

植物材料的薄片超薄片技术

徐是雄

北京大学出版社

植物材料的薄切片超薄切片技术

徐是雄 编著



北林图 A00068809



267207

北京大学出版社

内 容 简 介

本书主要介绍近代植物细胞学研究中应用的几种技术，包括供电子显微镜研究的超薄切片法、供光学显微镜观察的塑料包埋薄切片、供光、电镜检的自显影技术以及冰冻切片等技术。书中除了叙述方法外，还谈到一般的原理。可供大专院校教师、农、林、医学科学研究人员从事细胞学、组织学及植物解剖学研究的参考及细胞学技术课教材。

植物材料的薄切片超薄切片技术

北 京 大 学 出 版 社 出 版
(北京大学校内)

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行
武 汉 地 院 北 京 研 究 生 部 印 刷 厂 印 刷

787×1092毫米 32开本 3印张 58千字
1981年6月第一版 1981年6月第一次印刷
印数 1—10000册

统一书号：13209·16

定价：0.33元

序

细胞学的进步在相当程度上依赖于所采用的技术的发展。电子显微镜的发明对细胞超微结构的了解起了决定性的作用。近年来,在我国有关生物学和医学研究单位和高等院校逐渐比较普遍地建立了电镜实验室和开展了细胞超微结构的研究工作。超微结构样品制备方面新的技术资料和经验正是从事这方面的工作者所迫切要求的。同时,在当前电镜设备尚感不足的条件下,如何利用一台电镜开展各种技术的研究,以充分发挥高级仪器的效率,更是急待解决的问题。此外,在研究细胞超微结构时,对整体细胞,甚至组织的了解仍然是十分必要的。因此,如何改进原有的石蜡切片技术,使之能与电镜工作配合,成为配套的实验技术是在工作中需要解决的问题。

1980年7月北京大学生物系聘请香港大学植物系徐是雄博士讲学,进行了供关于光学显微镜检的塑料薄切片技术,冰冻蚀刻,放射自显影,细胞化学,扫描电镜,X-射线微区分析等专题报告。对上述几方面的问题都有所涉及并有一定的启发。现在他将有关薄切片及超薄切片技术整理出版,对提高我们在细胞学、组织学、解剖学及胚胎学研究工作是很有帮助和很及时的。

徐是雄博士在植物细胞的显微技术方面具有丰富的经验。本书所介绍的几种切片方法都包括了他本人的实践经验。在电镜样品制作技术中,Spurr氏环氧树脂由于粘度较低,

特别适用于植物材料，在国际上有成为植物细胞最常用的电镜包埋剂的趋势。我们实验室经过试用，效果很好。乙二醇甲基丙烯酸脂（GMA）切片技术可以在普通石蜡切片机上切成 $1-3\mu$ 的切片，是研究细胞和组织的很好方法。这次徐博士来讲学，和我们一起用这方法进行了豇豆胚柄传导细胞的研究，获得很满意的效果。书中其它方法在各种研究工作中也是很重要的和实用的。

北 京 大 学 生 物 系
植物细胞学及胚胎学教研室

朱 激

1980 年 9 月 18 日

前 言

近二十年来植物制片技术有了很大的发展。由于新方法的不断发明,许多旧方法已被新方法所取代。譬如以前经常用来固定材料的固定剂,如福尔马林—醋酸—酒精液(FAA)、酒精—醋酸—氯仿固定液(卡诺氏液)、纳瓦兴氏固定液(CRAF)等,已逐渐被饿酸、戊二醛等固定液所取代;而包埋剂方面,传统的石蜡包埋剂也已逐渐被一些塑料包埋剂如乙二醇甲基丙烯酸脂(glycol methacrylate)和环氧树脂类塑料(epoxy resins)所替代。

