

显微镜标本的制作方法

田中克己著

科学出版社



79.844

169

顯微鏡標本的制作方法

田中克己著

長伯譯

馬駿駟校

科學出版社

田 中 克 己
显微镜标本の作り方

东京 裳华房 1957

内 容 簡 介

本書是关于显微镜标本制作的专门技术书籍,全书分为21章,全面地介绍了各种显微镜标本的制作方法;包括各种切片,苏木精·伊红染色标本,腺组织和结缔组织标本,脑、脊髓标本,血球标本,细菌标本等以及细胞核、染色体、粒线体、高尔基体和中心体的显微技术;还另章叙述了组织化学,非切片标本的制作法和细胞、组织的活体观察。在取材上除了人体和动物之外,还选入了某些植物方面的材料。关于标本的采集、固定技术,有关仪器的使用,以及各种固定剂的配制和效用,亦均有专章详加叙述。

本书适用于高等学校、中等技术学校有关生理学、病理学、生物学、生物化学、医学、农学等各系科的教学人员、技术人员和学生,对于一般初学者尤为适合。医院和卫生防疫机构、检验部门的工作人员,以及上述有关系科的研究人员亦均适合。

显微镜标本的制作方法

田 中 克 己 著
長 伯 譯
馬 駿 駒 校

*

科学出版社出版 (北京朝阳门大街117号)

北京市书刊出版业营业许可证出字第061号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总经售

*

1961年12月第一版

书号:2310 字数:264,000

1961年12月第一次印刷

开本:850×1168 1/32

(京)0001—7,200

印张:10 1/8 插页:3

定价:1.35元

凡 例

1. 本書主要的目的是在于传授关于显微镜标本制作的必要的基础知識和基本技术,所述及的各个方面,虽尙嫌初浅,但如能严格地按照書中所載的有关注意事項去实践,則操作大体均不致于失敗,而所制出的标本亦均能清晰可辨。

2. 标本的种类繁多,固定和染色的方法更是浩如烟海,如果一开始就全盘予以罗列,則無疑是将初学者置于迷途。为此,在固定液中本書先以福尔馬林和包音氏液为代表,而在染色法中則选取苏木精·伊紅染色为代表,然后,再从采取标本开始,依次将标本的制作、整理,以及保管等一系列操作詳細加以叙述。以上这些部分,組成了本書的前半部(到第十一章为止)。

3. 第十二章以后,則分別叙述上述以外的各种方法(并无重复)。如与前半部合併閱讀,則更能放手从事于标本的制作。

4. 本書对于日常广泛应用的一些主要方法的叙述是不遺余力的,然而,对于某些特殊的方法却不可能全盘加以收罗。为此,卷末特列举参考書目,謹备參閱。

5. 主要的術語均附以英語和德語,但也有略去其中之一者。英語用直体文字,德語用斜体文字,以示区别。凡是标有*符号者,則系上述两語的共同語,或者是相互間比較类似而易于类推的詞語。

目 录

第一章 着手制作标本之前	1
第一节 实验计划	1
第二节 标本制作法的概略	2
一、活体观察, 二、切片法与非切片法,	
三、切片染色标本的制作方法——概要。	
第三节 日程和记录	4
第二章 标本	7
第一节 蒐集标本的方法	7
第二节 采取标本之前	7
第三节 动物组织的采取方法和麻醉法	9
第三章 固定法	11
第一节 总述	11
一、固定的意义, 二、用具, 三、固定液,	
四、割取组织块的方法, 五、附加记号的方法。	
第二节 组织的洗涤	18
一、水洗法, 二、酒精洗涤法。	
第三节 福尔马林固定法	20
一、固定液, 二、固定, 三、水洗, 四、整形。	
第四节 包晋氏液固定法	24
一、固定液, 二、固定, 三、酒精洗涤。	
第五节 固定结束后的事后处理	25
第四章 切片制作法——总论	26
第一节 切片法和包埋法的种类	26
一、简单的切片法, 二、包埋法,	
三、各种包埋法的优缺点, 四、包埋法的选择。	

