

**无脊椎动物
玻片标本制作法**

堵南山 編著

50171015
E19
529

无脊椎动物玻片标本制作法

堵南山 編著

zk02/06



上海科学技术出版社

1492736

內 容 提 要

本书讲述了各种无脊椎动物玻片标本的制作方法，特別詳細地介紹了固定与染色的方法和原理。

本书前一部分按切片、整体、涂布等不同标本，分別介紹每一类标本的制作方法，后一部分按不同的动物，分門別类地介紹某种动物标本的各种制法，內容具体实用，可供大专学校生物学系师生以及科学研究人員参考。

无脊椎动物玻片标本制法

堵 南 山 編著

*

上海科学技术出版社出版

(上海南京西路2004号)

上海市书刊出版业营业許可証出093号

新华书店上海发行所发行 各地新华书店經售

中华书局上海印刷厂印刷

开本850×1168 1/32 印張7 12/32 字數181,000

1960年4月第1版 1960年4月第1次印刷

印數1-3,000

統 一 书 号 15419·344

定 价 : (十二) 1.05 元

前 言

在生物科学及其有关学科的教学和科学研究过程中，不可能不应用玻片标本，因此掌握其制作技术，对教学和研究工作者来说，那是十分必要的。目前出版的一些制片书籍，无论是外文的也好，中文的也好，内容绝大部分只涉及脊椎动物，不少同志要想制作无脊椎动物的玻片标本常常感到缺少适当的参考书籍。作者有鉴于此，几年来结合教学工作，搜集了不少资料，现在加以整理，写成本书，希望它对教学和科学研究能起一定的作用。

玻片标本的好坏，主要取决于固定与染色，因此本书特别详细地介绍了固定与染色的各种方法，同时还说明其原理。至于一般制作过程，只作扼要叙述，读者可参阅其他有关书籍。

本书不妥与错误之处，欢迎读者批评。

堵 南 山

上海华东师范大学生物学系

1959年6月

目 录

第一章 緒論	1
一、标本的种类	1
二、制片的一般过程	2
三、制片守則	2
第二章 固定剂及其应用	4
一、固定方法	4
二、配制固定剂的原药	6
三、各种固定剂	11
第三章 染色剂及其应用	36
一、染色的基础知識	36
二、各种染料及其染色剂	38
三、染色的方法	81
第四章 金属显印	99
一、金属显印的基本原理	99
二、各种显印法	99
第五章 整体(整装)标本的制作	117
一、透明整体标本	117
二、不透明整装标本	119
三、干制整装标本	120
四、甘油胶整体标本	120
第六章 涂布标本的制作	122
一、一般制作法	122
二、制法举例	123
第七章 磨片标本的制作	125
第八章 組織分离标本的制作	126
一、各种分离剂	126

二、制作方法	127
第九章 石蜡切片标本的制作	129
第十章 胶棉切片标本的制作	137
第十一章 胶棉石蜡联合切片标本的制作	141
第十二章 冻结切片标本的制作	143
第十三章 原生动物的制片	146
一、固定与染色	146
二、整体标本的制作	146
三、切片标本的制作	149
第十四章 海绵动物的制片	151
一、整体标本和骨骼标本的制作	151
二、切片标本的制作	152
第十五章 腔肠动物的制片	154
一、水螅虫网玻片标本的制作	154
二、钵水母网玻片标本的制作	158
三、珊瑚虫网玻片标本的制作	159
四、栉水母网切片标本的制作	160
第十六章 扁形动物的制片	161
一、涡虫网玻片标本的制作	161
二、吸虫网玻片标本的制作	163
三、绦虫网玻片标本的制作	164
第十七章 圆形动物的制片	167
一、整体标本的制作	167
二、切片标本与组织分离标本的制作	167
第十八章 纽形动物的制片	170
第十九章 环节动物的制片	171
一、原环虫网和多毛网玻片标本的制作	171
二、寡毛网玻片标本的制作	171
三、蛭网玻片标本的制作	175
四、螭网和星虫网玻片标本的制作	177

第二十章 輪虫、腹毛类与动吻类的制片	179
一、輪虫玻片标本的制作	179
二、腹毛类与动吻类玻片标本的制作	180
第二十一章 苔蘚动物与腕足动物的制片	181
一、苔蘚动物玻片标本的制作	181
二、腕足动物切片标本的制作	181
第二十二章 毛顎动物的制片	182
第二十三章 节肢动物的制片	183
一、一般整体标本的制作	183
二、一般切片标本的制作	184
三、各种組織与器官的制片	185
第二十四章 軟體动物的制片	201
一、一般切片标本的制作	201
二、各种組織与器官的制片	202
第二十五章 棘皮动物的制片	210
一、切片标本的制作	210
二、其他各种玻片标本的制作	211
第二十六章 原索动物的制片	213
一、腸鳃动物玻片标本的制作	213
二、尾索动物玻片标本的制作	213
三、头索动物玻片标本的制作	214
主要参考书目	215
中西人名对照表	216
索引	220

