

研 究 報 告

1958年

木材顯微制片操作指导

I、試材准备

1. 切片材料

① 木材試材

标准木——树龄应为7年生以上者。

取材部位——取材部位决定于試驗目的；平常多采自树木胸高（1.3m.）部分，由木材横断面上边材的内緣取材。

試材大小——每块試材約为 1.5cm^3 。在截取試材时注意将其横切面（Cross section）、半徑切面（Radial section）、切綫切面（Tangential section）切准确。

② 竹材試材

取材部位——取材部位决定于試驗目的；当作同株不同部分解剖特点比較时可分茎程为上、中、下3段，在每段中择其1个节間之中部取材，并应在节上側芽相对的1面取材。

試材大小——每块試材竹青、竹黄两个表面积各为 1.5cm^2 。試材厚度（肉厚）为由原来竹青至竹黄之厚。

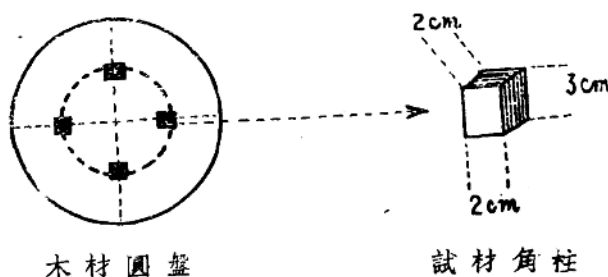
2. 离析材料

① 木材試材

采取試材方法决定于試驗目的；平常取材方法如下：

标准木——其树龄应为7年生以上者。

取材部位——視試驗目的而定；平常由树干 $\frac{1}{3}$ 和 $\frac{2}{3}$ 两处各取 3cm. 厚的横截圓盤



1个。在每个圆盘上通过随心作两条直交直线，再以圆盘半径 $\frac{1}{2}$ 为半径作1圆，由圆周与直线的4个交点处各取1个角柱作为试材，詳上图：

试材大小——由上述的4个角柱各取出等量的小木棒，将4组小木棒混合作为代表该横断面(圆盘)的1份试材。每份试材約有小木棒10—20根。每根小木棒如火柴杆般粗，长为1—2cm。

② 竹材试材

取材方法决定于試驗目的；平常取材方法与取切片材的部位相同，但试材大小和取木材离析材不同。在竹杆每段取寬1.5cm.的圓环1个，由圓环4方各取等量竹片，合为1份试材。每份试材由数片至十数片，每片寬度由原来竹青至竹黄，长1.5cm.許，厚0.5—1.0mm。又可将每片试材均分为外(竹青)、中、內(竹黄)3部，将各片相应部分各作为1份试材(外、中、內)，即分为3份试材。

③ 煮试材

将每份木材(或竹材)试材用綫紧扎为1束，加上标籤放入冷水中，然后以文火煮，使材料內气体排出。水沸后可換冷水再煮，煮至试材自沉水底为止(約需2小时)，煮好使其自行冷却后浸入离析液中。

II、軟化方法

1. 在作切片前常須將试材处理一下，试材是否必需作一定处理視下列情况而定：

- ①徒手切片——部分較軟針叶树材可以不需处理，直接用剃刀切片。
- ②用滑走切片機直接切片——适用于較軟木材。
- ③用滑走切片機切片，用甘油、酒精軟化处理——适用于一般木材。
- ④用滑走切片機切片，用氡酸軟化处理——适用于矽質化較强的木、竹材。
- ⑤用滑走切片機切片，用綿胶包埋者——适用于过軟或結構极不均匀的试材。
- ⑥旋轉切片機切片，以石蜡包埋者——亦适用于过軟木材。

2. 甘油、酒精軟化法

排除试材內气体——凡需經过葯剂处理的试材都应先除去內部气体。排除气体方法可用油抽气机，亦可用水煮法。水煮兼有使木材軟化的效果。水煮的具体方法与前述离析材的水煮法相同。

- ②用甘油、酒精軟化——以浓甘油(或用蒸餾水稀释的)与95%酒精各 $\frac{1}{2}$ 的混合

液浸泡用水煮好的試材，軟化時間視樹種而異，由2星期至數月不等。

3. 氟酸處理法

①試材首先需經排除內部氣體處理。

②用氟酸(HF)軟化，使用時可用市售38—40%HF原液，放古塔波膠容器(或內塗石蠟的容器)中。將試材上作上標記(刻痕)或加用石蠟浸過的標籤，然後放入氟酸中，並將容器密閉。約需經數周至數月可軟化好，平常4周即可。軟化好的試材可以切割自如。在操作時應戴上醫用橡皮手套，並宜在通風廚中進行。

