

电子显微镜 组织化学技术

刘 斌 编

人民卫生出版社

Q9.4515/191

电子显微镜组织化学技术

刘 斌 编

人 民 卫 生 出 版 社

电子显微镜组织化学技术

刘 斌 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
(北京市崇文区天坛西里 10 号)

北 京 顺 义 寺 上 印 刷 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米 32 开本 2 $\frac{1}{2}$ 印张 51千字

1983 年 10 月 第 1 版 1983 年 10 月 第 1 版 第 1 次印刷

印数：00,001—5,800

统一书号：14048·4469 定价：0.41 元

〔科技新书目 53—72〕

编 者 的 话

从五十年代末到六十年代初，国际上开始把电子显微镜技术与组织化学技术（包括细胞化学技术）结合起来，成为电子显微镜组织化学技术。这项技术把细胞、组织的形态学研究又推进了一步。目前，电镜组织化学仍在发展中，有些方法还需不断改进与提高。

本书介绍的电镜组织化学四个方面的技术，共十几个配方，是作者在比利时布鲁塞尔医学院工作期间搜集的资料，并参阅当前有关文献加以整理。每个方法都有技术操作步骤、应用范围和注意事项。

在编写过程中，曾蒙李肇特教授的指导和审阅，在此深表谢意。

由于作者的经验有限，体会还很肤浅，定会存在不少缺点错误，敬请读者批评指正。

北京医学院组织胚胎教研室

刘 斌 1982年12月

37611

目 录

一、电子显微镜技术	1
(一) 一般组织或活体检查标本的电镜技术	1
(二) 卵细胞、胚胎标本的电镜技术	4
(三) 包埋剂Epon 812 的配制	7
(四) 染色技术	10
二、糖原	13
三、5-核苷酸酶	20
(一) 普通超薄切片法	20
(二) 冰冻超薄切片法	22
四、碱性磷酸酶	27
(一) 戊二醛固定法	27
(二) 甲醛固定法	29
五、酸性磷酸酶	34
(一) Gomori-Mulnard 法	36
(二) Hourdry 法	37
(三) Tris-Maleate 法	39
(四) S-三甲吡啶法	41
(五) 胞苷-磷酸法	43
(六) 室温操作法	44
(七) 二甲基亚砷法	46
六、溶液的配制与应用	60
(一) 几种缓冲液的配制	60
(二) 预固定液的配制与应用	65
(三) 四氧化钨后固定液的应用	71
(四) 时间表	72

一、电子显微镜技术

(一) 一般组织或活体检查标本的电镜技术

1. 操作步骤：包括取材、固定、脱水、包埋、聚合、切片、染色、电镜观察等步骤，通常可用青霉素药瓶作为器皿进行操作。

(1) 取材：组织块或活体标本一般长约5~6毫米，宽约0.5毫米，先放在Locke氏溶液中或直接放入预固定液里。在Locke氏溶液中的时间不宜过长，一般不超过1~2天，就要进入预固定液。

