

穿透式及掃描式電子顯微鏡 生物技術

譯著者 張喜寧·夏鎮洋

穿透式及掃描式電子顯微鏡生物技術 / 張喜寧, 夏鎮洋譯著. -- 修訂版. -- 臺北市 : 曉園, 1991
[民80]

面 : 公分

譯自: Biological techniques for transmission
and scanning electron microscopy

參考書目: 面

ISBN 957-12-0043-3 (平裝)

1. 生物學 - 技術

368.5



80000768

書名 穿透式及掃描式電子顯微鏡生物技術

著者 張喜寧 夏鎮洋

發行人 黃旭政

發行所 曉園出版社有限公司
臺北市青田街7巷5號
(02)3949931(六線)

門市部 北市新生南路三段96號之3/3627375)

印刷行 復大印刷廠
新聞局局版台業字第1244號

版次 1991年4月修訂版第一刷
版權所有·翻印必究

定價 200元

ISBN 957-12-0043-3

第一版序

生物研究上由於電子顯微鏡技術的應用，使我們對於細胞的整體構造及細胞器官所扮演的角色有了更深入的瞭解。此類研究支持並改變了早先用偏光顯微鏡及X射線繞射方法所得到有關細胞的資料。真核及原核細胞結構的觀念已經成爲現代生物學의普通名詞。製備生物樣品以供電子顯微鏡觀察的技術是一種很新且不斷進步的技術，因此人們迫切需要一本簡潔討論電子顯微鏡所用的標準製備技術書籍，而本書就符合這種需求。

本書可作爲教授指導下的學生之實驗手冊，並適於自修學習使用電子顯微鏡的初學者使用，也可以給有志於瞭解用電子顯微鏡作研究的生物學家作補充讀物。很明顯的人們需要簡潔而標準的生物樣品製備方法，故本書不僅試圖供給初學者之所需，亦推薦了生物材料製備的要領，因此書中皆先討論一種方法，再介紹特殊的配方或方法。附錄Ⅱ附有可供研究者逐步遵行的要領。

由於本書基本上是一本技術性書籍，故附有多種資料，例如來源有科學雜誌，私人聯繫及研究經驗等。本書之完成與改進，獲得多人的幫助，在此要特別感謝澳洲維多利亞，摩那許（Monash）大學的亞倫瓦多浦（Allan Wardrop）博士，及作者學基本電子顯微鏡技術的加州大學洛杉磯分部之佛羅拉·慕雷·史考特博士（Flora Murray Scott）。那些幫我作研究及收集文獻的許多學生及教授們無法一一列舉，但是他們的影響明顯地貫穿全文。特別感謝幫忙準備原稿及圖版的利蘭·史塔克（Lillian Stark）夫人及哈力·卡斐特（

Harry Calvert) 先生和譚巴·南佛羅里達大學之瓊妮·戴維絲 (Joanne Davis) 夫人，另外，圖片之許多說明是靠研究生哈力·格利爾 (Harry Grier) 先生及南佛羅里達大學攝影系的幫助，在此一併致謝。

克林頓·傑·道斯 (Clinton J. Dawes)

譚巴，佛羅里達 (Tampa, Florida)

1970年6月

第二版序

本修訂版之目的及背景與 1971 年所出之第一版相同。由於人們對於一本簡潔可作教本的教科書或個人用來處理電子顯微鏡生物技術的迫切需求仍然存在，故本書基於個人教書十四年的經驗予以擴充成爲最新的教本，並加入新的章節（物理技術，掃描電子顯微鏡學製備技術），且原有各章內也加入了適當的參考資料與細節。基於電子顯微鏡學組織製備知識的急速進步，本書又新加入常用固定劑、染料及化學反應的討論。固定及染色的化學理論之討論部份有助於研究者解釋所得到的圖片。

本書設計成一本通俗性的單卷書籍，但包含穿透式及掃描式電子顯微鏡二種生物技術，適於大學部高年級及研究生，同時也適於獨立的研究者使用。本書可作自修或有組織的課程教授之用。由於週全地添加了參考資料，故對研究者獲得與他或她研究有關的詳細特殊資料有所助益。材料的來源及有關穿透及掃描電子顯微鏡樣品製備的大綱列在附錄 I 及 II。