③試材的去酸——將軟化好的試材放多孔的罐中，將罐懸于水盆中用流水沖洗，沖盡試材內的酸為止，約共需3日(72小時)。

4. 綿膠處理法

①除很軟的試材外都需先將試材充分軟化好，除淨其中的酸。不需經軟化者也应先除去試材內氣體。

②試材的脫水。經過上項過程後應將試材順序放入下列各種濃度酒精中，脫去試材內的水。具體過程如次：

→蒸餾水→70%酒精→95%酒精→95%酒精、純乙醚各 $\frac{1}{2}$ ；→

試材在上面每個過程中停4小時。

③浸綿膠過程。經過脫水的試材再以綿膠液浸之。綿膠液以固體綿膠為溶質，以純乙醚、95%酒精各 $\frac{1}{2}$ 為溶劑配制。浸綿膠的處所為45℃溫箱中。綿膠放溫箱中應以鐵夾挾緊瓶塞。于每次換綿膠液時注意須在瓶內綿膠液自行冷卻後再打開瓶塞。試材在每種濃度綿膠液內停2日(48小時)，其具體過程如次：

→2%綿膠→4%綿膠→6%綿膠→8%綿膠→10%綿膠→10%綿膠液內逐漸加入固體綿膠至溶液不流動時為止(停的時間應長于2日)。→

④綿膠包埋。經過上述處理後再于室溫下將材料以綿膠包埋之。

→將附有綿膠試材放入純氯仿中，經24小時後綿膠凝成硬塊→包埋好的試材放甘油酒精液中保存，以備切片→

5. 蒸汽法切片

①适用于竹材等較硬試材。

②先將試材用水煮好(竹材約需煮20余小時)。

③將試材放切片机上夾好後，引灼熱水蒸汽管對准試材噴射，噴射10余分鐘後，可

以試切，已軟化的試材可以切割自如。边切片边以蒸汽喷射試材，并在切下一切片后，稍停一下待試材被噴軟后再切下一切片。

III、离·析 方 法 (Maceration)

1. Schultze 方 法

① 离析液 (maceration mixture) 为硝酸加氯酸钾 (KClO_3)。硝酸常用者为浓硝酸1份加蒸馏水2份稀释者。

离析过程中有氯气 (Cl_2) 放出，宜在通风厨内进行。

在迅速离析法加热时应将有材料的容器放沙浴中。

② 迅速离析法

煮好試材→放指形玻管中，加硝酸浸沒試材，加氯酸钾1、2耳匙→加热达 60°C 約用15分鐘，試材可用玻棒触散为止→流水冲洗試材，去尽其中的酸→以玻棒叩解試材，使試材离心沉降；去原有的水→用蒸馏水洗3分鐘；沉降，去水→用30%酒精脱水3分鐘；沉降；去30%酒精→50%酒精脱水，可保存于50%酒精中备用→（在去酸前亦可叩解，并在水洗时应用离心沉降法）

③ 徐緩离析法

試驗过程与上面方法相同，但用离析液浸試材时是在室温下进行，待試材可以玻棒充分叩解离析为止，需时較长（約数日至10几日），优点是对試材损坏少。

2. Jeffrey 方 法

① 离析液为硝酸铬酸液，該液由10%硝酸和10%铬酸各 $\frac{1}{2}$ ，合成。每100ml，10%硝酸中有10ml，浓硝酸、90ml，蒸馏水。每100ml，10%铬酸中有铬酸10g，加蒸馏水达到溶液为100ml，时止。

② 离析过程煮好的試材→放指形玻管中，加离析液浸沒試材，加上瓶蓋→放 35° — 40°C 温箱中1—2日→檢視試材，未离析好換离析液再浸，至用玻棒能充分叩解为止→流水充分冲洗，去酸。→用玻棒將試材叩解→蒸馏水洗3分鐘（以下与前述 Schultze 法同）→30%酒精脱水3分鐘→50%酒精脱水，保存。→

