

植物制片、标本制作 和植物鉴定

段国禄 施 江 等 编著

气象出版社

植物制片、标本制作和 植物鉴定

段国禄 施 江 等 编著

气象出版社

内 容 简 介

本书分为五章:第一章为植物制片,主要包括植物一般制片技术和植物石蜡切片的制作;第二章为植物标本制作,分为植物标本的采集和植物标本制作保存;第三章为植物鉴定,主要内容是对植物的观察和植物的鉴定,并对一些常见植物进行识别和鉴定;第四章和第五章为常用试剂与染料的配制及其使用和实验技术。

本书内容涉及植物学、植物生物学、植物生理学、遗传学、生态学等多个学科,可供植物学、植物生物学、农、林、牧、医药、环境保护等有关院校师生和科技工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物制片、标本制作和植物鉴定/段国禄,施江等编著. —北京:气象出版社,2008.5

ISBN 978-7-5029-4513-8

I. 植… II. ①段…②施 III. ①植物-切片(生物学)-制作②植物-标本制作③植物-鉴定
IV. Q94-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 070031 号

Zhiwu Zhipian、Biaoben Zhizuo he Zhiwu Jianding

植物制片、标本制作和植物鉴定

出版发行:气象出版社

地 址:北京市海淀区中关村南大街 46 号

邮 编:100081

网 址:<http://cmp.cma.gov.cn>

E-mail: qxcbs@263.net

电 话:总编室 010-68407112,发行部 010-68409198

责任编辑:王萃萃 李太宇

终 审:汪勤模

印 刷 者:北京中新伟业印刷有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:17.5

字 数:510 千字

版 次:2008 年 5 月第 1 版

印 次:2008 年 5 月第 1 次印刷

印 数:1~2500 册

定 价:35.00 元

本书如存在文字不清、漏印以及缺页、倒页、脱页等,请与本社发行部联系调换。

编 委 会

主 编 段国禄 施 江

副主编 陈传印 高双成 辛 莉

编委(以拼音为序)

刘素云 刘小梅 刘玉华

吕静霞 庞晓斌 孙会忠

张鲁斌

前 言

本书是作者在教学与科研实践中,经过长时间经验积累,参考一些文献资料和其它资料编著的一部较为系统地总结植物制片技术、植物标本制作技术和进行植物识别鉴定的著作。全书分为五章:第一章为植物制片,主要包括植物一般制片技术和植物石蜡切片的制作;第二章为植物标本制作,分为植物标本的采集和植物标本制作保存;第三章为植物鉴定,主要内容是对植物的观察和植物的鉴定,并对一些常见植物进行识别和鉴定,书中关于河南科技大学校园内外和王城公园、西宛植物园常见植物的选取以能见到的和具有观赏价值的植物为主,并适当收取少量文献检索中所涉及的植物;第四章和第五章为常用试剂与染料的配制与使用和实验技术。本书内容涉及植物学、植物生物学、植物生理学、遗传学、生态学等多个学科,可供植物学、植物生物学、农、林、牧、医药、环保等有关院校师生和科技工作者参考。本书的图版、插图部分引自或参考《中国高等植物图鉴》和书中所列的参考文献,在此向有关作者和出版者致以衷心的感谢。

本书由洛阳市环境监测站段国禄和河南科技大学农学院施江任主编,商丘职业技术学院陈传印、河南科技大学农学院高双成、河南科技大学食品与生物工程学院辛莉任副主编。参加本书编写的有:河南科技大学农学院孙会忠、刘玉华、刘素云、吕静霞,焦作市中医药学校刘小梅、河南大学药学院庞晓斌、中国热带农业科学院南亚热带作物研究所张鲁斌。

本书具体编写分工如下:第一章:刘素云、吕静霞、施江和陈传印;第二章:高双成、辛莉、孙会忠;第三章:施江、高双成、陈传印、刘玉华、庞晓斌、张鲁斌;第四章和第五章:陈传印、段国禄、刘素云、吕静霞和刘小梅。其中,施江编写 4.1 万字,陈传印编写 4.1 万字,高双成编写 5.1 万字,辛莉编写 4.1 万字,孙会忠编写 5.1 万字,刘玉华编写 5.1 万字,刘素云编写 4.1 万字,吕静霞编写 4.2 万字,庞晓斌编写 5.5 万字,张鲁斌编写 5.1 万字。

