

# 生物学显微技术

余炳生 张 仪 编著

北京农业大学出版社

# 生物学显微技术

余炳生 张 仪 编著

北京农业大学出版社

1 9 8 9

责任编辑：赵玉琴

封面设计：雷克敬

绘 图：于立彦

余炳生

郑 川

## 生物学显微技术

余炳生 张 仪 编著

北京农业大学出版社出版

(北京市海淀区圆明园西路二号)

世界知识印刷厂印刷

新华书店首都发行所发行

787×1092毫米16开本 10.25印张 240千字

1989年8月第1版 1989年8月第1次印刷

印数：5050

ISBN 7-81002-107-9/Q·108

---

定 价：3.60元

# 前 言

生物学显微技术，是生物科学领域中一项重要的实验技术。它的产生和发展，不仅影响着、而且直接推动着生物学各个学科的进展。

近年来，由于生物学显微技术的发展，特别是新的理论和技术在显微镜中的应用，使显微镜的功能开发又进入了一个崭新的阶段。各类新型的研究用显微镜，正在教学、科研、生产等各个部门中发挥其优越的高性能。

近年来，很多院校及科研单位引进了大量的生物制片新设备及各类新型的研究用显微镜，笔者曾多次应邀举办了讲座，并从中了解到目前急待有一本较为全面的介绍显微技术基本理论与操作技术的书籍。为此，我们在原编写的《植物显微技术》教材基础上，尽力将新的内容纳入，力求能适应当代科学技术发展的需要，重新编写了《生物学显微技术》一书。

本书共分三篇，包括：生物制片技术；生物显微镜技术；显微照相技术。为了配合直观教学，后两篇还摄制了电视教学系列录象片。

《生物学显微技术》是我校研究生的教材之一。目前该课程在一些高等院校的教学计划中，参考时数多安排为70~80学时。考虑到本书兼作科技人员的参考之用，在某些章节的内容上略为偏多，以应参考之需。

由于水平所限，书中缺点和谬误在所难免，我们恳切地希望同行专家以及本书的读者批评指正。

**编著者**

1988年11月于北京农业大学

# 目 录

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| <b>第一篇 生物制片技术</b> .....     | ( 1 )  |
| <b>第一章 概论</b> .....         | ( 1 )  |
| 第一节 制片的目的和任务.....           | ( 1 )  |
| 第二节 生物制片的分类法.....           | ( 1 )  |
| <b>第二章 生物制片的步骤和原理</b> ..... | ( 3 )  |
| 第一节 选材.....                 | ( 3 )  |
| 第二节 杀死、固定和保存.....           | ( 5 )  |
| 一、 杀死、固定和保存的概念.....         | ( 5 )  |
| 二、 固定的理论.....               | ( 5 )  |
| 三、 固定象.....                 | ( 7 )  |
| 四、 固定剂.....                 | ( 7 )  |
| 五、 固定时应注意的事项.....           | ( 18 ) |
| 第三节 冲洗与脱水.....              | ( 20 ) |
| 一、 冲洗的意义.....               | ( 20 ) |
| 二、 冲洗的方法.....               | ( 20 ) |
| 三、 脱水的作用.....               | ( 21 ) |
| 四、 常用的脱水剂.....              | ( 21 ) |
| 第四节 透明及透明剂.....             | ( 23 ) |
| 第五节 浸透和包埋.....              | ( 24 ) |
| 第六节 切片.....                 | ( 26 ) |
| 第七节 粘片及粘贴剂.....             | ( 31 ) |
| 第八节 染色及染色剂.....             | ( 32 ) |
| 一、 染色剂.....                 | ( 32 ) |
| 二、 染色剂的选择.....              | ( 39 ) |
| 三、 染色的理论.....               | ( 40 ) |
| 四、 有关染色剂与染色的一些问题.....       | ( 42 ) |
| 五、 染色方法的简介.....             | ( 43 ) |
| 第九节 封固.....                 | ( 46 ) |
| 一、 封固剂.....                 | ( 46 ) |
| 二、 封固技术.....                | ( 46 ) |
| <b>第三章 生物制片的各类法</b> .....   | ( 48 ) |
| 第一节 徒手切片法.....              | ( 48 ) |