3. Franklin 方 法

① 离析液为冰醋酸和6%过氧化氢 (H_2O_2) 各 $\frac{1}{2}$ ，合成。

②离析过程

煮好的试材→用离析液浸→放 60°C 温箱中 48 小时约可离析好→流水洗去酸→叩解→蒸馏水洗→30%酒精脱水→50%酒精脱水, 保存→

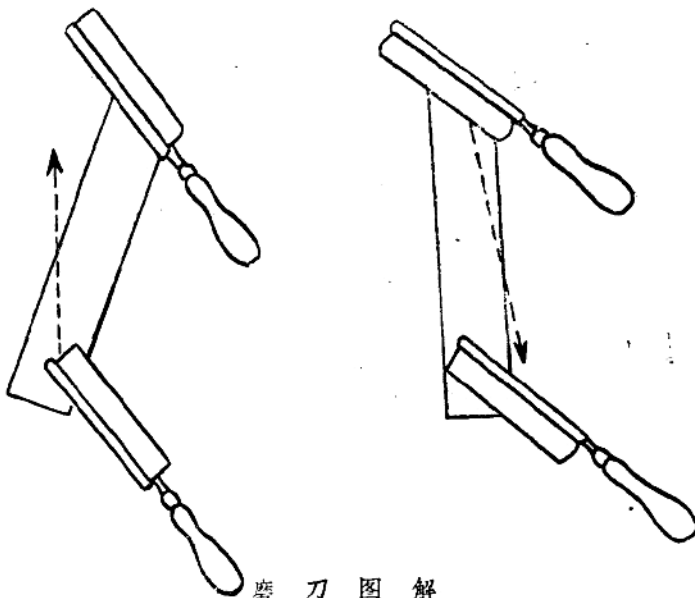
IV、切片方法 (Sectioning)

1. 切片刀的研磨和保存

①滑走切片机为木材切片的主要机器。所用的切片刀附有专用的刀背和刀柄。磨刀时应先按好刀背和刀柄。磨刀时刀片与磨刀石之间的斜度要保持一定, 而刀背可影响斜度, 因此每次刀背的安装法应该相同, 并且磨刀时刀背应保持稳定。

②应备有颗粒粗细不同的磨石 2—3 块。当刀刃有缺口时使用粗磨石, 磨时加蒸馏水。当平常刀钝时使用细磨石 (如比利时黄石), 磨时用机油。磨刀用油以不过于光滑与粘滞为佳, 可用亚麻仁油、三合油等。用油磨刀不易伤刀刃, 下来的石粒均匀; 用水磨刀时水入刀刃缝隙使刀生锈, 用油磨则无此弊。

③磨刀前先在刀片上装好刀柄、刀背, 将磨石放平稳。磨刀时左手 3 个指头持刀片先端, 右手持刀柄。磨时先以刀先端与磨石近身端相接, 刀刃向前推刀片斜向前进, 使刀刃全部能磨到。刀片到磨石远身端后再反转刀刃方向 (刀刃向上转) 将刀片斜向拉回。刀片到近身端再反转刀刃向前推进, 如是反复研磨。磨时应注意刀刃全部能均匀磨到, 使刀片与磨石间角度保持一定。



磨刀图解

④切片刀在使用前后应以鲨鱼皮磨刀, 磨刀时持刀和刀刃转动方法和磨刀时相同,

但应注意刀刃是在刀片前进方向之后，否则刀刃将会划破边刀皮。

⑤检查切片刀利钝的方法

在低倍显微镜下检视刀刃是否呈平滑直线，钝者可見映刻。用手指輕按刀刃，利刃有刺痛之感。用头发在刀刃上滑动时，利刃可卡头发并可切断头发。用利刃割薄紙片割开綫平直，鈍刀划开綫不平直。

⑥存放刀片时应先将其擦干净，然后涂上机油，放置于专为放刀片的匣中，注意勿碰損刀刃。

2. 切片(用滑走切片机)

①用酸处理过的試材在切片前先要洗净材料中的酸；用甘油酒精軟化者不必去酸。將試材的3个切面修理端正后准备切片。

②切片刀的裝置：先将刀片紧旋在切片机刀架中，再調整刀片和准备切的試材切面間的角度，使約为5—10度，調好將其固定。再調刀刃与試材边綫之間的夹角，使約为35度，然后固定。

③試材的裝置：先将試材紧夹在切片机試材夹中，再調有关前、后、左、右方向轉动的螺旋，使試材切面成水平面，調好后旋紧。再調有关試材高低的螺旋，使試材接近刀刃，調好后固定。