有了较优良的固定剂和包埋剂,不但植物组织的形态可以被完整地保存下来,细胞的细微结构,同样也能相当真实地被保存下来。此外,由于塑料包埋剂能切出 $1-2\mu$ 的薄切片,因此这些切片在光显微镜下的分辨率和清晰度也有了很大的提高。

为了使这些比较优良的切片技术能够被更多的人掌握,编者根据近期文献内的有关报导以及编者个人在应用这些技术时总结出来的一些经验,编成此书。在编写过程中,承北京大学生物系朱澂和胡适宜同志的鼓励和帮助,编者表示衷心的感谢。但由于编者的知识有限,书中错误一定不少,希望读者批评、指正,以便将来修改提高。

徐 是 雄

1980年9月

目 录

前言

I、环氧树脂制片技术

(1) 环氧树脂	1
(A) Araldite	2
(B) Epon 812	3
(C) ERL-4206	3
(2) 制片程序	4
(3) 固定	6
(A) 戊二醛	7
(B) 锇酸	8
(C) 甲醛	9
(4) 固定剂配方	10
(A) 戊二醛	10
(B) 多聚甲醛 + 戊二醛	10
(C) 丙烯醛 + 戊二醛	11
(D) 锇酸	11
(E) 锇酸与重铬酸钾混合液	12
(F) 高锰酸盐固定液	13
(G) 特殊的固定方法	13
(i) 戊二醛 + 钨红	13
(ii) 戊二醛 + 鞣酸	14

(iii) 戊二醛 + 镧	14
(iv) 锇酸浸透法	14
(5) 缓冲液	14
(A) 磷酸缓冲液 (0.2M)	14
(B) Sørensen氏磷酸缓冲液	15
(C) 二甲胂酸钠缓冲液 (0.2M)	15
(D) 顺丁烯二酸缓冲液 (0.2M)	16
(E) 乙酸缓冲液 (0.1M)	16
(F) Tris- 顺丁烯二酸 缓冲液	16
(G) Tris-HCl 缓冲液 (0.05M)	17
(H) 硼酸盐缓冲液	17
(I) Sym-Collidine 缓冲液	18
(J) γ -Collidine HCl 缓冲液	18
(K) Piperazine 缓冲液 (0.3M)	19
(6) 清洗和脱水	19
(7) 渗透与包埋	20
(8) 包埋剂配方	22
(A) Epon 812	22
(B) Araldite	23
(C) #618 包埋剂	24
(D) ERL-4206 (Spurr氏环氧树脂)	24
(E) 环氧树脂 #600	25
(9) 染色	26
超薄切片染色	26
(A) 醋酸铀	26
(B) 柠檬酸铅	27
薄切片染色	29

(A) 甲苯胺蓝 -O	31
(B) 碱性品红/亚甲蓝	31
(C) 亚甲蓝/天青A/番红O	32
(D) 高碘酸-Schiff (PAS)	32
(E) Silver Hexamine	33
(1) 薄切片染色	33
(2) 超薄切片染色	34
(F) 溶解环氧树脂法	34

参考文献	35
------------	----

II、乙二醇甲基丙烯酸脂 (GMA) 制片技术

(1) GMA 的性质	37
(A) Frater 的提纯方法	39
(B) Tippet 和 O'Brien 的提纯方法	40
(2) GMA 的配方	41
(A) GMA 混合液的配方	41
(B) Frater 配方	42
(C) Bennett 配方	42
(3) 固定	42
(A) 3% 戊二醛	44
(B) 4% 甲醛	44
(C) 其它的固定剂	44
(4) 清洗	45
(5) 脱水	45
(6) 渗透	46
(7) 聚合	46
(8) 切片	47
(A) 修块	47

