

植物制片技术

(第二版)

李正理 编著

科学出版社

植物制片技术

(第二版)

李正理 编著

科学出版社

1987

内 容 简 介

这是一本介绍植物细胞、组织制片方法的基本技术用书。主要叙述植物制片的一般原理、各种制片方法和所需的器材药品。

本书可供中等学校及大专院校进行有关教学和科研，以及科研部门和其他需要植物制片以资观察、鉴定的单位参考。

植 物 制 片 技 术

(第 二 版)

李正理 编著

责任编辑 王爱琳

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1978年4月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1987年4月第 二 版 印张：5 1/2

1987年4月第二次印刷 字数：124,000

印数：15,191—18,390

统一书号：13031·3488

本社书号：5312·13—10

定价：1.35元

前 言

此书自1978年出版以来，已历七年，需要学习植物制片技术的读者，希望此书能够早日再版。另外，近年来，个别经典方法经过改进又复盛行，而此书过去未列入，因此可以利用再版予以补充。

薄切片法所制切片，由于仍可以在一般光学显微镜下观察，近来已普遍应用，因此也列入本书内“植物的一般制片方法”中，由董忠民同志编写，作为第十法，专门予以介绍。

为了方便读者参考国外同类著作，本版将所有化学试剂与染料等都附上英文名词，这些化学名词基本上都以1982年《英汉化学化工词汇》（第三版）为依据。一些因发明人而定名的固定剂、染色法，以及各种制片方法等，此版也将附上作者原名。本版书末附有索引可资查找。

本书经增订以后，希望继续能作为有关院校、中等学校师生，以及各种生产与科研部门需要此方面技术的人员参考。

由于编者业务水平的限制，书中缺点和错误可能不少，尚望广大读者批评、指正，以便再版时修改提高。

编 者

1985年12月于北京大学

目 录

前言	(iv)
一、引论	(1)
二、制片的准备工作	(8)
(一) 各种制片用的基本设备和常用试剂	(8)
1. 基本设备	(8)
2. 常用试剂	(9)
(二) 制作切片时应注意的事项	(14)
三、制片的一般原理	(18)
(一) 固定与常用的固定剂	(18)
1. 理想的固定剂	(19)
2. 配制固定剂的一些常用化学物品	(21)
3. 一些常用的固定剂	(26)
(二) 脱水作用与脱水剂	(36)
1. 脱水作用	(36)
2. 常用的脱水剂	(36)
(三) 植物制片上各种其他用剂	(39)
1. 透明剂	(39)
2. 粘附剂	(42)
3. 包埋剂	(44)
4. 封固剂	(45)
5. 封边剂	(57)
6. 漂白剂	(58)
7. 其他用剂	(59)
(四) 染色原理与应用的染料	(60)
1. 染色原理	(60)
2. 各种常用的染料	(63)

(五) 染色方法及各种染色剂.....	(71)
1. 染色方法.....	(71)
2. 染色剂及染色程序.....	(73)
四、植物的一般制片方法	(92)
(一) 整体封固法.....	(92)
1. 甘油法.....	(92)
2. 甘油冻胶法	(94)
3. 甘油-二甲苯法	(94)
4. 松节油法.....	(95)
(二) 离析法.....	(96)
1. 铬酸-硝酸离析法	(96)
2. 硝酸-氯酸钾离析法	(96)
3. 醋酸-过氧化氢离析法	(97)
4. 盐酸-草酸铵离析法	(97)
5. 氨水离析法	(98)
6. 铬酸离析法	(98)
7. 酒精-盐酸离析法	(98)
8. 氯水-亚硫酸钠法	(99)
9. 次氯酸钠法	(99)
10. 氢氧化钠透明离析法	(99)
(三) 透明法.....	(100)
1. 乳酸-石炭酸透明法	(100)
2. 氢氧化钠透明法	(101)
3. 其他透明剂透明法	(101)
(四) 涂片法(压片法)	(103)
1. 压片法的一般程序	(104)
2. 几种常用的压片方法	(106)
(五) 徒手切片法及简单的显微化学试验方法	(113)
1. 徒手切片法.....	(113)
2. 简单的显微化学试验方法	(117)
(六) 滑走切片机切片法及蒸气切片法	(130)
1. 切片刀的磨刀技术.....	(130)