④切片：先調好調节切片厚度裝置并固定之。切片厚度平常为14—20 μ ，一般为16 μ 。切片时要輕捷，使刀片在机上来去自如。为使切片刀和試材保持滑潤状态，应随时用70%酒精或蒸餾水潤澤之。切片机应保持清潔，經常涂上机油，使机件灵活和防銹。切片机应保持稳定，特别是在切片时。

⑤切下的切片可用湿毛笔揩下，放于盛有70%酒精或蒸餾水的培养皿中。

V、染色 (Staining)

平常的木材显微制片是用加拿大树脂封固，加拿大树脂溶于二甲苯中，所以材料也多用二甲苯透明，在透明前用酒精脫水。由于多种染料溶于酒精中，因此染色在脫水过程中同时进行。切片或离析材料作成显微制片标本的过程如下：

→脫水→染色→脫水→透明→封固。

1. 脫水 (Dehydration)

使材料通过一系列浓度不同酒精，由低浓度者最后到无水酒精中，除淨材料中的水。为防止发生質壁分离現象，在脫水时要按一定酒精梯度順序进行，并在每过1种浓度

的酒精时使試材停留一定時間。

2. 常用染料的性質

由于細胞各部分化学性質不同（或一个組織組成細胞性質不同），又各种染料性質不同，所以不同染料可使細胞不同部分着色（或一个組織的不同細胞着色）。常用染料如次：

①番紅——碱性；可染細胞核、染色質、栓質化、再質化部分。

②俾士麥棕——碱性。

③苯胺藍——碱性。

④苏木精——碱性。可染纖維素細胞壁；染色前应用媒染剂；热带含多量胶体的木材用此染色易呈黑色，应改用其他染料。

⑤固綠——酸性；可染原生質細胞膜。

⑥亮綠——酸性；用途如固綠，但易褪色。

⑦桔紅G——酸性；可染原生質。

⑧苏丹Ⅲ——酸性；可染脂类。

⑨酸性品紅

⑩碱性品紅

3. 染料的配制

①0.5%苏木精——每100ml.中有苏木精0.5g., 蒸馏水100ml。

②4%鉄礬——每100ml.中有鉄礬4g., 蒸馏水100ml。

③1%番紅——每100ml.中有番紅1g., 有50%（或70%）酒精100ml。

④1%固綠——每100ml.中有固綠1g., 有95%酒精100ml。也可以用純酒精或丁香油为溶剂。

⑤1%俾士麥棕——每100ml.中有俾士麥棕1g, 有70%酒精100ml。

4. 用番紅、鉄礬、苏木精染切片的过程

→50%酒精中的切片→30%酒精中停2分鐘→蒸馏水中停2分鐘→4%鉄礬中媒染30—60分鐘→0.5%苏木精染色1—4小时→蒸馏水洗去多余染料→2%鉄礬分色（Defferniation）→流水冲洗30—60分鐘→30%酒精脫水2分鐘→50%酒精脫水2分鐘→1%番紅染色24小时（或过夜）→50%酒精分色（快）→70%酒精脫水30秒（或更快）→95%酒精脫水2分鐘（或稍短）→純酒精脫水1分鐘→純酒精1分鐘→透明→

5. 用番紅、固綠染木材切片过程

→50%酒精中切片→1%番紅染色24时(过夜)→50%酒精分色→70%酒精30秒(更快)→95%酒精2分鐘(或更短)→1%固綠染色数秒或稍长时间→95%酒精分色(快)→純酒精1分鐘(或稍短)→純酒精1分鐘→透明→

6. 用番紅染木材离析标本过程

→浸50%酒精中之試料→70%酒精溶解之1%番紅液染色 10小时或过夜→95%酒精分色脫水1分鐘(或稍短)→純酒精脫水1分鐘(或稍短)→純酒精脫水1分鐘→透明→

VI. 封 固 (Mounting)

1. 切片或离析标本封固过程

→經純酒精脫水的試料→用純酒精和二甲苯各 $\frac{1}{2}$ 溶液媒浸1分鐘(或稍短)→純二甲苯透明5分鐘→加拿大树脂封固。

2. 封固时的操作过程

用鑷子將标本放載片上,排列好→以适量加拿大树脂滴标本上→夹盖片一边,以他边先与載片相接,輕放盖片于标本上,放下 $\frac{1}{2}$ 时抽出鑷子,使盖片自落→去多余树脂,使树脂干燥,加标籤。

