

生物显微技术

目 录

第一编	生物显微技术的基本理论	1
第一章	绪论	1
第二章	制片的一般原理与方法	3
第一节	制片的方法	3
一、	切片法	3
二、	非切片法	4
第二节	材料的采集与分割	4
一、	采集	4
二、	麻醉	5
三、	分割	6
四、	切面	6
第三节	固定与固定液	7
一、	固定的目的	7
二、	固定的方法	7
(一)	物理固定法	7
1、	冰冻干燥法	8
2、	冰冻取代法	8
3、	冰冻溶解法	8
4、	物理固定法的优缺点	8
(二)	化学固定法	8
	固定液的种类、性能及其使用方法	8
(1)	单纯固定液的种类、性能及其使用方法	9
(2)	混合固定液的种类、性能及其使用方法	10
三、	固定时应注意事项	17
四、	固定液的选择	18

五.	组织的洗涤方法	18
第四节	脱水与透明	19
一.	脱水	19
(一)	脱水的目的	19
(二)	脱水的步骤	19
(三)	常用的脱水剂	19
二.	透明	21
(一)	透明的目的及步骤	21
(二)	常用的透明剂	21
第五节	透入与包埋	22
一.	透入的方法	22
(一)	石蜡透入法	22
(二)	火棉胶透入法	22
二.	包埋剂的种类	23
三.	包埋的方法	24
(一)	石蜡包埋法	24
(二)	火棉胶包埋法	25
(三)	二重包埋法	26
(四)	明胶包埋法	26
(五)	真空石蜡包埋法	26
(六)	急速石蜡包埋法	26
(七)	碳蜡包埋法	27
(八)	体液及碎屑组织石蜡包埋法	27
第六节	切片与贴片	28
一.	切片机的种类	28
(一)	石蜡切片机(类型、构造)	29
(二)	火棉胶切片机	29
(三)	冰冻切片机	29
(四)	大标本切片机	32
(五)	超薄切片机	32
(六)	切片机的保养方法	33
二.	切片刀	33

(一)	切片刀的类型	33
(二)	磨刀法	33
1.	磨刀石的类型	33
2.	徒手磨刀法	34
3.	机助磨刀法	34
三	切片方法	35
(一)	石蜡切片法	35
(二)	火棉胶切片法	37
(三)	火棉胶石蜡切片法	39
(四)	冰冻切片法	39
四	贴片	40
(一)	贴片剂的种类及配法	40
(二)	贴片的种类及方法	40
1.	石蜡贴片法	40
2.	火棉胶贴片法	41
3.	火棉胶——石蜡切片贴片法	41
第七节	染料与染色	42
一	染料的种类、性质、配法及用途	42
二	染色	59
(一)	染色的目的与原理	59
(二)	媒染剂、促染剂及分化剂	62
(三)	染色法	62
1.	石蜡切片染色法	62
2.	冰冻切片染色法	63
3.	火棉胶切片染色法	63
(四)	染色性质与固定液的关系	64
第八节	封片与封片剂	64
一	封片的目的	64
二	封片剂	64
(一)	含水封片剂	64
(二)	无水封片剂	65
第九节	整体切片法	66

一、	非永久性制片法	66
(一)	水封片法	66
(二)	甘油封片法	66
二、	永久性制片法	67
第十节	涂片法与压碎法	67
一、	涂片法	67
二、	压碎法	67
第十一章	离散法与伸片法	68
	离散法(分离法)	68
(一)	离散法种类	68
(二)	离散法	68
	伸片法	68
第十二节	液体染色法	70
第三章	植物制片技术	71
第一节	植物组织切片法	71
一、	高等植物营养器官切片法	71
二、	低等植物切片法	75
第二节	植物胚胎切片法	77
一、	蕨类植物	77
二、	种子植物	79
第三节	植物细胞切片法	79
一、	有丝分裂	79
二、	减数分裂	81
三、	细胞四	82
四、	植物染色体	82
(一)	禾本科植物幼体染色体	82
(二)	花粉管幼体染色体	82
第四章	动物制片技术	84
第一节	动物组织切片法	84
一、	红血球与白血球切片法	84
二、	硬骨、软骨及牙齿切片法	85
三、	结缔组织与组织切片法	87