第二节 切片刀.....	31
一、切片刀的种类, 二、切片刀的选择, 三、切片刀的使用法,	
四、磨刀的方法——原理, 五、刀片的显微镜检查,	
六、磨刀砖和磨刀机, 七、软砖的使用法——准备工作,	
八、磨刀的实际操作, 九、保险刀的刀片。	
第三节 切片机.....	44
一、种类和构造, 二、托馬·金式切片机, 三、香茲式切片机,	
四、回轉式切片机, 五、特殊的切片机, 六、超切片机,	
七、切片机的使用法,	
第五章 石蜡切片的制作方法	55
第一节 全部操作的概略.....	55
第二节 脱水.....	56
一、酒精的使用和稀释的方法, 二、无水酒精,	
三、酒精脱水, 四、酒精以外的脱水剂。	
第三节 透明.....	61
一、用二甲苯进行透明处理, 二、二甲苯以外的透明剂,	
三、兼具脱水作用的透明剂。	
第四节 石蜡的渗透.....	67
一、用具和准备工作, 二、石蜡渗透的方法。	
第五节 石蜡包埋.....	72
一、用具, 二、包埋的实际操作, 三、石蜡包埋的实际操作,	
四、有关石蜡包埋的问题解答, 五、失败后的措施, 六、包埋組織块附加标誌的方法, 七、包埋組織块的整理, 八、包埋的事后处理。	
第六节 包埋块在台木上的固着.....	82
一、台木, 二、固着包埋块的方法, 三、整形。	
第七节 用推动式切片机制作石蜡切片的方法.....	83
一、用具, 二、准备工作, 三、切片的厚度, 四、切片刀的傾斜度,	
五、切削的方法, 六、切削質量不佳的原因和解决的办法,	
七、用斜刀式进行切削的方法, 八、切削結束后的处置。	
第八节 用回轉式切片机制作切片的方法.....	96
一、用具, 二、准备工作, 三、切削的方法。	

第九节 石蜡切片的摊平和贴附的方法	99
一、用具，二、贴附的方法，三、捞取法， 四、整理工作，五、切片脱落的原因和解决的办法。	
第六章 炭蜡切片的制作法	108
第一节 炭蜡法概說	108
一、炭蜡，二、操作的大要，三、炭蜡法的优缺点。	
第二节 炭蜡的渗透和包埋	109
一、用具，二、炭蜡溶液，三、固定和洗涤的方法， 四、渗透的实际操作，五、包埋，六、包埋的事后处理。	
第三节 炭蜡切片的切削和贴附的方法	113
一、准备工作，二、切削方法，三、切片的处理方法。	
第七章 火棉胶切片的制作法	116
第一节 火棉胶法概說	116
一、全部操作的概略，二、火棉胶法的优缺点。	
第二节 脱水和渗透的准备工作	117
一、脱水，二、无水酒精·无水乙醚的等分液。	
第三节 火棉胶渗透	118
一、用具，二、火棉胶溶液的配制方法，三、火棉胶渗透的方法。	
第四节 火棉胶包埋法	121
一、用具，二、包埋的实际操作，三、組織块标加記号的方法， 四、删略包埋手續的场合。	
第五节 在台木上固定	125
一、台木，二、固定的方法。	
第六节 火棉胶切片的切削方法	126
一、用具，二、准备工作，三、切削的方法，四、失败的原因和解 决的办法，五、連續切片的制作法，六、关于切削的事后处理。	
第七节 火棉胶·石蜡双重包埋法	134
一、方法，二、失败的原因和解决的办法。	
第八章 冰冻切片的制作法	137
第一节 冰冻法概說	137
一、操作的概略，二、冰冻法的优缺点。	

