doi:10.12301/spxb202300148　　文章编号:2095-6002(2024)03-0147-12
引用格式:王盈, 刘丽娅, 朱捷, 等. 基于高压辅助处理的青稞籽粒电镜观测超微结构样品制备[J]. 食品科学技术学报, 2024,42(3):147 - 158.
WANG Ying, LIU Liya, ZHU Jie, et al. Preparation of ultrastructural samples for transmission electron microscope observation of highland barley grains based on high pressure assisted treatment[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(3):147 - 158.

基于高压辅助处理的青稞籽粒电镜观测超微结构样品制备

王　盈[1], 刘丽娅[1], 朱　捷[2], 马　慧[1], 何　珊[1], 孙艳丽[1,*]
(1. 中国农业科学院农产品加工研究所/农业农村部农产品加工综合性重点实验室, 北京　100193;
2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京　100081)

摘　要: 透射电镜生物样品制备过程中,因青稞籽粒结构致密、细胞壁厚、试剂渗透性差,使用常规样品制备方法会造成制样失败,无法对籽粒超微结构进行观察。为解决青稞籽粒制样问题,将高压处理引入戊二醛固定和树脂浸透两个步骤中,并对常规样品制备方法中戊二醛固定液、锇酸固定液、树脂浸透液浓度进行相应调整。通过对不同试剂浓度和不同压强处理的结果进行观察和比较,选定实验范围,通过正交试验确定优化实验条件。结果表明,青稞籽粒透射电镜样品制备的较优前处理条件:体积分数为 4.5% 的戊二醛,质量浓度为 15 g/L 的锇酸,过夜处理的树脂浸透液中丙酮与环氧树脂体积比为 1∶1,戊二醛固定和树脂浸透的高压处理压强为 50 MPa,处理时间为 10 min。在该处理条件下制备的青稞籽粒观测样品表皮细胞壁完整、无断裂,糊粉层各组织完整、结构清晰、无空洞,胚乳层细胞结构完整、形状规则,淀粉粒无缺失和褶皱。将该样品用于实验,结果稳定、可重复,可用于青稞籽粒透射电镜样品制备。

关键词: 青稞籽粒; 透射电子显微镜; 样品制备; 高压处理; 超微结构
中图分类号: TS210.1　　**文献标志码:** A

青稞(*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. f.),属禾本科大麦属一年生草本植物,又称裸大麦[1],是我国青藏高原地区主要粮食作物[2]。青稞生长在高寒、高海拔的特殊环境[3-4],其蛋白质、膳食纤维和维生素含量高,脂肪、糖含量低[5-6],具有丰富的次生代谢产物,如 β-葡聚糖、多酚类物质、植物甾醇类物质等,并富含多种有益健康的微量元素[7-8]。青稞内含的多种活性物质,在抗癌[9]、调节血糖[10-11]、降低血脂[12]等方面具有显著功效。

青稞全谷物适口性和蒸煮品质较差,碾磨是必需的加工方式,经反复碾磨去皮后得到的青稞米,在色泽和口感上与大米类似。对青稞碾磨精度控制的研究对其营养品质、适口性、加工损失以及储藏性能均具有重要意义。青稞籽粒的组织形貌观测和超微结构解析,可系统、全面地展现加工后青稞组织结构和内含物质的存留、变化情况。但因青稞在高原地区进化出的特殊性,透射电镜生物样品常规制备方法中的固定液和树脂浸透液无法有效进入样品组织内部,影响样品的固定和包埋效果,导致青稞籽粒制

收稿日期: 2023 - 03 - 15
基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目(Y2022PT17)。
Foundation: Fundamental Research Funds for Central Non-profit Scientific Institution (Y2022PT17).
第一作者:王　盈,女,高级实验师,博士,主要从事电子显微技术方面的研究。
* 通信作者:孙艳丽,女,副研究员,主要从事电子显微技术方面的研究。

样失败而无法观察到真实、准确的籽粒超微结构。本研究拟根据青稞籽粒的特殊性,将高压处理引入透射电镜样品制备过程,并配合处理试剂浓度的调整,希望建立适用于青稞籽粒超微结构观测的透射电镜样品制备技术,为高品质青稞产品的研发与生产提供有力的形态学支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青稞籽粒,由西藏农业科学院提供,为芍芒紫品种,2021 年收获,初始水分质量分数为 10%。选取同一批次在自然状态下充分干燥的去壳籽粒,且颜色和大小均一,形态饱满,无损伤或病虫害情况。将筛选出的青稞籽粒分装于密封袋中,4 ℃保存,待用。

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙醇、丙酮、三氯甲烷、硝酸铅、柠檬酸钠和氢氧化钠,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;体积分数为 25% 的戊二醛, Sigma-Aldrich(上海)公司;四氧化锇,美国 SPI 公司;环氧树脂 618,上海麦克林生化科技股份有限公司;醋酸双氧铀,美国 EMS 公司。

1.2 仪器与设备

DHG-9071A 型电热恒温干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;HPP. L2-600/2 型超高压设备,天津华泰森淼生物工程技术股份有限公司;EM UC7 型超薄切片机,德国 Leica 公司;H-7500 型透射电子显微镜(配有 832 型 CCD 相机,美国 Gatan 公司),日本 Hitachi 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品取材

取干青稞籽粒在纯净水中室温浸泡 24 h。将青稞籽粒径向三等分并切开,取中间部分再沿垂直切面方向二等分,再次室温浸泡 24 h,备用。

1.3.2 前固定

将复水青稞籽粒放入体积分数分别为 3.5%、4.5%、6.0% 的戊二醛固定液[13-14](pH 值为 7.2,由 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液配制)中固定。每组取3 个籽粒完成重复实验。

1.3.3 前固定高压处理

将青稞籽粒和固定液放置于密封袋中,将密封袋内气泡赶出后用封口机封口。将密封袋置于高压设备中进行高压处理,高压处理的压强和时间见表 1,完成二因素四水平正交试验,共 16 组。高压处理结束后于室温固定 48 h 以上。每组取 3 个籽粒完成重复实验。固定结束后,使用 PBS 缓冲液(0.1 mol/L,pH 值为 7.2)冲洗,15 min/次,重复 6 ~ 8 次。

表 1 高压处理正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment for high-pressure treatment

	因素	
	P/MPa	t/min
水平	20	5
	100	10
	200	20
	400	30

1.3.4 后固定

分别使用质量浓度为 10、15、20 g/L 的锇酸将青稞籽粒后固定 2 h[15]。使用 PBS 缓冲液(0.1 mol/L,pH 值为 7.2)再次冲洗青稞籽粒,10 min/次,重复 3 ~4 次。每组取 3 个籽粒完成重复实验。

