

切片材料的染色方法

—电镜技术—

切片材料的染色方法

—— 电镜技术 ——

路易斯 著

〔英〕 P. R. Lewis

D. P. Knight

李 译

严 共 华

洪 涛 校

人 民 卫 生 出 版 社

STAINING METHODS FOR
SECTIONED MATERIAL
——Practical Methods in
Electron Microscopy——

P. R. Lewis

D. P. Knight

NORTH-HOLLAND PUBLISHING COMPANY
AMSTERDAM • NEW YORK • OXFORD
1977

切片材料的染色方法

—— 电镜技术 ——

严共华 译 洪 涛 校

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 12印张 4插页 250千字

1981年9月第1版第1次印刷

印数：1—4,000

统一书号：14048·3975 定价：1.25元

作者前言

如果不通过某种适当的染色方法增强反差，生物材料的超薄切片是很难用普通透射电子显微镜（以下简称电镜）技术进行研究的。现在，已经有很多染色方法了。有的很简单，如形态学染色的枸橼酸铅法；有的则很复杂，如很多酶细胞化学方法。本书主要就是讲这些方法的具体作法和存在问题，重点则是在一个具有中等设备条件的实验室里怎样来实施这些方法。

本书有两个目的。其一是帮助初作电镜工作的人对已发表的各种技术进行选择；其二是为那些确实有用而且比较好用的方法提供一本简明的资料汇编。为达到第一个目的，对这些染色技术的化学基础作了一些讨论。熟悉光学显微镜（以下简称光镜）组织化学技术会有助于理解三、四、五章中那些比较复杂的染色程序，但是，我们希望这本书也能充分满足初学者的需要。为了达到第二个目的，还收入了一些难度较大的细胞化学技术。这些技术最好不要由新手作，但是，只要细心，好好练习，其中的大多数方法也不是太难掌握的。

为便于实验室内参考使用，大多数方法都是分条陈述的。只是在讨论几个较复杂的酶技术时没有完全这样做。一般讲，一个方法只有除创立它的实验室之外，至少还有两个实验室应用成功了才予以分条叙述。本书的文献调查完成于1975年春，关系特别密切的较近的参考资料也收入了，但着重点不是要把电镜上用的每个方法的最新应用和改进都收集起来，而是要给那些适合普通电镜工作者用的基本的、可靠的染色方法提供更丰富的细节。

目 录

作者前言

第一章 引言	1
1.1 切片染色的目的	2
1.2 组织固定	8
1.2.1 作初固定剂用的醛类	9
1.2.2 几个化学问题	10
1.2.3 固定程序	14
1.3 组织制备	14
1.3.1 获得薄组织片的简单方法	15
1.3.2 组织切片机	17
1.3.3 组织切片的定向	18
1.3.4 特殊包埋技术	19
1.4 实验室的安全	20
第二章 电镜技术中的细胞学染色方法	27
2.1 电镜观察用的厚树脂切片	28
2.1.1 厚切片的处理	28
2.1.2 电镜用树脂切片的染色	29
2.2 处理超薄切片的程序	32
2.2.1 载网上切片的染色	33
2.2.2 未载网超薄切片的染色	38
2.2.3 除去超薄切片上的铅	39
2.2.4 染色程序的选择	39
2.3 铅染色剂	43
2.3.1 铅染的一般程序	43

2·3·1 a	氢氧化铅水溶液染色程序·····	44
2·3·2	碱性铅盐溶液染色·····	45
2·3·2 a	铅染法 A (Karnovsky 1961) ·····	45
2·3·2 b	铅染法 B (Karnovsky 1961) ·····	46
2·3·2 c	铅染法 C ——酒石酸铅染色法 (Millonig 1961) ·····	46
2·3·2 d	铅染法 D ——枸橼酸铅染色法 (Reynolds 1963) ·····	46
2·3·2 e	铅染法 E ——枸橼酸铅染色法 (Venable 和 Coggeshall 1965) ·····	47
2·3·2 f	铅染法 F ——枸橼酸铅染色法 (Fahmy 1967) ·····	47
2·3·3	铅染液的用途·····	48
2·4	醋酸双氧铀·····	48
2·4·1	醋酸双氧铀酒精溶液·····	49
2·4·2	铀盐水溶液·····	49
2·4·3	醋酸双氧铀块染程序·····	50
2·5	双染法·····	52
2·6	其它细胞学染色剂·····	56
2·6·1	四氧化钼·····	57
2·6·1 a	钼-硫卡巴胍-钼法·····	59
2·6·2	磷钨酸·····	60
2·6·3	高锰酸钾·····	62
2·6·4	证实生物胺的方法·····	64
2·6·5	其它非特异染色法·····	67
2·7	电镜技术中的示踪剂·····	67
2·7·1	真溶液中的小分子·····	68
2·7·1 a	硝酸钼和钒红·····	69
2·7·1 b	葡萄糖亚铁在体内的应用·····	70