本书在编写和出版过程中得到了同仁、同事的大力支持以及文印室工作人员的大力协助,在此表示诚挚的谢意。

由于编者水平有限,加之时间较仓促,书中难免有不足之处,恳请读者及专家指正。

编者

2008 年 3 月

目 录

前言

第一章 植物制片	(1)
1.1 植物一般制片技术	(1)
1.2 植物石蜡切片的制作	(6)
1.3 植物超薄切片的制作	(21)
第二章 植物标本制作	(24)
2.1 植物标本的采集	(24)
2.2 植物标本制作和保存	(28)
第三章 植物鉴定	(39)
3.1 植物的观察	(39)
3.2 植物的鉴定	(50)
第四章 常用试剂与染料的配制与使用	(199)
4.1 染色液	(199)
4.2 固定液	(200)
4.3 粘贴剂	(201)
4.4 封固剂	(201)
4.5 离析液	(201)
4.6 预处理液	(201)
第五章 植物及植物生物学实验技术	(202)
5.1 实验注意事项和要求	(202)
5.2 显微镜的构造和使用方法	(203)
5.3 植物细胞基本结构、后含物的观察及生物绘图法	(209)
5.4 植物分生组织细胞有丝分裂和胞间连丝的观察	(215)
5.5 成熟组织的观察	(217)
5.6 种子的形态结构和幼苗的类型	(221)
5.7 根尖分区和根的初生结构和次生结构	(224)
5.8 茎的形态和结构	(228)
5.9 叶的组成和结构及营养器官的变态	(233)
5.10 花的组成、花药和子房的结构及胚的发育	(238)
5.11 花序及果实类型的观察	(242)
5.12 藻类、菌类和地衣的观察	(246)

5.13	苔藓、蕨类和裸子植物的观察	(252)
5.14	被子植物花图式、花程式及检索表的使用	(257)
5.15	被子植物几个重要科的观察.....	(261)
5.16	植物标本的采集制作及其鉴定.....	(266)
5.17	校园绿化观赏植物的调查与识别.....	(270)
参考文献		(271)

第一章 植物制片

1.1 植物一般制片技术

植物制片是人们认识植物体结构的有效手段。一般常用的制片方法有以下几种。

1.1.1 临时装片法

主要用于动、植物组织的表皮层观察。可活体取待观察的动、植物组织,用尖头镊撕去一小块表皮,迅速平铺在载玻片的水滴上(也可用染剂),用盖玻片盖上,避免气泡,除去多余水分,即可观察。

植物材料临时装片制作的具体步骤:

(1)擦净载玻片和盖玻片,即将浸洗过的玻片用纱布擦干,擦盖玻片时,应十分小心。

(2)用玻璃滴管吸水,滴一滴在载玻片的中央。用镊子或毛笔挑选小而薄的材料放置于载玻片上的水滴中。

(3)加盖片:右手持镊子,轻轻夹住盖玻片,使盖玻片边缘与材料左边水滴的边缘接触,然后慢慢向下落,放平盖玻片。这样可使盖玻片下的空气逐渐被水挤掉,以免产生气泡。如果盖玻片下的水分过多,则材料和盖玻片容易浮动,影响观察,可用吸水纸条从盖玻片的侧面吸去一部分水。如果水未充满盖玻片时,容易产生气泡,可从盖玻片的一侧再滴清水将气泡驱走,即可进行观察。

1.1.2 涂片法

主要用于果肉、汁液、微生物等无固定组织结构的样品。取一干净载玻片,将一滴待观察样品滴在载玻片左侧,用另一干净载玻片的窄边接触样品。此时液态样品沿两载玻片接触处展成一细线,迅速将上边载玻片以45度角向右侧推动,即在第一张载玻片上形成一薄层样品膜,可自然风干待用。

1.1.3 徒手切片法

徒手切片法是指用手拿刀片把植物新鲜材料切成薄片,所作的切片通常不经染色或经简单染色后,制成临时的切片用于临时观察,亦可通过脱水与染色制成永久制片。徒手切片的优点是简单、方便,不需要复杂的设备,不经过化学药物的处理,基本上保留了植物活体的状态。徒手切片的重要工具是双面刀片,每次用后必须擦干净,注意保护,以免生锈。

(1)实验用品

电视显微镜、显微镜、载玻片、盖玻片、双面刀片、毛笔、培养皿、滤纸和滴管。

(2)材料的选择

一般选用软硬适度的植物根、茎或叶等,材料不宜太硬也不宜太软。切较软的材料时,可用马铃薯、胡萝卜根或肥皂将欲切的材料夹住;一起进行切片。有些叶片亦可卷成筒状再进行切片。欲切之材料应先截成适当的段块,并削平切面,一般截面的大小以不超过 $3\sim 5\text{ mm}^2$ 为

宜,长度 2~3 cm,较便于手持并进行切片。

(3)方法和步骤

A. 切片前,在小培养皿中盛以清水,准备好毛笔、滴管和刀片等用具和欲切的材料。

B. 切片时用左手的三个指头拿住材料,并使材料稍突出在手指上,以免刀口损伤手指。右手持双面刀片,把刀刃放在经过削平的平面上,轻轻压住它,刀口向内,且与材料断面平行,然后以均匀的力量和平稳的动作,自左前方向右后方滑行切片,注意要用整个手臂向后拉(手腕不必用力)。切片时动作要敏捷,材料要一次切下(整个过程中应用清水湿润材料和刀面,使之润滑,否则材料容易破损)。如此连续动作,切下许多薄片后,就用湿毛笔将这些薄片轻轻移入已盛水的培养皿中备用。徒手切片时最重要的是切下一小片平而薄的组织,而并不要求切下一个完整的切片。

注意在切片前,要不断地用水润湿材料和刀片。切片时,两只手应该保持活动状态,不要使它们紧靠身体或实验台,且用力不要过猛,不能用刀片挤压材料或来回切割植物。动作要敏捷,材料要一次切下,不要追求切片形状的完整。