四、	肌肉组织制片法	90
五、	神经组织制片法	92
第二节	动物胚胎制片法	93
一、	整体制片法(鱼卵及各期胚胎等)	93
二、	胚胎切片法	95
第三节	动物细胞制片法	97
一、	有丝分裂	97
二、	减数分裂	97
三、	染色体	98
(一)	唾液腺染色体	98
(二)	哺乳类染色体	98
四、	细胞器	99
(一)	粒线体的制片法	99
(二)	高尔基体制片法	100
(三)	中心体制片法	100
第四节	无脊椎动物的制片法	101
一、	水螅制片法	101
二、	蚯蚓制片法	102
三、	绦虫及吸虫制片法	102
第五节	原生动物制片法	103
一、	固定	103
二、	染色	103
三、	标本制作法	104
四、	原生动物制片法举例(如眼虫、变形虫、草履虫等)	104
第五章	显微化学法	107
第一节	显微化学的定义	107
第二节	显微化学的特性和要求	108
第三节	显微化学的固定与包埋技术	108
第四节	组织化学染色法的种类	109
一、	化学方法	109
(一)	铁测方法	109

(二)	酶的测定法	110
1.	硷性磷酸酶 (AKP)	110
2.	酸性磷酸酶 (ACP)	112
3.	琥珀酸脱氢酶	113
4.	β -葡萄糖苷酸酶	114
5.	脂酶测定	115
(三)	核酸测定法	115
1.	DNA测定法 (Fe	
	及Pearse法等)	115
2.	RNA测定法 (Brachet	
	及Kumick法等)	116
(四)	多糖测定法	117
1.	PAS反应法	117
2.	异染墨水法	117
(五)	蛋白质测定法 (Millon, Biurelli	
	及Kraghori法等)	118
二、	类化学法	118
(一)	磷脂类测定法	118
(二)	胆固醇测定法	118
三、	物理学方法	119
(一)	脂类测定法 (苏丹染料法)	119
(二)	荧光显微镜测定法	119
(三)	放射自显术测定法	120
第六章	显微镜	121
第一节	显微镜	121
一、	光学显微镜的基本结构原理	121
(一)	光学系统 (目镜、物镜、照明装置等)	123
(二)	机械装置	126
二、	显微镜的使用	129
三、	显微镜使用应注意事项	129
四、	显微镜的种类	130
第二节	非光学显微镜	143

一、	X射线显微镜	143
二、	电子显微镜	145
(一)	电子显微镜的构造与原理	145
(二)	标本的制备	145
1、	固定	145
2、	染色	146
3、	脱水	146
4、	包埋	146
5、	切片	146
6、	支架——金属网	146
三、	扫描电子显微镜	148
(一)	扫描电子显微镜简介	148
(二)	生物样品的制备	148
第三节	显微镜的附件	150
一、	显微镜灯	150
二、	移动台	151
三、	显微镜另度设备	152
四、	描绘台及其用法	154
五、	显微镜照相设备	154
第七章	摄影技术与暗室技术	156
第一节	摄影技术	156
一、	常见的摄影机种类	156
二、	摄影的基本结构	164
三、	摄影机的用法	165
四、	底片的选择与装片	167
五、	摄影时应注意的事项	174
第二节	各种摄影法	177
一、	静物标本摄影法	177
二、	显微摄影法	178
三、	暗视野显微摄影法	179
四、	偏光显微摄影法	189
五、	红外线摄影法	189

六、	紫外线摄影法	192
第二节	暗室技术	193
一、	黑白底片的处理	193
(一)	显影	193
(二)	定影	190
(三)	水洗与干燥	190
(四)	彩色底片的处理	193
二、	印相与放大	196
(一)	感光纸的种类 (印相纸和放大纸)	197
(二)	纸的性质与底片的配合	197
(三)	印相技术	197
(四)	放大技术	200
三、	暗室的注意事项	206

第二编 生物显微技术实验指导 - - - - - 208

实验一	实验准备工作 - - - - -	208
实验二	在体制片法 - - - - -	209
实验三	石蜡切片法 - - - - -	212
实验四	冰冻切片法 - - - - -	216
实验五	显微化学法 - - - - -	218
实验六	涂片法 - - - - -	221
实验七	显微镜的使用、描绘图与测微图的使用 以及放大倍数的计算 - - - - -	223
实验八	扫描电子显微镜的使用 - - - - -	226
实验九	普通摄影与显微摄影技术 - - - - -	228
实验十	暗室技术——印相与放大 - - - - -	231

