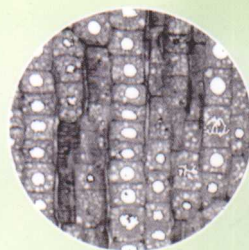
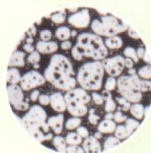
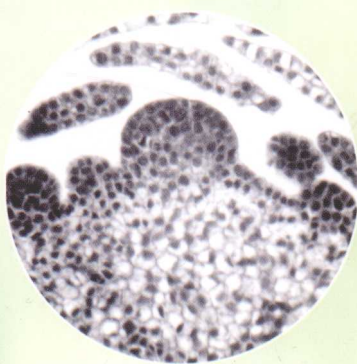




全国高等农林院校“十一五”规划教材

生物显微技术

王庆亚 主编



 中国农业出版社

全国高等农林院校“十一五”规划教材

生物显微技术

王庆亚 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物显微技术/王庆亚主编. —北京: 中国农业出版社, 2010. 8

全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978-7-109-14821-5

I. ①生… II. ①王… III. ①生物显微镜—高等学校—教材 IV. ①TH742.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 140825 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100125)

责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 21.5

字数: 515 千字

定价: 35.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本教材介绍了生物显微技术的基本理论、生物制片的基本方法以及常用动物、植物和微生物的制片技术、生物显微化学、光学和电子显微镜技术，还介绍了近期科研工作中的新方法、新技术，如原位杂交和植物染色体技术、数码显微摄影技术等。书中介绍的技术在教学、科研实际工作过程中比较切实可行。

本教材可供与生命科学相关的本科专业使用，也可作为大专院校相关专业的教材及生物学爱好者的参考书。

主 编 王庆亚（南京农业大学）

副 主 编 李贵全（山西农业大学）

参编人员（按姓氏笔画排序）

尹增芳（南京林业大学）

石火英（扬州大学）

孙建云（南京农业大学）

吴金男（常熟理工学院）

陈秋生（南京农业大学）

林国庆（南京农业大学）

季祥彪（贵州大学）

赵海泉（安徽农业大学）

郝建华（常熟理工学院）

晏春耕（湖南农业大学）

前 言

21 世纪是生物科学的世纪，生命科学将成为自然科学的带头学科。随着科学技术的发展，生物学研究的技术手段日益先进，生物显微技术是生物学工作者教学、科研的基本技术之一。一直被生物学工作者重视和应用，近年来，随着科学技术的发展，生物显微技术得到了很大的提高，新的技术已被越来越多地被掌握使用，生物显微技术的内容不断丰富。

本教材的编写参考了国内外生物显微技术书籍及近期科研工作的新方法、新技术。注意理论和实践的统一，力求在介绍传统基本技术的基础上，增加生物显微技术研究领域的新内容、新成果。全教材共 12 章，第一章介绍了生物显微技术的发生发展以及今后的趋势；第二章和第三章分别介绍了生物制片的基本原理以及常用生物制片的基本方法；第四、五章和第六章分别介绍常用植物、动物和微生物的制片技术；第七章和第八章分别介绍近年发展起来的植物染色体技术和原位杂交；第九章介绍生物显微化学；第十章和第十一章分别介绍光学显微镜技术和电子显微镜技术；第十二章介绍了数码显微摄影技术。本教材不仅阐述生物显微技术的原理和技术流程，同时对实验中经常出现的问题做了较好的分析，指出了解决问题的途径和方法。便于学生扩大知识面，为学生将来走上工作岗位后进行有关科研工作打下良好的技术基础。

本教材编写人员的分工如下：第一章由王庆亚和林国庆编写，第二章由尹增芳编写，第三章由孙建云编写，第四章由季祥彪编写，第五章由陈秋生编写，第六章由赵海泉编写，第七章和第八章由李贵全编写，第九章由晏春耕编写，第十章由林国庆和王庆亚编写，第十一章由石火英编写，第十二章由郝建华和吴金男编写，最后由王庆亚统稿。

本教材编写过程中得到了南京林业大学丁雨龙教授、扬州大学金银根教授、安徽农业大学何金铃副教授的鼓励和帮助，得到了南京农业大学教务处、生命科学学院领导以及植物生物学系教师的关心和大力支持。中国农业出版社的编辑提出了非常宝贵的意见，南京农业大学生物学实验中心史永红同志在图片和