2. 滑走切片机切片法	(133)
3. 蒸气切片法	(136)
(七) 冰冻切片法	(137)
(八) 石蜡切片法	(138)
1. 选择材料	(139)
2. 材料固定	(139)
3. 脱水	(142)
4. 透明或清淨	(142)
5. 浸蜡	(142)
6. 包埋	(143)
7. 切片	(145)
8. 粘片	(147)
9. 制片染色	(148)
(九) 火棉胶切片法	(149)
(十) 薄切片法	(150)
1. 固定	(151)
2. 清洗与脱水	(155)
3. 渗透与包埋	(156)
4. 切片	(160)
5. 染色	(161)
6. 封固和照相	(163)
索引	(164)

一、引 论

人类很早就已利用自然界中生长的植物，并认识到根、茎、叶、花等方面的形态。但是对于植物结构上的观察，一直到显微镜发明以后才开始发展。起初用在显微镜下观察的方法是十分简陋的。到了十九世纪，物理学及化学随着工业革命有了重大的发展以后，在观察生物的方法上，也起了一个革命性的改变。目前一般应用的一些显微技术，可以说在上世纪末叶及本世纪初期就已奠定了基础。十九世纪末，随着工、农业生产的进一步发展，也促进了制片技术学的发展。这时期无论在制片原理的阐明，或各种方法的创造上，都有很多的贡献，特别在新兴人工合成（煤焦油提炼）染料工业的推动下，为制片技术（尤其是染色方法）的改进，创造了条件。当时许多从事植物学的研究者，同时亦可以说都是优秀的技术工作者，因为这个关系，植物学上各种原理的建立与技术上的改进互相促进，使植物形态学、组织学及细胞学迅速地发展，并且为生产实际提供了不少解决问题的新方法。

到目前为止，多年来已创造的许多制片方法，可适用于特定的材料和一定的观察目的。例如单细胞的、丝状的及薄的叶状体，以及幼小的胚胎等都可以不经切片，进行整体的制片。易于分离的组织可以在载玻片上压散或涂成一层，染色后制成压片或涂片。复杂的及大块的组织，通常可用徒手或用滑走切片机切成薄片。不太坚硬的材料在切片前还可以埋藏在包埋物质（例如石蜡、火棉胶或树脂）中，然后切片。

为了了解器官、组织与细胞中的物质含量和性质，以及确定这些物质的分布部位，都可以应用各种显微化学试剂测定方法。总之，制片的方法是繁多的。由于不断改进，不断创新，目前一般常用的方法已多达几十种，这里只介绍几个基本的方法，因为掌握了这几个基本方法以后，其他许多方法是容易理解和掌握的。

制片的方法虽然很多，但是其共同特点和基本要求，不外乎要求尽量保持原来结构的真象，切成适当的厚度，以及应用各种染色方法，使内部清晰易见，并且能使制片保持长久，不变形，不褪色。

我们在开始学习制片技术之前，还必须先了解两点：

首先，在制片工作中，可能遇到很多不同的工作情况，我们应该善于运用制片的一些基本原理和方法，根据材料的特征、观察的目的，同时考虑到实验室的设备、时间的方便等来决定应用什么方法，而且必须因地制宜、灵活地加以应用。目前制片学上的方法，不能说是尽善尽美的，我们还可以在应用中加以改进。

另外，在制片的时候常会碰到很多困难，甚至会失败，这时绝不要气馁。如果是试剂、仪器设备上的困难，应该设法用代用品来代替使用，如果是制片标本不能如意或制片过程中某一些步骤不能顺利进行，应该仔细地找出原因，努力克服。