(2) 预固定：在4℃条件下，用戊二醛固定液，固定4~6小时。固定液的用量是组织块体积的40倍左右。

(3) 洗涤：在4℃条件下，用0.1M Mollonig缓冲液冲洗2小时至2~3天。在此期间内需数次更换冲洗剂，以便尽量洗去预固定液。

(4) 切组织块：为使组织标本更好的固定、包埋、需将组织块切成长2~3mm的小块。

(5) 后固定：在4℃冰箱中，用2%锇酸固定液固定30~60分钟。

(6) 脱水：组织块顺次经过以下各溶液：在室温下进行(18~20℃)。

25%酒精：2×5分钟

50%酒精：2×5分钟

70%酒精：2×10分钟

纯酒精：3×20 分钟。注意：经过纯酒精时需盖严瓶口。

氧化丙烯 (propylene oxyde)：2×7 分钟。这时需将瓶口完全敞开，使液体挥发。

(7) 包埋、聚合：分三步进行，前二步浸透包埋，后一步聚合 (图 1)。

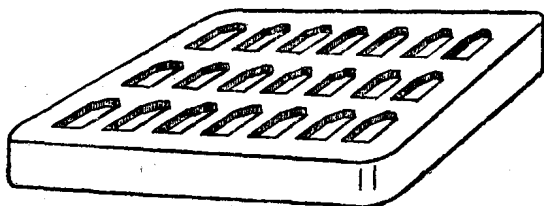


图 1 长 7 厘米、宽 6 厘米、厚 0.5 厘米的一块橡胶，上方有三排小槽，组织块可在槽内包埋、聚合。

聚合后，从小槽里取出

第一步：将组织块入氧化丙烯与 Epon 812 包埋剂 1:1 的混合溶液中，1 小时左右。这时仍敞开瓶口。

第二步：再进入纯的 Epon 812 包埋剂中，至少 2 小时或更长时间。

第三步：将组织块入 2 号胶囊中或其他包埋器皿 (如橡胶槽等) 内。组织块从纯 Epon 812 里取出后，宜先用吸水纸吸净组织块上的水份，再置入胶囊中，然后将包埋剂充满胶囊或橡胶槽。把包埋好的组织标本置入 60℃ 的温箱内，一般经过 48 小时，Epon 812 聚合块应呈透明的褐黄色。

(8) 切片：用超薄切片机切成厚 300 Å 的切片。直接贴在铜网上，无需用聚乙烯醇缩甲醛 (即 PVF) 做膜。切片不宜过厚，否则用透射电镜无法观察。

(9) 染色：通常用醋酸铀-枸橼酸铅染色法，其操作过程

是：先将染色液用吸管滴在蜡盘的表面上或滴在特制的染色平皿的小槽中，然后将铜网的切片面向下盖在染液珠上，待染色充分后，（醋酸铀染色 10~15 分钟），再用小镊子取出铜网，用双蒸水冲洗铜网 2~3 次，再用吸水纸吸去水份，按同法操作再经过枸橼酸铅染液复染 5~10 分钟。将染色后的铜网晾干即可用电镜观察。

根据不同要求，有的标本只用一种染液，无需复染即可用电镜观察。

(10) 电子显微镜观察与拍照：从略。

2. 配制固定液与缓冲液

(1) 预固定液：50%戊二醛	10ml
0.1M Mollonig 缓冲液	62.5ml
蒸馏水	52.5ml

如此配成 4%戊二醛，即 50%戊二醛稀释 12.5 倍。

将配成的预固定液贮存在 4℃ 冰箱中。

(2) 后固定液的配制： OsO_4 是剧毒药品，配制后固定液时要在通风橱中进行，操作者要带橡皮手套，以防药品溅在皮肤上。具体操作分二步：

第一步：配制 4%的 OsO_4 溶液。

取 1 安瓿药液（含 OsO_4 0.5g），用肥皂水冲洗表面的灰尘和商标，经过洗液、自来水和蒸馏水洗净。用小锯刀将安瓿锯破，再放入洁净的棕色瓶内，加 12.5ml 蒸馏水，盖严瓶盖，再加入一、二粒 MgCl_2 结晶，即得到 4% 的 OsO_4 溶液。因钒酸易于挥发，因此在冰箱贮存时，要把棕色瓶再装入一个铁桶内，盖严，以减少挥发。