附录一	- - - - -	233
一	实验室规则 - - - - -	233
二	玻璃器皿与玻片洗涤方法 - - - - -	233
三	实验工具与药品 - - - - -	235
四	动植物培养液配法 - - - - -	241
五	实验室常用的配方 - - - - -	245
六	度、分、秒换算表 - - - - -	247
附录二	参考资料 - - - - -	249
附录三	中英名词对照表 - - - - -	251

第一编 生物显微技术的基本概念

第一章 绪论

生物显微技术 (Biological microtechnique) 就是利用新技术方法和新仪器, 特别是使用显微镜来研究生物学的一门年青学科。它所包括的内容是极为广泛的, 诸如动物或植物的整体, 个别组织, 器官的暂时制片或永久的各种制片技术 (如石蜡切片法等), 动植物显微化学, 光学、非光学显微镜和绘图仪的使用, 以及显微照相技术等都属于生物显微技术的范畴。

早在1590年左右, 由荷兰的光匠师詹森父子发明了第一架放大仪器, 放大率约十倍。接着意大利学者伽利略于1609年发明了第一台天文望远镜, 第二年他把它用于微小物体的观察。显微镜这一名词在1625年首先由法伯尔定名的。在十七世纪中叶, 英国学者虎克 (Robert Hooke) 创造了第一台复合的显微镜 (放大率约为40—140倍) 和小刀, 他卓越的发现了木栓组织的细胞, 并提出细胞 (Cell: 小室) 这一名词, 在同一时期, 许多学者如吕文虎克 (Leeuwenhoek, 1628—1694) 用自制的放大镜发现了精子、红血球、肌纤维和神经细胞等; 葛拉夫 (Graafian, 1641—1673) 发现卵细胞, 他们开辟了对细胞组织的研究。

从十九世纪中叶起, 由于保存与固定标本的化学药剂的发现和发明, Brücke (1861) 等又采用了各种杀死和固定细胞的方法和染色方法, 大大推动了显微技术的发展。1863年瓦达尔 (Waldeyer) 发现了用途最大的苏木素 (Haematoxylin); 在整个切片染色的领域中起了很大的作用。直至1865年荷兰的惠更斯等人制造了目镜和集光镜的装置, 大大提高了显微镜的辨别力, 加上染色法的进步, 和1870年希斯 (W. His) 发明了精确的切片机, 代替了徒手切片的粗糙方法, 从而更促进了生物显微技术的迅速成长。

随着十九世纪末叶染料工业的兴起而使细胞组织的染色法发

成为今天的显微镜的基本技术。组织化学虽然开始于十九世纪。直至1936年Lison氏的《动物组织化学》总结了过去的经验以后，才逐渐发展为一门新的学科。1963年左右，由于偶氮染料的合成成功及恒冷新鲜组织冰冻切片法的建立，为研究细胞内酶活性的显示创造了有利条件。但是，我们也应知道，在研究细胞学时，固定的和染色的标本对于结构与功能的关系，只能提供有限的资料。应该结合其它技术方法去研究，才比较全面。

近年来由于新理论，新假设的提出，新技术方法及新仪器的应用，使生物显微技术的发展突飞猛进，而技术本身就是促进科学发达提高工作效率的重要手段之一。所以技术的熟练程度是与从事科学研究工作有着密切的关系。*譬如说，在制片技术中仅就现有的石蜡切片标本，已经不能满足观察更微细结构的要求了，而需要一种超薄切片技术，因这种技术也是近20年来才发展起来的，特别是1955年以来超薄切片技术的革新。利用超薄切片技术可以把一粒小米大的组织切成一万片至十万多片，这样薄的片子放在电子显微镜下放大几千倍至40万多倍，这样细胞的微细结构便十分清晰地呈现在我们眼前了，它能够帮助我们在生物学和医学等学科中指示及解决不少问题。

其实，在胚胎学、组织学、生化学、解剖学、细胞学、生物化学、分析化学、微生物学及动物学等学科的基础理论研究中，所应用的许多新的精密仪器或新技术方法，如微波光谱术、X射线结构分析、电子显微镜技术、扫描电子显微镜技术、电生理技术、紫外线和荧光显微镜技术等仪器的使用，都直接或间接与显微照相技术有关；又如光学显微镜中采用暗视野、相差、荧光、偏光、紫外光和干涉等技术方法，也扩大了它的使用范围。应用石英搜集光凹版能够正确地处理和研究活体等问题。