C. 用毛笔挑选最薄而透明的切片,取出放在载玻片上,制成临时装片观察;如标本有保留价值,则可再进行以下处理,制成永久标本。

C₁. 将切片移入小烧杯中,经 50%、60%、70% 各级乙醇中进行脱水及固定,每级 5 min,然后移入 1% 番红染液(用 70% 乙醇溶液配制)中 30 min。

C₂. 继续移入 80%、90%、95% 各级乙醇脱水,每级 5 min。再移入 1% 固绿染液(用 95% 乙醇配制)染色 30 s 左右,再入 95% 乙醇中洗去浮色,最后进入无水乙醇脱水 5 min。

C₃. 切片置于无水乙醇:二甲苯=1:1 的溶液中 5 min,再移入纯二甲苯中 5 min,此时组织切片呈透明状态。

C₄. 将切片置于载玻片中央,加一滴树胶,盖上盖玻片封片,待干燥后即可使用。

将已封的切片左边贴上标签,注明材料名称、制作日期和制作者姓名等项,以便查考。较好的切片,其木质化的细胞壁和细胞核可染成红色,细胞质和纤维素的壁则常被染成绿色,红绿相衬,有利于观察分辨植物体内部的结构。

徒手切片的简要步骤也可如下进行:

选材→切片→固定(70% 酒精,10 min 以上)→1% 番红(用 50% 乙醇溶液配制)染色 30 min→85% 酒精脱水 3~5 min→95% 酒精脱水 3~5 min→70% 酒精冲洗 3~5 min→0.5% 固绿(用 95% 乙醇溶液配制)复染色 30 s→95% 酒精冲洗 10 s→纯酒精再脱水 2~3 次,每次 3~5 min→脱水透明(1/2 纯酒精+1/2 二甲苯中,1 次 5 min)→透明(纯二甲苯中,1 次 5 min)→封片→贴标签。

1.1.4 压片法

压片法是把植物的器官或组织经过处理后压在载玻片上,使细胞成一薄层,便于进行观察的一种制片方法。主要应用于植物染色体的观察和研究。一些幼嫩、柔软的材料可将其置于载玻片上,加染液一滴,再盖上盖玻片,用拇指垂直用力挤压,使组织散成一薄片,再进行观察。如植物根尖观察染色体,花粉观察发育阶段等。

(1)仪器用品

电视显微镜、荧光显微镜、冰冻切片机、恒温水浴锅、培养皿、染色皿、载玻片、盖玻片。

(2) 药品

对二氯苯饱和水溶液、0.05%~2%的秋水仙碱水溶液、1N 盐酸、解离酶、卡诺氏固定剂、醋酸洋红染色液、卡宝品红染色液、各级浓度酒精。

(3) 方法步骤

1) 取材:用锋利的双面刀片截取生长良好的植物根尖或茎尖,长度为 2~3 mm,作为分析研究植物的染色体,通常多用根尖会茎端,或幼叶细胞的有丝分裂时期,和幼小花粉的减数分裂。例如小麦,多用麦粒萌发后取其根尖;或洋葱,使其长根后,截取根尖,作为观察有丝分裂的材料。观察减数分裂则必须用幼小花芽。

2) 预处理:植物根尖有丝分裂时,染色体的形状较细长,而且数目多的,也往往聚集在一起,很难计数,所以一般需要使用一些预处理的药品进行预处理,使染色体缩短变粗,并且使之分散,然后固定,染色以后就容易观察。观察减数分裂的幼小花药可以不必作预处理(除非有其它的特殊要求)。

将材料放入 8-羟基喹啉或对二氯苯等预处理液中进行预处理,使细胞分裂停留在有丝分裂的中期,并使染色体缩短变粗。预处理的时间视不同植物而定。一般洋葱根尖用对二氯苯预处理液处理 4~5 h。

3) 固定:固定的目的是利用药剂(或物理方法),迅速杀死正在分裂的细胞,使之固定下来,尽量保持原来分裂的状态。这种固定剂种类很多,一般用卡诺氏固定剂进行固定,时间通常为 2~24 h,以低温固定效果较好。材料固定后,如不立即进行压片,可保存在 70%酒精中,置于冰箱内长期保存。

4) 解离:根尖或(茎端)细胞之间,有坚固的细胞壁结合在一起,因此压片时,各个细胞往往不能分散。为了分离出分裂的细胞,所以必须经过离析。离析剂有多种,较简单的是用 1N 的盐酸(大约 10%左右),在 60℃的水温下,处理 15 min 左右。离析后的根尖细胞,较容易压片。离析时要掌握好时间,如果时间不足,细胞不易分开;离析过久,就不容易染色。一般是将固定好的材料在 50%的酒精中浸泡 5 min,再入蒸馏水洗涤 5 min 后,转入浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液中,置于 60℃恒温水浴锅中解离,解离时间一般 2~8 min,时间太短,细胞不易分离,时间过长,则染色体染色浅或不着色。