第二步：配制后固定液

后固定液以 0.2M Mollonig 缓冲液稀释 4% 的 OsO_4 配

制而成，Mollonig 缓冲液含有 1.08% 的葡萄糖。

1) 配制 0.2M 的 Mollonig 缓冲液：由 A、B 两种溶液组成。

A 溶液：取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25.4g 溶于 500ml 蒸馏水中。

B 溶液：取氢氧化钠 (NaOH) 5.04g 溶于 100ml 蒸馏水中。

混合 A、B 溶液：

A 溶液	207.5ml
B 溶液	42.5ml

即得到 0.2M Mollonig 缓冲液。

调缓冲液的 pH 值：用 A 或 B 溶液调 pH 值至 7.4。配制好的缓冲液要贮存在 4℃ 冰箱中。

2) 配制含葡萄糖的 0.1M Mollonig 缓冲液

0.2M Mollonig 缓冲液	50ml
蒸馏水	50ml
葡萄糖	1.08g

充分混匀，使葡萄糖完全溶解，再将配制好的缓冲液贮存在 4℃ 冰箱中。

3) 临用时以 4% OsO_4 与等量含葡萄糖的 0.2M Mollonig 缓冲液混合而成：

2% OsO_4
0.1M Mollonig 缓冲液
1.08% 葡萄糖

(二) 卵细胞、胚胎标本的电镜技术

从卵细胞到胚泡形成的早期胚胎标本，用肉眼看不见。

所以,全部电镜制片技术过程,需用特制的玻璃池(图2),在双筒解剖镜下进行。

1. 操作步骤

(1) 取材: 操作过程需注意切勿丢失标本及损伤胚胎结构。在解剖镜下用微吸管将胚胎吸至 Locke 液内。

(2) 预固定: 用戊二醛固定液,在4℃冰箱中固定1~2小时。

(3) 洗涤: 在0.1M 二甲砷酸盐缓冲液中冲洗2小时左右,过夜,甚至长达数天。在此期间要更换几次洗液。洗涤及存放均在4℃条件下进行。

(4) 后固定: 用下述2%钨酸溶液在4℃冰箱中固定30~60分钟。

2%OsO₄

0.1M 二甲砷酸盐缓冲液

0.05%MgCl₂

(5) 漂洗: 用0.1M的二甲砷酸盐缓冲液,漂洗数分钟即可,在室温下进行。

(6) 脱水: 早期胚胎标本体积甚小,不同于一般组织标本,不宜用氧化丙烯(propylene oxide)脱水,因其挥发太快,标本在玻璃池中飘浮不定使操作困难。通常多用新鲜的无水酒精。

先过70%酒精5分钟,4℃冰箱中。

再过90%酒精7分钟,4℃冰箱中。

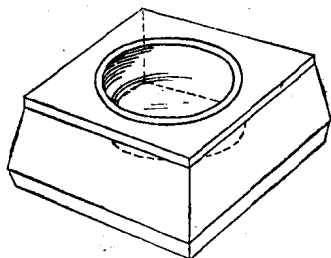


图2 制做胚胎电镜标本使用的玻璃平皿,底部有一个玻璃样小凹

最后进入 100% 酒精, 3×10 分钟, 室温中进行。

(7) 包埋和聚合: 用一个特制的塑料器皿或有机玻璃器皿 (图 3) 包埋。

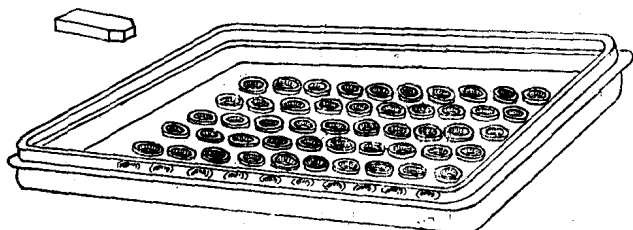


图 3 有机玻璃盒, 长约 8 厘米、宽 5 厘米, 底部有 6 排小窝, 用于包埋、聚合胚胎标本。左上为树脂托

1) 先将标本入 Epon 812 包埋剂和纯酒各半组成的混合液中, 过夜。

2) 进入 2 份 Epon 812 和 1 份纯酒混合液中, 3~4 小时。

3) 最后进入纯 Epon 812 中过夜。

4) 次日将胚胎标本置入有机玻璃器皿的窝底部, 注满包埋剂。这时应注意, ①切勿有气泡; ②使标本沉在窝底, 不应浮起。按需要观察的部位调整胚胎标本的方位。将包埋好的有机玻璃器皿移入 37°C 温箱中 24 小时左右或更长些时间。