1.3.5 脱水、置换和浸透

采用乙醇对青稞籽粒梯度脱水,乙醇体积分数依次为 30%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%(重复 1 次),20 min/梯度。采用丙酮置换乙醇,10 min/次,置换 5 ~ 6 次。将丙酮与环氧树脂分别以 3∶1 和 2∶1 的体积比配置成树脂浸透液,按顺序先后于 30 ℃恒温箱梯度浸透青稞籽粒 1 h。参照徐柏森等[16]的方法,分别使用丙酮与环氧树脂体积比为 1∶2 和 1∶1 的两组树脂浸透液,将青稞籽粒于恒温箱 30 ℃浸透过夜,每组取 3 个籽粒完成重复实验。

1.3.6 浸透高压处理

将青稞籽粒和树脂浸透液置于密封袋中,尽量去除密封袋内气体,同时避免树脂浸透液接触密封袋内侧需封口位置,防止树脂浸透液影响密封效果。用封口机将密封袋封口后,于高压设备中进行处理,处理压强和时间的正交试验设计与前固定高压处理一致,共计 16 组。处理结束后,用丙酮与环氧树脂体积比为 1∶2 的树脂浸透液将青稞籽粒继续在 30 ℃恒温箱浸透 24 h,每组取 3 个籽粒完成重复实验。

1.3.7 包埋和聚合

使用纯环氧树脂在包埋板内对青稞籽粒进行包

埋，将籽粒径向切面垂直于包埋板摆放，在电热恒温干燥箱内分别于 37、45、50 ℃处理 12 h；58 ℃聚合 48 h[17]。

1.3.8　修块和超薄切片

聚合完成的树脂包埋块，去掉外围空白树脂，修出青稞籽粒样品块。选取籽粒的表皮、糊粉层和胚乳组织三部分结构完全的位置，在横切面深度 1 mm 以内使用钻石刀进行超薄切片，切片厚度 80 ~ 100 nm。在钻石刀水槽中观察超薄切片状态：树脂是否包埋进青稞籽粒内部，是否形成完整切片，切片有无破损和空洞，切片是否平整无褶皱。以覆膜铜网捞取超薄切片。

1.3.9　电子染色

采用滴染法，使用常规醋酸双氧铀和柠檬酸铅对铜网进行双染色。先用醋酸双氧铀染色 10 min，重蒸水冲洗数次，以 0.02 mol/L 的 NaOH 处理 30 s，再用柠檬酸铅染色 10 min，重蒸水充分冲洗，晾干后将铜网置于培养皿中。

1.3.10　透射电镜样品制备的评价方法和标准

使用透射电子显微镜对超薄切片进行观察，分析并评估样品块和超薄切片状态，以及青稞籽粒超微结构变化。以常规透射电镜样品制备方法为标准操作[18]，即对青稞籽粒以体积分数为 3.5% 的戊二醛前固定，质量浓度为 10 g/L 的锇酸后固定，丙酮与环氧树脂（二者体积比为 1∶2）浸透液 30 ℃浸透过夜。分别完成 **1.3.2** 至 **1.3.6** 中所有变量的单因素实验，其中前固定和树脂浸透的高压处理条件相同。实验共计 40 组，每组取 3 个籽粒完成重复实验。比较各因素对样品块、超薄切片和超微结构的影响及变化趋势，选取适宜的因素及水平进行正交试验，通过透射电镜观察正交试验结果。以青稞籽粒样品超微结构清晰、无变形、无损伤作为观测样品制备成功的标准（表 2）。根据正交试验结果，确定优化方案。

表 2　青稞籽粒超微结构评价标准

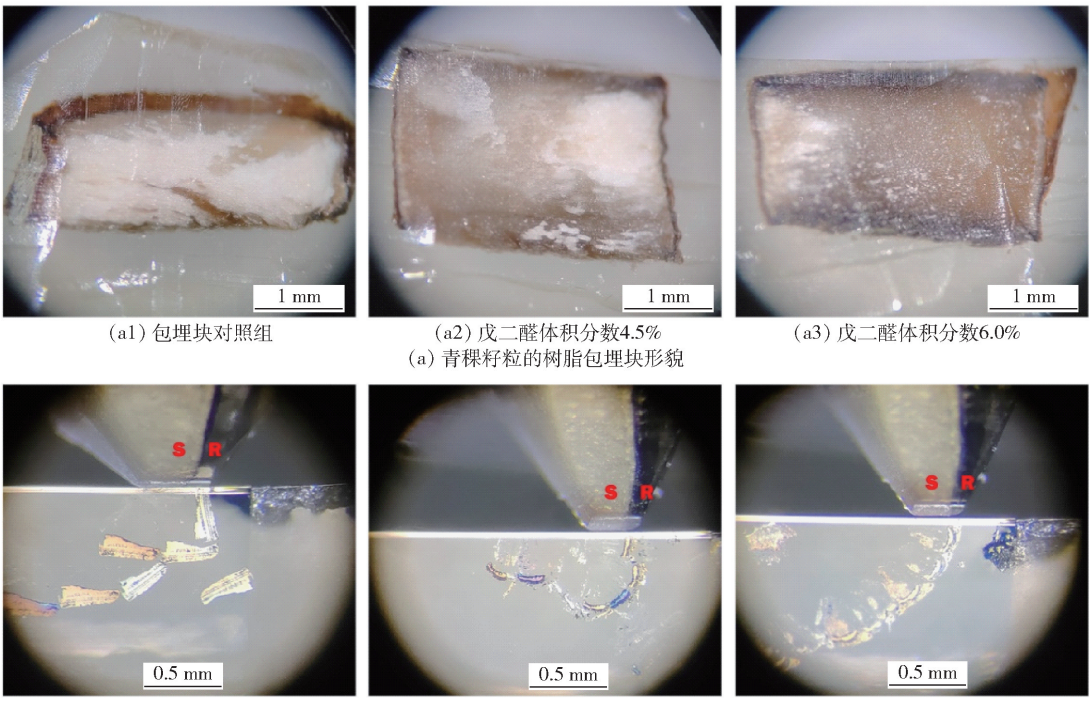
Tab. 2　Evaluation criteria for ultrastructure of highland barley grains

组织部位	结构形貌	
	制样成功	制样失败
表皮	细胞壁结构完整、层次清晰、没有断裂	细胞壁有破损、空洞
糊粉层	细胞壁、糊粉粒、蛋白体、油体组织完整、结构清晰、无空洞	细胞壁破损、褶皱，细胞内溶物缺失或结构不可观察，糊粉粒、蛋白体空洞或变形，油体结构不完整
胚乳	细胞整体结构完整、形状规则，细胞壁无损伤，淀粉粒无缺失、无明显褶皱，树脂包埋完全	完整切片成型困难、破损严重，细胞变形，淀粉粒褶皱严重或淀粉粒存在空缺