5) 染色:此处所用的染色方法,是利用一些能将染色体染上颜色,而使细胞质不染色的染料进行染色。这些染料平常叫做核染料,种类较多。常用卡宝品红(即石碳酸-碱性品红)或醋酸洋红等核染色剂进行染色。

6) 压片:将材料放在干净的载玻片上,盖上盖玻片,用解剖针或铅笔轻轻敲击盖玻片,使细胞分离散开并压平。

7) 镜检:将压片置于显微镜下进行观察,选取染色体分散、清晰的细胞,用记号笔在载玻片和盖玻片上分别作记号。

8) 封固:好的压片可采用冷冻干燥后,用光学树胶封固保存。

永久片的制作 镜检后理想的片子,可以制成永久片子,以便较长时间保存,为观察研究用。制作过程:准备 5 套直径约 12 cm 的培养皿,每套培养皿中放一根短的玻棒,按顺序倒入 50%酒精→95%酒精→100%酒精→1/2 纯酒精+1/2 叔丁醇→叔丁醇。将盖玻片向下放入 50%酒精的培养皿中,一端搁在玻棒上,使盖玻片自然脱落。然后将盖玻片或载玻片(看材料粘在哪个玻片上)顺序脱水各 5~10 min,最后用滤纸吸去多余的叔丁醇,滴上加拿大树胶封片。

制作根尖细胞有丝分裂的压片(以洋葱为实验材料)

取洋葱头(或大蒜头)将其置于盛满清水的烧杯上,使鳞茎盘浸于水中,置温暖处,待根长出2~3 cm长时,于上午11时左右或下午3~4时,在1 cm处剪取根尖。剪下的根尖立即投入盛有盐酸酒精液(浓盐酸和95%酒精各半混合液)的培养皿中,固定离析,经10~20 min取出用清水冲洗几次。选择一个经过固定、离析、冲洗过的根尖,置于载玻片上,滴加2滴醋酸洋红染液。染色10~15 min后盖上盖玻片,用铅笔上的橡皮头,对准盖玻片下的材料在盖玻片上轻轻敲击,使材料压成均匀的薄片,然后用吸水纸吸去溢出的染液,即可。若染色过浅,可手持玻片标本在酒精灯上微微加热,以增进染色效果。此种压片也可用龙胆紫染液(即1滴医用龙胆紫药水加5滴蒸馏水),滴染1~2 min后,再加1滴20%的醋酸,制成压片。亦可获得较好的染色效果。制成压片后,放在显微镜下,选择有丝分裂各个时期的细胞,进行仔细的观察。上述压片也可用小麦、水稻、玉米、蚕豆等植物的根尖为材料。但要注意不同植物根尖细胞有丝分裂活动的高峰时间是不同的。所以取材的时间也不一样。小麦在上午11时至下午1时,水稻在下午4时左右,玉米和蚕豆在上午8—10时和下午3—5时为好。

1.1.5 整装片法

一些个体微小的原生动动物或藻类,如衣藻、团藻等,可整体将其置于载玻片的水滴中,盖上盖玻片观察。

以上仅是临时观察所用玻片标本的制作方法,如形态良好,有保存的必要,则应将盖玻片揭开,用化学试剂进行固定、洗涤、染色、脱水、透明、封藏步骤,才可制成永久标本。

1.1.6 滑走切片法

滑走切片法是利用滑走切片机切新鲜的或保存的材料,也可以切由石蜡制片法包埋的材料。此法切出的切片厚薄均匀、结构完整,适用于一些较硬的材料,如木本茎、根、枝条等的切片。

在做滑走切片前须对材料进行软化处理,一般除先用水煮外,用下列两种方法软化:

(1) 甘油-酒精软化法

凡要处理的材料,都应先用抽气机或简易抽气办法除去材料内部的气体,以免妨碍软化剂的渗入。普通也可就用水煮办法,水煮兼有使木材软化的作用,平常木材约1~2 h,冷却后再投入甘油-酒精软化剂(由1份甘油和1份95%酒精混合而成)中。软化时间视木材的性质不同,自1-数周。检查软化是否合适,可用刀片切割材料,如较容易切下薄片,则表示软化已好。

(2) 氢氟酸软化法

预备处理的材料最好也先煮2~3 h,而且要间歇反复进行,或者连续煮沸(注意随时加水)24 h,冷却后放入市售浓度的氢氟酸(约37%~40%)与水各半混合液中,特硬的材料须用原液浓度。盛装氢氟酸不能用玻璃或陶瓷器皿,必须用特制蜡质或塑料容器,也可在玻璃器内浸涂一厚层石蜡。软化操作最好在通风橱内进行,一个月左右可以软化完全。要检查是否已软化合适时,必须先用流水充分洗涤再进行切割,并且要戴上医用橡皮手套,绝不能草率从事。软化好的材料,可放在多孔的小盒中流水洗涤2~3 d。

用滑走切片机切片时,先准备培养皿一个,并装有蒸馏水;毛笔一支,并把要切的材料准备好。切片时先把切片刀固着在固着器上,然后把材料用二片木片夹着,材料露出木片0.5 cm,再固着于切片机的固着器上。调好材料的高度,使刀刃靠近材料的切面,并使材料与刀刃平