|      |                      |        |
|------|----------------------|--------|
| 第二节  | 暂时封藏法                | ( 49 ) |
| 一、   | 简易观察法                | ( 49 ) |
| 二、   | 悬滴培养法                | ( 49 ) |
| 三、   | 花粉母细胞减数分裂的观察         | ( 50 ) |
| 第三节  | 整体封固法                | ( 50 ) |
| 一、   | 甘油法                  | ( 51 ) |
| 二、   | 糖浆法                  | ( 51 ) |
| 三、   | 加拿大树胶封固法             | ( 52 ) |
| 第四节  | 涂沫制片法                | ( 52 ) |
| 一、   | 根尖涂片法——醋酸洋红染色        | ( 52 ) |
| 二、   | 花药涂片法——铁矾苏木精染色       | ( 53 ) |
| 三、   | 根瘤涂片法——结晶紫染色         | ( 53 ) |
| 四、   | 血液涂片法——赖特氏染色         | ( 54 ) |
| 第五节  | 压片法                  | ( 54 ) |
| 一、   | 取材                   | ( 54 ) |
| 二、   | 预处理                  | ( 54 ) |
| 三、   | 固定                   | ( 55 ) |
| 四、   | 解离                   | ( 55 ) |
| 五、   | 染色                   | ( 55 ) |
| 六、   | 压片                   | ( 56 ) |
| 七、   | 封固                   | ( 56 ) |
| 第六节  | 组织分离制片法              | ( 56 ) |
| 一、   | Schultze 氏分离法        | ( 56 ) |
| 二、   | Jeffrey 氏分离法         | ( 57 ) |
| 三、   | 盐酸——草酸铵离析法           | ( 57 ) |
| 四、   | 氨水离析法                | ( 57 ) |
| 五、   | 氯化钾、氯化镁分离法           | ( 57 ) |
| 六、   | 氢氧化钾分离法              | ( 58 ) |
| 第七节  | 滑动切片法                | ( 58 ) |
| 第八节  | 蒸气切片法                | ( 60 ) |
| 第九节  | 冷冻切片法                | ( 60 ) |
| 第十节  | 火棉胶制片法               | ( 62 ) |
| 第十一节 | 石蜡切片法                | ( 63 ) |
| 第十二节 | 连续切片法及在同一载玻片上示器官的发生法 | ( 65 ) |
| 第十三节 | 透明制片法                | ( 65 ) |
| 一、   | 乳酸—石炭酸法              | ( 65 ) |
| 二、   | 氢氧化钠法                | ( 66 ) |
| 第十四节 | 显微研究特殊法              | ( 66 ) |
| 一、   | 孚尔根 (Feulgen) 氏反应法   | ( 66 ) |

|            |                     |        |
|------------|---------------------|--------|
| 二、         | 甲基绿—吡咯宁G显示DNA和RNA法  | ( 67 ) |
| 三、         | 高碘酸—席夫染色法           | ( 68 ) |
| 四、         | 线粒体染色法              | ( 69 ) |
| 五、         | 胞间连丝染色法             | ( 69 ) |
| 六、         | 花粉管染色法              | ( 70 ) |
| <b>第四章</b> | <b>植物组织化学的简易测定法</b> | ( 72 ) |
| 一、         | 钙的测定法               | ( 72 ) |
| 二、         | 镁的测定法               | ( 72 ) |
| 三、         | 铁的测定法               | ( 72 ) |
| 四、         | 淀粉的测定法              | ( 73 ) |
| 五、         | 糖的测定法               | ( 73 ) |
| 六、         | 脂肪的测定法              | ( 74 ) |
| 七、         | 蛋白质的测定法             | ( 74 ) |
| 八、         | 纤维素的测定法             | ( 75 ) |
| 九、         | 木质素的测定法             | ( 75 ) |
| 十、         | 角质与栓质的测定法           | ( 75 ) |
| 十一、        | 果胶质的测定法             | ( 75 ) |
| 十二、        | 检查活细胞或死细胞的染色液       | ( 76 ) |
| <b>附录:</b> |                     | ( 76 ) |
| 一、         | 制片中常用的仪器及用具         | ( 76 ) |
| 二、         | 常用的药剂               | ( 77 ) |
| 三、         | 常用的染料               | ( 79 ) |
| 四、         | 溶液的配制               | ( 80 ) |
| <b>第二篇</b> | <b>光学显微镜技术</b>      | ( 81 ) |
| <b>第一章</b> | <b>概述</b>           | ( 81 ) |
| 第一节        | 显微镜的作用              | ( 81 ) |
| 第二节        | 显微镜的类型              | ( 81 ) |
| 第三节        | 显微镜的发展简史            | ( 83 ) |
| 第四节        | 显微镜的基本光学原理          | ( 84 ) |
| 一、         | 折射和折射率              | ( 84 ) |
| 二、         | 透镜的性能               | ( 85 ) |
| 三、         | 透镜的成象质量             | ( 86 ) |
| 四、         | 显微镜的成象(几何成象)原理      | ( 90 ) |
| <b>第二章</b> | <b>显微镜的光学技术参数</b>   | ( 92 ) |
| 第一节        | 数值孔径                | ( 92 ) |
| 第二节        | 分辨率                 | ( 93 ) |
| 第三节        | 放大率                 | ( 94 ) |
| 第四节        | 焦深                  | ( 96 ) |
| 第五节        | 视场直径                | ( 97 ) |