特別要感謝那些衷心幫助我準備原稿的學生們。勞佛·慕 (Ralph Moon) 先生幫助作者打字、圖表的製作 (圖 1—8 ; 9—5 ; 11—1 ; 13—1) 及示範用的攝影。同時我要感謝許多供我引用的電子顯微鏡圖片：圖 2—3, 4, 6, 8, 9, 琳達·文蘭 (Linda Weinland) 女士，圖 2—5, 加利·郭丹德斯特 (Gary Grotendorf) 先生；圖 2—7 安娜·萬金傑 (Anna Wenzinger) 夫人，圖 8—1, 2, 3, 4, 5, 6, 12—4, 5 史丹·賴斯 (Stan

Rice) 先生；圖 12—1，卡倫·史塔津若 (Karen Steindinger) 先生；圖 12—6，麥隆·賴得比得 (Myron Ledbetter) 博士·恩尼斯特·楚比 (Ernest Truby) 先生，卡倫·史塔津若 (Karen Steindinger) 夫人及拉娜·塔斯特 (Lana Tester) 女士作圖 11—8，9，12—3。羅素·高達德 (Russel Goddard) 先生及比蒂·洛蘭 (Betty Lohraamm) 夫人幫助作者對原稿作最後修正。本作者願對本書內容的正確性負責，當然如無上述諸位的幫助本書就無法完成。

克林頓·傑·道斯 (Clinton J. Dawes)

譚巴，佛羅里達 (Tampa, Florida)

1979 年 1 月

目 錄

第一版序

第二版序

第一章 電子顯微鏡學.....	1
1-1 電子顯微鏡學的歷史與目的.....	1
緒言	1
歷史	5
1-2 穿透式電子顯微鏡的構造與利用	7
構造	7
解像力與波長	7
1-3 掃描式電子顯微鏡的構造與到用	13
1-4 電子顯微鏡學樣品的製備	16
穿透式電子顯微鏡	16
掃描式電子顯微鏡	17
第二章 穿透式電子顯微鏡的化學固定法	19
2-1 緒言	19
化學固定的目的與影響	19
化學固定的一般反應	20
2-2 影響化學固定的因子	21
緩衝液和酸鹼度	21

2 目錄

張力	22
電解質與非電解質	24
溫度	24
時間長短	24
樣品大小	25
清洗	25
2-3 固定步驟	25
一般評論	25
原處固定法	27
灌流固定法	28
一般固定步驟	29
2-4 化學固定劑的種類	29
緒言	29
四氧化鐵	30
與脂質的作用	30
與蛋白質的作用	33
與碳水化合物化合物的作用	33
反應摘要	34
四氧化鐵的使用	34
與四氧化鐵合用的緩衝液配方	36
(1)Palade (1952) 醋酸佛羅那緩衝鐵	37
(2)Dalton (1955) 鉻-鐵固定劑 (1%)	39
(3)Millonig (1961b) 磷酸緩衝鐵 (1%)	40
(4)Sorensen 氏之磷酸緩衝液 (Mc Clean 及 Cook, 1952) 及鐵 (1%)	41

(5) Kellenberger 等氏 (1958) 醋酸佛羅那緩衝之	
鐵 (1 %)	43
四氧化鈣	44
醛類之介紹	44
戊二醛 (戊二酸二醛)	45
與蛋白質的作用	46
與其他細胞成分的作用	47
戊二醛的操作	47
丙烯醛	49
甲醛 (福馬林 , 甲酸 - 醛)	50
醛類摘要	52
醛類之緩衝液配方	52
(1) Pease (1964) 磷酸緩衝之甲醛 (10 %)	52
(2) Sabatini 等氏 (1962) , 二甲次砷酸緩衝之戊	
二醛 (5 %)	53
(3) Holt 及 Hicks (1961 b) , S- 膠吡啶緩衝之戊	
二醛 (5 %)	55
(4) Millonig (1961 b) , 磷酸緩衝之戊二醛 (10 %)	
.....	60
(5) Gibbs (1962) , 海產固定劑 , 醋酸佛羅那緩衝	
之戊二醛 (5 %)	61
(6) Ramuss (1969) , 二甲次砷酸鹽 - 蔗糖緩衝之	
戊二醛 (5 %)	62
(7) Luft (1959) , 二甲次砷酸鹽緩衝之內烯醛 (
5 %)	63
(8) Karnovsky (1965) , 二甲次砷酸鹽緩衝之戊—	