文字处理等方面付出了辛勤的劳动，在此一并表示衷心的感谢。我的导师李扬汉教授生前十分重视显微技术，特将自己的专著《禾本科作物的形态与解剖》、《蔬菜解剖与解剖技术》送给我，嘱我好好学习，并亲自指导。参加工作后，长期跟随徐汉卿教授学习植物制片技术。两位先生对我的言传身教影响很深，谨以此书纪念恩师李扬汉教授和徐汉卿教授。

生物显微技术是一门发展中的学科，限于编者的知识水平，书中缺点和谬误在所难免，恳请各位专家、学者与读者批评指正，以便改进和提高。

王庆亚

2010年6月

目 录

前言

第一章 概论	1
第一节 生物显微技术的内容和应用	1
第二节 生物显微技术的发展简史	1
一、16 世纪的显微技术	2
二、17 世纪的显微技术	2
三、18 世纪的显微技术	3
四、19 世纪的显微技术	4
五、20 世纪的显微科学	5
第三节 现代生物显微技术	6
一、透射电子显微镜	6
二、扫描电子显微镜	6
三、近场光学显微镜	7
四、X 射线显微技术	7
五、扫描探针技术	7
复习思考题	9
第二章 生物制片的基本原理	10
第一节 材料的采集与处理	10
一、植物材料的采集与处理	10
二、动物材料的采集与处理	11
第二节 固定和固定液	12
一、固定	12
二、固定液	12
三、固定时的注意事项	19
第三节 冲洗与脱水	20
一、冲洗	20
二、脱水	21
第四节 透明与透明剂	23
一、透明	23
二、透明剂	24
第五节 包埋与包埋剂	25
一、包埋	25

二、包埋剂	25
第六节 切片与粘片	26
一、切片	26
二、粘片	29
第七节 染色原理及染色剂	29
一、染色原理	30
二、染色剂	31
第八节 封藏与封藏剂	37
复习思考题	38
第三章 常用生物制片的基本方法	39
第一节 徒手切片法	39
一、概述	39
二、徒手切片法常用器具	39
三、徒手切片的方法	39
四、注意事项	40
第二节 石蜡切片法	40
一、概述	40
二、石蜡切片常用器具及药品	40
三、石蜡切片的方法	40
四、石蜡切片的注意事项	45
五、石蜡切片及其染色程序总结	46
第三节 冰冻切片法	47
一、概述	47
二、冰冻切片的主要仪器和用具	48
三、冷冻切片的方法	48
四、注意事项	50
第四节 半薄切片法	51
一、概述	51
二、半薄切片常用器具及药品	51
三、半薄切片的方法	51
四、塑料厚切片法	53
第五节 非切片制片法	54
一、整体制片法	54
二、离析法	57
三、压片法	58
复习思考题	63
第四章 常用植物制片技术	64
第一节 整体封片技术	64
一、地木耳装片	64

二、水绵装片	65
三、葫芦藓整体装片	66
四、葫芦藓原丝体装片	66
五、马尾松花粉粒装片	67
六、百合花粉粒萌发装片	68
七、禾本科植物叶表皮装片	69
八、蚕豆叶下表皮装片示气孔	69
九、洋葱鳞片叶表皮装片	70
第二节 组织器官制片技术	71
一、玉米花药减数分裂制片（涂抹法）	71
二、洋葱根尖细胞压片法示有丝分裂	72
三、导管分离装片	73
四、柿胚乳细胞胞间连丝的制片法	73
五、蚕豆石蜡制片示线粒体	75
六、桑石蜡制片示皮孔	76
七、橘果皮分泌腔制片	76
八、洋葱根尖纵切石蜡制片示细胞有丝分裂	77
九、地衣原植体横切石蜡制片	78
十、地钱生殖托纵切石蜡制片	79
十一、葫芦藓精子器和颈卵器纵切石蜡制片	79
十二、毛茛根初生构造横切石蜡制片	80
十三、木槿根的次生构造横切石蜡制片	81
十四、湖南山核桃花序纵切石蜡制片	81
十五、木材材料制片法	82
十六、三叶草叶片横切石蜡制片	83
十七、百合花药横切石蜡制片	83
十八、百合子房横切石蜡制片	84
十九、荠菜角果纵切石蜡制片	84
二十、葡萄胚纵切	84
复习思考题	85
第五章 常用动物组织制片法	86
第一节 涂片法	86
一、Giemsa 染色法	86
二、Wright 染色法	87
三、Giemsa-Wright 混合染色法	87
第二节 无丝分裂（膀胱印片）法	87
第三节 间皮硝酸银染色制片法	88
第四节 纤维性结缔组织与细胞的制片术	88
一、胶原纤维	88
二、弹性纤维	91
三、网状纤维	92