|            |                     |         |
|------------|---------------------|---------|
| 第六节        | 复盖差                 | ( 98 )  |
| 第七节        | 镜象亮度与视场亮度           | ( 99 )  |
| 第八节        | 工作距离                | ( 99 )  |
| <b>第三章</b> | <b>显微镜的光学部件</b>     | ( 101 ) |
| 第一节        | 物镜                  | ( 101 ) |
| 第二节        | 目镜                  | ( 104 ) |
| 第三节        | 聚光镜                 | ( 107 ) |
| 第四节        | 显微镜的照明装置            | ( 108 ) |
| 一、         | 透射式照明               | ( 109 ) |
| 二、         | 落射式照明               | ( 110 ) |
| 第五节        | 显微镜的光轴调节            | ( 111 ) |
| <b>第四章</b> | <b>各类研究用显微镜</b>     | ( 113 ) |
| 第一节        | 暗场显微镜               | ( 113 ) |
| 第二节        | 相衬显微镜               | ( 114 ) |
| 第三节        | 偏光显微镜               | ( 119 ) |
| 第四节        | 微分干涉衬显微镜            | ( 123 ) |
| 第五节        | 荧光显微镜               | ( 126 ) |
| 第六节        | 倒置显微镜               | ( 129 ) |
| 第七节        | 体视显微镜               | ( 130 ) |
| 第八节        | 万能研究用显微镜            | ( 131 ) |
| <b>第五章</b> | <b>显微镜的几种常用附件</b>   | ( 133 ) |
| 第一节        | 游标尺的使用              | ( 133 ) |
| 第二节        | 显微测微尺               | ( 133 ) |
| 第三节        | 描绘器                 | ( 134 ) |
| 第四节        | 投影屏和投影目镜            | ( 135 ) |
| 第五节        | 共览装置                | ( 135 ) |
| <b>第三篇</b> | <b>显微照相术</b>        | ( 137 ) |
| <b>第一章</b> | <b>显微照相的装置</b>      | ( 137 ) |
| 第一节        | 不同类型的显微照相装置及其功能     | ( 137 ) |
| 第二节        | 显微照相对物镜、目镜及聚光镜的选择   | ( 138 ) |
| 第三节        | 显微照相的照明装置           | ( 139 ) |
| <b>第二章</b> | <b>滤光镜在显微照相中的作用</b> | ( 140 ) |
| 第一节        | 可见光谱的特点、原色和补色       | ( 140 ) |
| 第二节        | 滤光镜的种类与功能           | ( 141 ) |
| 第三节        | 滤光镜在黑白显微照相中的应用      | ( 142 ) |
| 第四节        | 光源的色温及色温平衡滤光镜       | ( 143 ) |
| <b>第三章</b> | <b>感光片的选择与应用</b>    | ( 144 ) |
| 第一节        | 感光片的组成              | ( 144 ) |
| 第二节        | 黑白感光片的种类及其性能        | ( 144 ) |

|            |                           |                |
|------------|---------------------------|----------------|
| 第三节        | 彩色感光片的类型及应用·····          | ( 145 )        |
| 第四节        | 感光片的速度·····               | ( 146 )        |
| <b>第四章</b> | <b>显微照相的操作·····</b>       | <b>( 148 )</b> |
| 第一节        | 工作前的准备·····               | ( 148 )        |
| 第二节        | 视场光阑与孔径光阑在显微照相中的实际应用····· | ( 148 )        |
| 第三节        | 人眼屈光度的校正·····             | ( 149 )        |
| 第四节        | 感光片倒易律失效的补偿·····          | ( 149 )        |
| 第五节        | 曝光的补偿·····                | ( 150 )        |
| 第六节        | 全自动显微照相装置控制器的操作·····      | ( 150 )        |
| <b>附录:</b> | ·····                     | ( 152 )        |
| 一、         | 显微镜长度单位的换算·····           | ( 152 )        |
| 二、         | 可见光在电磁波光谱中的位置·····        | ( 152 )        |
| 三、         | 色光和它们的波长·····             | ( 152 )        |