醛—甲醛 (各 3%)	64
(9) Dawes (1969b), 磷酸緩衝之戊二醛—丙烯 醛 (各 3%)	65
(10) Hirsh 及 Fidorko (1968) 同時固定 (戊二醛 及四氧化鐵)	66
高錳酸 (MnO_4)	66
高錳酸鹽之操作	67
高錳酸鹽用緩衝液配方	68
(1) Luft (1956), 醋酸佛羅那緩衝之高錳酸鹽 (0.6%)	68
(2) Mollenhauer (1959), 未緩衝之高錳酸鹽 (5 %)	69
(3) Dawes 及 Rhamstine (1967), 醋酸佛羅那 鹽緩衝之高錳酸鹽 (0.6%)	69
(4) Dawes 及 Rhamstine (1967), 海水緩衝之 高錳酸鹽 (0.6%)	70
第三章 穿透式電子顯微鏡包埋材料之製備	71
3-1 組織操作	71
3-2 清洗	71
3-3 脫水	72
3-4 以水溶性塑膠作脫水劑	74
3-5 脫水步驟	75
乙醇—環氧丙烷或丙酮—緩慢步驟	76
乙醇—環氧丙烷或丙酮—迅速步驟	77
丙酮脫水	77

	無限稀釋	77
第四章	包埋	79
4-1	緒言	79
4-2	塑膠之處理	80
4-3	滲透	81
4-4	膠囊包埋	82
4-5	平式包埋	86
4-6	顆粒樣品包埋(預包埋)	87
	洋菜預包埋	89
	牛蛋白素預包埋	90
	組織培養之三明治式包埋	90
	易碎樣品之包埋	90
第五章	塑膠	93
5-1	緒言	93
5-2	甲基丙烯酸酯類(丙烯樹酯類)	94
	一般資料.....	96
	塑膠混合物及包埋	96
5-3	聚酯樹脂(羥基醇類)	98
	聚酯樹脂配方	99
	(1)Vestopal W (Ryter 及 Kellenberger, 1958)	99
	(2)Rigolac (Kushida, 1960)	100
5-4	環氧樹脂(環氧乙烷塑膠類)	101
	環氧樹脂類之化學	101
	(1)Epon 及 Araldite 樹脂	102

(2) ERL - 4206	103
(3)其他的環氧樹脂	104
硬化劑的化學	104
(1)十二烯基丁二酐 (DDSA)	104
(2) Nadic methyl anhydride (NMA)	105
(3)Nonenyl succinic anhydride (NSA)	105
塑化劑的化學	105
(1)二丁基苯二甲酯	105
(2) DER 736	106
加速劑的化學 (催化劑)	106
(1)苯二甲胺 (BDMA)	106
(2)2, 4, 6 Tris (dimethyl aminomethyl) phenol (DMP - 30)	107
(3)Dimethyl amino methyl phenol (DMP 10)	107
(4)二甲基氨基乙醇 (DMAE, S - 1)	107
酸酐—環氧系統之硬化機制	108
環氧塑膠的去除	109
環氧樹脂配方 (非水溶性)	110
(1)Glauert 及 Glauert 氏之英國Araldite (1958)	110
(2)Luft 氏之美國Araldite (1961)	111
(3)Coulter (1967) 氏之 Luft 氏Araldite 之改良	111
(4)Fineran 及 Bullock (1972) 氏之 Luft 氏 Aral- dite 之改良	112
(5)Cargille 氏之美國Araldite (1962)	112
(6)Luft 氏之 Epon (1961)	113
(7)Coulter 氏 (1967) : Luft 氏 Epon 之改良	115

	(8) Spurr 氏 (1969) 之低粘度包埋介質	115
	(9) Mollenhauer 氏之 Epon-Araldite 混合物 (1963)	116
	(10) Freeman 及 Spurlack 氏之 Maraglas 混合物 (1962)	117
5-5	水溶性塑膠之包埋	119
	Durcupan	119
	(1) Stabbi 氏 (1960) 之純 Durcupan	119
	(2) Kushida 氏 (1964) 之組合性 Durcupan	120
	(3) Staubi 氏 (1963) 之 Durcupan-Araldite 步驟	121
	甲基丙烯酸乙二酯 (GMA)	121
	(1) Leduc 及 Bernhard 氏 (1967) 之甲基丙烯酸乙二酯	122
第六章	樣品塊之修整與切片刀	125
6-1	樣品塊之修整	125
	初步修整	125
	最後修整	126
6-2	切片刀	127
	金屬刀	129
	鑽石刀	129
	鑽石刀的使用	131
	鑽石刀的清潔	132
	玻璃刀	133
	玻璃刀的製作原理	133

