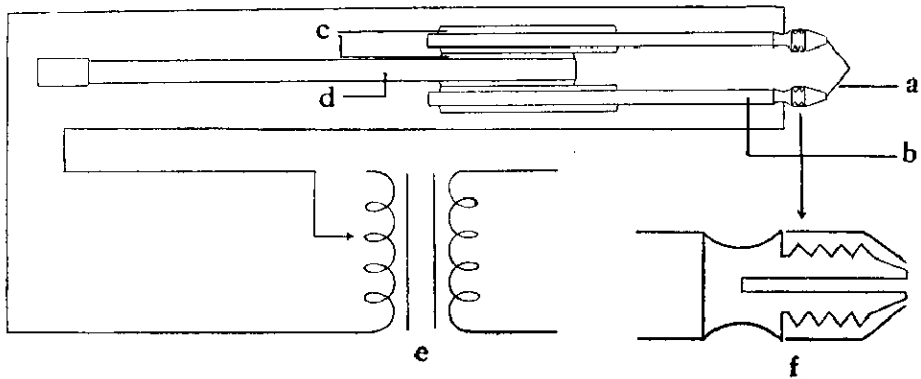


圖3 電熱器的構造。

a, 白金絲; b, 解剖針幹; c, 橡皮管; d, 蔡氏針頭負載棒; e, 可調變壓器; f, 解剖針幹頭部放大。

加熱的白金絲需彎成 V 形。在製造極精細的微針時需要非常細的白金絲。但如白金絲過細非但不易固定在解剖針幹的頭上而且容易彎曲。在此時可將 V 形白金絲的尖端鎚扁。可是在製造作酵母菌工作的微針時則不需要如此。將變成 V 形的白金絲的兩臂末端插入解剖針幹頭部，將頭部螺旋旋緊即成。

在使用時將蔡司針頭負載棒無橡皮的一端裝置在操縱器上。白金絲的溫度可用調壓變壓器調節電壓來變換。

在製造微針時所用的接物鏡是蔡司的 3 倍鏡。

現在在作者實驗室內所用的電熱器固定白金絲和通電流的部分是用黃銅和耐熱塑料製成的。因一般實驗室沒有附屬工場，所以關於這一點在此從略。

3. 載針管 蔡司操縱器載針附件包括兩個部分：載針頭和針頭負載棒。前者是裝在後者頭部的。可是載針頭不能固定一般的微針，而需要一個較粗的載針管。這種載針管是用玻璃管拉成的。它的外徑約 1.5 毫米，內徑約 1.0 毫米，長約 5.5 厘米。微針插入此種載針管並用蠟固定後再插入蔡司載針頭。

微針的製法

在分離及解剖的操作中主要應用兩種微針，即直角平頭針和環形針。現在將這些針的製法敘述於後。

(一) 直角平頭針

1. 長頸直角平頭針 長頸直角平頭針的形狀如圖 4 所示。這種針的平頭是在顯微鏡下用蔡司操縱器和電熱器拉成的。它們亦可用手和簡單的工具製造，可是沒有在顯微鏡下製造的好。用操縱器製造時可選取直徑約在 1 毫米左右的毛細管一段，在微燈火焰上燒溶如圖 5a。從火焰中取出後，當玻璃尚在溶態時，將毛細管拉成圖 5b 所示的形狀。拉時兩手須平行。然後再將它在火焰上方約 1 厘米左右（視火焰大小而定），拉成如圖 5c 所

示形狀。在中央截斷後就得兩根具有實心幹的微針半成品。將這種針安裝在載針管上用蠟固定，裝在蔡司載針頭及針頭負載棒上，而最後安裝在右方的操縱器上。電熱器則裝置在左方的操縱器上。移動微針和電熱器的白金絲到顯微鏡的視野之下，調節變壓器加熱白金絲。白金絲加熱後將微針輕輕與白金絲接觸。此時如白金絲溫度恰當，微針的頂端即溶化在白金絲上（要預先加上少量玻璃在白金絲上，然後再將微針頂端溶化）。當移動操縱器拉成長頸時，立即將電路關閉。如是白金絲因冷卻而收縮，就會將針端拉斷成一平面。有時如針幹太粗、白金絲收縮不能將針端拉斷時，可用操縱器微微拉動針端即可截斷。在顯微鏡下製造這種微針的過程大致如圖 6 所示。