2　结果与分析

2.1　戊二醛体积分数对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

常规植物电镜观察样品制备的固定液戊二醛的体积分数为 3.5%，特殊组织固定液戊二醛的体积分数最高为 6.0%[15]。参考文献[15]中固定液浓度，选取体积分数为 3.5%、4.5% 和 6.0% 的戊二醛对青稞籽粒进行前固定处理。采用体视镜观察不同体积分数戊二醛固定后，制备的青稞籽粒样品的树脂包埋块和超薄切片状态，观测结果如图 1。由图 1（a）可见，包埋块对照组（戊二醛体积分数为 3.5% 的前固定处理）籽粒内部组织大部分呈白色，剖面结构松散，靠近横切面边缘的极浅位置呈浅黄色，组织固定效果差；戊二醛体积分数为 4.5% 时，籽粒内部白色区域显著减少，多呈黄褐色，剖面变紧实，组织固定效果改善；戊二醛体积分数为 6.0% 时，籽粒内部偶有白色区域，多呈灰黑色，横切面边缘呈黑色，剖面结构更加致密、平滑，固定效果明显提升。由图 1（b）可见，超薄切片对照组（采用体积分数为 3.5% 的戊二醛处理）青稞籽粒组织完全无法形成切片，或切片破碎极其严重，只有空白树脂部位能形成超薄切片；采用体积分数为 4.5% 的戊二醛处理后，青稞籽粒的组织部位切片破损严重，可观察到絮状切片碎片；采用体积分数为 6.0% 的戊二醛处理后，观察到青稞籽粒组织部位切片破损情况进一步缓解，切片破碎程度降低。适当提高前固定过程中戊二醛的体积分数，对青稞籽粒的前固定效果提升明显，并有助于后续锇酸固定和树脂浸透、包埋工作的完成。



(a1) 包埋块对照组 (a2) 戊二醛体积分数4.5% (a3) 戊二醛体积分数6.0%

(a) 青稞籽粒的树脂包埋块形貌

(b1) 超薄切片对照组 (b2) 戊二醛体积分数4.5% (b3) 戊二醛体积分数6.0%

(b) 超薄切片制作过程中青稞籽粒切片形貌

对照组戊二醛体积分数为 3.5%。S 表示青稞籽粒组织部分,R 表示空白树脂部分。

图 1 戊二醛体积分数对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

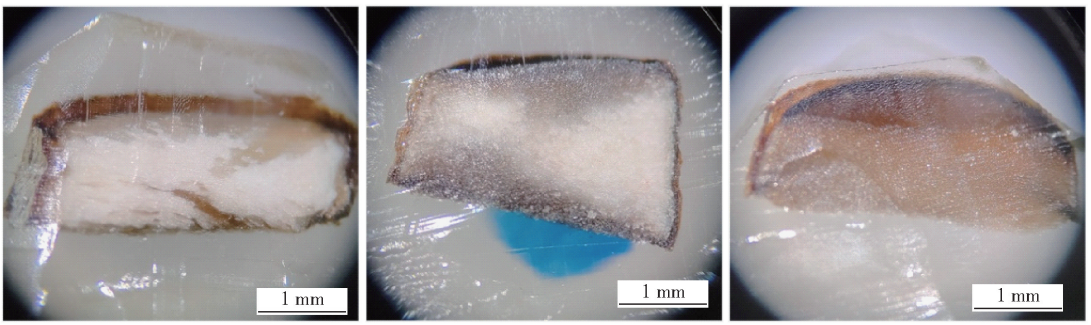
Fig. 1 Effect of glutaraldehyde volume fraction on preparation of transmission electron microscope samples of highland barley grains

2.2 锇酸质量浓度对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

采用体视镜观察后固定中锇酸不同质量浓度处理的青稞籽粒样品的树脂包埋块和超薄切片状态,观测结果如图 2。由图 2(a)可见:包埋块对照组(锇酸质量浓度为 10 g/L 时)青稞籽粒靠近横切面极浅位置呈浅黄色,并迅速向中心过渡为白色,固定效果差;锇酸质量浓度为 15 g/L 时,可观察到籽粒横切面附近为黑色,并逐渐向中心过渡为浅灰色或黄褐色,中心部位仍为白色,青稞籽粒边缘固定效果改善;锇酸质量浓度为 20 g/L 时,青稞籽粒整体颜色明显加深,观察不到白色区域,整体固定效果有所提升。由图 2(b)可见:超薄切片对照组(采用质量浓度为 10 g/L 的锇酸处理)青稞籽粒组织无法正常成片或破损极其严重,只有空白树脂部位的超薄切片在水槽表面可见;采用质量浓度为 15 g/L 的锇酸处理后,青稞籽粒组织部位可以成片但存在大量破损;采用质量浓度为 20 g/L 的锇酸处理后,超薄切片破损进一步减少。比较发现,适当提高锇酸质量浓度,有助于锇酸渗透并固定青稞籽粒,提升锇酸对青稞籽粒内部结构的固定效果。

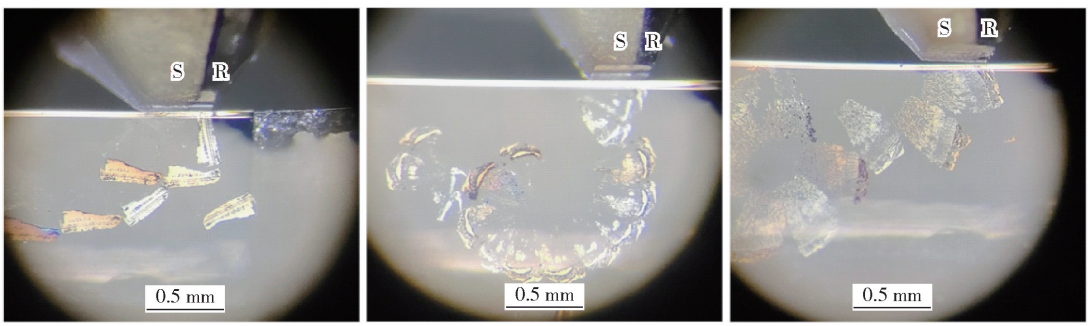
2.3 树脂浸透液黏度对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

因青稞籽粒结构致密、坚实,导致树脂浸透和包埋过程难度增大,同时丙酮对青稞籽粒的结构破坏性相对减小。在本研究的样品制备过程中,将样品在丙酮与环氧树脂体积比为 3∶1 的浸透液中处理 1 h,丙酮与环氧树脂体积比为 2∶1 的浸透液中处理 1 h,将后续过夜树脂浸透液的丙酮与环氧树脂体积比分别设置为 1∶2 和 1∶1,通过适当提高梯度浸透过程中树脂浸透液的丙酮含量来降低浸透液黏度,提高树脂浸透效率。分别采用体视镜和透射电镜观察不同丙酮与环氧树脂比例的过夜树脂浸透液处理的青稞籽粒样品状态,观测结果如图 3。由图 3(a)可见,在超薄切片制作过程中,超薄切片对照组(丙酮与树脂体积比为 1∶2)与降低树脂浸透液黏度后的处理组(丙酮与树脂体积比为 1∶1)相比,切片破损减少,且在超薄切片制作过程中没有发现因提高丙酮比例而导致的样品蚀脆情况。由图 3(b)可见,超微结构对照组(丙酮与树脂体积比为 1∶2)糊粉层完