第二节 用具	138
一、冰冻切片机, 二、切片刀, 三、液态二氧化碳气和鋼筒台,	
四、切片針和玻璃棒。	
第三节 切削的方法	141
一、組織块的固定和水洗, 二、准备工作, 三、薄切的实际操作,	
四、冰冻程度的鑑別, 五、事后的整理工作, 六、切片的处理方法。	
第四节 明胶包埋	147
一、明胶包埋概說, 二、包埋的实际操作, 三、明胶包埋切片的切	
剖方法和处理方法, 四、不行冰冻法的明胶包埋切片的制作法。	
第九章 載玻片和盖玻片	151
第一节 載玻片	151
一、載玻片的規格, 二、載玻片的厚度,	
三、載玻片的清洁, 四、特殊的載玻片。	
第二节 盖玻片	154
一、盖玻片的大小和質量, 二、盖玻片的厚度,	
三、盖玻片的清洁, 四、特殊的盖玻片。	
第三节 玻片的再利用	157
第十章 苏木精·伊紅染色标本的制作法	159
第一节 染色方法的概略	159
一、染色之前, 二、染色和封固, 三、染色結果。	
第二节 染色前切片的处理	162
一、石蜡切片的处理方法, 二、游离切片的处理方法, 三、其他。	
第三节 染色液、区别染色液、脫水液以及透明液的配制方法	166
一、苏木精染色液, 二、盐酸酒精(区别染色液),	
三、伊紅溶液, 四、脫水剂, 五、透明液。	
第四节 染色、脫水、透明的用具	170
一、玻璃板, 二、貼附切片的染色用具,	
三、游离切片的染色用具, 四、其他用具。	
第五节 貼附切片的染色方法	172
一、苏木精的染色方法, 二、区别染色, 三、酸性苏木明矾合剂的	
染色法, 四、伊紅染色和脫水、透明处理, 五、染色的事后处理。	
第六节 游离切片的染色方法	179

第七节 封固	180
一、封固的类型, 二、加拿大香胶, 三、封固的用具, 四、封固的实际操作 I, 五、封固的实际操作 II, 六、盖玻片的加压, 七、封固的事后处理。	
第八节 标本的褪色和重新染色	189
第十一章 标本的整理和保管	190
一、标本的整理, 二、标本的保管。	
第十二章 固定剂的配制和主要的固定法	193
第一节 固定液的选择	193
第二节 福尔马林	194
第三节 含苦味酸的固定液	193
第四节 含升汞的固定液	198
第五节 含酒精的固定液	201
第六节 含铬的固定液	202
第七节 含三氯醋酸的固定液	203
第八节 含铁酸的固定液	204
一、铁酸剂的配制方法, 二、固定和水洗, 三、漂白, 四、蒸气固定, 五、含铁固定液的处方例。	
第九节 注射固定法	208
一、全身注射固定, 二、局部注射固定。	
第十三章 细胞核和染色体	211
第一节 活体观察	211
第二节 涂布法和压碎法——概要	212
一、涂布法和压碎法的特点, 二、涂布标本, 三、压碎法, 四、醋酸系染色液, 五、龙胆紫和结晶紫, 六、孚尔根氏反应和铁苏木精染色。	
第三节 涂布法和压碎法的实际	217
一、花粉母细胞的观察法, 二、根端细胞的染色体, 三、哺乳动物的组织块, 四、唾腺染色体的观察法, 五、永久标本的制作法, 六、液体中的细胞成分。	
第四节 切片法	223