# 第一篇 生物制片技术

## 第一章 概 论

### 第一节 制片的目的和任务

制片技术是生物学必不可少的研究手段。人类生活在大自然中，虽很早就认识和研究自然界中形形色色的生物，但起初只限于在外部形态、种类以及生长发育等方面的研究，对于内部细微结构的奥秘，直到十七世纪中叶发明了显微镜后，才开始借助工具进行探索。当时限于工具的简陋及科学发展的水平，观察和研究的方法是十分简单的。到了十九世纪，由于工业革命促进了物理学和化学的发展，进而为显微技术的发展提供了丰富的知识和新的技术装备，使显微技术产生了根本性的变化。制片技术就是在这样的基础上形成一门新的学科，从而推动生物科学的日益发展。当然，生物科学的迅速发展，也要求制片技术的内容更加充实和完备，以达到各种观察和研究的目的。

由于各种材料的性质及观察研究的目的不同，要制成适合于显微镜下观察的薄片，并要显示出结构的正确和清晰，因而产生了多种制作生物制片的技术和方法。为了达到观察和研究的目的，需选用不同的制片方法。如平时观察细小透明的生物体或组织材料，可无需经切片手续，只需封在一滴水中就能在显微镜下进行观察；对易于分离的组织，可在载玻片上涂上一薄层，经染色或不染色做成涂片；大而复杂的材料，可以用徒手或用切片机切成薄片；若要进一步研究其细微的结构，尚须经过若干制片步骤；为了显示组织间更加清晰的结构，还可进一步染色等等。总之，制片方法是极其繁多的，而且仍在不断地发展和充实。

由于制片技术在生物科学的领域内占有重要的地位，因此已成为生物学工作者必须掌握的一项技术。本篇以石蜡切片技术为主线来阐述制片的基本方法和原理，在掌握基本方法和原理的基础上，其他生物制片法则可融汇贯通，以便在工作中达到灵活应用的目的。

### 第二节 生物制片的分类法

生物制片法的种类，从不同的角度出发其分类是不一的，如从保存时间的长短可分为“临时制片”与“永久制片”两大类。而目前常根据其制作的方法来分，采用如下的分类方法：

#### 一、活体观察

将生物体的个体或其一部分，就其原来的状态置于载玻片上，加上一滴水和盖玻片

进行镜检，从而达到预定的检查目的。此法既简便而且又节省时间，并能观察到活体的情况，也不需要什么特殊的设备。但因此法未经过其他处理，常常因组织过厚，光线不易透过，且活体材料又多为无色透明的，结果常难取得满意的效果，同时不易作长期的保存。

## 二、切片法

切片法即是利用锋利的刀具将材料切成薄片。简便的切片法为徒手切片法，是利用刀片或剃刀将材料切成薄片后，置于载玻片上加盖片进行活体观察，或经处理、染色等步骤做成制片，此法可制成临时制片，必要时亦可做成永久制片。徒手切片法在制片技术中甚为重要，因为能及时的观察到生活组织的内部结构，也不需特殊设备。另外在制作永久制片时，有必要先作徒手切片进行观察，才能决定材料是否符合目的和要求。

完善的切片法如石蜡切片法、火棉胶切片法等，需要经过一系列的过程和各种药剂、染色剂处理，手续甚为复杂，而且要有一定的设备。这些方法由于经过了各种处理，使组织和细胞内所含各种成分发生物理和化学的作用，而显示其差异，以便于观察和研究，同时可作长时间的保存。

因此，切片法在生物制片技术中占有极其重要的地位。

## 三、非切片法

所谓非切片法，即是指不经切片手续作成制片，但其不同于活体观察法之点是：此法常需经过药剂或染色剂的处理，这样组织常被杀死后并经染色作成临时或永久制片。可包括：

（一）离析法：借化学药剂的作用，将组织之间联接部分的物质溶解，使各个细胞分离而作成制片。

（二）涂片法：将组织的一部分置于载玻片上，涂成薄层后经不同处理而作成制片。

（三）正体封固法：将细小或扁平的材料，不经切片手续，而经染色等处理后，将材料整体用封固剂封固起来作成制片。

（四）透明法：利用化学药品，使组织变得透明而作成制片，如显示维管束等。

上列的各类法，又由于处理方法的不同，其中又可分为若干种。我们应该了解各种方法都各有其优缺点，在应用时需相互配合，才能得到制片技术的最佳效果。因此，要根据观察的目的、材料的性质而决定采用何种制片方法。

## 第二章 生物制片的步骤和原理

前面已经提到生物制片的方法很多，其各法的制作过程也有繁简之不同。为了阐述方便和便于学习，本章采用一般应用最广、过程复杂完善的制片方法——石蜡制片法予以叙述。至于其它制片法，则将在本篇第三章“生物制片的各类法”中再作介绍，以便于了解和掌握。