(a1) 包埋块对照组　(a2) 锇酸质量浓度15 g/L　(a3) 锇酸质量浓度20 g/L

(a) 青稞籽粒的树脂包埋块形貌



(b1) 超薄切片对照组　(b2) 锇酸质量浓度15 g/L　(b3) 锇酸质量浓度20 g/L

(b) 超薄切片制作过程中青稞籽粒切片形貌

对照组锇酸质量浓度为 10 g/L。S 表示青稞籽粒组织部分,R 表示空白树脂部分。

图 2　锇酸质量浓度对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

Fig. 2　Effect of osmic acid concentration on preparation of transmission electron microscope samples of highland barley grains

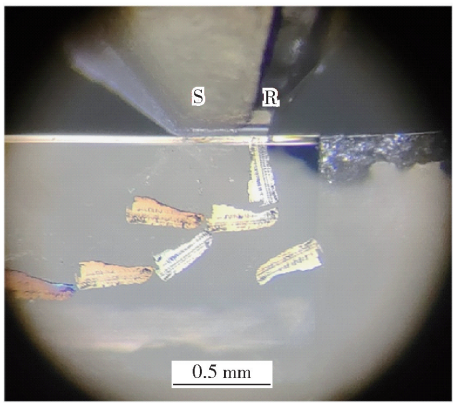
全没有包埋剂支撑,细胞质破损呈空洞,细胞壁断裂皱缩。降低树脂浸透液黏度的处理组(丙酮与树脂体积比为 1∶1),糊粉层细胞质仍缺失,但细胞壁框架基本保存,切片破损情况显著改善。

2.4　前固定和浸透过程高压处理对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

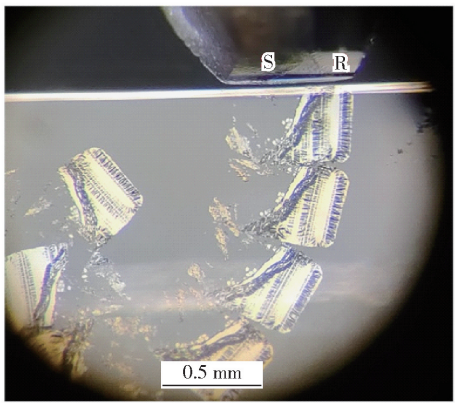
分别在戊二醛前固定和树脂浸透液浸透过程中,对青稞籽粒进行不同压强和不同时长的高压处理,共计 32 组。统计不同处理后青稞籽粒超微结构的破损和变形情况,结果如表 3。由表 3 可知,当处理时长为 5 min,前固定和浸透高压处理后的青稞籽粒超微结构破损依旧非常严重,有的处理甚至不能形成完整超薄切片。这是因为 5 min 的高压处理时间,对前固定和浸透两个处理过程来说,反应时间太短,处理极不充分,高压没有达到预期效果。当处理时长为 30 min,前固定压强为 100 MPa 时,可以观察到青稞籽粒组织结构发生形变,但破损情况没有得到有效改善。这是因为,30 min 的高压处理时间过长,青稞籽粒在长时间高压下产生形变,但前固定和浸透效果提高不显著。比较 10 min 和 20 min 高压处理结果,发现二者效果基本相同,没有显著区别,因此首选时间短、干预少的 10 min 处理时长为前固定和浸透高压处理时间。当高压处理时长为 10 min,压强在 200 MPa 和 400 MPa 的条件下,观察到青稞组织结构有形变的现象,破坏了青稞籽粒原有形貌,无法用于样品制备。当压强在 20 MPa 时,处理时间即使达到 30 min 时长,仍无法有效提高浸透效果,切片破损严重,表明压强太低则无法有效提高对青稞籽粒组织的前固定和浸透处理效果,因此不再对压强小于20 MPa 的处理条件进行研究。

在处理时长为 10 min,压强在 20 MPa 和 100 MPa 的处理条件下,观察到的青稞籽粒超微结构如图 4。由图 4(a)可见,对青稞籽粒分别在前固定和浸透过程进行 20 MPa 的高压处理,青稞籽粒的糊粉层和胚乳组织仍存在明显破损,其中前固定高压处理的破损情况比浸透高压处理稍严重,但都没有观察到组织结构变形情况。由图 4(b)可见,对青稞籽粒分别在前固定和浸透过程进行 100 MPa 的高压处

理,青稞籽粒的组织结构破损情况明显改善,青稞籽粒固定和包埋效果显著提升,切片更完整、易切,组织结构更清晰、分明,且在糊粉层和胚乳组织中没有发现明显形变情况。

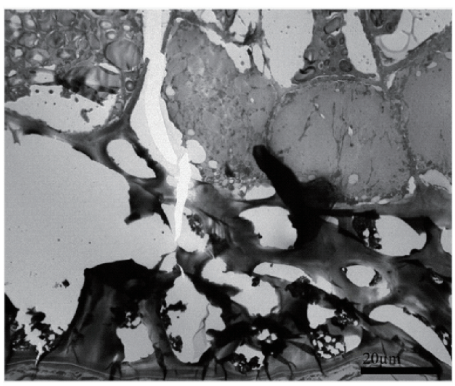


(a1) 超薄切片对照组

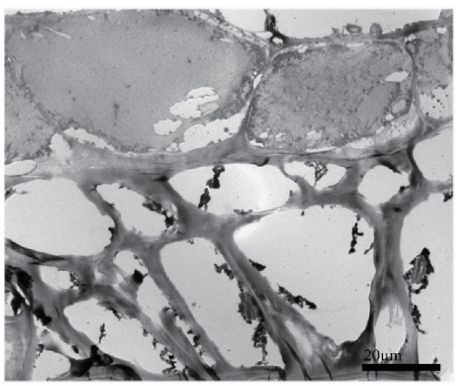


(a2) 丙酮与树脂体积比为1:1

(a) 超薄切片制作过程中青稞籽粒切片形貌



(b1) 超微结构对照组



(b2) 丙酮与树脂体积比为1:1

(b) 青稞籽粒超微结构

对照组丙酮与树脂体积比为 1∶2。S 表示青稞籽粒组织部分,R 表示空白树脂部分。

图 3 树脂浸透液黏度对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

Fig. 3 Effect of viscosity of resin soaking solution on preparation of transmission electron microscope samples of highland barley grains

表 3 两次高压处理的青稞籽粒超微结构电镜观察结果

Tab. 3 Electron microscopic observations of ultrastructure of highland barley grains after two high pressure treatment

t/min	组织状态	P/MPa							
		前固定高压处理				浸透高压处理			
		20	100	200	400	20	100	200	400
5	破损	++++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
	变形	−	−	++	+++	−	−	++	+++
10	破损	+++	++	++	+	+++	++	+	+
	变形	−	−	++	+++	−	−	+	++
20	破损	+++	++	++	+	+++	++	+	+
	变形	−	+	++	+++	−	−	++	+++
30	破损	++	++	+	+	+++	++	+	+
	变形	−	++	+++	+++	−	+	++	+++