微針頂端平面形成後，將載針管和微針取下。在微燈火焰上方離火焰約 1 厘米左右的地方，用金屬解剖針在所需的部位將微針彎成直角如圖 4 所示。



圖 4 長頸平頭針。

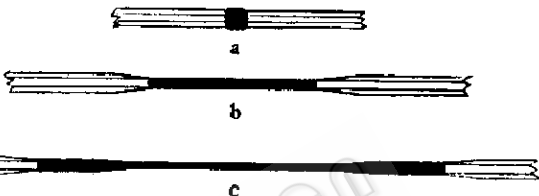


圖 5 手製實心幹的過程。（黑色示實心幹）

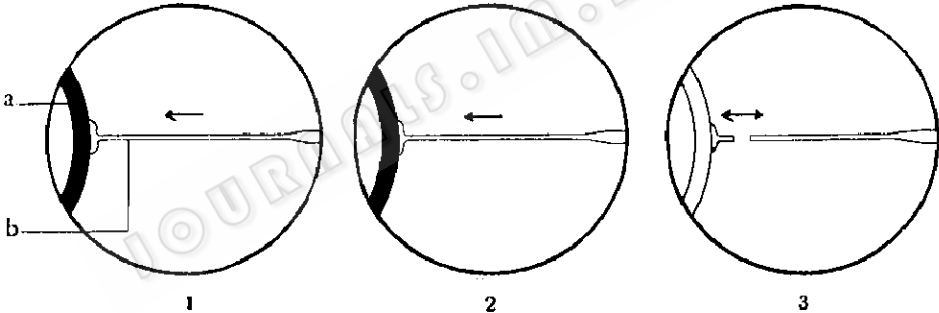


圖 6 顯微操縱器製造平頭針的過程。

a, 白金絲（黑色示灼熱狀態，白色示冷卻狀態）； b, 微針。
箭頭表示微針運動的方向。

長頸直角平頭針的彎曲部分（頸部）比較細長。在某些操作上需要短頸直角平頭針。可是短頸在顯微鏡下製造比較方便。

2. 短頸直角平頭針（圖 7） 製造短頸直角平頭針的最初步驟和長頸平頭針一樣。當具有實心針幹的毛細管製成並安裝在操縱器上後，將微針和白金絲移到顯微鏡的視野下。將具有少量玻璃的白金絲通入電流，調節溫度。白金絲的溫度須要相當的高。移動操縱器使微針與白金絲接觸。在與微針長軸成直角的方向將微針移動拉成所需的直角針。移動的速度需看白金絲的溫度和微針端頭的粗細等因子而定。一般說來，宜慢不宜快。工作者試製幾次後就可得心應手製成所需粗細長短適合的頸部。在頸部拉成後隨即關閉電路，停止加熱。如微針不太粗大，白金絲冷卻收縮就可拉斷針頂端使成平頭。如白金絲收縮不能拉斷微針時，可微微拉動它就能拉斷成平頭或近平頭。

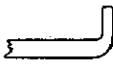


圖 7 短頸直角平頭針。

(二) 環形針 (圖 8)

製造環形針的方法最初亦如長頸直角平頭針,不過實心針幹比較纖細。在將微針和電熱器白金絲移至顯微鏡視野以後,即調節電熱器白金絲的溫度。製造環形針是需要玻璃軟化的溫度而不使它溶化的溫度。因此,最好先將白金絲的溫度調節到最低點。每加一次溫度,即用微針與白金絲輕輕觸碰,察看微針頂端是否可以彎曲。如能彎曲、而白金絲又不黏着,就是白金絲已到適合彎曲微針的溫度。此時即間斷地將針端在白金絲上觸碰,逐步將針端彎成環狀。在顯微鏡下製造這種針的過程大致如圖 9 所示。