为了求得切片能够在显微镜下观察的清晰，以显示出细致结构，反映其真实性（尽可能保持生活状态下的结构），并能作为永久保存石蜡制片法，需要经过以下的步骤：

- |           |              |
|-----------|--------------|
| （一）选材；    | （二）杀死、固定和保存； |
| （三）冲洗和脱水； | （四）透明；       |
| （五）浸蜡和包埋； | （六）切片；       |
| （七）粘片；    | （八）染色；       |
| （九）封固。    |              |

上列各个步骤是相互制约、相互影响的，每一步骤对于制片的质量都有着极大的影响，操作时应予重视。现将各个步骤分节详述于下：

### 第一节 选 材

选择材料是由制作者的目的所决定的，在制片技术中所选取的材料是在于“精而小”，不在于“大而多”（但也要照顾其完整性）。并且应尽可能采用新鲜的、健康的、正常的、有代表性的材料，此外还要注意材料的季节性和生长的不同时期等情况。最可靠的办法是先作徒手切片观察一下，决定是否适用。材料选择好后，并要求在极短的时间内加以杀死和固定。

#### 植物材料的切取

在取切植物器官时，应先确定切取那种切面，因为不同的切面对于细胞的形状、排列以至在结构上均存在着差异。现在以茎、根为例予以说明：

植物器官的切取面，一般可分为二类：

#### 一、横切面

切取时，刀的切向横越根、茎的横断面（与长轴方向垂直）的切面（图 I-2-1 A）。在横切面的切片中，可观察到材料由外向内的各种组织的横切面结构。各种组织细胞的特征及所占比例等都可以从这种切面上辨别出来。

#### 二、纵切面

切取时，刀的切向与根、茎的长轴方向平行的切面。这种切面又可分为两种：

（一）半径切面：刀穿过中心点与其半径吻合的切面（图 I-2-1 B）。这种切面可

以观察到各种组织纵向排列的情况。

(二) 切线切面：刀沿植物体的表面与其半径成直角所切的切面（图 I-2-1 C）。

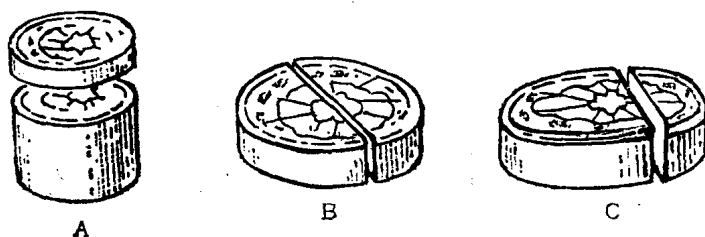


图 I-2-1 茎、根的切剖面

A. 横切面 B. 半径切面 C. 切线切面

上述各种切面，对于研究组织甚为重要，很多材料往往需要切成三个切面进行观察，才能全面地了解到它的整体结构，而取得完整的概念。

叶片在进行取材时，必须切成许多小块。由于叶片的形状、大小不同，其切割的方法也不一样。对于扁平叶片来说，往往都是做横切面观察，而很少做纵切面来进行观察。现以两种不同的叶片为例说明于下：

(一) 细长的叶片：如水稻、小麦等禾本科植物的叶以及某些双子叶植物的叶片等，其宽度约5毫米左右，可用刀片横切成长约4毫米的小段（图 I-2-2 A）。

(二) 大而宽的叶片：切取的材料面，应先选定适当的部分。在研究叶片受真菌危害的部分时，应注意菌类寄生的部位。切取材料时，应设法表明叶的长轴及两侧，以便以后切片时易辨明切面，一般是自叶的主脉处切取约5毫米长8毫米宽的小片，主脉两侧的叶片应相等。（图 I-2-2 B）