2·7·2	胶体粒子·····	72
2·7·2 a	胶体金的制备方法·····	72
2·7·3	酶和金属蛋白质·····	74
第三章	普通细胞化学方法·····	92
3·1	现有技术的局限性·····	92
3·2	广谱特异性细胞化学方法·····	94
3·2·1	证实酸性或硷性基团的程序·····	94
3·2·2	某些羟基的染色剂——乙醇铊·····	95
3·3	核酸染色法·····	97
3·3·1	核酸的一般染色法·····	97
3·3·1 a	核酸的三氯化铊染色法·····	97
3·3·1 b	核酸的钨酸钠染色法·····	99
3·3·1 c	核酸的醋酸双氧铊染色法·····	99
3·3·2	DNA 的特异染色法·····	100
3·3·2 a	DNA 的富尔根-六亚甲四胺银染色法·····	101
3·3·2 b	DNA 的富尔根-席夫-乙醇铊染色法·····	101
3·3·3	RNA 的选择性染色·····	105
3·4	蛋白质的一般染色法·····	107
3·4·1	丙烯醛在蛋白质染色中的应用·····	107
3·4·2	蛋白质的磷钨酸染色法·····	108
3·4·3	硫氢基的特异染色法·····	109
3·4·3 a	高硫蛋白质的染色法·····	111
3·5	碳水化合物的特异染色法·····	114
3·5·1	过碘酸氧化法的特异性·····	115
3·5·1 a	醛基阻断法·····	117
3·5·2	碳水化合物的过碘酸-六亚甲四胺银染色法·····	117
3·5·3	碳水化合物的氨基硫脲-蛋白质酸银染色法·····	119
3·5·4	碳水化合物的过碘酸-碱性铋染色法·····	122
3·6	酸性粘液物质的染色法·····	123

3.6.1	含铁溶液的应用	124
3.6.2	用铁溶液块染酸性粘液物质的方法	125
3.6.3	用铁染超薄切片酸性粘液物质的方法	126
3.6.4	用胶体钍染酸性粘液物质的方法	126
3.6.5	酸性粘液物质的其它染色法	128
3.7	脂类染色法	130
3.7.1	保存脂类用的特殊脱水和包埋方法	131
3.7.2	保持脂类的氨基塑料包埋剂	131
3.7.2 a	戊二醛-卡巴肼混合物 (GACH) 包埋	133
3.7.2 b	戊二醛-尿素混合物 (GUR) 包埋	134
3.7.2 c	戊二醛-尿素乙二醇甲基丙烯酸酯共聚体 (GUGM) 包埋	135
3.7.3	用毛地黄皂甙保存胆固醇	136
3.7.4	磷脂的保存	138
3.8	无机离子沉淀法	139
3.8.1	用焦锑酸盐沉淀钠	139
3.8.2	钙离子的显示法	140
3.8.3	磷酸盐离子的沉淀	141
3.8.4	氯化物离子的沉淀	142
3.8.5	显示重金属的方法	142
3.9	提取方法	144
3.9.1	某些固有的困难	145
3.9.2	核酸的提取	147
3.9.3	蛋白水解酶的应用	148
3.9.4	多糖的提取	150
第四章	水解酶的金属沉淀法	167
4.1	酶细胞化学原理	167
4.1.1	一些理论上的考虑	169
4.1.2	理论上的一些推论	173