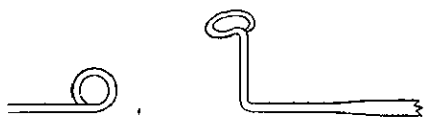


圖 8 環形針及直角環形針。

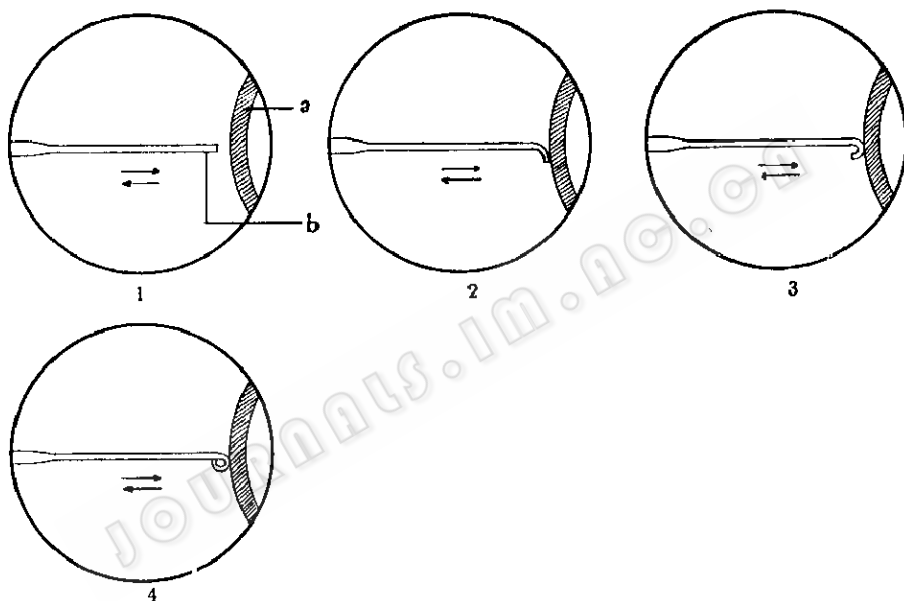


圖 9 顯微操縱器製造環形針的過程。

a, 白金絲 (斜綫部分示中度的熱狀態。)

箭頭表示微針往復運動的方向。

環狀針端製成後再用製造長頸直角平頭針的方法在微燈火焰上方用金屬針將針幹彎成直角。這種針尤其適合於細菌的單細胞分離。

微 針 的 清 洗

微針如因放置太久或經使用變成污穢,可先將微針浸在濃硝酸內一夜,然後用蒸餾水浸洗數次。一般經這樣處理後的微針就可清潔。如尚未清潔可以同法反復舉行數次直至微針清潔為止。

有關酵母菌的操作

(一) 操作前的準備

(1) 器材: 在分離或解剖子囊時所需器材如下: 1. 凡士林——作黏着蓋玻片於濕室

上之用; 2. 濾紙條——作保持濕室濕度之用, 長 50 毫米, 寬 9 毫米; 3. 蒸餾水一小瓶, 保持濕室濕度之用; 4. 吸管——作為移蒸餾水於濕室之用, 大口末端塞棉花少許; 5. 蓋玻片鑷子——移動蓋玻片之用; 6. 移菌耳——用白金絲或其他合宜金屬絲製, 作移菌用; 7. 固體和液體培養基; 8. 微針。

(2) 消毒: 濕室及微針必須用紫外光消毒, 因為濕室是用加拿大膠黏合起來的, 不耐高溫高壓, 微針非常纖細用高溫高壓非常不便。這些器具都用紫外光照射 30 分鐘。蓋玻片吸管和蓋玻片鑷子用乾燥高溫消毒。蒸餾水、濾紙條、培養基以及凡士林則用高壓蒸氣消毒。