(B) 玻璃刀.....	48
(C) 切薄片.....	48
(D) 粘片.....	52
(9) 染色.....	52
(A) 甲苯胺蓝-O.....	53
(B) 酸性品红/甲苯胺蓝-O	54
(C) 高碘酸 / 锡夫氏试剂法.....	54
(D) 孚尔根染色法	56
(E) 苏木精染色法	58
(F) 酰胺黑 10B—染蛋白质.....	58
(G) 苏丹黑 B—染脂类.....	59
(H) 萤光染料	59
(10) 照相.....	61
(11) GMA 和环氧树脂薄切片比较.....	62
参考文献.....	63

III、显微放射自显术

(1) 放射性同位素的应用.....	65
(2) 参数名词解释.....	65
(A) 半衰期.....	65
(B) β - 能量	67
(C) 比放射性.....	67
(D) 放射性物质浓度.....	68
(E) 放射性化合物纯度.....	69
(3) 标记化合物的贮存.....	69
(4) 标记的方法.....	70
(5) 标记材料的固定.....	70
(6) 环氧树脂光显微镜自显术.....	70

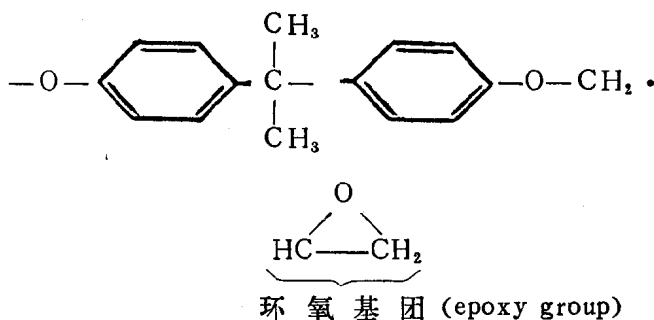
(7) GMA 薄切片和光显微镜自显术·····	73
(8) 电子显微镜放射自显术·····	74
(A) 浸片法·····	75
(B) 圆环法·····	75
(9) 放射自显影图照的清晰度和分辨力·····	76
参考文献·····	78
IV、冰冻薄切片技术	
(1) 固定·····	79
(2) 清洗·····	79
(3) 抗结冰剂处理·····	80
(4) 冰冻切片·····	80
(5) 染色·····	81
(6) 抗结冰剂对组织结构的影响·····	81
参考文献·····	82

I. 环氧树脂制片技术

(1) 环氧树脂

环氧树脂为一种呈黄色的高分子树脂。在单体状态为液体，能渗入植物组织。与组织结构聚合硬化后，适宜用来做薄切片（1—2 μ ）和超薄切片，供光显微镜和电子显微镜观察。

环氧树脂按其原料组分有两种类型：二酚丙烷型环氧树脂(phenolic epoxy resin 如 araldite)和甘油基脂肪族环氧树脂(glycerol-based aliphatic epoxy resin 如 Epon 812)。前者粘度比后者一般为高。环氧树脂的一般结构式为：



环氧树脂的包埋机制是：环氧末端基团很容易打开（打开时能产生 $\sim 22 \text{ kcal/mol}$ 的能量），与其它含有活性氢原

子基团，包括被包埋样品的氢原子基团联结起来。由于这个原因，所以样品经环氧树脂包埋后，就不易染色，因为所有能与染料结合的氢原子基团，都被环氧树脂形成的键占了去。另外，由于环氧树脂和样品在聚合时形成许多横键，使一般水溶性的染料都渗透不进去。故此经环氧树脂包埋的材料就不容易做组织化学方面的染色以供光显微镜观察，但对电子显微镜切片染色则不受影响。

当纯的环氧树脂聚合时，聚合速度是很缓慢的，因为环氧树脂本身在聚合时不易形成交联（cross-link）而硬化。故此环氧树脂的聚合需要借助一些交联物质（即硬化剂或固化剂hardener）才能快速硬化。除了附加硬化剂之外，通常在应用环氧树脂包埋剂时，还得附加一些加速剂（或聚合加促剂 accelerator）来加快硬化的速度。其次，有时在有些配方内还得附加一些软化剂或增塑剂（plasticizer）来调节环氧树脂聚合的硬度，以利于切片。