一、包埋和薄切，二、核和染色体的固定，三、染色法——概要，	
四、孚尔根氏反应，五、海登哈音氏铁苏木精染色法。	
第十四章 粒綫体、高尔基氏体、中心体	233
第一节 粒綫体	233
一、活体观察，二、体外活体染色，三、固定，	
四、包埋和薄切，五、染色法。	
第二节 高尔基氏体(高尔基氏内网装置)	238
一、一般注意事项，二、鍍銀法，三、鐵剂法。	
第三节 細胞中心体	241
第十五章 腺組織及結締組織	243
第一节 阿丈氏染色法	243
第二节 彈力纖維的染色方法	246
第三节 范捷蓀氏染色法	247
第四节 脫鈣法	250
一、固定及其他，二、电气脱鈣法，三、硝酸脱鈣法，四、有机酸	
脱鈣以及兼行脱鈣的固定液，五、离子交换树脂法，六、脱鈣完成	
的判断，七、包埋。	
第五节 骨和齿的研磨标本	254
一、前处置，二、研磨法，三、封固，四、鍍銀法。	
第十六章 脑和脊髓	257
一、采取标本的方法和固定，二、染色的方針，	
三、尼司耳氏染色，四、皮尔肯斯基氏染色，五、髓鞘。	
第十七章 組織化学	263
第一节 一般注意事項	263
一、組織化学反应的特異性和敏感度，二、操作的心得。	
第二节 肝糖	264
一、采取标本的方法和固定，二、鮑尤尔·孚尔根两氏染色法，	
三、李黎氏法，四、唾液消化試驗。	
第三节 粘液	268
第四节 脂肪質	268
一、用水溶性封固剂进行封固，二、苏丹染色，三、鐵剂染色，	

四、奈耳蓝染色，五、油紅染色，六、史密斯·戴厥理赫两氏类脂 体染色，七、胆固醇的証实法(萧尔兹氏法)。	
第五节 鉄的檢驗	274
第六节 維生素丙	276
一、嵇洛特·勒勃隆特两氏法，二、鮑尔尼氏法。	
第七节 碱性磷酸脂酶	277
第十八章 血球标本的制作方法	279
第一节 采取血液的方法	279
第二节 血球的体外活体染色	280
第三节 血液涂布标本	280
第四节 染色方法	281
一、姬姆薩氏染色，二、梅-葛伦瓦尔德两氏染液。	
第五节 氧化酶反应	283
第六节 瑞志氏染色法	284
第十九章 細胞与組織的活体观察	286
第一节 活体观察的要点	286
第二节 媒液	287
一、液体石蜡，二、生理的盐类溶液，三、蔗糖溶液。	
第三节 悬滴标本的制作方法	290
第四节 活体染色	292
一、台盼蓝，二、苏打胭脂紅，三、中性紅。	
第五节 解离法	294
第二十章 非切片法	295
一、整体标本，二、涂布法，三、伸展法， 四、分离法，五、消化法，六、癌細胞的抹片診斷法。	
第二十一章 細菌标本的制作方法	301
第一节 一般注意事项	301
一、感染的危險，二、常备消毒剂，三、器材。	
第二节 涂片染色标本的制作方法	303
一、涂片，二、干燥，三、固定，四、染色， 五、水洗，六、干燥，七、鏡檢。	

第三节 染色方法.....	305
一、染料原液，二、吕弗勒氏染色，三、齐尔氏石炭酸复红，四、 浦飞弗尔氏染色，五、革兰氏染色，六、芽胞染色，七、痰中结核 杆菌的染色法。	
参考文献.....	309
西文索引.....	311

第一章 着手制作标本之前

第一节 实验计划

显微镜标本(preparation; *Präparat*)的制作者,无论如何首先要决定的,有下列3件事情:

- i) 检查的目的为何?
- ii) 选择何种标本?
- iii) 用何种方法制作标本?

我们之所以要制作标本,其目的是通过显微镜检查,从而探明某些问题。随着各种各样不同的检查目的,标本的制作方法也相应地有着很多的种类,而且,不论选择那一种方法,从一开始起它的制作手续就各不相同。因此,第一步工作,就是要求明确检查的目的。在这个基础上,才能确立整个的实验计划,否则,标本的制作是存在着很大的困难的。

第二步工作,是要决定研究用的标本,尽可能要选择最适合于该项研究目的的标本。但是,有时也不一定按照这样的规则来进行的,例如:要求查明患者手术时所摘出的肿瘤的性質,在这个场合,检查的目的和标本就是同时解决的,象这样的事例,也并不在少数。