二、制片的准备工作

从事植物制片以前，必须有一些准备工作。下面将简单地介绍一些基本设备和注意事项，作为初学时的参考。

（一）各种制片用的基本设备和常用试剂

植物制片有各种方法，每种方法的进行过程，需要有一定的设备。了解了这些设备以后，也可以就地取材，用较简单的日常用具或物品代替。例如作植物徒手切片用的剃刀，标准的刀刃，要求两面平直，而通常所用的则是两面下凹的。但是为了购置方便，已多用这种两面下凹的，或其他种类的剃刀。不过，不论用什么形式的剃刀，要求必须十分锋利。一般还可使用剃须刀片。至于染色试剂，不得已时，也可用有些日常医药用品代替，例如紫药水可以替代结晶紫溶液，碘酒稀释后，代替碘-碘化钾溶液等等。这些将在有关章节中予以讨论。

1. 基本设备

（1）一般仪器

电热温箱 (incubator)；

利用电热。有各种容积大小。平常可调节温度25—180℃，误差一般不超过 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。电热温箱普通有二种隔热方式：一种在箱壁双层中间垫以隔热材料；另一种在双层壁之间可灌入适当温度的热水，作为隔热所需，称为水浴温箱，

此种性能较好。

制片时需要二个温箱：一个较大，一个较小。较大的一个，可调节温度到 $25-50^{\circ}\text{C}$ 左右，作为萌发种子、酶促反应、离析材料，以及较低温度的浸蜡等用途。较小的一个，可调节温度到 $60-75^{\circ}\text{C}$ ，用以浸蜡或快速离析材料之用。

如果没有这些温箱，也可用较简便办法代替，例如石蜡制片法中的高温（ $65-70^{\circ}\text{C}$ ）浸蜡，即可自制“亭子灯”（图1A）。此种自制溶蜡“灯”使用时必须在灯下放置一块隔热材料，以免烧坏台面，引起意外。