注: ①在空气过湿处加盖片前,可先将盖片在酒精灯上掠过1、2次,使盖片更干燥些,再加盖标本上。

②加盖片时应使盖片由一端自行下落,勿压入气泡;万一压入气泡可將切片标本放30°C左右温台上驅出气泡,并促使制片速干燥。

VII. 永久标本(Permanent Preparation)的保存

1. 作好的制片标本应在載片右角刻上号碼以备查考。在載片左面貼上标籤,写明标本的学名、产地等項。

2. 标本适当的干燥以后应放入标本盒或标本夹中。

3. 保存标本的柜应不受日光照射;在暖热地区存放应使制片保持水平位置,因此可将豎裝的标本盒直立放置。

附 录

1. 显微研究工作之必需设备

① 試驗桌、仪器厨、药品厨、标本厨、标本盒等。

② 广口瓶、細口瓶、指形管、滴瓶、标本瓶、染色缸、染色皿、培养皿等。

③ 滑走切片机 (Sliding microtome)、旋轉切片机 (Rotary microtome)、磨刀石、盪刀皮、磨刀机、解剖器 (Dissecting apparatus)、盖玻片 (Cover glass)、载玻片 (Slides glass)、古塔波胶 (Guttapercha) 容器或鉛壶等。

④ 研究用显微镜 (如Luminpan-microscope)、检查用显微镜 (Compound microscope)、双筒解剖显微镜 (Biocular microscope)、显微投影器 (Small micro-projector)、显微描繪器 (Indication apparatus)、显微镜灯、目鏡測微尺 (Ocular micrometer)、螺旋測微尺 (Screw micrometer)、測微台尺 (Object micrometer) 等。

⑤ 电热温箱 (30° — 150°C)、电热温台 (38°C 左右)、电爐、离心沉降器 (Centrifuger)、油抽气机、托盘天秤、扩大鏡、剃刀等。

2. 主要药品的中外文对照

純酒精	Absolute alcohol
酒精	Alcohol
氨水	Ammonium
苯胺蓝	Aniline blue
酸性品紅	Acid fuchsin
铁矾	Ammonia ferric sulphate
苯	Benzine, Benzol
俾士麦棕	Bismarck brow
碱性品紅	Basic fuchsin
鉻酸	Chromic acid
氯仿	Chloroform
綿胶	Colloidin, Celloidin, Parlodion
加拿大树脂	Canadium balsam
柏木油	Cedar-wood oil
丁香油	Clove oil
乙醚	Ether

甲醛	Formalin, Formal
固綠	Fast green
冰醋酸	Glacial acetic acid
甘油	Glycerine
龙胆紫	Gentian violet
盐酸	Hydrochloric acid
氟酸	Hydrofluoric acid
过氧化氢	Hydrogen peroxide
苏木精	Haematoxylin
碘	Iodine
輕机油	Light machine oil
乳酸	Lactic acid
亮綠	Light green
甲醇	Methyl alcohol, Methanol
甲基綠	Methyl green
硝酸	Nitric acid
桔紅G	Orange G.
重鉻酸鉀	Potassium bichromate
氫氧化鉀	Potassium hydroxide
碘化鉀	Potassium iodide
石蜡	Parraffin
石蜡油	Parraffin oil
苦味酸	Picric acid
間三苯三酚	Phloroglasin
硫酸	Sulphuric acid
氫氧化鈉	Sodium hydroxide
苏丹Ⅲ	Sudan III
番紅	Safranine
甲苯	Toluol, Toluene
单宁酸	Tannic acid
冬綠油	Winter green oil
二甲苯	Xylene, Xylol

参 考 书 籍

1. Chamberlain, Methods of Plant Histology
2. Sass, L. E. Elements of Botanical Microtechnique
3. Johansen, D. A. Plant Microtechnique
4. Richards, O. W. The Effective Use and Proper Care of the Microtome
5. Conn, H. J. Biological Stains Biotech Publications
6. Franklin, G. L. Permanent Preparations of Macerated Wood Fiber
(Trop. Woods, 1937 No. 49. 21-22)
7. Rawlins, T. E. Phytopathological Methods
8. Franklin, G. L. Preparation of Thin Sections of Synthetic Resins and
Wood Resin Composites, and a new Macerating Method for Wood. (Nature,
1945. 155, 51)