目的和标本一经决定,那末,检查的方法,自然也就大体上肯定了,但是,在选择具体的方法时,也往往还有使人徬徨不决的情况。因为,任何一种方法,都有它一定的缺陷,所谓万能的方法是沒有的。所以,单独依赖某一种方法的话,这可以说是非常不可靠的。因此,必须併用若干种方法,将各方法所观察到的结果,加以综合,然后,再慎重地求出结论,这是作为一个学者应有的正确的

态度。

标本的选择、采取的方法、检查的方法这一系列工作的考虑和决定,都需要精湛的学识,以及丰富的经验。初学者必须多向辅导人员,前辈学者请教,还须要精读文献,深入钻研,或者多作准备实验。在这个基础上,尽可能还要作出精密的实验计划。

第二节 标本制作法的概略

一、活体观察

将生物个体或者它的一部分,就其原来状态,置于显微镜下进行观察,从而达到预定的检查目的。这种方法既简便,又因为毋须加以繁琐的处理,故人工的产物亦较少,堪称为理想的实验方法。然而,实际检查时,却往往因为缺少了某种必要的处理,而使结果难以令人满意者。其主要原因有二:

第一,因为通常生物体的组织、或细胞,大抵均系无色而近于透明。

一般人的眼力,如要分辨某种物体的话,此种物体和媒质(例如,空气、水等)之间,在色度上一定要存在明暗的差别(contrast)。因此,凡是无色透明的物体;就必须先用某种方法,使其形成色度上的明暗差。其方法颇多,例如:标本内部相互之间或者标本与媒质之间,在屈折率上有所差异时,即可以用收小显微镜光圈的办法来加以调节。或者,更好的方法,就是应用位相差法,将屈折率差改变为明暗差,从而达到观察的目的。若是标本为光学的异方体,则可以应用偏光显微镜,将复屈折性改变为明暗差和色度差,亦能达到观察的目的。这些方法,概可以统称为物理的方法。除活体标本外,其他标本的观察,亦可以采用¹⁾。

另外,更为广泛使用的方法,就是利用各种药品和染料的作

1) 关于位相差法和偏光显微镜的应用,请参阅拙著“显微镜的使用法”。

用,基于組織和細胞內所含各种成分的化学的、物理化学的性質有所不同,因而得以显示着色上的差異。本法一般均利用葯液先将細胞杀死(此項操作称为“固定”),然后,再加上染料,予以染色。更有在細胞保持其生命状态的情况下,进行染色者,此种方法称为“活体染色”。关于活体观察及活体染色的这个部分,将于第十九章(第 286 頁)詳述之。

二、切片法与非切片法

将生物体就其原来状态进行观察之所以困难者,另一原因就是因為一般組織較厚,光綫不易透及其內部¹⁾。要使光綫得以通透,就必須將組織切成薄片。因此,标本的制作,遂有切片法与非切片法之分。

切片法者,即利用銳利的刀具,割切組織,將組織分割成极薄的片层。完善的切片法,还須要設法向組織滲入某些特殊物質,然后,使用切片机切割,故手續比較复杂。非切片法,乃是一个总称,其中包括:“分离法”——凭借葯液的作用,將組織各成分相互連接處予以溶化,然后,用針尖將組織分离;“涂布法”——在玻片上将标本涂布成薄层后,再行观察者;以及“压碎法”等等。这些方法,各有长短,可以适当地配合併用。

茲先将一般应用最广,手續最为复杂的一种方法——切片染色标本的制作法,概要介紹如下,其他方法留待后面再行敘述。

三、切片染色标本的制作法——概要

切片染色标本的制作,要經歷下列 5 个阶段:

- i) 采取标本,
- ii) 固定标本,
- iii) 切片,
- iv) 染色,
- v) 封固²⁾。

1) 如仅作表面的观察者,則应用落射鏡檢裝置即可,但內部构造則无法明了。

2) 所謂“封固”者,即將已經染色的切片,夾置于二枚玻璃片(載玻片和盖玻片)之間,趁切片未嘗干燥之际,加注某种液体或树脂,予以封固。

以上五个阶段,每个阶段都可以有若干种方法,特别是(二)固定标本和(四)染色,这二个阶段的方法,尤其繁多。如果把这些方法全部汇集起来,几乎可以说是洋洋大观,其数无穷!