需用较低温度（ $25-45^{\circ}\text{C}$ ）的，也可以“因材施教”，自制土温箱，或用一般孵蛋箱代替。

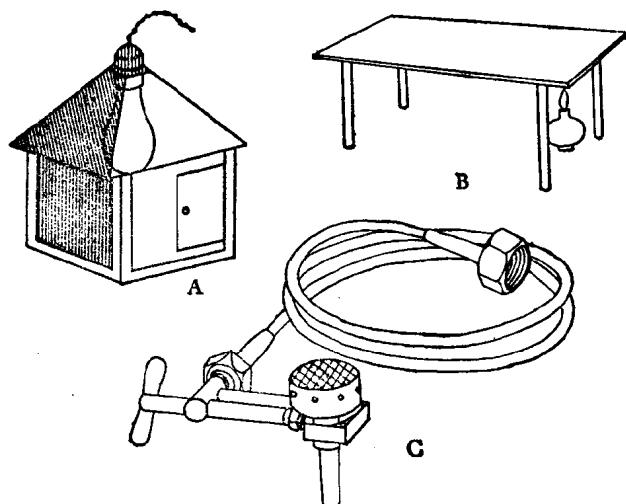


图1 仪器附件

A. 浸蜡用“亭子灯”，B. 烤干用“温台”，
C. 冰冻切片用的冷却装置（固着器）。

冰箱（refrigerator）：

可用电冰箱或用天然冰的冷却办法。制片所用材料，有

时需要在低温（0—3℃）下处理或

显微镜（microscope）：

平常需用一台较简单（或废旧的）的显微镜，以作制片时临时检片之用。另一台应稍好，作为最后研究观察之用。制片过程中应不用研究用显微镜作检查染色情况，以保护显微镜。

双筒解剖镜（stereoscopic microscope），

此种显微镜立体感较强，用于解剖实物。不过放大倍数较低，只宜作一般实物的观察。

转动切片机（rotary microtome），

石蜡切片法中必须应用切片机。通常为了便于进行连续切片，多用转动切片机，这种切片机有各种式样。

滑走切片机（sliding microtome），

专为切制木材或其他较硬材料（例如小麦粒、玉米粒等）之用。平常冰冻切片和棉胶切片也多用此种切片机。也可作石蜡切片之用，但作连续切片不如转动切片机方便。

切片刀（knife）：

有各种刃式和长短，平常多用二面平直的。用在转动切片机上的稍短（110或120毫米长）；用在滑走切片机上，宜较长的（185毫米）。

冰冻切片机（freezing microtome）：

通常是在滑走切片机上装一冷冻装置。切片刀及切片操作，基本上与使用滑走切片机的相似。这种冷冻装置有几种样式，一般所用的如图1C所示。

电热温台（hot plate）：

为了展平蜡带或烤干制片都需温台，普通多用电热温台。也可用合适的铜板或铁板，自做温台，利用一端用酒精灯烧热即可，如图1B。如果在一边下面做一小水箱，加热水

箱，效果更好。台面或做成三角形，在长尖一端烧热，温度较易控制，但容易倾跌，是其缺点。只要注意控制好温度，此种“烫板”也很好用。

磨刀石 (hone, honing stone, sharpening stone)；

通用青石和黄石，否则也可用平常较细的磨刀石。最好能有一块较粗的和一块较细的（可用旧砚台石代用）。

荡刀皮 (honing strop)；

就是平常所用的荡刀皮，如一面附有帆布的更好。

剃刀 (razor)；

用通常刀刃二面下凹的即可。如找代用的，刀刃不能太厚，否则不易切成薄片。

扩大镜 (magnifier)；

用 $5\times$ 或 $8\times$ 的即可。最好用固定式的，不要三片（或二片）折叠的。

天平 (balance)；

通常的三梁秤 (triple beam balance)，灵敏度在10毫克的就已够用，或可用秤中草药的戥子代替。

(2) 玻璃器皿

载玻片 (slide)；

通用的为 25×75 毫米，厚度在1.1—1.5毫米左右。载玻片太薄容易破碎，而且不符合一般显微镜预制上的要求。如果太厚（超过2毫米），由于高倍接物镜（例如油镜）焦距很短，无法用作细胞学制片。

盖玻片 (coverglass)；

有圆的、方的或长方的等许多规格。平常方的多用18毫米或22毫米见方二种；长方的视需要可备用 22×30 ， 22×40 （毫米）等等。植物制片中较少用圆形盖玻片，如应用时，也多

用直径18毫米的。

染色缸 (staining jar) :

平常有三种式样: 二种立式和一种横卧式。立式较普通, 容量较小, 也比较节省药液, 但是只有5个凹槽, 一次只能装厚片5片, 薄片则可利用背靠背的放入8片(二端最好各放一片)。

还有一种立式, 一次可装厚片10片, 或背靠背薄片18片, 但容易倒翻, 而且口盖也不严密, 现已较少应用。

横卧式染色缸, 放置切片最为平稳。每缸可放厚片10片或薄片18片。缺点是费药液较多, 而且口盖不严密, 药液容易蒸发。

酒精灯 (alcohol lamp) :

也可自制, 但必须具有随时能盖灭火焰的盖子, 以保安全。

培养皿 (Petri dish) :

有各种直径和高度不同的规格。平常可按需要备有100×15毫米的数套及直径较小的数套, 视情况而定。

染色碟 (Syracuse watch glass) :

通常用底径为6.5厘米的一种。也可用浅碟代替, 但要设法防止蒸发。

量筒 (cylinder) :

一般备有25、100、1000毫升的三种即可。

漏斗 (funnel) :

可备用上口直径55毫米和100毫米的二种。

试管 (test tube) :

通用口径20×150毫米的。

小酒杯 (small wine cup) :

此为石蜡切片法中浸蜡所必需, 通常就用瓷制小酒杯。

为了节省石蜡，不必太大，以口径在4厘米左右的较为合适。

烧杯 (beaker) ;