4.1.3	孵育阶段的细则	174
4.2	酶细胞化学的一些实际问题	178
4.2.1	孵育用组织样品的制备	179
4.2.2	孵育时可能产生的问题	182
4.2.3	孵育后遇到的问题	184
4.2.4	一个典型的孵育程序	187
4.3	酸性水解酶的染色方法	189
4.3.1	酸性磷酸酶的显示法	190
4.3.2	酸性磷酸酶的常规染色法	191
4.3.3	酸性单核苷酸酶的显示法	194
4.3.4	核苷酸二磷酸酯酶, 特别是硫胺焦磷酸酶的显示法	195
4.3.5	硫酸酯酶技术	197
4.4	水解 ATP 的酶类	199
4.4.1	命名问题	200
4.4.2	某些组织化学的复杂问题	201
4.4.3	一种用铅离子显示 ATP 酶的可能方法	204
4.4.4	用镉离子显示运载 ATP 酶	211
4.4.5	腺苷酸环化酶的显示法	213
4.5	其它磷酸酶	215
4.5.1	碱性磷酸酶技术	215
4.5.1 a	钙作捕捉离子的用法	219
4.5.1 b	胞苷一磷酸作底物的用法	219
4.5.1 c	枸橼酸盐作螯合剂的用法	220
4.5.2	葡萄糖-6-磷酸酶技术	221
4.5.2 a	推荐一个证实葡萄糖-6-磷酸酶的方法	223
4.6	一般性酯酶技术	224
4.6.1	现用技术的总特异性	224
4.6.2	用于酯酶的硫赶醋酸原法	228

4·6·2 a	一个简单的硫赶醋酸方法·····	228
4·6·3	两个改进的酯酶方法·····	229
4·6·3 a	纯硫赶醋酸的制备·····	230
4·6·3 b	铅-乙酰二硫化物法·····	230
4·6·3 c	金-硫赶醋酸盐法·····	232
4·6·4	酶抑制物的重要性·····	233
4·6·5	用于酯酶的金-苯硫酚盐法·····	234
4·6·5 a	对硝基苯硫赶醋酸盐 (PNPTA) 的合成···	235
4·6·5 b	推荐的 PNPTA 孵育程序·····	235
4·6·6	8-羟基喹啉在证实酯酶上的可能用法·····	236
4·7	胆碱酯酶的特异方法·····	237
4·7·1	现用实验方法概况·····	237
4·7·2	铜-硫代胆碱法在组织化学上的某些局限性···	238
4·7·3	各种铜-硫代胆碱法的比较·····	240
4·7·4	用于胆碱酯酶的铜-甘氨酸常规方法·····	243
4·7·4 a	Tennyson-Brzin 法·····	243
4·7·4 b	Kasa-Csillik 法·····	244
4·7·4 c	Lewis-Shute 法·····	245
4·7·4 d	一种可变通的简单孵育程序·····	247
4·7·4 e	抑制剂和替换底物的用法·····	249
4·7·5	胆碱酯酶的铜-铁氰化物染色法·····	251
4·7·5 a	标准的铜-铁氰化物染色法·····	253
4·7·5 b	硒代胆碱酯的用法·····	254
4·7·6	胆碱酯酶的金-硫代胆碱法·····	255
第五章	其它酶细胞化学方法·····	273
5·1	氧化酶的组织化学·····	274
5·1·1	DAB 在氧化酶组织化学中的应用·····	276
5·1·1 a	过氧化物酶活性的显示·····	279
5·1·1 b	细胞色素氧化酶和线粒体染色·····	281

5.1.1 c	过氧化氢酶和微体的染色	283
5.1.1 d	内源性非酶促染色	285
5.1.1 e	细胞色素 C 的检出	285
5.1.1 f	相关化合物的应用	286
5.1.2	DOPA-氧化酶法	287
5.1.3	其它氧化酶法	290
5.2	脱氢酶组织化学的生化基础	291
5.2.1	呼吸链概述	291
5.2.2	氧化磷酸化作用和组织化学抑制剂	293
5.2.3	组织化学的应用	296
5.3	铁氰化物的用法	297
5.3.1	线粒体对铁氰化物的还原作用	298
5.3.2	琥珀酸脱氢酶的显示	300
5.3.3	其它脱氢酶的显示	303
5.3.4	α -羟酸氧化酶的检出技术	305
5.3.5	增强初发亚铁氰化物沉淀反差的方法	306
5.4	四唑盐的用法	307
5.4.1	琥珀酸脱氢酶的染色程序	311
5.4.2	递氢酶活性的染色程序	312
5.4.3	乳酸脱氢酶的染色程序	313
5.4.4	其它脱氢酶的染色	314
5.5	偶氮染料的偶联技术	314
5.5.1	偶氮染料技术的缺点	316
5.5.2	有关六偶氮副蔷薇苯胺的方法	317
5.5.2 a	六偶氮副蔷薇苯胺的制备	318
5.5.2 b	萘酚酯作底物的用法	319
5.5.2 c	吲哚酚酯作底物的用法	320
5.5.3	芳基硫酸酯作底物的用法	322
5.5.3 a	酯酶的染色法	323