行。调整厚度调节器,使所指刻度正适合切片厚度的要求后,便可进行切片。切片时用右手扶切片刀固着器,往自己方向拉,材料便被刀切下而附着于刀的表面上。此时用毛笔蘸水把切片取下放于培养皿中,然后把刀推回,转动厚度推进器后,再拉切片刀。如此来回推拉,便可获得许多厚度均匀的完整切片。如切坚硬的材料可以直接夹在切片机的固着器上。柔软的材料可先夹于胡萝卜或土豆中,再进行切片。

1.1.7 组织分离制片法

植物组织分离制片法,是用各种机械或化学药剂等处理,使组织中的细胞彼此分离的制片方法。分离出来的细胞单元,可以在显微镜下观察其长、宽、厚的立体形态结构。经分离的材料,可以做临时观察,也可以制作成永久切片。根据植物材料不同,处理方法也不同。

(1)硬组织离析法

杰弗赖离析法(硝酸—铬酸法)

适应于木质化的组织如导管、管胞、纤维、石细胞等。具体方法如下:

1)配制铬酸—硝酸离析液:取10%铬酸和10%硝酸液等量混合,配制成铬酸—硝酸离析液。

2)离析前将材料洗净,切成小片或切成火柴杆粗细,长约1 cm的小条,放入平底小烧瓶中,加入为材料10~20倍的铬酸—硝酸离析液,盖紧瓶塞,置于30~40℃温箱中,约经1~2 d取少许置载玻片上,滴水加盖玻片后,用滴管橡皮头轻轻敲压盖玻片,若材料离散,表明浸渍可停止。如果材料仍未离析好,则可换新的离析液,继续浸渍1~2 d。

3)材料离析好了以后,倒去离析液,用清水反复多次清洗,直到没有任何黄色为止,然后移到70%酒精中,作随时观察。

(2)舒尔泽法(浓硝酸法)

浓硝酸离析作用很强,适用于极坚硬的材料如木材的离析。具体方法:将坚硬的木材块,先敲成碎块,然后投入盛有浓硝酸(用市售浓硝酸加蒸馏水1份制成)的试管中,材料需要完全浸没在硝酸溶液中,再加入少量氯化钾晶体,在酒精灯上微微加热,以至沸腾,直到材料变白为止倾去浸离液,用清水冲洗4~5次,并随时用玻璃棒搅动。最后保存于70%酒精中。

(3)软组织离析法

A. 盐酸法

将植物茎段沿纵轴切成若干小片,浸入4份95%酒精及1份盐酸的混合液中1~2 d。经水洗,换4~5次,移入10%氨水10~15 min,再用水洗。为了加速离析,可用玻棒搅动,用解剖针撕分。分离后的材料保存于70%酒精中备用。

B. 氨水离析法

此法用于观察分生组织细胞的立体形态结构。将刚发芽的蚕豆、大豆或其他植物的幼根,纵切成薄片,在浓氨水中浸泡24 h,以溶去细胞之间的中胶层,再在10%氢氧化钠的50%酒精溶液中浸24 h,然后用水清洗。最后,用染纤维素的方法染色,使材料出现深蓝色,取少许材料于载玻片上,盖上盖玻片,并解剖针柄轻敲,使细胞完全分离。在显微镜下可以观察到分生细胞的立体形态。

染色方法:先将1%碘液滴在材料上,再加一滴66.5%硫酸染色,使材料变为深蓝色。

1%碘液的配制:先将1.5 g KI溶于100 mL的蒸馏水,待全溶解后,加入1 g的碘,震荡溶解。

66.5%硫酸溶液的配制:7份浓硫酸加上3份蒸馏水配制而成。配制时,将浓硫酸慢慢加入蒸馏水中,并不断用玻棒搅动。

1.2 植物石蜡切片的制作

1.2.1 石蜡切片的应用范围

制片的基本要求是尽量保持原来的结构,切成适当的厚度,应用各种染色方法使内部各种结构清晰易见,使材料保持长久,不变形、不褪色。

石蜡制片的优点是一般的材料都适用、切片薄。能切成连续的蜡带,可以观察到细胞和组织结构的连续变化过程,这是其他方法所不及的。

缺点是制片过程复杂,不适合制作比较坚硬的材料,如木材切片、竹材切片等等。

1.2.2 基本试剂和用具

蒸馏水、洗液(重铬酸钾,浓硫酸)、95%乙醇(工业用),95%乙醇(试剂纯),95%乙醇(化学纯),纯乙醇,冰醋酸,甲醛,叔丁醇,二甲苯,丁香油,石蜡 48~50℃,石蜡 56~58℃,明胶,石炭酸(苯酚),甘油,粘贴剂,番红、固绿等各种染料,树胶(封固剂),胶片、像纸、显影剂、定影剂。