四、巨噬细胞	95
五、浆细胞	96
六、肥大细胞	96
第五节 软骨和骨	98
一、软骨	98
二、骨	99
第六节 血管注射技术	102
第七节 消化器官	104
一、常规苏木精-伊红染色法	104
二、过碘酸 Schiff 反应 (PAS)	105
三、阿利新蓝染色法	105
四、黏液卡红 (mucicarmin) 染色法	105
五、小肠潘氏细胞染色法	106
六、闭锁堤	106
七、消化管的内分泌细胞	106
八、肠肌丛 (Auerbach 神经丛) 镀银法	109
九、肝血管双色注射	109
十、肝血窦内星状细胞 (Kupffer 细胞) 活体注射显示法	109
十一、肝细胞间的胆小管显示法	110
十二、肝储脂细胞显示法	111
十三、胰岛 A 细胞、胰岛 B 细胞及胰岛 D 细胞显示法	111
第八节 呼吸器官	113
一、取材	113
二、固定	114
三、嗅细胞及神经显示法	114
四、肺的弹性纤维染色法	114
五、肺的网状纤维染色法	114
六、肺泡毛细血管网注射显示法	114
七、肺泡上皮镀银法	114
八、肺泡 II 型细胞显示法 (McNary)	115
九、分离气管上皮细胞法	115
第九节 泌尿器官	115
一、肾的常规染色	116
二、球旁细胞颗粒染色	116
第十节 生殖器官	117
一、精液内的精子检测	117
二、三色法	118
三、巴氏精液涂片染色法	118
四、精子核的苯胺蓝染色法	119
五、精子核的萘酚磺酸钠染色法	120
六、精子顶体的结晶紫染色法	120
七、精子顶体的酶活性检测——底膜法	121

八、动物精子头部膜的超薄切片改进染色法	121
第十一节 全鸡胚制片法	122
复习思考题	123
第六章 常用微生物制片技术	124
第一节 细菌的制片技术	124
一、简单染色法	124
二、革兰氏染色法	125
三、芽孢染色法	126
四、荚膜染色法	127
五、鞭毛染色法	128
第二节 放线菌的制片技术	130
一、插片法	130
二、印片染色法	131
三、凹载玻片培养法	131
第三节 真菌的制片技术	132
一、水浸制片观察霉菌的菌体形态	132
二、根霉接合孢子的培养与观察	133
三、酵母菌子囊孢子的培养与观察	134
四、伞菌子实体的压片观察	135
复习思考题	135
第七章 植物染色体技术	136
第一节 植物染色体常规压片技术	136
一、取材	136
二、预处理	138
三、压片法	142
四、低渗法	146
五、减数分裂的制片	147
第二节 植物染色体分带技术	148
一、Giemsa 分带	148
二、荧光分带	160
三、显带机制	161
第三节 植物染色体银染色技术	163
一、银染色技术	163
二、染色体的银染色原理	163
三、染色体银染色法分类及技术流程	165
第四节 植物染色体核型和带型分析	170
一、核型分析的意义	170
二、核型分析	171
三、染色体图像分析	182

复习思考题	184
第八章 原位杂交	185
第一节 原位杂交的基本原理	185
第二节 染色体原位杂交技术	186
一、植物核 DNA 的提取	186
二、探针及标记	190
三、染色体制备	197
四、杂交前处理	200
五、杂交反应	201
六、杂交后处理	203
七、杂交信号的检测	203
八、复染和封片	206
九、观察和摄影	207
十、载玻片的再杂交	207
十一、对照	207
十二、疑难解答	208
第三节 RNA 原位杂交技术	209
一、取材和固定	209
二、标本制备	210
三、探针及标记	210
四、杂交前处理	211
五、杂交反应	211
六、杂交后的处理	212
七、杂交信号的检测和对比染色	212
八、RNA 原位杂交结果的评定	212
第四节 原位杂交的应用	213
一、植物基因的染色体物理作图	213
二、染色体识别、分子核型构建和异源多倍体物种进化等	214
三、减数分裂染色体行为的分析和外源染色体或染色体片段的检测	214
四、基因组的空间分布	215
五、植物基因表达的规律	215
六、荧光原位杂交技术用于微生物多样性和原位功能研究	217
复习思考题	217
第九章 生物显微化学	218
第一节 概述	218
一、生物显微化学的技术要求	218
二、生物显微化学的研究内容	219
三、显微化学的研究方法	219
四、显微化学一般注意事项	220
第二节 无机物质的鉴定	221