总而言之，每一门学科的发展是和当时的经济条件及工业基础分不开的，而技术方法及仪器是获得科学知识的必要工具，必须经常的革新，不断地应用其它学科的新仪器新技术方法为本学科服务，使理论研究不断提高。生物显微技术也不例外。生物显微技术是生物系各专业不可缺少的基础知识和技术之一，要求同学们通过实践

* 但是，无论一个科学家可能多么卓越，无论他们观察多么仔细和有系统，他总是会受到当时所能利用的仪器和技术条件的限制。

后能基本掌握一般的显微切片技术，学会使用光学显微镜及描绘图，以及学会显微照相技术方法以及了解扫描电镜及电子显微镜的使用等。欲掌握或认识这些技术，只有通过实践才能学到。为今后从事生产、科研和教学工作奠定良好的生物显微技术基础，以便将来能更好地为我们伟大的社会主义祖国的四个现代化服务。

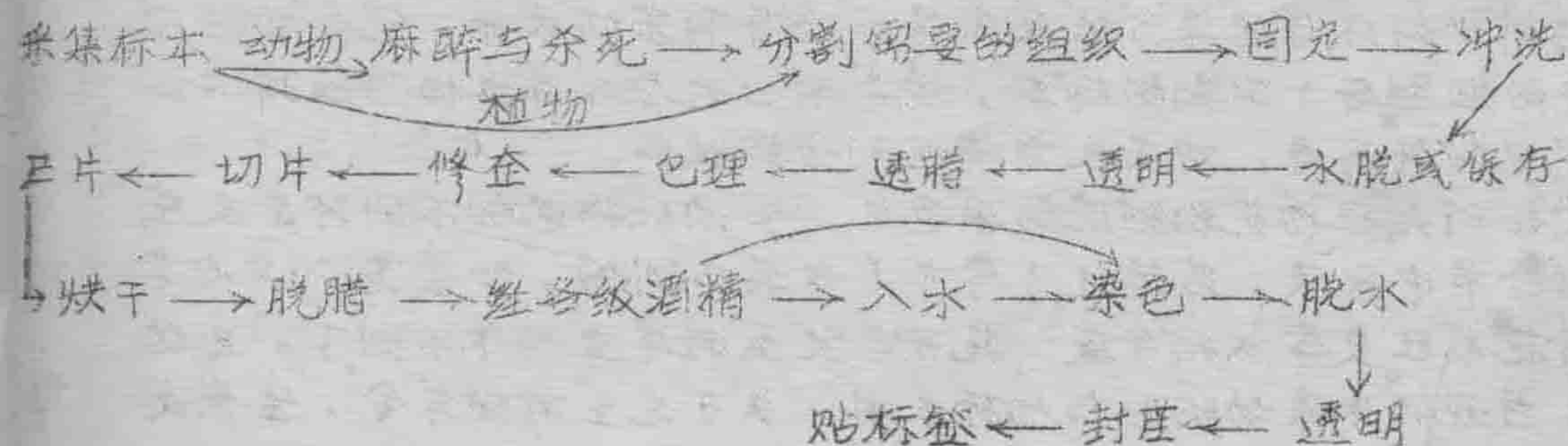
第二章 制片的一般原理与方法

第一节 制片的方法概述

当我们研究生物体的组织或细胞时，除某些生物体可用相差显微镜或偏光显微镜等方法达到观察的目的外，其余大部分的生物体，因为组织较厚，光线不易通过内中等关系而达不到观察的要求，为了达到此目的，就必须将生物体的组织切成薄片或不切片，经过一系列的処理，使光线得以通过，即可进行观察。因此，根据标本的制作便分为切片法与非切片法两种，这些方法，各有长短，应根据适当地配合使用，才能获得比较理想的结果。

一、切片法

切片法就是利用锐利的刀具，将器官组织或个体分割成许多极薄的切片，而制成标本的一种方法。常用的组织切片方法有三种，即石蜡切片法、冰冻切片法和火棉胶切片法，此外尚有超薄切片法等。现将切片法的全过程列表如下：



二、非切片法

非切片法就是生物体个体或组织不必经过切割，而制成标本的一种方法。这种方法的优点是，操作方法简便且较快，能够保持生物体或组织原有的状态，人为的产物亦较少。缺点是，适用的范围有限，例如压碎法中的标本，有改变某些组织细胞结构的正常关系等缺点。