天平、大小烧杯、大小量筒、大铝锅、电炉、大标本缸、温箱、冰箱、大小培养皿、针筒、显微镜、放大镜、切片机、磨刀机、载玻片 1.5 mm,盖玻片,滴管、试剂瓶,漏斗、滤纸,载玻片架,染色缸,蜡管,小瓷杯(小酒杯),小纸盒(蜡盒),大盆,标签,铅笔、记号笔,毛笔,酒精灯,解剖针,镊子,展片台,剪刀、解剖刀,单面刀片、双面刀片、绸缎,蜡带盒、显微摄影设备,暗室及其设备等等。

1.2.3 石蜡切片的步骤

石蜡切片包括切片前的准备,选材,杀死、固定和保存,冲洗和脱水,透明,浸蜡和包埋,切片,粘片,染色,封固(封片)等步骤。下面依次介绍。

切片前的准备

恒温水浴锅首先预热至 35~40℃。

蜡块整修,将蜡块组织面的石蜡用刀修去,使组织全部暴露出切面并修平,以减少切片刀的磨损。将组织块左右两侧的石蜡在不损伤组织及影响诊断的原则上,全部切除;否则切片容易皱褶。组织块上下边缘的石蜡视组织情况修齐修平;石蜡不须留得过多,应尽量少留,以保持组织间距的最小限度。这样切下的切片既呈带状,也不弯曲。片距小,在贴片时就可相应多贴片,有利于检查诊断。修切蜡块时只能一点一点地切掉蜡边,要是大片修切易使蜡块断裂露出组织;遇此情况应返入新蜡再次包埋。

载玻片应事先洗涤干净,无油腻和不透明现象,应将载玻片浸入酸缸内 12 小时后流水冲洗,再烤干备用。根据切片需要张数,每片涂上一层极薄的蛋白甘油,插于载片板(或载片架)上备用。

蛋白甘油的配制:取新鲜鸡蛋 1 份加甘油 1 份再加适量麝香草酚搅匀。此法主要是防止脱片,实际上一张很清洁的载玻片不涂蛋白甘油也不会脱片。

将锋利的刀片装入切片刀夹钳内,调整角度和位置后随即紧固,检查切片刀的倾斜度是否

正确,倾角过大、则切片上卷;倾角过小则切片皱起,以 $20^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 为佳。

备用小型毛笔、小型无钩镊子、铅笔。

选材

为了全面地观察到组织和细胞中各种细致的结构,采集标本时必须选择健全而有代表性的植物,而且在采集标本时尽可能的不要损伤植物体或所需要的部分。如果所采集的材料应立即杀死固定,而条件不能满足时,应尽量防止材料变干、损伤和生霉。已经压制的干标本可以将它放在水中浸软后再做切片,但只能用于观察维管束排列等较粗略的构造,而不能作精细的研究。

取材时一般的要求是新鲜、健康、正常、有代表性,大小不超过 $1\sim 2\text{ cm}$,在能满足观察的前提下越小越好,以便能使固定液迅速进入组织、杀死细胞和便于切片。

最好先通过徒手切片在显微镜下观察,以确定材料是否可用。

切割材料时,刀要锋利,用力要均匀,避免组织破裂,影响制片效果。

现将采集各类植物和不同器官时应注意的事项分述如下:

叶 采集叶的时候,应该用刀片将叶柄切下,如果不能立即固定杀死,可将叶片夹在潮湿的纸内,放在采集箱或其它密闭的容器内。带回来的叶子如有枯萎现象,须先使其潮湿,恢复原状后固定。

茎 带有叶子的茎,采回来后如果不能立即固定杀死,可放在盛水的花瓶或其它容器内养几天。如果在野外采集,没有条件用此法保存时,可将茎切成很长的几段,用湿纸包起来,放在采集箱内带回实验室后取样固定。

根 采集根及其它地下器官时,不要用力将根拔出来,以免柔软的皮层与中柱部分分离。而应先将泥土翻开,将根挖出来,将泥土洗净,然后用湿纸包好后拿回实验室固定杀死。

花 将整个花或花序摘下来,包在潮湿的纸内,然后贮藏在密闭的容器内放在阴凉处,果实的采集与贮藏也可以这样。

苔藓植物 采集这些材料时,应将一大簇植物连底土一起采,然后放在潮湿的容器内,使植物体吸收水分而展开,把植物体放在解剖镜下,将所需部分解剖出来固定。

藻类 将藻类带水一块采集,放在阴凉处。许多丝状藻类拿回实验室中会很快衰老而死亡,所以这些藻类采到后必须立即固定。

肉质菌类 许多大的肉质菌类可以包在蜡纸里贮藏一段时间,但不可太久,否则容易损坏。小的菌类应夹在潮湿的纸内,再包上蜡纸,但时间不可太长,固定愈快愈好。

杀死、固定和保存

(杀死和)固定

将观察材料尽快置于特定的药剂(固定剂)中,将其细胞迅速杀死,并使它尽量保持生活时的自然状态(固定),而不至于在细胞死亡之前材料的形态和结构发生变化,如,结构发生萎缩或分解。这一过程称为杀死和固定,要求是越快越好。

固定时要注意的事项:

固定液的用量要达到材料体积的 $20\sim 50$ 倍,否则,材料中的水分稀释固定剂的浓度,降低固定效果。

固定时要对材料进行真空抽气。组织、细胞中都有空气,会阻止固定剂渗透到组织中,使固定不全面和不彻底,影响后续的浸蜡、切片等等。抽气最好用抽气泵抽气,简易的可以用针筒抽气,或用自来水抽气装置抽气。

保存

材料经过固定后,需要保存下来以备利用,这一过程中,要求材料的结构不会发生变化。有些杀死剂和固定剂本身就是良好的保存剂,有些则不然。通常使用的保存剂是 70% 的酒精溶液,可以使一般的材料保存较长的时间而不至于变坏。保存时,通常还要求在冰箱中存放。

好的固定剂的特点:

渗透力强;迅速杀死原生质,并显示出其原来的细微结构;

增加细胞结构及内含物的折光程度,使各部结构更为清晰,有利于显微镜观察;

使组织适当地变硬,并具有一定的坚韧性,便于切片。但又不能过于坚硬或变为松脆,反而不利于切片;

促进生物组织对某些染色剂的媒染作用,能使组织增加染色能力;

使组织或细胞不发生收缩和膨胀;

有良好的保存作用,使材料固定后能经久不坏。表 1.1 总结了主要的固定剂的性质。

表 1.1 主要的固定剂性质

名称	优点	缺点	注意要点	特点
纯酒精	渗透力强,有脱水作用。	原生质收缩。	单独用时,时间要短,几 min 到 1 h 足够。酒精是还原剂,易被氧化成乙醛和乙酸,不宜与洛酸、重洛酸甲或钼酸等配合。能与甲醛、冰醋酸、丙酸等配合。	使组织中的蛋白质发生不溶性沉淀,使核酸发生可溶性沉淀,还可以溶解脂类物质,不适宜用于这一类材料的固定。
95%酒精	材料固定后无需冲洗就可以脱水,使用简便。	原生质收缩,但仍然能保持细胞壁的形状。	单独用时,时间十几 min 到 1~2 h 足够。固定时间长,材料变脆、易折断,难以切片。	适宜制作无需保存细胞内含物的切片。
甲醛 (Formalin), HCOH 福尔马林	市面出售为饱和液,浓度为 40%,又称福尔马林,是很好的硬化剂。	材料易收缩。渗透力慢。与酒精混合,可以阻止材料过于坚硬。	单独用时,浓度一般为 5%~10%。是强还原剂,易氧化为蚁酸,故不能与洛酸或钼酸等配合。	甲醛储存过久会变成蚁醛酸,可加入 5% 的吡啶中和。
冰醋酸(glacial acetic acid) H ₃ COOH	渗透力强而快,能溶解脂肪,可保存蛋白质不变质,是染色体很好的保存剂。	组织发胀,可阻止酒精、甲醛等引起的收缩。		通常以 1%~5% 的浓度作固定剂。
洛酸 (cronic acid) H ₂ CrO ₄	固定蛋白质、核蛋白、核酸等产生良好的不溶性沉淀。它对脂肪和拟脂类没有作用。生物制片中使用广泛,尤其在细胞学制片中不可缺少,是许多固定剂的基本成分。	缺点是阻止易收缩,渗透力弱,而且阻止易过度硬化。一般以 0.5%~1% 水溶液用,用量要多,固定后用水彻底冲洗干净。	是强氧化剂,即配即用,也不能与酒精、甲醛等合用,否则很快还原为氧化洛而失效。用洛酸处理的材料易出现棕红色有碍染色,可将切片浸入 1% 的高锰酸钾水溶液中漂白 1 min,再用水洗净,再浸入 5% 的草酸中 1 min,水洗净即可。	是三氧化洛水化物,红棕色结晶体,极易潮解故容器必须严密封紧。阻止固定在洛酸中时,不能暴露在阳光下,以引起蛋白质分解。
苦味酸(三硝基苯酚)(picric acid) C ₆ H ₂ (NO ₂) ₃ OH	常用其饱和水溶液(溶解度 0.9%~1.4%)固定,使蛋白质、核蛋白、核酸沉淀,对于胚囊自由核时期的固定效果很好,还可以阻止过度硬化和增进染色效果。	渗透力强,但组织收缩强。		很少单独使用。

(续)

名称	优点	缺点	注意要点	特点
锇酸 (osmic acid) OsO_4	能良好固定细胞的细微构造,是脂肪类的唯一固定剂。是细胞学研究的最好固定剂,在电镜的超薄切片中作为主要的固定剂。材料经此固定后,能防止用酒精脱水时产生沉淀。	是目前最昂贵最好的固定剂。渗透力很弱,因而往往材料外部已经固定过度,而内部还未完全固定,所以材料越小越好。	配置时容器和水要绝对干净,如有任何有机质,就可以使起还原成黑色,而失去固定作用。保存时用棕色瓶装。	通常单独使用,不能与甲醛、酒精混合。强烈的氧化剂,配置时要高度小心,不能与皮肤直接接触。配置成 2% 水溶液,或饱和水溶液(约 6%)。
重铬酸甲 (potassium dichromate) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	强烈硬化剂,但是渗透力很弱,所以材料越小越好。	强烈的氧化剂,不能与甲醛、酒精混合。很少单独使用。	因配合物不同,具有不同的效果。与酸性液体混合时,在 pH 4.2 以下,可以固定染色体,但不能固定线粒体。pH 5.2 以上,可以溶解染色体,但是细胞质则保持得均匀一致,尤其固定线粒体效果好。	配置成 1%~3% 水溶液使用,其饱和水溶液浓度约 9%。
氧化汞 (升汞) (mercuric chloride) HgCl_2	作用快,渗透力强,固定蛋白质,不足是细胞易收缩。	升汞留于细胞中会形成结晶,所以用升汞固定的材料一定要清洗干净。	用其固定的材料不能久留,要及时包埋,以免材料经久会变坏。	剧毒。
碘 (iodine) I_2				