一般地说,在制成一份标本的许多操作步骤当中,最初的阶段是很为重要的。若是采取标本的方法不当,所要观察的部分在标本中并不存在,那末,即使制成了任何佳美的标本,其结果也是枉然。反之,采取的标本很好,而固定的方法不当,所要求的某些物质,并未获得保存,这同样地也达不到检查的目的。而且,在这一阶段操作失败的话,标本就很难再返工重制。制作切片的各个步骤的操作,虽均能返工,但总较一次成功的质量为差。比较起来,还是染色和封固这二个阶段的差错所引起的损害,较为轻微。

第三节 日程和记录

标本的种类,以及固定、切片、染色的方法,一经确定之后,应即将所有的操作步骤,预先编制成日程表。关于日程表的编制,下面将有详细的介绍。有的甚至将采取标本的适当时刻,也作了明确的规定。至于固定等操作所需要的时数、日数,这是有一定的规定的,缩短或者推迟,都是不好的。若是不很好地按照日程表进行,就可能为其他工作所打乱,以致于造成半夜出勤,或者其他种种的不方便。再者,大批标本同时进行处理的时候,若是单凭记忆,要求将所有的行事,一一详细记住的话,这根本也是不可能的。为此,必须使用记录册或者卡片,预先编写好日程表。每天清晨,一到研究室之后,即予过目一遍,这样,当天的工作,就可以有条不紊地顺次进行了。

制订日程表时,务必安排得不和其他工作发生冲突。并须按照不同种类的标本和不同的固定法分项进行记录。一切安排得很妥当,而只是在预定的时日上有所差错时,则应及时地予以订正。

这种日程表将組成整个实验记录的一部分,它的价值很大,应予长期保存备查。根据这些材料,如果操作失败时,就可以找出失败的原因,这样,同样的失败事例,以后就很少再会发生。反之,亦可以获得成功的经验,以后在操作上,就可以更有把握。

所以,标本的制作过程必须备有记录册,详加记录。万一发生漏记的情况,例如:操作时间,一时无法精确回忆,那末,就应该实事求是地予以补记。例如:“上午 7.30 分左右”等等。

兹将此种记录¹⁾的实例一份,介绍如下:

天竺鼠 No 18, ♀, 体重 220 克(从大西購到),于福岡。

1953—10/XII, (木), 下午 4.30, 用空气栓塞法杀死, 卵巢 2 个。

固 定	10%的中性福尔馬林	(室温 10°C)
水 洗	11/XII (金)	上午 8.30
50%的酒精		下午 1.00
70%的酒精		下午 5.00
80%的酒精	12/XII (土)	上午 8.30
90%的酒精		下午 3.00
96%的酒精	14/XII (月)	上午 8.30
純酒精		下午 5.00
二甲苯·酒精	15/XII (火)	上午 8.30
純二甲苯		下午 1.00
二甲苯·石蜡		下午 2.00
石 蜡 53°C I.	16/XII (水)	上午 9.00
石 蜡 II.		上午 9.30
石 蜡 III.		上午 10.00
包 埋		上午 10.30
切 片	16/XII 室温 12°C,	厚 7 微米。

1) 实际上记录册的表内,大多利用一定的略字,以求其简化。固定、染色等操作,在某些按常规成法进行的情况下,只须记录最初的一页,以后即可予以省略。最初所制订的日程表,有时只能制订到操作过程的中途为止,例如:行石蜡包埋之后,有时要保存到数年之久,当然,这以后的一些操作,就没有加以预定的必要了。