通过透射电镜观察超微结构,确认组织破损和变形情况:++++,极其严重;+++,严重;++,中等程度;+,轻度;−,没有影响。

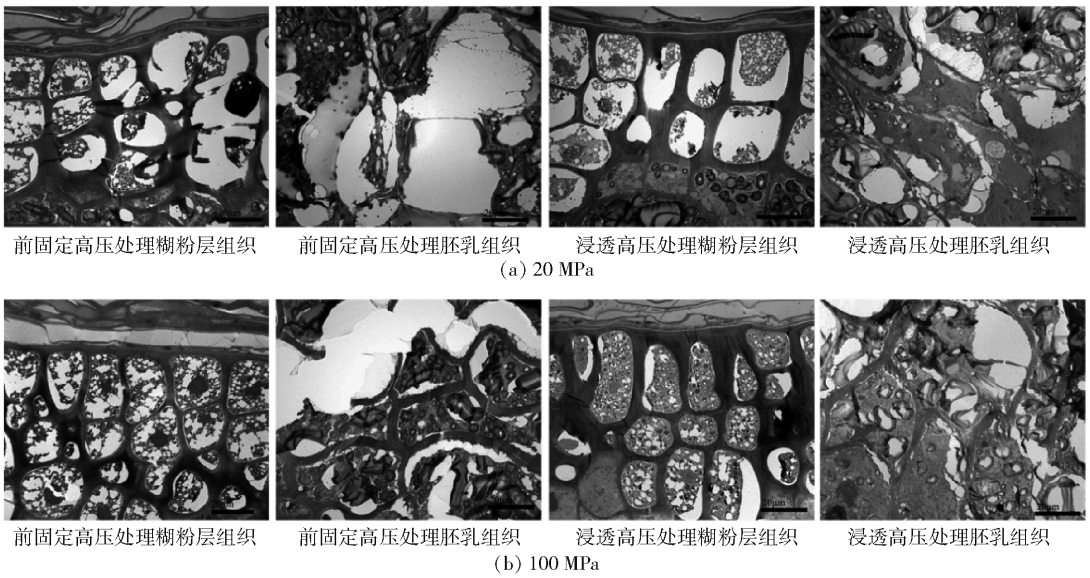


图 4　高压处理对青稞籽粒透射电镜样品制备的影响

Fig. 4　Effect of high pressure treatment on preparation of transmission electron microscope samples of highland barley grains

2.5　青稞籽粒透射电镜样品制备条件的优化结果

2.5.1　三因素三水平正交试验结果

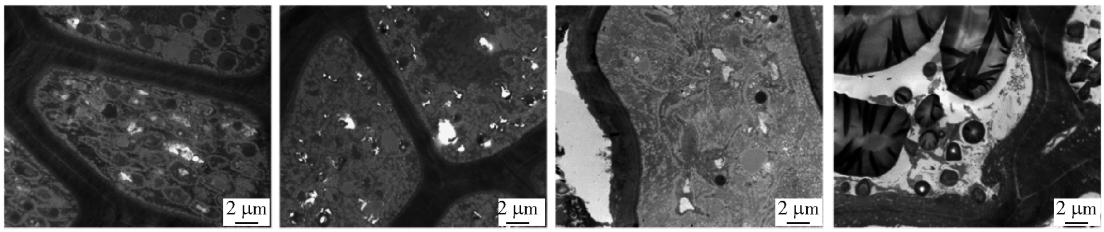
由 **2.3** 结果可知，提高树脂浸透液中丙酮的体积，降低树脂黏度，可提高青稞籽粒浸透效果，且对籽粒组织结构没有伤害，所以确定过夜处理的树脂浸透液中丙酮与环氧树脂体积比为1∶1。基于青稞籽粒的前固定和树脂浸透过程高压处理正交试验结果，选择前固定和树脂浸透过程高压处理时间为 10 min。选择对青稞籽粒透射电镜样品制备效果影响显著的 3 个因素（戊二醛体积分数、锇酸质量浓度以及处理压强），选取适当水平变化范围，完成三因素三水平正交试验，试验设计方案见表 4。试验共计 27 组，分别完成对青稞籽粒的透射电镜样品制备，每组选取不同籽粒完成 3 次重复实验。

表 4　青稞籽粒透射电镜样品制备的正交试验因素水平表

Tab. 4　Factors and levels of orthogonal experiment for preparation of transmission electron microscope samples of highland barley grains

	因素		
	φ(戊二醛)/%	ρ(锇酸)/(g·L^{-1})	P/MPa
水平	3.5	10	20
	4.5	15	50
	6.0	20	100

采用透射电镜分别对 27 组正交试验的青稞籽粒超微结构进行观察，正交试验中代表性的、存在问题的样品超微结构如图 5。由图 5(a)可见，当戊二醛体积分数为最低水平(3.5%)时，取锇酸质量浓度和处理压强的最高水平，即 20 g/L 的锇酸和 100 MPa 的处理压强，通过透射电镜观察发现，青稞籽粒糊粉层空洞明显，组织内部有破损、缺失。这是因为戊二醛体积分数较低导致前固定不完全，影响后续树脂浸透和超薄切片效果。因此，正交试验中戊二醛体积分数为 3.5% 的 9 个实验条件不可用。由图 5(b)可见，当锇酸的质量浓度为最低水平(10 g/L)时，取戊二醛体积分数和处理压强的最高水平，即戊二醛体积分数为 6.0%，处理压强为 100 MPa，通过透射电镜观察发现，青稞籽粒糊粉层中仍存在不同程度的空洞，以脂类和蛋白体组织处较多。这是因为较低质量浓度的锇酸对坚实、致密的青稞籽粒组织后固定不完全。因此，正交试验中剩余的锇酸质量浓度为10 g/L 的6 个实验条件不可用。由图 5(c)和图 5(d)可见，当处理压强为最高水平(100 MPa)时，取戊二醛和锇酸的中间处理水平，即戊二醛体积分数为 4.5%，锇酸质量浓度为 15 g/L，透射电镜观察发现，青稞籽粒糊粉层和胚乳组织存在不同程度的细胞壁及部分细胞内部组织变形情况，以较薄的胚乳层细胞壁变形最为明显。这是因为压强过高，导致青稞籽粒组织发生变形。因此，正交试验中



(a) 3.5%戊二醛、20 g/L锇酸、100 MPa高压处理的糊粉层组织　(b) 10%锇酸、6.0 g/L戊二醛、100 MPa高压处理的糊粉层组织　(c) 100 MPa高压处理、4.5%戊二醛、15 g/L锇酸处理的糊粉层组织　(d) 100 MPa高压处理、4.5%戊二醛、15 g/L锇酸处理的胚乳组织