5·5·3 b	用于其它酶的可能性·····	324
5·5·4	氨基肽酶的显示·····	325
5·5·5	含重金属重氮盐的用法·····	328
5·6	某些转移酶的可能染色法·····	329
5·6·1	转氨酶的铅-草酸盐染色法·····	329
5·6·2	鸟氨酸氨基甲酰转移酶的建议方法·····	331
5·6·3	酰基转移酶的染色方法·····	333
5·7	酶细胞化学的展望·····	335
附录 I	贮备液·····	355
附录 II	常用试剂与器材的供应厂商目录·····	362

第一章 引 言

P. R. Lewis, D. P. Knight

从开始固定到最后切片染色的整个电镜标本制备过程中，每一步都有许多需要进行选择的技术问题，这对初做电镜工作的人是颇为困难的。本丛书的前几卷已经对固定、脱水、包埋（Gauert 1974）和超薄切片（Reid 1974）的一般技术进行了描述。本书主要是谈在最后切片上进行适当染色所使用的一些方法。如果主要是为组织学目的而染色，组织制备方法不是很严格的，但是如果是细胞化学染色，则每一步处理都必须有严格的要求。例如，虽然在铅染色前的某一步骤里用过四氧化锇的最终结果通常要好一些，然而常规铅染色对各种方法固定包埋的材料都还是可以用的。第二章描述了六种使用碱性铅溶液的方法，选用哪一个，主要是根据方便和习惯。相比之下，如果想用酶消化法去掉 DNA（如 § 3.9.2 所述），组织就必须先用甲醛溶液轻微地固定；而且，如果酶是直接用于超薄切片，迄今只有乙二醇甲基丙烯酸酯（glycol methacrylate）包埋的极薄切片能得到满意的结果。四、五两章所描述的酶技术，从固定一直到孵育的材料制备过程中都要求细心，有些技术再往后的步骤也还要求细心。

我们可以将普通电镜实验室里应该具备并经常使用的组织制备技术和只有很专门的细胞学研究工作才需要用的那些技术明确地加以区分。本书是为一般电镜工作者写的，对后一类制备方法只是简略地提到，注意力主要放在细胞化学研

究中常规需要的那些技术程序上。

1.1 切片染色的目的

电镜观察用生物学材料的染色有多种目的。许多生物学家用染色技术仅仅是为了获得足够的反差，以便研究细胞的超微结构。特异性并不重要，技术要求也不很严格。比较特殊一点的用法是对混合组织中特定细胞类型，或者更多地是特定细胞器的选择性染色。用立体法（如 Williams 1977 所述的）或者自动计数技术作定量研究时，细胞器选择性染色特别有价值。把生物学材料染色的另一个原因是想在超微结构水平上获得一些细胞化学组成的认识。最近十多年这方面的研究大大地增加了，这是写这本书的主要理由。直到最近，这些研究工作还是纯定性的。但是随着X-线微区分析技术的改进，现在有可能使某些细胞化学方法定量了。这项技术要在本卷第二分册中论述（Chandler 1977）。

在作单纯超微结构研究时，电镜工作者大多用枸橼酸铅和醋酸双氧铀，但许多别的染料也可以用。这将在第二章中讨论。对这些染色技术的要求完全是定性的，不需要精确地了解它们的化学基础。以往的改进基本上都是经过盲目地试探而达到的。这种经验方法导致把许多重金属染料引进了电镜技术，其中有几种可能是很有价值的，在任何新的研究工作中都应当考虑用一用。这些染色技术中有几种还具有一定程度的选择性，可用以增强特定细胞器的染色。举例来说吧，四氧化钼和细胞的很多生物学成分起反应，大多是用来增加总反差，但是在适当条件下，四氧化钼也可用来选择性地使高氏器和溶酶体产生高反差染色。图 1.1 是一个很好的说明。