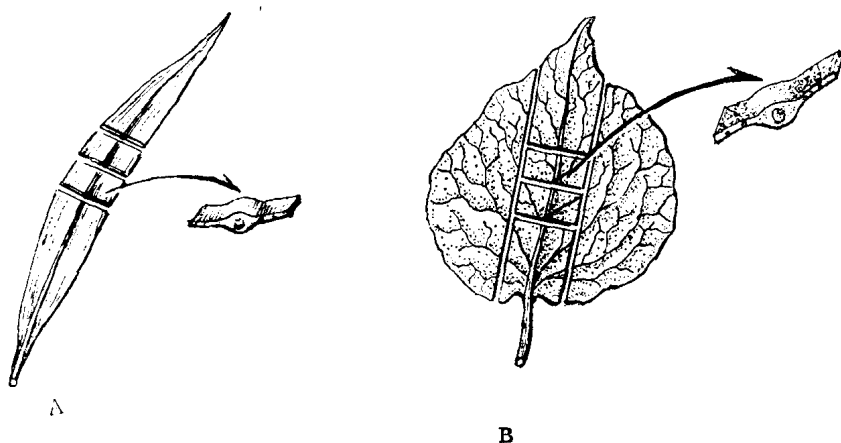


图 I-2-2 叶子的切取法

A. 细而长的叶片切割法 B. 大而宽的叶片切割法

### 动物材料的切取

切取活着的动物组织块则不像切取植物体那么容易，必须采取适当措施。

制作一般动物组织切片，要求不太严格，可以将动物先杀死、或麻醉以后，割取材

料，但要注意所用之杀死、麻醉的药剂，以不影响细胞结构为宜，割取材料时，也要越快越好，否则动物体的细胞成分、结构及分布等会发生变化。

不论是植物还是动物在切取材料之前，应先把材料用水冲洗干净（如观察菌类寄生状况的材料，则不应经水冲刷），切割时再用毛笔蘸水，然后将材料切成小块（体积不超过1/4立方时，但是以不缺少主要部分为原则。若是作滑动切片的材料，长度不要超过2厘米为宜）。假如材料过大，则会影响固定的效果。

此外在切割材料时，必须注意用力要均匀，避免组织破裂，影响制片效果。

## 第二节 杀死、固定和保存

当我们选择某种材料制作切片时，应立刻把材料加以处理，否则组织结构很快会发生萎缩、死亡或分解等变化。如何处理才能把材料按原来生活的状态保持下来，这是制片首先遇到的问题。因此，材料在选定后，即需将动植物的组织迅速地予以杀死和固定下来，使它保持生活时之自然状态，而不至于在死亡之前，在形态及结构上发生变化。下面分别讨论有关这一过程的原理、性质和作用等问题。

### 一、杀死、固定和保存的概念

杀死：指用一种或多种化学药品，很迅速地终结生物组织的生命而言。这一处理要求越快越好，尽量减少改变其生活状态的可能性。所以要选择渗透力很强的化学药品来做为杀死剂，力求在很短的时间内迅速浸入到组织中的每一个细胞内，以避免在生命死亡之前发生变化，这是选择杀死剂的一个重要原则。

固定：在杀死的基础上，把组织或细胞按生活的状态固定下来，使在以后制片的任何过程中不发生变化。

杀死和固定两者之间的关系是极为密切的，是两个不同的步骤，但又是相互统一、相互作用的过程。我们常用的杀死剂，一般都兼作固定剂，在选配时就应加以考虑。

保存：材料经杀死、固定处理后，需要把组织或细胞的结构在较长的时间内保存下来，不至于发生溶解或其他的变化。我们常用的固定剂有的能兼作保存作用，例如甲醛—醋酸—酒精固定液，材料可长期保存于该溶液中几年或更长时间，也不会变坏。有的固定剂则不能兼作保存的作用，例如铬酸类的固定剂，在固定作用完成后必须更换保存液，否则会使材料变坏。通常所用的保存液为70%的酒精溶液，一般的材料在其中可保存较长的时间而不至变坏。

### 二、固定的理论

为了使生物体组织或细胞的细微结构及其内含物完整的固定起来，在制片的各个步骤中也不至发生变化，通常都是利用化学药品加以处理。到目前为止，还没有一种化学药品能达到十分完美的效果，使材料在固定后能完全保持它的原来生活状态。这点也不难理解，因为生命在死亡之前是要强烈的“挣扎”，并对外来的刺激有反应。因此，材料经过处理后，就或多或少会发生一些改变的。用化学药品来处理，实际上对于生命来说是一种毒杀作用，要求一成不变是不可能的。但是人们可以寻找或发现符合理想的化

学药品，来达到理想的目的。那末，什么算是理想的固定药剂呢？对此我们应先了解下述几个问题。

### （一）固定作用的原理

1. 化学作用：即凝结作用。例如细胞内的蛋白质，遇到酒精后即凝结成块状，并不在以后所用的任何药剂中发生变化或溶解。

2. 物理变化：即沉淀作用，如油类和脂肪等遇到铬酸即发生黑色沉淀。但必须指出某种沉淀发生后又能溶解于水，这样就不能看作是固定。

### （二）固定的目的和理想的固定剂

我们要求达到固定的目的，可以归纳为下列四点：

1. 迅速地杀死原生质，并显示出其原来的细微结构；  
2. 增加细胞结构及内含物的折光程度，使各部结构更为清晰，适于在显微镜下观察；

3. 凝固组织中某部分，使材料适当的硬化，而便于切片；

4. 促进生物组织对于某些染色剂的媒染作用。因为固定剂可直接影响以后的染色，有的固定剂会阻碍或不利于某种染色剂的着色，而另一些固定剂则可以促进或有利于着色。在选用固定剂和染色剂时，若配合得好可得到良好的效果，配合得不好，则难以着色。因此，在选用固定剂时，就应事先加以考虑以后将采用何种染色剂染色，否则会造成着色的困难或效果不佳。