一、钙的鉴定与定位	221
二、镁的鉴定与定位	221
三、铁的鉴定与定位	222
四、磷酸盐的鉴定与定位	223
五、草酸钙结晶的鉴定与定位	223
第三节 有机物质的鉴定	223
一、糖类的鉴定与定位	224
二、脂类的鉴定与定位	230
三、蛋白质的鉴定与定位	232
四、核酸的鉴定与定位	236
五、酶类的鉴定与定位	237
复习思考题	242
第十章 生物显微镜	243
第一节 光学显微镜的种类及性能	243
一、生物显微镜	244
二、荧光显微镜	248
三、体视显微镜	254
四、倒置显微镜	256
五、相差显微镜	258
六、激光共聚焦显微镜	261
第二节 显微镜常用技术参数与专业名词	264
一、显微镜常用技术参数	264
二、显微镜常用专业名词	267
复习思考题	271
第十一章 电子显微技术	272
第一节 透射电子显微镜结构和原理	272
一、电子光学部分	272
二、真空排气部分	274
三、电气系统	275
第二节 扫描电子显微镜的结构和原理	276
一、电子光学系统	276
二、信号检测及显示系统	277
三、真空系统和电气系统	278
第三节 透射电子显微镜的生物样品制备技术	278
第四节 生物样品的负染色技术	286
一、负染色样品的制备	286
二、负染色液的配制	287
三、负染色的操作方法	288
四、影响负染色效果的因素	288

第五节 扫描电子显微镜的生物样品制备技术	289
一、取材	289
二、前固定	290
三、清洗	290
四、后固定	290
五、脱水	291
六、更换中间液	291
七、干燥	291
八、样品的粘贴与安置	293
九、镀膜	293
十、样品观察	294
第六节 扫描探针显微镜	297
一、扫描隧道显微镜	297
二、原子力显微镜	298
复习思考题	299
第十二章 生物显微摄影及显微图像分析系统	300
第一节 生物显微摄影	300
一、普通光学显微摄影	300
二、数码显微摄影	300
三、显微图像分析系统	301
第二节 普通光学显微摄影技术	301
一、光学显微摄影装置	301
二、光学显微摄影的一般工作步骤	302
三、洗印和放大	307
第三节 生物显微图像分析系统	310
一、生物显微图像分析系统的类型和功能	310
二、生物显微图像分析系统的组成部分	310
三、图像分析的主要流程	312
四、显微图像分析中的数字图像基础知识	312
五、几个主要的显微图像分析系统软件简介	314
复习思考题	326
主要参考文献	327

第一章 概 论

第一节 生物显微技术的内容和应用

生物显微技术是用各种显微镜或电子显微镜观察和辨认微小生物（动物、植物和微生物等）的形态和显微、亚显微结构以及植物染色体技术与原位杂交等的方法和技术。生物显微技术主要包括各种显微镜、电子显微镜的使用方法，各种层次生物标本切片的准备与制作技术，以及观察结果的记录、分析技术等。

生物的一切生命活动，都是以细胞作为基本结构和功能单位进行的。因此，对生物的组织、器官的研究就显得非常重要。如石蜡切片法是动物、植物和病理组织切片制作上最重要、最常用的一种方法。除某些材料确实经不住石蜡法中各种药剂的处理或加温而不能应用外，一般的材料都可以采用石蜡切片法来制成装片在显微镜下观看或长期保存。本法的优点是可以极薄的切片，并可制作大批或是连续的切片。而且以石蜡包埋的组织块还可以长期保存。

显微摄影是一项重要的显微技术，在生物科学的研究中，从再现显微镜中物体影像的各种方法中比较，显微摄影是最好的方法。基建的结果除文字的描述外，显微照相能客观而生动的记录下生物体的细微结构或形态，它常与生物绘图技术配合，起到相辅相成的作用。显微标本的制作技术是组织学、胚胎学、生理学及细胞学等学科研究观察细胞、组织的生理、病理形态变化的一种主要方法。大多数的生物材料，在自然状态下是不适合显微观察的，因为材料较厚，光线不易透过，以致不易看清其结构。同时，细胞内的各个结构，由于其折射率相差很小，即使光线可透过，也难以辨明。但在经过固定、脱水、透明、包埋等处理后就可把材料切成较薄的片子，再用不同的染色方法就可以显示不同细胞组织的形态及其中某些化学成分含量的变化，即可在显微镜下清楚地看到其中不同的区域组分状态，切片也便于保存，所以是教学和科研中常用的方法。