图 5　正交试验存在问题的青稞籽粒超微结构

Fig. 5　Ultrastructure of highland barley grains with problems in orthogonal experiment

剩余的处理压强为 100 MPa 的 4 个实验条件不可用。

进一步对戊二醛体积分数分别为 4.5% 和 6.0%，锇酸质量浓度分别为 15 g/L 和 20 g/L，以及处理压强分别为 20 MPa 和 50 MPa 的 8 个处理组的实验结果进行观察，青稞籽粒超微结构如图 6。由图 6(a) 和图 6(b) 可见，当处理压强为 20 MPa 时，戊二醛体积分数分别为 4.5% 和 6.0%，锇酸质量浓度分别为 15 g/L 和20 g/L 的4 个处理组，青稞籽粒胚乳层超微结构基本正常。但压力没有使固定液和树脂浸透液完全进入青稞籽粒的糊粉层细胞内部，糊粉层固定、浸透不完全，细胞内存在细小空洞。由图 6(c) 和图 6(d) 可见，当处理压强为 50 MPa 时，戊二醛体积分数分别为 4.5% 和 6.0%，锇酸质量浓度分别为 15 g/L 和 20 g/L 的 4 个处理组，其中戊二醛体积分数为 6.0%，锇酸质量浓度为 20g/L 的处理组可观察到青稞籽粒的糊粉层和胚乳层存在细胞内部结构和细胞壁变形的情况。另外 3 个处理组，青稞籽粒超微结构无明显问题，表皮部分细胞壁结构完整、层次清晰、没有断裂，且细胞无明显形变；青稞籽粒糊粉层包含 3 ~4 层细胞，细胞壁、糊粉粒、蛋白体、脂质体组织完整，结构清晰，无开裂、破损及形态异常情况；胚乳组织细胞整体结构完整、形状规则，细胞壁无损伤，淀粉粒颗粒大、含量高且无明显褶皱，符合表 2 中样品制备成功的结构形貌标准。

通过观察和分析正交试验的青稞籽粒超微结构，得出戊二醛体积分数为 4.5%，锇酸质量浓度为 15 g/L，过夜处理的树脂浸透液中丙酮与环氧树脂体积比为 1∶1，戊二醛前固定和树脂浸透液浸透的处理压强为 50 MPa，高压处理时间为10 min 的青稞籽粒透射电镜样品制备条件，是在满足正常完成超薄切片，正常观测超微结构的需求下的最低处理水平，为青稞籽粒透射电镜样品制备的较优前处理条件。

2.5.2　优化条件的实验验证结果

按照优化的实验条件进行 6 次重复实验，均能观察到青稞籽粒中完好的表皮、糊粉层和胚乳层组织的超微结构，观测结果如图 7。由图 7 可见，表皮层细胞呈扁平状、排列紧密、液泡发达、胞质极少。糊粉层细胞呈规则方形、胞壁极厚，含有大量糊粉粒，蛋白质和油脂颗粒多，不含淀粉粒，细胞内含物丰富，组织致密。胚乳层细胞体积较糊粉层显著增大，呈长方形，细胞壁较薄、胞质较少，含丰富的淀粉颗粒。没有发现组织缺失、损伤或变形的情况，实验结果稳定、可重复。

3　结　论

近年来，对各类谷物及种子的微观结构和营养物质分布及差异研究较多[19-22]，而青稞籽粒因其结构的特殊性，导致常规超微结构观察的样品制备技术对其不能适用。调整常规处理方法中试剂的浓度仍无法满足青稞籽粒的制样需求，无法得到完整的超薄切片，切片破损明显，干扰了青稞籽粒的超微结构观测。本研究在对原有处理方法进行调整的基础上，新增高压处理步骤，可以从根本上解决固定液和包埋剂不能与青稞籽粒充分反应并有效渗透浸入籽粒内部致密组织而导致的固定、浸透不完全的问题。高压处理可显著提升青稞籽粒样品制备效果，且其中浸透高压处理比前固定高压处理效果更明显。在戊二醛前固定和树脂浸透液浸透两个样品处理过程中，同时引入高压处理步骤，配合其他相关试剂的浓度调整，可以解决青稞籽粒样品制备存在的观察质量问题，得到标准、完整的超薄切片，清晰、精确的超微结构观察结果。正交试验中，选择满足需求的最