根据上述的要求，一种较理想的良好固定剂，应具备下列条件：

1. 渗透力强<sup>\*</sup>：能迅速地渗透到生物组织或细胞的各个部分，立即杀死原生质，并固定其细微的结构，使其不发生变化；

2. 使组织或细胞不发生收缩或膨胀现象；

3. 能增加染色能力或媒染作用；

4. 固定剂又必须是良好的保存剂（当然有些组织的良好固定剂，不一定能作保存剂），材料经固定后能经久不坏；

5. 使组织适当的变硬，并具有一定的坚韧性，而便于切片。但是，又不能使材料过于坚硬或变成松脆，而不利于切片。

要达到上述各项所要求的条件，如用单纯的化学药品来处理，显然是难以达到。因有的药品渗透力很强，但容易引起收缩，如酒精是最常用的固定剂，它的渗透力很强（95%酒精每小时渗透速度可达一毫米），但它的缺点能使原生质发生收缩。而醋酸则可产生相反的作用，使原生质发生膨胀。若两种药剂按适当的比例混合使用，则可相互抵消缺陷。所以，我们通常采用的固定剂，都是由两种或两种以上的化学药品配合而成，谓之混合固定剂，目的在于相互制约，克服单纯固定剂所不能达到的效果。

目前所用的混合固定剂的种类是很多的，但是，尚没有一种可以完全适合各种生物组织的固定，就是同一器官或组织，其幼年和老年的结构、特性也不相同。因此，在选

---

\* 固定剂渗透力的强弱，常因其本身的性质、浓度以及温度等而影响其渗透力。表现在：  
化学性质的影响：不同的化学物质，有着不同的渗透速度和强度。例如醋酸的渗透力很快，而铬酸则较慢；  
物理特性的影响：决定于材料的大小、组织的紧密度、溶液的温度及浓度等因素。

择固定液时，必须根据动、植物的种类、不同的器官、年龄、特性以及制片者的经验和观察的目的等而决定。

### 三、固定象fixation image

(一) 酸性固定象：即是在酸性固定剂中可使细胞分裂期间的染色质、核仁、纺锤丝保存下来，细胞质固定成索状海绵质，核质和线粒体则被溶解。

(二) 碱性固定象：在碱性固定剂中和酸性作用相反。使分裂期间的染色质和纺锤丝被溶解，而核质和线粒体被保存，细胞质固定成透明质状态，植物细胞内液泡也可保存下来。

我们通常使用的固定剂，大多数是产生酸性固定象，只有少数的固定剂才产生碱性固定象。固定后所产生的结果，是和固定剂以及材料的种类有关，例如有时用酸性固定剂，对某些材料进行固定，也发现线粒体的存在。此外还与应用的脱水剂、透明剂亦有连带关系，如用波茵氏 (Bouin's) 液固定、纯酒精脱水、二甲苯透明的结果，则和用叔丁醇为脱水剂的结果显然不同。

有的固定剂可以产生两种固定象。例如重铬酸钾在pH4.8时，同时可以保存染色质和线粒体。固定剂中若含有两种以上的化学药品时，其固定结果所产生的象，主要决定于此种混合液中的渗透力最强的一种。

在制片技术中，酸性固定剂较碱性固定剂应用的为多，而碱性固定剂仅适用于研究细胞的内含物、线粒体等。

### 四、固定剂

(一) 单纯固定剂的种类、性质及其应用：

#### 1. 酒精 (ethyl alcohol) $C_2H_5OH$

酒精是常用的固定剂，依其水分的含量可分为两种：

(1) 纯酒精·(无水乙醇)：纯酒精的标准浓度为100%，是一种良好的杀死及固定剂。假如材料需要立即杀死与固定，纯酒精相当适用。但它的缺点能使原生质发生收缩，故很少单独使用。若应用时，固定的时间要短，一般不超过一小时。例如小型的菌类仅需1分钟，植物的根尖、茎尖、花药、子房等固定15~20分钟已足够。用纯酒精不但可以杀死和固定，而且还有脱水的作用。固定后只需要更换两次，将组织中的水分彻底除去，即可进行透明。