5) 再移入 60°C 的温箱中, 一般要 48 小时, 包埋剂完全聚合。

6) 最后把标本贴在树脂托上, 树脂托是用 Epon 812 包埋剂在橡胶槽聚合而成的。用包埋剂或特制的胶水把树脂托贴在标本上, 再移入 60°C 温箱中过夜, 待完全贴牢为止, 再把它们置入冰箱里冷却 2~3 小时, 从冰箱取出后立即用力掰

下树脂托，其顶端即有标本。

(8) 切片：可根据需要选择切片的方位，厚度一般为 300 Å。

(9) 染色：同普通标本的染色技术。

(10) 电镜观察与拍照：按常规进行。

2. 配制预固定液和缓冲液

(1) 2% 戊二醛预固定液

50% 戊二醛 2ml

0.2M 二甲砷酸盐缓冲液 48ml

MgCl₂ 25mg

即配成 2% 戊二醛预固定液。配制好的预固定液可以贮存在 4℃ 冰箱。

(2) 0.2M 的二甲砷酸盐缓冲液 pH7.4

取二甲砷酸钠 (sodium cacodylate) 8.56g，加入 200ml 蒸馏水，待完全溶解后即得 0.2M 二甲砷酸盐缓冲液，并调至 pH7.4。

(三) 包埋剂 Epon 812 的配制

1. 配制 Epon 812 的配方：目前常用的有三种：

Epon 的成份包括：Epon 812 resin (或者用 Epikot)，十二烷基琥珀酸酐 (dodecenyl succinic anhydride, 简称 DDSA)；甲基内次甲基四氢苯二甲酸酐 (methyl nadic anhydride, 简称 MNA) 及苄基二甲基胺 (benzyl dimethylamine, 简称 BDMA)

第一种配方：较复杂，先制备 A 与 B 溶液，再按比例混合，最后加入催化剂 BDMA。

A 溶液：Epon 812 (Epikote) 38g

DDSA	50g
用电动搅拌器或玻璃棒不停地搅拌 20~30 分钟。	
B 溶液: Epon 812	61.5g
MNA	55.0g

充分搅拌 20~30 分钟。

混合: A + B + 2%BDMA

A 溶液	49ml
B 溶液	49ml
BDMA	2ml

搅拌均匀, 搅拌速度不宜过快, 以免出现气泡。

第二种配方: 比较简便, 一次配成。

Epon 812	206g
MNA	128g
DDSA	70g
BDMA	7.1ml

将以上四种成份, 按顺次加入烧杯中, 同时充分缓缓搅拌。

把配制好的包埋剂立即分装在小的塑料注射器 (或其它器皿) 内, 为了防止 Epon812 外溢, 可在注射器的入口处涂以石蜡, Epon 812 在冰箱制冷器中可以贮存一个月左右。

第三种配方: 当需要硬度大的 Epon812 时 (如做牙组织的超薄切片), 可用此法, 它是由三种成份构成的。即 Epon 812; 甲基内次甲基四氢苯二甲酸酐 (MNA) 及 2,4,6-三 (二甲氨基甲基) 苯酚 (2, 4, 6-tri (dimethyl amino-methyl)-phenol 简称 DMP-30)。DMP-30 为催化剂。

先混合: Epon 812	100ml
MNA	89ml

将其混合溶液贮存在冰箱中，需要时，

取 混合溶液	10ml
DMP-30	0.15ml

充分混匀，搅拌 5~10 分钟后，即可使用。

2. 包埋剂的硬度

包埋剂的调配适当与否，直接关系到标本细微结构的保存及切片的制作。包埋剂的硬度适当，才能作超薄切片，否则无法切片。如硬度不够切片较厚，则结构模糊。可以改变配方的比例，或延长聚合时间，使包埋剂呈适当硬度。

(1) 改变配方的比例

可适当增加 MNA 的用量，如从 128g 增加到 138g 左右，或适当减少 DDSA 的用量，如从 70g 减少到 60g 左右。这两种方法可同时使用或分别进行，都能提高包埋剂的硬度。