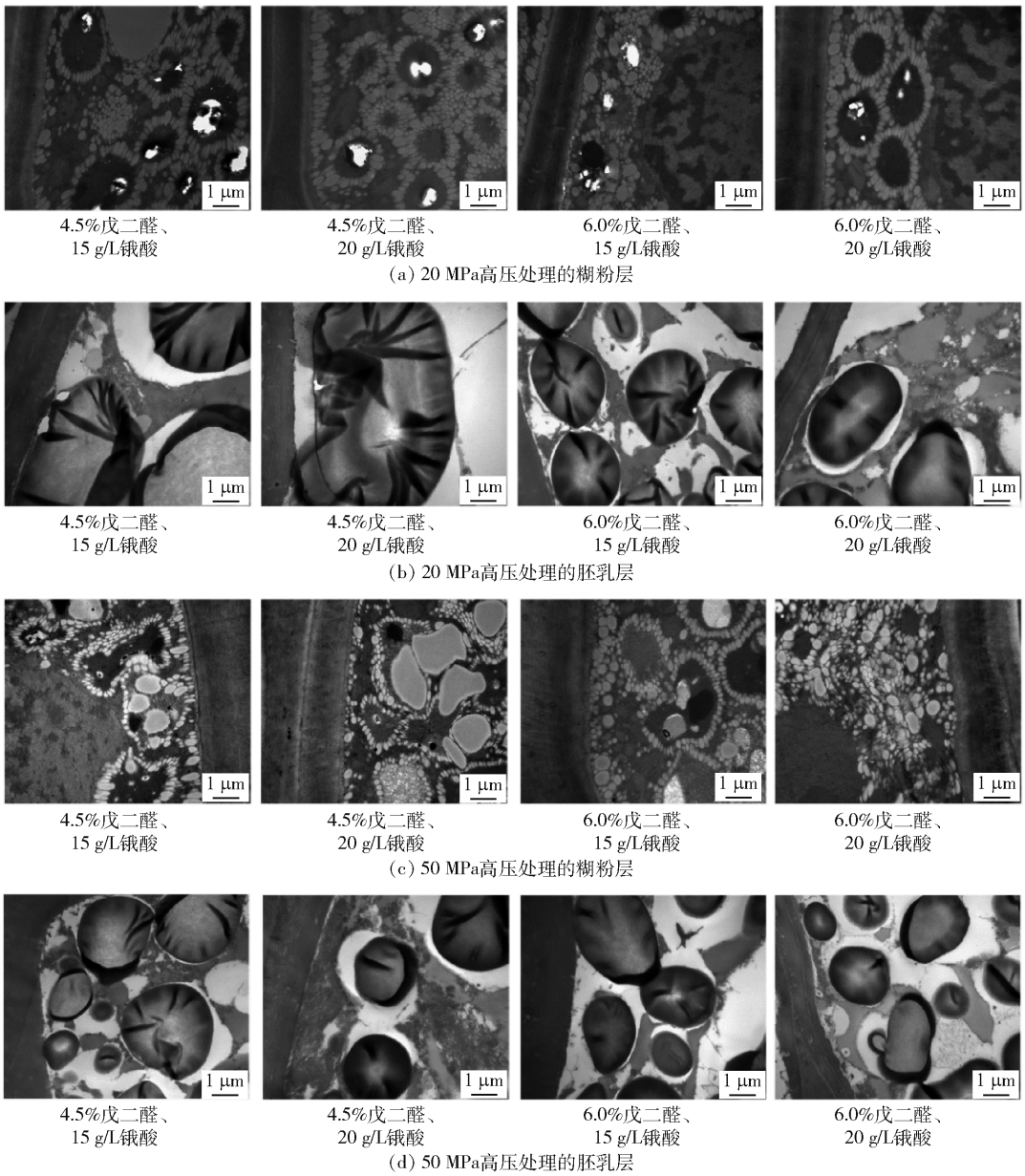
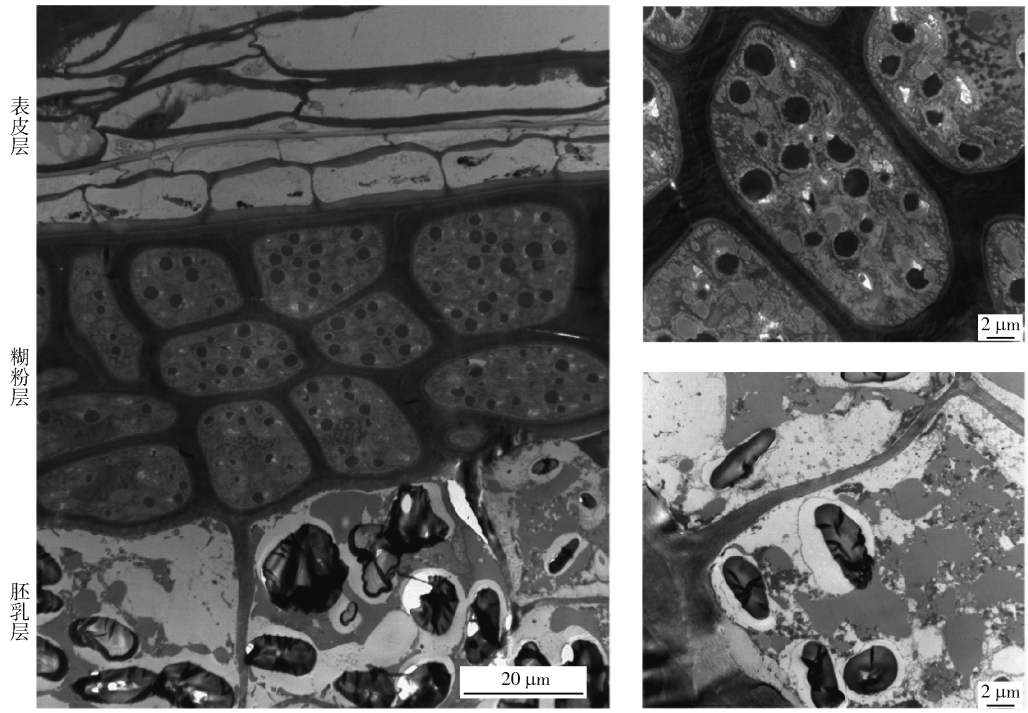


图 6　不同处理条件下青稞籽粒超微结构比较

Fig. 6　Comparison of ultrastructure of highland barley grains under different treatment conditions

低处理水平作为优化条件，以尽力减少化学制样对样品超微结构的干扰。同时，戊二醛体积分数为 4.5%，锇酸质量浓度为 20 g/L，处理压强为 50 MPa，高压处理时间为 10 min 和戊二醛体积分数为 6.0%，锇酸质量浓度为 15 g/L，处理压强为 50 MPa，高压处理时间为 10 min 两个前处理条件，也可以满足实验需求，未发现明显的超微结构损伤现象，可作为备选条件。进行重复验证实验时，不同青稞籽粒取材位置统一、规范，以确保实验的真实性、可靠性和严谨性。

使用优化的青稞籽粒样品制备方法，可有效提高样品制备效果，得到完整、无破损的青稞籽粒超微结构，为后续青稞籽粒不同部位营养物质的研究、精深加工、质量调控和功能成分高效利用等提供直观的细胞学理论支撑。同时，将高压辅助处理引入透射电镜样品制备的技术，也可解决其他大宗粮食作物的超微结构观测问题，如水稻、玉米、大豆和小米等。可根据不同谷物的类型和特质，对高压处理的强度和时间进行适当调整，得到针对各种籽粒超微结构观测的最适样品前处理方法。



右上图为左侧糊粉层的放大图,右下图为左侧胚乳层的放大图。

图 7 青稞籽粒超微结构

Fig. 7 Ultrastructure of highland barley grains

参考文献:

[1] ZENG X Q, GUO Y, XU Q J, et al. Origin and evolution of Qingke barley in Tibet[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5433.

[2] 赵萌萌, 党斌, 张文刚, 等. 青稞分层碾磨中各层粉体的营养及功能成分的分布差异[J]. 食品科学技术学报,2021, 39(6): 98 – 107.
ZHAO M M, DANG B, ZHANG W G, et al. Distribution difference of nutrients and functional components of various powders in milling layer of highland barley by stratified milling[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(6): 98 – 107.

[3] ZENG X Q, LONG H, WANG Z, et al. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(4): 1095 – 1100.

[4] 阚建全, 洪晴悦. 青稞生物活性成分及其生理功能研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(6):11 – 20.
KAN J Q, HONG Q Y. Research progress of bioactive ingredients and physiological functions in Qingke[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(6):11 – 20.

[5] 方圆, 任欣, 彭 洁, 等. 青稞及其制品的体内外淀粉消化特性研究[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1):144 – 152.
FANG Y, REN X, PENG J, et al. Study on *in vivo* starch digestive characteristics of Qingke barley and its products[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1):144 – 152.

[6] GUO T L, CARLA H, CHEN L, et al. Understanding the nutrient composition and nutritional functions of highland barley (Qingke): a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 103: 109 – 177.

[7] SHEN Y B, HU C R, ZHANG H, et al. Characteristics of three typical Chinese highland barley varieties: phenolic compounds and antioxidant activities[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(2):37 – 45.