常用的非切片法有下列几种：

(一) 整体封片法——将某些微小的生物体或它的一部分（如蕨类的原叶体、蛙肝蛭、蛙胚、鸡胚、昆虫之翅、腿及口器等），就其原有的外形，经过固定、染色及脱水等处理而制成的标本。

(二) 涂片法——将液体或半流动性标本，在载玻片（或盖玻片）上涂布推开，经过某些处理而制成的标本，如蛭精子涂片、花粉涂片及血球涂片等。

(三) 压片法——将标本置于载玻片与盖玻片之间，用适当的压力轻轻地将其压碎，经过染色等处理而制成的标本，这种方法基本上与涂布法相同，只是其中某些操作步骤稍有不同而已。

(四) 离数法（浸渍撕散法）——将组织投入适当的药液中，使组织软化，然后用解剖针使各个细胞分开，制成玻片，如平滑肌细胞、上皮细胞等。

(五) 展片法——一般膜状的组织器官，需先经过把它置于玻片上伸展处理之后再行固定及染色，而制成的标本。

第二节 材料的采集与分割

一、采集

我们在制作标本之前，必须采集符合制片要求的材料，因此，采集材料的好坏与采集方法及采集经验等有密切关系。例如胚胎学所需要的胚胎各个时期的标本，须耐心地用双目立体显微镜下详细观察它的外形等，按其发育情况而分期收集。

又如研究植物花粉细胞的染色体，必须根据它的不同种类及在一定的季节中采集，若错过了季节是采集不到的。如曇花（仙人掌科）开花多在夏季秋初午夜，花开后就逐渐萎垂而采不到了。总的来说，当我们采集动物和植物标本时，关于它生前的年令、生长发

育情况、外界条件（季节、温度等），外形观察的结果，以及采集标本的年、月、日和地点等，必须详细记录，供日后分析材料时参考之用。

二、麻醉

采集的标本，有些活的动物，在不施加麻醉的情况下，很难进行，剥取其组织或保持原来形状进行固定。为此，根据不同种类的动物而采取适当的措施，通常使用的麻醉的药物及其使用方法如下。

(一) 乙醚（哥罗仿）——适用于麻醉较大的动物（如狗、猫及豚鼠等）。其方法是用脱脂棉花蘸取乙醚后，置于动物的鼻尖下，使其吸入；若是较小的动物（如昆虫），可将动物置于小缸中，再用脱脂棉蘸取乙醚，放入缸中盖紧，利用乙醚饱和蒸气使其麻醉。

(二) 0.1% 丙酮氯仿（Chloretone）——适用于麻醉水螅类及轮虫等。

使用方法：将采到的标本放在少量水中，然后每隔一定时间加入数滴0.1%丙酮氯仿，直至标本不动和不收缩为止。

(三) 1% 氢氯化古柯碱（Hydrochloride of Cocaine），又名莫利逊（Morrison）液——适用于麻醉钩手水母、草苔虫及较小的水生生物等。

使用方法：将采到的标本放在装有海水的小缸中或广口瓶中，每隔五分钟加入二滴1%氢氯化古柯碱，直至标本没有动作和不收缩时为止。

(四) 薄荷脑（Menthol）——适用于麻醉一般大型的水生动物（软体动物、海藻、海参、海鞘等）。

使用方法：将采到的标本，用洁净的水（水生动物用海水）放在培养缸内培养，等待标本呈现它的自然状态时，取薄荷脑包在纱布内，把纱布包悬于水面，约3—12小时，或者更长一些时间。

(五) 硫酸镁——适用于麻醉沙蚕、蠕虫、牡丹苔藓虫、海楼的甲壳纲、棘皮动物、海鸡头、柳珊瑚及海鳃等。

使用方法：基本上与（四）相同。

(六) 水——适用于麻醉水肝蛭、绦虫、蜗牛、头足纲动物及水生甲壳类等动物。

(七) 其它：如冰冻麻醉及针麻法等，特别适用于个体大的动物进行麻醉。

三、分割

一般在分割之前，先将固定液准备好，然后，把活动物处死之后，立刻把分割好的组织块投入固定液中进行固定。这一过程时间越短越好（一般不要超过十分钟），因为组织暴露于空气中时间过久会使组织发生变化，但其变化也决定于它们的种类不同而有快慢之分。如人的胃肠粘膜等组织的变化最快，又如从植物体上或水中采到的标本，也应立即固定，避免标本发生变化。