第二节 生物显微技术的发展简史

生物显微技术的发展是和显微镜的发明密切联系的，可以说，显微镜的发明和显微观察技术的不断提高，推动了生物显微技术的发展，形成了微观生物学。显微镜（microscope）最早发明于16世纪晚期。至今已有400多年的历史。它是一种借助物理方法产生物体放大影像的仪器。在17世纪，虽然发明了许多现代实验科学中十分重要的仪器，如气压计、温度计、摆钟和气泵等，但是对科学界产生冲击最大的无疑是显微镜和望远镜，它们为人类探索地球上无限小的世界和无限大的宇宙提供了最新的手段。可以说，显微镜是所有促进生物学进步的仪器中最重要仪器，正因为有了它，才开创了细胞学、组织学和微生物学等学

科领域。现在,在许多科学领域(如生物、化学、物理、冶金、酿造等)的各种科研活动,显微镜已成为了一种极为重要的科学仪器,对人类的发展做出了巨大而卓越的贡献。

一、16 世纪的显微技术

罗马人在 4 世纪就把玻璃应用在门窗上,我国人民在公元前用水晶材料,创造出了透镜制造技术。马可·波罗将中国的眼镜传入欧洲,欧洲人学会了磨制眼镜的技术,他们发现凸透镜能够产生物体的放大影像,将其称为放大镜,由于只有一个透镜又称为单式显微镜。人们开始使用凸透镜来观察细小的物体,凸透镜在科学研究中开始发挥它巨大的作用。但单式显微镜存在缺点,即它的焦距与透镜直径成正比,与放大倍数成反比。即放大倍数越大,焦距越短,透镜直径也越小,当时的技术很难制造直径过小的透镜,所以放大的倍数最多为 25 倍。而体积较小的生物,如纤毛虫的长度只有 0.1 mm,即使放大 25 倍后也只有 2.5 mm,难以看清它内部的细微结构。1595 年,荷兰的著名磨镜师詹森(Janssen)发明了第一个简单的复式显微镜。这个显微镜是由 3 个镜筒连接而成。中间较粗的镜筒,是手握的地方。另外两个镜筒分别插入它的两端,可以自由伸缩,从而达到聚焦的目的。在镜筒的两端镜头都是用凸透镜,物镜是一个只有一个凸面的单凸透镜。目镜是一个有两个凸面的双凸透镜。当这个显微镜的两个活动镜筒完全收拢时,它的放大倍数是 3 倍;当两个活动镜筒完全伸出时,它的放大倍数是 10 倍。其总放大倍数为 10~30 倍,可观察一些整体小昆虫如跳蚤等,故有“跳蚤镜”之称。自此,掀起了一个显微镜研究以及以显微镜为工具、以实验和观察为目的的生命科学研究热潮,为生命科学的发展开拓了一个崭新的世界。复式显微镜与单式显微镜相比,它可以把几个放大倍数较小的凸透镜组合起来,放大率大幅度提高,获得很高的放大率。此外,也不必磨制一个个极小的透镜,制造工艺较简单。人类从此开始认识微观世界。但由于技术条件不成熟,16 世纪的显微镜放大倍数都不高,人类在探索微观世界方面的工作比较简单。

二、17 世纪的显微技术

17 世纪制造的单式显微镜,镜头镶在一个圆盘形金属眼罩的中部,两个金属手柄一长一短,长的那个手柄是手握的地方,在末端还设置了几个突起。载物台是 6 个圆孔可以转动的圆盘。使用时,将切成薄片的样品放到载物台的圆孔上,将圆孔对准光源,进行观察。从这个显微镜镜头的大小就可以看出它的放大率比较大。当时的显微镜非常精美,制造者所追求的并不是高的性能,而是视觉上的享受。

1665 年,荷兰的列文虎克(Antonie van Leeuwenhoek)(1632—1723),用自己磨制的玻璃透镜,组成光学显微镜,观察了许多动植物的活细胞与池塘水中原生动物。1675 年,列文虎克观察雨水,他发现了极小的小虫子,经过反复观察和思考后给英国皇家学会写信,向全世界公布他的发现。后又第一次看到了血液里红色的红细胞(直径约 $7\text{ }\mu\text{m}$)。1683 年,他在显微镜下,模模糊糊地看到了在牙垢中比红细胞还要小的细菌。列文虎克见过的细菌,大小约为 $1\text{ }\mu\text{m}$,差不多是当时光学显微镜所能看到的最小的东西,从而开创了微生物学。列文虎克还正确地描述了微生物的形态有球形、杆状和螺旋样等,证实了毛细血管的真实存