[8] 梁雨荷, 党斌, 杨希娟, 等. 萌发青稞营养成分、多酚含量及抗氧化活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(2):70 – 81.
LIANG Y H, DANG B, YANG X J, et al. Study on changes of nutrients, polyphenol contents, and antioxidant activities of germinated hulless barley[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(2): 70 – 81.

[9] CHENG D, ZHANG X Y, MENG M, et al. Inhibitory effect on HT-29 colon cancer cells of a water-soluble polysaccharide obtained from highland barley[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 88 – 95.

[10] CHILLO S, RANAWANA D, PRATT M, et al. Glyce-

mic response and glycemic index of semolina spaghetti enriched with barley beta-glucan[J]. Nutrition, 2011, 27(6): 653 – 658.

[11] PANAHI S, EZATAGHA A, JOVANOVSKI E, et al. Glycemic effect of oat and barley beta-glucan when incorporated into a snack bar: a dose escalation study[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2014, 33(6): 442 – 449.

[12] XIA X J, LI G N, DING Y B, et al. Effect of whole grain qingke (Tibetan *Hordeum vulgare* L. Zangqing 320) on the serum lipid levels and intestinal microbiota of rats under high-fat diet[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(13): 2686 – 2693.

[13] 李叶, 黄华平, 邓睿, 等. 不同固定条件对几种植物样品超微结构的影响[J]. 热带作物学报, 2016, 37(11): 2100 – 2105.
LI Y, HUANG H P, DENG R, et al. The improvement of the sample preparation technique for TEM of plan [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(11): 2100 – 2105.

[14] HAYAT M A. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications[M]. 4th Ed. London: Cambridge University Press,2000: 26 – 43.

[15] 丁明孝, 梁凤霞, 洪健, 等. 生命科学中的电子显微镜技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2021: 241 – 269.
DING M X, LIANG F X, HONG J, et al. Electron microscopy in life sciences[M]. Beijing: Higher Education Press, 2021: 241 – 269.

[16] 徐柏森, 杨静. 电子显微技术与应用[M]. 南京: 东南大学出版社, 2016: 82 – 89.
XU B S, YANG J. Electron microscopy and its applications[M]. Nanjing: Southeast University Press, 2016: 82 – 89.

[17] 刘仁林, 虞功清, 邹伟民, 等. 植物透射电镜样品制备技术的改进[J]. 南方林业科学, 2008(1): 41 – 43.
LIU R L, YU G Q, ZOU W M, et al. Improvements in technique of madding ultrath in section for transmission electron microscope[J]. South China Forestry Science, 2008(1): 41 – 43.

[18] 付洪兰. 实用电子显微镜技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 10 – 58.
FU H L. Practical electron microscopy[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 10 – 58.

[19] BARRON C, HOLOPAINEN M U, SAHLSTROM S, et al. Assessment of biochemical markers identified in wheat for monitoring barley grain tissue[J]. Journal of Cereal Science, 2017, 74: 11 – 18.

[20] JING Y P, LIU D T, YU X R, et al. Development of endosperm cells and starch granules in common wheat [J]. Cereal Research Communications, 2014, 42: 514 – 524.

[21] LING Z, CHENL L, ZHANG H, et al. Research on migration path and structuring role of water in rice grain during soaking [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 41 – 50.

[22] 何宇清, 操春燕, 沈文忠, 等. 甘蓝型油菜种子中油体的超微结构及蛋白质组分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(4): 566 – 573.
HE Y Q, CAO C Y, SHEN W Z, et al. Study on the ultrastructure andproteome of oil bodies in *Brassica napus* L. seeds[J]. Plant Science Journal, 2017, 35(4): 566 – 573.

Preparation of Ultrastructural Samples for Transmission Electron Microscope Observation of Highland Barley Grains Based on High Pressure Assisted Treatment

WANG Ying[1], LIU Liya[1], ZHU Jie[2], MA Hui[1], HE Shan[1], SUN Yanli[1,*]

(1. *Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing* 100193, *China*;
2. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081, *China*)

Abstract: The preparation of highland barley grain samples using conventional transmission electron microscope (TEM) methods often results in sample preparation failure, making it impossible to observe

the grain ultrastructure. This is due to the dense structure, thick cell walls, and poor permeability of highland barley seeds. To address these issues, high pressure treatment was introduced during the glutaraldehyde fixation and resin penetration steps. Additionally, the concentrations of the glutaraldehyde fixative solution, osmium acid fixative solution, and resin soaking solution were adjusted to suit the characteristics of highland barley grains. The samples were observed under different reagent concentrations and high pressure treatment conditions. By comparing the differences, the optimal reagent concentrations and high pressure ranges were selected, and the suitable experimental conditions were further refined through orthogonal experiments. The optimal pre-treatment conditions for TEM of highland barley grains were determined as follows: glutaraldehyde volume fraction of 4.5%, osmium acid concentration of 15 g/L, acetone to epoxy resin volume ratio of 1∶1 in the resin soaking solution treated overnight, high pressure treatment of 50 MPa for both glutaraldehyde fixation and resin soaking, and a treatment time of 10 minutes. Under these conditions, the epidermal cell wall of highland barley grains remained intact without breakage. The aleurone layer structure was complete and clear, with no cavities. The cell structure of the endosperm layer was complete and regularly shaped, and the starch grains were intact and unwrinkled. These conditions are optimal for preparing high-quality transmission electron microscopy samples of highland barley grains.

Keywords: highland barley grains; transmission electron microscope; preparation of samples; high pressure processing; ultrastructure

(责任编辑:叶红波)

(上接第 146 页)

was used as the index to evaluate protection of the inclusion complex on geraniol, and the morphology and stability of the inclusion complex were characterized by X-ray diffractometer, scanning electron microscope, infrared spectrometer, differential scanning calorimeter and thermogravimetric analyzer. The results showed that there was no linear relationship between the content of amylose and the embedding rate, and the highest embedding rate was 9.05%, acquired at an amylose concentration of 5.86%. X-ray diffraction results indicated that the position of the diffraction peaks changed after the formation of the inclusion complex and the inclusion changed the crystalline pattern of the wall material from A-type to A + V-type. The stability of the inclusion complex was improved. Scanning electron microscopy results showed that the surface of the wall material became more and more concave with the increase of the content of amylose, while the local surface of the inclusion complex was relatively intact. Infrared spectrum results revealed that the characteristic peaks were blue shifted with the increase of the embedding rate, and the characteristic peaks of geraniol did not appear in the inclusion complex. The analysis of the enthalpy characteristics indicated that the enthalpy of phase transformation and the rate of thermogravimetry second stage weight loss increased with the increase of embedding rate. The above result further conformed that inclusion complex formation improved the stability of geraniols. In summary, the debranching treatment of waxy corn starch and the inclusion of geraniol based on the formed amylose could improve the stability of geraniol, and this study hoped to provide a reference for the embedding of active substances by amylose.

Keywords: waxy maize starch; amylose; geraniol; inclusion complex; structural characterization; enzymatic hydrolysis

(责任编辑:张逸群)