能备有25、50、100、200、500、1000毫升等几种，较为方便。

广口瓶和细口瓶 (wide-and narrow mouthed bottles) ;

需有各种容积的 (30毫升到1000毫升) 若干，视需要备用。

树胶瓶 (balsam bottle);

有几种式样。通用的有密封的外盖。这种树胶瓶，如果放置较久不用，容易胶住外盖，难以打开。(注：如被加拿大树胶胶住，不能打开时，如用强力撬开或火烤，往往使瓶口破裂。较妥办法，可将全瓶放置在废二甲苯中，使之没过瓶盖。放置几天以后取出，轻轻旋动外盖即可。注意避免废二甲苯溅入。)

树胶瓶也可以找其他大小合适的玻璃瓶代用，但需防止树胶液的不挥发。

滴管及滴瓶 (dropper & dropping bottle) ;

可视需要，酌量置备若干。

(3) 其他用具

剪刀 (scissors) ;

有多种规格，最好有一大一小的平剪和一、二把小弯剪。

镊子 (forceps);

视需要置备几把，在进行染色体压片时，要求使用较精细的镊子。

解剖刀 (scalpel) ;

有各种规格，可选合适的置备。

解剖针 (dissecting needle)：

可以用缝衣针自制。方法：选取粗细合适（直径约7—8毫米左右）的小木棍，锯成10厘米长，将缝衣针的后眼扳断。然后用钳子夹住后部，轻轻敲打钳口，将针嵌入小木棍的一端中央即成。

毛笔 (writing brush)：

用通常最起码的中楷笔即可，只作刷下蜡带和刷去蜡屑之用。如用旧笔，必须将残墨洗净后方可应用。否则残留墨屑会影响石蜡制片。

刀片 (blade)：

即平常剃须刀片，有单面的和双面的二种。切较硬的材料，宜用单面的。

小木块 (small wood block)：

石蜡切片用的小木块。可用较硬的木材，锯成如图12A所示的小长方块。大小为 $2 \times 2 \times 2.5$ 厘米或稍小。在方形的一面上，锯出纵横沟纹，以便固着石蜡。

2. 常用试剂

本书各章中介绍的各种方法所应用的试剂，并未全都列上。此处只列举平常容易购置的试剂名称和一般3—6个月的需要量，作为建立一个小型制片实验室时参考。其中有的尚可因陋就简，觅取代用。

(1) 一般试剂

95%酒精 (工业用) (ethanol, ethyl alcohol, alcohol)	5升
无水酒精 (纯酒精) (absolute alcohol)	2升

甲 醇 (methanol)	2升
甲 醛 (formaldehyde)	500毫升
福尔马林 (37%甲醛) (formalin)	2升
醋 酸 (乙酸) (acetic acid)	2升
丙 酸 (propionic acid)	1升
三氧化铬 (chromium trioxide)	250克
高锰酸钾 (potassium permanganate)	200克
苦味酸 (picric acid)	250克
重铬酸钾 (potassium dichromate, potas- sium bichromate)	500克
氯 仿 (chloroform)	2升
乙 醚 (ether)	1升
甘 油 (glycerin)	500毫升
乳 酸 (lactic acid)	500毫升
硫 酸 (sulfuric acid)	2升
硝 酸 (nitric acid)	1升
盐 酸 (hydrochloric acid)	2升
氢氧化钠 (sodium hydroxide)	500克
氢氧化钾 (potassium hydroxide)	500克
氯酸钾 (potassium chlorate)	100克
氯化锌 (zinc chloride)	100克
氯化钙 (calcium chloride)	200克
氯化铁 (ferric chloride)	200克
氯化汞 (升汞) (mercuric chloride)	100克
偏亚硫酸钠 (或钾) (sodium or potassium metabisulfite)	250克
高碘酸 (periodic acid)	50克
碘 片 (iodine plates)	100克