混合固定剂

实际使用中几乎都是用混合固定剂,使单一固定剂的缺点得到弥补,如能使细胞收缩的试剂要与能使细胞膨胀的试剂配合使用等等。强氧化剂与强还原剂也不能同时配制在一起,如果需要混合使用,也要分开配制,用时再混合。

产生酸性固定相的固定液

这类固定剂产生的固定相完全呈酸性反应,对染色质和核仁具有良好的固定,但是细胞内含物被溶解。植物制片中应用的固定剂大多数属于这类固定剂。

(1) 酒精—甲醛固定剂

70%酒精 100 mL + 甲醛 10~20 mL

用于固定一般生物组织,不发生收缩,效果很好。尤其用于在柱头上萌发的花粉管的固定。染色质和核仁固定良好,内含物被溶解。固定的时间通常为 24 h,也可以作保存剂。甲醛的用量可视材料而定。

(2) FAA 固定剂(酒精—甲醛—冰醋酸固定剂)

使用方便、效果较好、应用也最广。可以固定一般植物材料和昆虫、甲壳类动物。又是良好的保存液。固定时间几个 h 以上。

不适宜细胞学和藻类学用途的固定,因为酒精可以溶解脂类及使原生质收缩。

配方:

50%~70%酒精 90 mL + 冰醋酸 5 mL + 甲醛(40%) 5 mL

上述冰醋酸和甲醛的比例常常依据植物材料而调整;如果发现原生质收缩,可以适当增加冰醋酸比例。容易引起收缩的材料可以多加冰醋酸而减少甲醛;坚硬的材料可以略为减少冰醋酸而增加甲醛。

酒精浓度的使用:固定柔弱幼嫩的材料用低浓度的酒精,如 50%;固定较老或较坚硬的材

料用 70% 的酒精。

如果固定植物胚胎材料,配方可以修改为:

50% 酒精 89 mL + 冰醋酸 5 mL + 甲醛(40%) 6 mL

保存时,在上述的配方中按体积的 5% 加入甘油(体积比)能防止液体蒸发和材料变硬,保存效果更佳。

经过 FAA 固定的材料,用 50%~70% 的酒精换洗 2 次就可以进行脱水。

(3) 酒精—醋酸固定液

卡诺(carnoy)固定液:

甲液:纯酒精 15 mL + 冰醋酸 5 mL 现用现配,不能久放。

乙液:纯酒精 30 mL + 冰醋酸 5 mL + 氯仿 15 mL 现用现配,不能久放。

可以甲液、乙液等量混合使用,但是使用时现配现混合。

渗透力强,只需要 20 min 至 3 h,时间太久则材料受到破坏,材料膨胀、发粘。固定毕,需要用纯酒精洗涤 2~3 次,直至材料不含冰醋酸及氯仿的气味为止。

产生碱性固定相的固定液

这类固定液产生的固定相完全为碱性反应,所有的染色质均可以溶解,该类固定液适合相线粒体和液泡等的固定。主要有以下两种:

(1) 齐—欧氏液(Zirkle-Erlik)液

重铬酸钾 1.25 g

重铬酸氨 1.25 g

硫酸铜 1 g

蒸馏水 200 mL

(2) 齐氏还原铬酸液

硫酸铬 5 g

氧化铜 稍过量(即饱和并稍过量)

甲醛 10~50 mL

蒸馏水 50~90 mL(最后使溶液总量为 100 mL)

冲洗与脱水

冲洗的意义:

材料经固定后,在进行下一步或将材料保存起来前,一般都要把材料冲洗干净,作用是让冲洗液渗透到材料中,把固定液彻底替换出来。

常用的冲洗液是蒸馏水或一定浓度的酒精。一般水溶性的固定液用水来冲洗,酒精溶液的固定液用同浓度的酒精来冲洗。

冲洗的方法

一般材料在试管或试剂瓶中更换数次(倾倒或用吸管吸出),每次 1~2 h 即可。

某些难洗净的材料用流水冲洗一定时间。

脱水的作用

脱水就是把材料浸泡到能够与水分混溶的药剂中,使材料中的水分逐步(逐级)被吸出,最后全部被代替干净,有两个作用:

使材料变硬,形状更加稳定。

除净材料中的水分,才能使包埋剂和封固剂渗透到组织中。因为通常的包埋剂和封固剂