目前作为包埋剂的环氧树脂有好几种，但常用来包埋植物材料的有以下三种：Araldite①、Epon 812②和ERL-4206（又名 Spurr 氏环氧树脂③。这三种环氧树脂的粘度分别为（在25℃）：

Araldite 502	3000 厘泊 (cP)
Epon 812	150—210厘泊
ERL-4206	7.8 厘泊

下面介绍这三种环氧树脂的特性（具体的配方见后文）。

（A）Araldite

这一种环氧树脂粘度比较高，但聚合时不会收缩，同时

聚合后自发萤光很低。用来包埋单细胞如藻类、原生质体效果很好④。

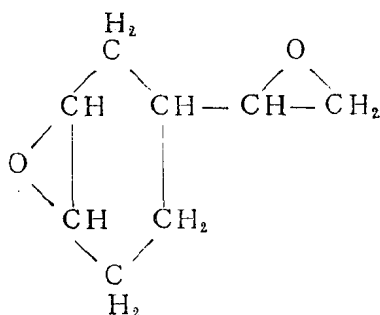
Araldite 配成包埋剂，一般用的硬化剂为：DDSA——十二烷基琥珀酸酐 (dodecyl succinic anhydride)。粘度 = 290 厘泊 (25℃)。加速剂用：DYO 64[DMP-30——2,4,6 tri (dimethylaminomethyl) phenol]。软化剂用：dibutyl phthalate 或 TAC (triallylcyanurate)。

(B) Epon 812

Epon 又名 Epikote 是一种粘度比较低的环氧树脂。现今用 Epon 812 的人最多。但这一种环氧树脂的弱点是吸潮性能很强，因此在潮湿和炎热的环境条件下，硬化了的树脂会变软，影响切片性能。配方内一般用两种硬化剂：DDSA和MNA (或 NMA) (甲基内次甲基二甲酸酐，又称六甲酐酐 methylnadic anhydride 或 nadic methyl anhydride)。粘度 = 175—275 厘泊 (25℃)。加速剂用：DMP-30。

(C) ERL-4206 (Spurr 氏环氧树脂)③

化学名称为 vinyl cyclohexene dioxide (VCD)，化学结构式为：



ERL-4206 的粘度相当低,只有 7.8 厘泊,就算附加了固化剂、软化剂、加速剂的混合液,粘度也只有 60 厘泊 (25℃),经存放 24 小时,粘度也只升至 140 厘泊 (25℃)。软化剂用 D.E.R.736 (diglycidyl ether of polypropylene glycol), 粘度为 30—60 厘泊 (25℃)。固化剂用 NSA (noenyl succinic anhydride), 粘度为 117 厘泊 (25℃)。加速剂用 DMAE (dimethylaminoethanol), 粘度为 3.32 厘泊 (25℃)。最好不要在潮湿的环境下操作,因为 ERL-4206 环氧树脂内的酐键很容易水解而遭到破坏。

(2) 制 片 程 序

制备环氧树脂的制片步骤如下:

1. 把组织结构切成 1—2mm² 的小块;
2. 用 1—3% 戊二醛在室温固定 2—3 小时;
3. 用固定液内相应的缓冲液清洗 2 次,每次停留 1—2 小时;
4. 再用 1% 锇酸固定 1 小时;
5. 用相应的缓冲液清洗 2 次,每次停留 1—2 小时;
6. 用不同级数的乙醇脱水,每级停留 15—30 分钟;
7. 换入树脂混合液渗透 1—2 小时,换 2 次,然后再换一次新鲜的包埋剂过夜。(如用其它的环氧树脂,在脱水之后需经过环氧丙烷,才能进入环氧树脂);
8. 第二天把样品和包埋剂放在胶囊内,在 70℃ 聚合过夜;
9. 修整硬化了的包埋块;
10. 在超薄切片机上切 1—2 μ 的薄切片,染色后,可以供光显微镜观察;
11. 切超薄切片,放在铜网上染色后,供电子显微镜观察。全部过程示于 (图 1)。下面详细论述各个步骤。