	玻璃刀的製作.....	13
第十章	切片及超薄切片機.....	14
	7-1 原理之考慮.....	14
	7-2 超薄切片之劈裂理論.....	14
	7-3 切片歷史之大要.....	14
	7-4 超薄切片機.....	14
	7-5 切片.....	14
	7-6 切片的處理.....	15
	7-7 困難的補救.....	15
第八章	染色(增強對比度).....	15
	8-1 緒言.....	15
	8-2 染色之特性.....	
	8-3 染色步驟.....	16
	組織塊染色.....	16
	切片染色.....	16
	鉛染色.....	16
	鉛化合物的反應.....	17
	鉛染色的步驟.....	17
	(1)氫氧化鉛的檸檬酸鹽鉍合物(Reynolds, 1963	
).....	17
	(2)檸檬酸鉍(Venable 及 Coggeshall, 1965).....	17
	(3)高濃度的檸檬酸鉛.....	17
	(4)氫氧化鉛的酒石酸鉍合物(Millonig, 1961a)	
	17

(5) 氫氧化鉛的環醋酸鉍合物 (Dalton 及 Zeigel, 1958)	175
(6) 氫氧化鉛的鉍合物 (Dalton 及 Zeigel, 1960)	175
(7) 氫氧化鉛 (Karnovsky, 1961)	176
(8) 氫氧化鉛 (Watson, 1958 b)	176
(9) 氫氧化鉛 (Converse, 私人聯繫)	177
鈾氧基染劑	177
鈾氧基染劑的反應	178
鈾氧基染色步驟	179
(1) 組織塊染色, 醋酸雙氧鈾 (Terzakis, 1968)	179
(2) 切片染色, 醋酸雙氧鈾 (Watson, 1958 a)	180
(3) 切片染色, 硝酸雙氧鈾 (Zobel 及 Beer, 1961)	180
(4) 雙重染色	180
磷鎢酸染劑	181
PTA 的反應	182
(1) 使用 PTA 的酒精溶液作組織塊染色	182
(2) 使用 PTA 的酒精溶液作切片染色	183
(3) PTA — 鉻酸 (Roland 等氏, 1972)	183
高錳酸鹽染劑	184
(1) 切片染色	184
(2) 組織塊染色	184
(3) 三重染色 (Soloff, 1973)	184
鐵染劑	185

(1)四氧化鐵	185
(2)四氧化鐵—碘化鋅 (Maillet, 1968)	185
(3)與鐵結合之染劑 (Seligman 等氏, 1968)	186
(4)鐵—對苯二胺 (Ledingham及 Simpson, 1972)	186
(5)丙烯酸—四氧化鐵 (Herbert 等氏, 1972)	187
(6)OTO方法 (Hanker 等氏, 1966; Seligman 等氏, 1966)	187
銀染劑	189
(1)高碘酸—銀染色法 (Martino 及 Zamboni, 1967)	190
(2)高碘酸—鉻酸—銀染色法 (Mowry, 1959)	191
鐵	191
(1)膠質的甘油鐵胺 (Rinehart 及 Abul-Haj, 1951)	192
(2)鹼性羥胺和三氯化鐵 (Gee 等氏, 1959)	193
鈦	193
(1)組織塊染色 (Ramboug 及 LeBlond, 1967)	193
(2)切片染色 (Revel, 1964)	194
鈹	194
(1)組織塊染色	194
(2)特殊切片染色	195
(3)一般目的之切片染色	196
鈳	196

(1)三氯化鈳及阻礙反應 (Watson 及 Aldridge, 1961, 1963)	196
(2)非特殊性鈳染劑 (Sheffield, 1964)	197
鈳	198
(1)硫酸鈳	198
(2)鉬酸鈳	198
鏷	198
釘紅	199
(1)釘紅—四氧化鐵 (Siew 及 Wagner, 1968)	199
(2)釘紅—細胞外染色 (Brooks, 1969)	200
在放射活性基上金或銀的沈澱	200
第九章 碳及金屬覆膜、鑄模及顆粒樣品	203
9-1 高真空蒸著機	203
抽氣系統	203
鐘罩與底盤	204
控制器	204
計量器	204
9-2 碳的蒸著	207
9-3 金屬投影	207
9-4 掃描式電子顯微鏡用之覆膜	210
9-5 鑄模	211
Henderson (1969) 的纖維素-醋酸鑄模技術	214
Wardrop (1974) 的濕鑄技術	215
9-6 顆粒性樣品	219
碎斷	219