(2) 包埋过程

同一种 Epon 812，因包埋过程不同其硬度各异。为了提高硬度，可以延长包埋时间或提高聚合的温度。标本浸在 Epon 812 与纯酒精 1:1 的混合液中 10 小时或更长时间。标本浸在纯 Epon 812 的时间长短尤为重要，一般不应少于 12 小时。

把在 60℃ 温箱聚合的时间从 48 小时增加到 72 小时，然后，如发现硬度仍不理想，可将标本再放在 80℃ 左右的温箱中 12 小时左右。

(3) 空气湿度

季节对包埋剂的硬度也有影响，如夏季或阴雨季节包埋剂的硬度较低。实验室内湿度较大（如 40~50%），对包埋剂的硬度也有影响，所以实验室的干湿度要适宜（20~30%）。另外，放置聚合标本的温箱内不应再放有其他液体

或易挥发的物品，以免影响温箱里的湿度。

无论那种配方，在配制过程中均应避免潮气，所用器材需在用前烤干。

(4) 包埋剂的贮存

理想的做法是临用前随时配制包埋剂。也可以一次多配些，贮存备用，贮存的时间以 10 天左右为宜。如果贮存的时间过久，包埋剂由凝胶变为溶胶的过程延长，甚至很困难，包埋标本的效果也不理想。另外，从冰箱取出的包埋剂用后还可放回冰箱，以备下次再用，但不能用第三次。一般新配制的包埋剂呈淡黄色，如果变成棕色，即说明在冰箱中贮存过久，不宜再用。

(四) 染色技术

电子显微镜切片目前多用醋酸铀 (uranyl acetate) 染色，再用枸橼酸铅 (lead citrate) 复染。亦可根据实验的要求，只用一种染色剂。

1. 醋酸铀染色 (uranyl acetate)

(1) 醋酸铀染液的配制

取 500mg 醋酸铀放在烧瓶中。

加入 12.5ml 的 50% 酒精。

用玻璃纸封严瓶口，摇动烧瓶使醋酸铀完全溶解于酒精中，或把烧瓶放在超声波摇动器上 5~10 分钟，即可完全溶解。即制成 4% 的酒精醋酸铀溶液。

用微滤器过滤。

将过滤后的醋酸铀染液置冰箱内避光贮存，存放时间最多不超过 15 天。

(2) 染色步骤

向平皿（图4）的小窝内加2~3滴染液。

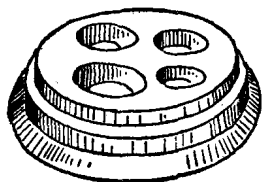


图4 用有机玻璃制成的电子显微镜标本染色器皿

用双蒸馏水冲洗铜网。再将有切片侧的铜网放在染液中，使切片直接接触染液。盖严平皿，完全避光，一般染10~15分钟。

从染色平皿中取出铜网，用双蒸馏水冲洗，去掉多余的染液。

再用除尘干燥器（如EFFA牌的Duster）冲。

将铜网放在洁净的吸水纸上吸去水份，晾干后即可在电镜下观察，或复染。

2. 枸橼酸铅染色（Reynolds 染色）

(1) 枸橼酸铅染液的配制

将30ml蒸馏水倒入干净的烧瓶中，用玻璃纸封口，避免空气进入。

加硝酸铅1.33g使之溶解。

加含有 $2\text{H}_2\text{O}$ 的枸橼酸钠1.76g，用力摇动烧瓶1分钟，30分钟后再次摇动。依此法摇动数次。

慢慢加入8ml 1N的NaOH，轻轻地摇动烧瓶，溶液由乳状逐渐变成清亮的溶液。

再加蒸馏水至50ml，倒置烧瓶，使其充分混匀。

调pH12±。

将配制的染液分装在注射器中，需赶出气泡，以免出现沉淀，注射器头上用玻璃纸封闭。

将配好的染液贮存在 4℃ 冰箱中，6 个月之内均可使用。

枸橼酸铅染液对于细胞膜、溶酶体、核蛋白体、糖原和髓磷脂的染色效果好。

(2) 染色步骤

染色步骤同醋酸铀染色。

通常染色 2~5 分钟。

染色时注意避光，不要与空气接触。