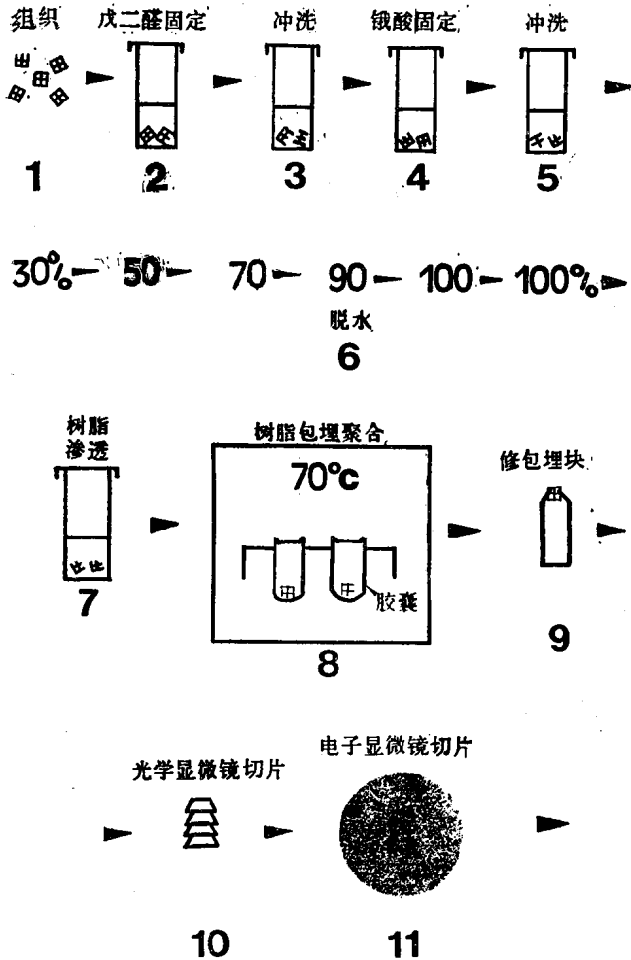


图 1. Spurr 氏环氧树脂包埋过程示意图。

(3) 固 定

固定是制片的第一步，它的主要目的，是将植物细胞迅速杀死及固定，使他们在死亡后，不至于变形或使结构受到损伤，产生人为假象 (artifact)。

一般来说，固定剂只能对植物组织内的蛋白质成份起到固定的作用，而对其它的组织成份如脂类、糖等的固定都是有困难的。故此根据蛋白质被固定的情形和效果，我们可以把固定剂分成两类：(1) 凝固性固定剂 (coagulant fixatives) 和 (2) 非凝固性固定剂 (non-coagulant fixatives) (表一)。

表一 一些常用的凝固性和非凝固性固定剂

(Baker 1958)⑤

凝固性固定剂
甲醇 (methanol)
乙醇 (ethanol)
丙酮 (acetone)
硝酸 (nitric acid)
氢氯酸 (hydrochloric acid)
三氯醋酸 (trichloroacetic acid)
苦味酸 (picric acid)
氯化汞 (mercuric chloride)
氯仿 (chloroform)
三氧化铬 (chromium trioxide)
非凝固性固定剂
甲醛 (formaldehyde)
锇酸 (四氧化锇) (osmium tetroxide)
重铬酸钾 (potassium dichromate)
戊二醛 (glutaraldehyde)
丙烯醛 (acrolein)
醋酸 (acetic acid)*

* 醋酸对蛋白质的固定来说可以被看作为非凝固性固定剂，但因为它对核蛋白 (nucleoprotein) 起凝固作用，故也可以被看作凝固性固定剂。