分割组织块总有一定的方法，不能随便切割，切割时应根据我们研究的性质、标本形状大小的不同而分割，如细胞系用的菌度不宜超过2厘米，组织学用的也在5厘米之内。例如人的脑或胎心等标本，均可在体固定，为了快固，易于透入其中，在标本上可以适当地分割若干切纹，或采取剖开腹腔或注射固定液的方法来解决。如遇到分割过的小标本，为了便于固定，有时特地连同周围的组织也一起固定。

此外，在分割组织时宜用锋利及不生锈的刀或刀片，用镊子钳住标本轻轻地分割，以免组织受到挫伤或压挤。

四、切面

在分割组织块或器官时，必须考虑好准备在分割材料的那一个面进行切面，这对于进行检查标本极为有利。

标本的切面常分为（以切植物茎为例）：

（一）横切面——就是用刀横过管状的标本的横切面（即切刀所切的面与标本的长轴互相垂直）的切面（图1—1）。

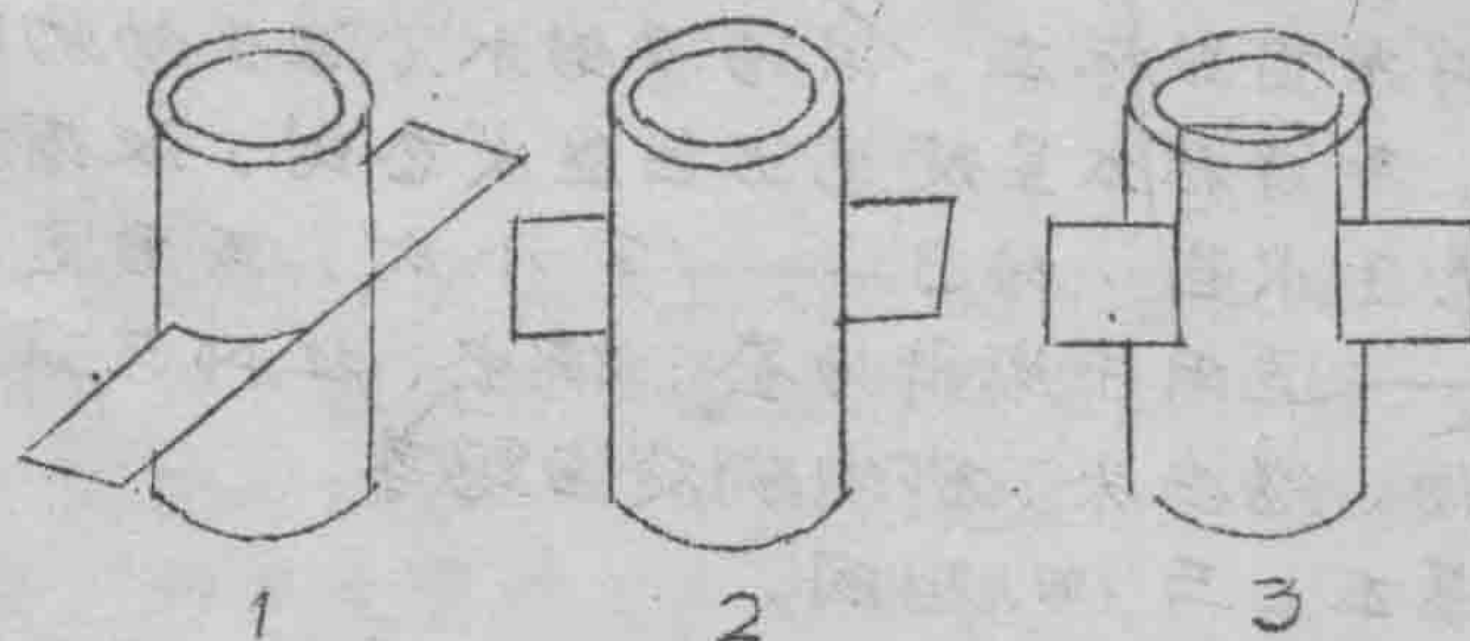


图1—1 示植物茎的三种切割面

1—横切面 2—纵切面中的直径切面 3—纵切面中的弦切面
这种横切面，便于观察材料自外向内的各种组织的排列、位置、厚度及宽度等。

(二) 纵切面——就是用刀直切标本与横切面垂直所成的切面(即切刀所切的面与标本的长轴互相平行), 这种切面又分为:

1. 半径切面——就是用刀通过标本的圆心的任何切面(图1—2)。

2. 切线切面——就是用刀延着标本长轴的表面与半径成直角所切的切面(图1—3)。

3. 正中矢状切面——就是用刀通过标本的中轴所切成的面, 如通过胚胎脊的纵切面, 实际上就是中矢状切面。

(三) 水平切面——就是用刀水平切标本所成的切面(即切刀所切的面与横切面或纵切面互相垂直)。这种切面常见于动物胚胎标本的切片。

第三节 固定与固定液

一、固定的目的

任何一种细胞组织器官和小的生物体, 无论是制作浸制标本或玻片标本, 必须经过固定的处理。其方法: 一是化学方法, 即用液态的药物作用, 或用蒸气状态的药物作用; 二是物理方法, 即用热或干燥等方法。无论是采用何种方法处理, 但其固定的目的是下面几类:

(一) 迅速地杀死细胞组织, 以保持原来的细胞形状与组织结构。

(二) 防止细胞组织的腐败及其分解变化。

(三) 为了增加细胞对于各种渗透压的抵抗力。

(四) 为了凝固及沉淀细胞内的物质, 以及了解活细胞时原来的物质分布位置等。

(五) 细胞组织经凝固及沉淀后, 可增加细胞内各种物质产生不同的折光率, 便于染色及识别细胞的结构等。

(六) 使组织硬化, 使组织切片时不致皱缩与变形。

总之, 标本经过固定与处理之后, 或多或少都产生一定的变化, 产生所谓“人为结果”。因此, 为了获得正确的结果, 还必须采用其他方法(如冰冻固定取代法等)作为对照来观察。

二、固定的方法

(一) 物理固定法

1. 冰冻干燥法

将细胞组织离开机体后立即停止其化学反应，否则会迅速自解。即是说，剥离机体的细胞组织要进行快速冰冻〔利用液体氮，以异戊烷作为导热体，先冷到 -165°C ，再把小块标本投入异戊烷中。最好是以干冰 (-78°C) 加氯仿、石油醚 (-100°C) 或己烷 (hexan) 作冷冻剂〕，然后，将冰冻的组织放在真空中 ($10^{-3}-10^{-4}\text{mmHg}$) 冰冻干燥 (用干冰维持 $-40^{\circ}\text{C}-60^{\circ}\text{C}$)，时间长短视组织，至于组织化学的是在真空状态下包埋 (脂溶后一分钟即告完成)，如作电子显微切片，宜用甲苯丙酮酸甲酯及丁酮混合剂或 EPON 812 等。

的大小而定

2. 冰冻取代法

将割取的细胞组织小块迅速投入 -70°C 至 -80°C 的石油醚中约 3 秒钟以上，然后再投入 -70°C 的 100% 酒精或丙酮等固定液中固定 4—5 天 (置于 0°C 以下冰箱中)，再逐渐到室温包埋，这一方法在一般实验中可以用。

3. 冰冻溶解法

先将割取的细胞组织迅速投入冰冻，很快转入室温固定液，电子显微用缓冲液的钨酸固定，组织化学一般用乙醚固定，然后进行包埋。

4. 物理固定法的优缺点：

(1) 优点：第一、免去化学固定；第二减少自解作用和扩散作用；第三、保证组织结构的歪曲；第四、保存下分泌酶的活性。

(2) 缺点：第一，是在组织细胞中有结晶形成；第二，设备条件要求较高，普及有困难；第三，有危险性，如在 -180°C 以下的冷液而与 O_2 凝聚而发生爆炸。

(二) 化学固定法

化学固定法主要是根据化学知识建立的，利用化学药剂来保存 (固定) 细胞组织的形态结构，并使某些化学物质在死位显示出来。常用的固定剂是福马林及酒精等。现分述如下：

1. 固定液的种类、性能及其使用方珐。

在制片技术中所用的固定液，种类很多。初学者没有必要一一试用，只要从中选择几种常用的固定液使用，深入了解它的性能就可以了。因固定液的理化性质各有不同，区分为氧化的、还原的、酸性的、碱性的、单纯的和复杂的等。如把固定液乱来配合，就