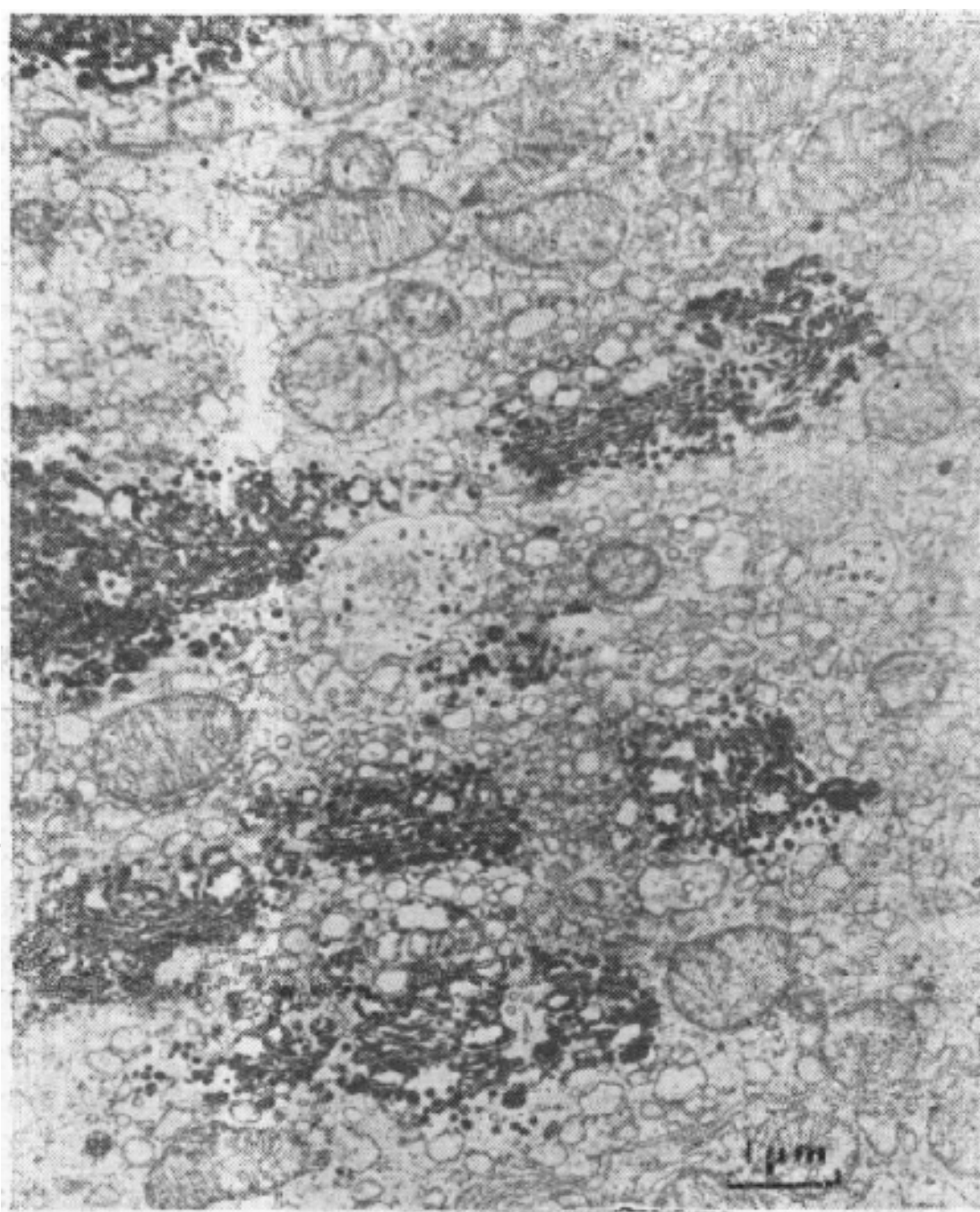


图 1·1 大白鼠附睾的低倍显微照片，是按第 2、6、1 节所述用四氧化鐵长时间处理组织得到的选择性染色，高尔基池和相连的小泡呈强染色。×11,500 (Friend 1969)

第三章所讲的是用于电镜细胞化学研究的染色技术，迄今为止基本上都是用于定性研究，但是使其中的化学反应尽

可能符合化学计量关系，并且至少在一般意义上很好地予以理解，仍然是必要的。只有看来能满足这些标准的技术才收入第三章了。这些技术大多按其所染的化学成分加以归类。重要的是，要认识到目前所用的一些技术其化学特异性的程度是各不相同的，对于严格的细胞化学工作说来，某些技术还很不理想。尽管如此，对那些只是比组织学染色的要求高一点和仅仅想选择性地突出某一特定细胞器（见表 1·1 的例子）的研究工作，它们可能是非常有价值的。而且，其中有些技术也有很高的选择性，可以用来获得超微水平上化学成分分