(3) 裝置工作: 在進行操作之前在不被沾污的情況下將消毒的濾紙條插在濕室的兩旁 (圖 1:a 之下)。在濕室上覆蓋兩塊消毒蓋玻片。將這整套的濕室安裝在顯微鏡下, 用聚光鏡調節焦點在蓋玻片上。用消毒的吸管將消毒的蒸餾水放在濾紙條上和濕室的底部 (圖 1 兩條 c 之間)。此後安裝微針並將微針移至顯微鏡視野之內。另取兩塊消毒的蓋玻片, 其中一塊置放液體培養基和酵母菌懸浮液, 另一塊則置放消毒的瓊脂滴或液體培養基, 視實驗目的而定。用這兩塊蓋玻片將以前兩塊換下。蓋玻片具有懸滴的一面向下。至此操作的準備工作即告完成。

(二) 單細胞分離的操作

用直角平頭針或環狀針在酵母懸滴邊緣, 藉着顯微鏡台上的移動器或操縱器移動, 將一個細胞移至水滴外, 使針頭附着適當水量而後用操縱器粗動作的昇降控制器將針尖迅速下降, 細胞即附着在針尖上。不管直角平頭針或環狀針, 針頭必須比所需要攫取的細胞稍大, 而且針頭上必須有適當的水量才能把細胞附着。經幾次操作後初學的人即能具有必要的經驗而能自如地攫取細胞。

在細胞附着於針尖上以後, 用顯微鏡台上移動器將具有無菌培養懸滴的蓋玻片移到顯微鏡的視野內。將針頭上升把細胞置於指定的懸滴內。如是同前再攫取細胞。當必要數目的細胞分離後可將具有被分離出細胞的蓋片取下另行培養, 例如放置在潮濕消毒培養皿內等細胞分裂到相當數目後再取出培養。必要時在取下蓋玻片之前可用紫外光將蓋玻片向上的一面消毒。因紫外光能透過普通玻璃的能力微弱, 所以分離的細胞不會受此消毒的影響。

(三) 子囊解剖操作法

用直角平頭針或環形針在酵母懸滴邊緣將一個子囊孢子移到懸滴外, 俟水滴稍乾後, 即將針尖輕輕觸及子囊並用顯微鏡台上的移動器移動濕室, 如針尖在子囊上的壓力適宜時, 子囊即行破裂, 孢子就脫出子囊。以後用針尖帶一小滴培養液至孢子處。用單細胞分離操作的方法將孢子一一取出移置在無菌的培養懸滴內。

參 考 文 獻

- [1] Lindegren, C. C.: The yeast cell, its genetics and cytology. Educational Publishers. Inc. St. Louis, 1949.
- [2] Косилов, К. В.: Генетика дрожжей и методы селекции дрожжевых Культур. Изд-во АН СССР, 1954.
- [3] Winge, Ö. and C. Roberts: Compt. Rend. d. Lab. Carlsberg, Sér. physiol., 25:288, 1954.

A METHOD FOR DISSECTING YEAST ASCI AND ISOLATING SINGLE YEAST CELLS BY MEANS OF A ZEISS SLIDING MICROMANUPULATOR

SZE, L. C. and WU, C. F.

(Peking Laboratory, Institute of Experimental Biology, Academia Sinica)

A method for dissecting yeast asci and isolating single yeast cells in a hanging drop by means of a Zeiss sliding micromanipulator is described. The operation is carried out inside a moist chamber made of glass with one of the specially designed micro needles described in this paper. These needles are of two kinds. One of them is bended 90 degrees near the tip and cut square at the end. The other has a fine loop at the end. They are made of fine glass rods and prepared by means of the same Zeiss sliding micromanipulator used for dissection and isolation and a set of simple accessories (consisting of a variable transformer, a filament holder, and a piece of platinum wire) under a microscope. The fine glass rod is prepared by hand over a tiny flame of a small alcohol burner which is designed particularly for the present purpose.