(2) 95%酒精：它的标准浓度为95~96%，是普通的杀死与固定剂，并可兼作保存剂。材料经固定后，不需进行冲洗或换液等手续就可进行脱水，所以平时应用很多。它的缺点也是能使原生质发生收缩，而对于植物的细胞壁仍能保持原来的形状，一般制作无需保存细胞内含物的切片是很适用的。用95%酒精固定的时间，一般15~30分钟为宜，较大的材料1~2小时即可。若固定时间过长，材料则变脆而易折断，难以切片。要长时间的保存，则必须加入等量的甘油而成酒精甘油混合液，材料保存其中可长久不坏。材料经95%酒精杀死固定后，一般常换入70%酒精作保存液。

• 确定纯酒精内是否含有水分，最简便的方法是取少许纯酒精，滴入盛有二甲苯的试管中，如发生混浊现象，则表明有水分存在。

酒精常与其他药品配合使用,但要注意它本身是一种还原剂,很容易被氧化成乙醛,甚至成为乙酸。因此,不宜与铬酸、重铬酸钾或钨酸等配合;而能与甲醛、冰醋酸或丙酸等配合使用,且固定效果良好。

酒精可使组织中的蛋白质发生沉淀,而且此种沉淀为不溶性的,它也可使核酸发生沉淀,但沉淀为可溶性的。此外,酒精又可以溶解脂肪、磷脂,所以不宜用于此二者的固定。

2. 甲醛 (formalin)  $\text{HCOH}$ : 甲醛通常叫福尔马林或蚁醛,它是一种气体,市上出售的是溶于水中的无色溶液,40%为其最高的饱和度(但由于吸水作用,常为38%的浓度)。制作切片时,通常都是以40%的浓度当作100%的浓度来配制固定液,但必须是化学纯的甲醛,一般商用的甲醛因含有杂质,品质不纯,因此不宜用来配制固定液。

甲醛可单独作为杀死和固定之用,有时可得到很好的效果。它的缺点是容易使材料发生收缩和固定过度的现象。因此,最好是与其它药品配合使用,可以大大增加其效果。如单独使用甲醛作固定时,其浓度一般为5—10%左右为宜。

甲醛为很好的硬化剂,惟其渗透力慢,如单独使用时可产生碱性固定象,而不能沉淀蛋白质。它和酒精混合使用,可以阻止因酒精造成材料过渡坚硬的缺点。甲醛对于脂肪既不保存也不破坏,对于磷脂则有保存的功用。

甲醛是一种强的还原剂,易于氧化成蚁酸,故不能与铬酸或钨酸等混合使用。此外甲醛贮存过久则会变成蚁醛酸,可加入5%吡啶来中和。

3. 冰醋酸 (glacial acetic acid)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : 纯的醋酸在低温的时候,即凝结成冰花状结晶,所以又叫冰醋酸。它是带有强烈刺激性的无色液体,通常用1~5%的浓度作为固定剂,而不单独使用。

醋酸主要的功用是渗透力很强,而且十分迅速,它能溶解脂肪,产生酸性的固定象。醋酸是一种良好的保存剂,除防腐之外,还可保存其中的蛋白质等,使它不至变质,另外它又是染色体很好的保存剂。

醋酸能使组织的细胞发生膨胀作用,可防止其他药剂如酒精、甲醛、铬酸等容易引起收缩的缺点,可以有相互平衡的作用。它还可与水或酒精任意混合成各种需要的固定液。

4. 铬酸 (chromic acid)  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ : 铬酸为三氧化铬 ( $\text{CrO}_3$ ) 的水化物,是一种红棕色的结晶体,十分容易潮解,故平时盛放的容器必须严密封紧。由于铬酸为一强烈的氧化剂,因此不能与酒精或甲醛等还原剂预先配合,混合配好后必须立即使用,否则失效。例如酪酸遇到酒精,很快地还原为氧化铬而失去固定的作用。

酪酸是一种很好的固定剂,可以使蛋白质、核蛋白、核酸等产生良好的沉淀,而且所产生的沉淀不再溶解,它对于脂肪及拟脂类等没有作用。组织固定在铬酸中时,不能直接暴露在阳光下,否则会引起已固定的蛋白质分解。

铬酸在制片技术上广于使用,尤其在研究细胞学方面是必不可少的药剂,是许多杀死剂与固定剂的基本成分。它的缺点是容易使组织收缩,渗透力较弱,且能使组织发生过度硬化,所以它常与作用相反的其他药剂混合使用,克服上述的一些缺点,而得到良好的效果。

铬酸的饱和度可达62%或更高,通常配成2~10%的水溶液作为基液,应用时可随时稀释至所需的浓度,一般用0.5~1%的水溶液作为固定之用。用铬酸液固定时,用量要