表 1·1 特定细胞成份的细胞化学染色方法

细 胞 器	细胞化学染色技术	所在章节	图例
高氏器	镀银	2·6·1	1·1
核染色质	富尔根-席夫-乙醇铈	3·3·2	3·2
核仁和核蛋白体	醋酸双氧铈 EDTA 差异染色	3·3·3	3·3
细胞表面物质	胶体铁或钍	3·6	
脂滴	氨基塑料包埋后用四氧化铁	3·7·2	
溶酶体	酸性磷酸酶	4·3·2	1·2
	芳基硫酸酯酶	4·3·5	4·9
高氏器	硫胺焦磷酸酶	4·3·4	4·8
刷状缘	碱性磷酸酶	4·5·1	1·3
内质网	葡萄糖-6-磷酸酶	4·5·2	4·13
	各种酯酶	4·6和4·7	1·4
运动终板	乙酰胆碱酯酶	4·7·4	4·14
过氧化小体	过氧化物酶	5·1·1	5·4
线粒体	细胞色素氧化酶	5·1·1	5·3
	琥珀酸脱氢酶	5·3·2	1·5

布的精确资料。

第四、五两章所讨论的酶技术可用于各种不同的目的。醛固定后仍能保持活性的几种酶对基本的组织学研究工作是很适合的，如鉴别特定的细胞类型或者细胞器。这些方法比非酶技术更特异，用起来也不太困难。比较起来，它们的主要缺点是酶处理必须在包埋之前进行，并且超微结构的保存不是太好。但它们对某些研究工作是很理想的，如表 1·1 中所举的例子就是。图 1·2 是用的酸性磷酸酶技术，和图 1·1 是一有趣的对比。图 1·3、1·4 和 1·5 显示了另一些酶技术的

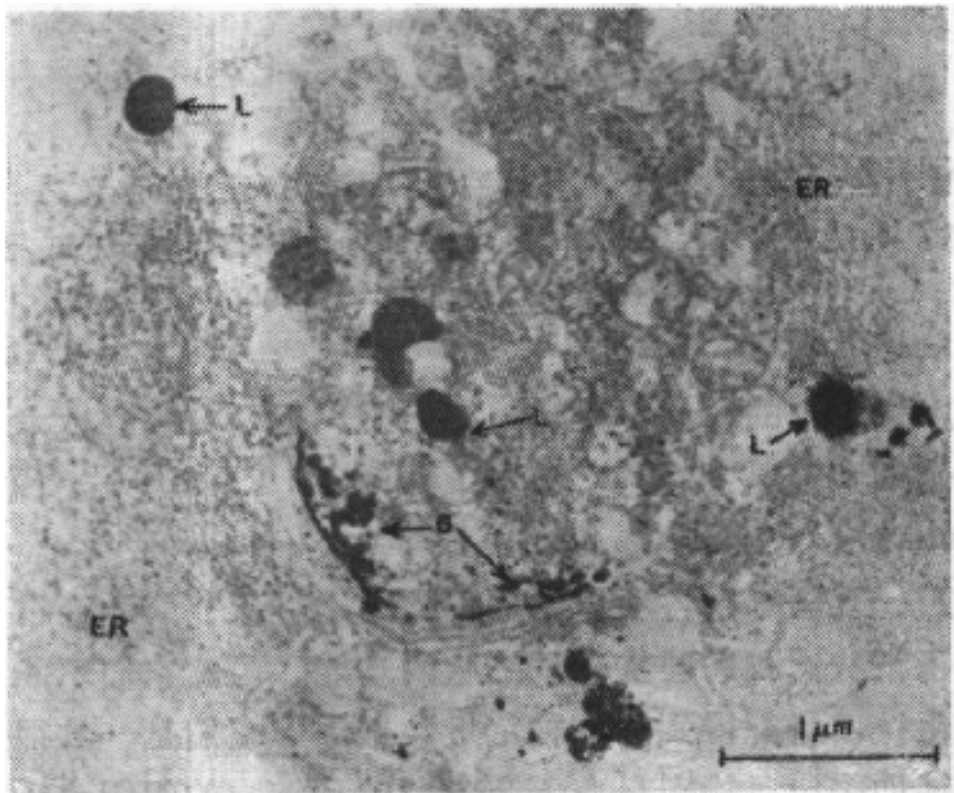


图 1·2 用水解酶技术作细胞器选择性染色的一例。显示大白鼠舌下核神经元的细胞质区域。此种染色为了证实酸性磷酸酶活性的分布 (§ 4·3·2)，并且没有另外做复染。一般细胞质和大片的糙面内质网(ER)区没染上色，而溶酶体和高氏器则呈很浓的选择性染色。
× 25,000 (Lewis 1975)