第一章 緒 論

一、 标本的种类

在教学和科学研究过程中，我們时常利用活的动物作为材料，但是活材料的应用由于养殖的困难而有其一定的局限性。同时在某些場合下，活材料并不适用。因此，标本在教学和科学研究上也就成为十分必需的了。

动物标本根据其制作方法与使用目的分为下列四大类：

(一)液浸标本 身体比較柔軟的大型动物可用酒精或福尔馬林制成液浸标本。其中特別柔軟的还必須預先麻醉，否則身体收縮，和原状大不相同，也就会失去价值。

(二)干制标本 脊椎动物的骨骼标本是我們常見的一种干制标本。至于无脊椎动物，例如昆虫、甲壳动物、軟体动物、棘皮动物、珊瑚与海綿等，也可設法制成本类标本。

(三)剥制标本 剥制标本的制作仅限于脊椎动物。通常剥取其外皮，內面涂以防腐剂，再用木屑、棉花与銅絲等支持物代替骨肉，以制成标本。

(四)玻片标本(显微鏡标本) 小型动物或动物体的某一部分，可以封藏于载玻片与盖玻片之間，制成玻片标本。这不仅宜于保存，并且又便于在显微鏡下观察。玻片标本可分为下列两类：

1. 临时标本 这类标本虽然不能长久保藏，但对于无脊椎动物的研究却是十分重要的。制作方法非常簡便，只要将材料放在载玻片与盖玻片之間，并加些水或及其他溶液，就可用来观察了。

2. 永久标本 这类标本可以长久保藏，制作方法相当复杂，分为六种：

(1) 整体标本(整装标本) 小型动物或动物体的某一部分，若能在显微镜下观察其详细结构，那么就不必切片，可以直接制成整体标本。

(2) 涂布标本 液状或半液状的材料，也不必切片，可直接涂于载玻片或盖玻片之上，制成涂布标本。

(3) 磨片标本 动物的骨骼以及其他坚硬的部分，不宜切片，可磨为薄片，制成磨片标本。

(4) 组织分离标本 要研究个别细胞的形态，可设法分散组织，使细胞游离，制成组织分离标本。

(5) 徒手切片标本 用剃刀将材料切成小片，制成标本。但动物材料，特别是无脊椎动物，一般不宜制作这种标本。

(6) 切片机切片标本 材料应用切片机切片，然后制成标本。在切片前，因包埋方法的不同，切片标本又可分为石蜡切片标本、胶棉切片标本、胶棉石蜡联合切片标本以及冻结切片标本等四种。

二、制片的一般过程

永久玻片标本的制作方法，因标本种类而不同，但材料一般都须经过固定、染色、透明与封片等四个重要步骤。所谓固定，也就是用药剂将材料迅速杀死，以达到保存原有形态、并能显示其结构的目的。染色乃是应用染色剂，使各种不同的细胞或细胞内部各种不同的结构着色。所谓透明，即系应用透明剂使材料透明，便于标本在显微镜下观察。材料最后封藏于载玻片与盖玻片之间，以便永久保存。

三、制片守则

制片时，应该遵循的守则很多，但以下列几条最为重要，希望

讀者特別注意：

第一、使用儀器藥品要貫徹精簡節約的精神，反對浪費。

第二、當制片藥品供不應求時，應開動腦筋，積極找尋代用品。

第三、不少制片藥劑是易燃品，用時應特別小心，以防燃燒。

第四、制片藥劑中有的是劇毒物品，使用切宜謹慎。

第五、前人的制片技術雖然值得學習，但其中還存在着不少缺點，我們不能保守，應該設法改進。

第六、制片手續繁復，必須細心穩靜。尤其初學者，即使失敗，也切忌煩躁。

第七、制片時要多參考有關的化學書籍，掌握所用藥品的性能，這樣既可提高技術，又可防止危險。

第八、制片室內的各種用具與藥品要放置在一定的地方，以免尋找而浪費時間。

第九、制片室及其用具與藥品務必保持清潔。

第十、藥品與標本均須標記名稱、號數以及配制日期等。

第十一、藥品與標本等要避免日光的直接照射。

第十二、制片前要先訂定計劃，每一手續都須妥善安排時間，以保證能按序進行。

第十三、在制片過程中，無論失敗或成功，都要將經驗記錄下來。

第十四、多多交流經驗，以便不斷改進技術。

第二章 固定剂及其应用

一、固定方法

固定材料的主要目的不外乎下列几点：其一，使材料能在短时间内迅速死亡，借以保存其原有形态；其二，使材料不至于腐烂和自解；其三，使细胞内的物质成为不溶性物质；其四，显示细胞与组织的结构；其五，硬化材料；其六，使材料易于着色。

为了达到上述的目的，不仅需用优良的固定剂，并且也应该注意固定的方法。固定的方法可分为物理法与化学法两种，前者利用高温和干燥固定材料，例如用热水固定腔肠动物，各种涂片在空气中晾干等。至于化学法，那就必须用化学药品。有时借蒸汽进行固定，例如以醋酸蒸汽处理原生动物，但一般都是用溶液来固定的，这种溶液就叫做固定剂。

用溶液固定材料的方法有两种，即液浸法与注射法。液浸法是常用的固定方法，也就是将材料浸渍于固定剂内。但有时由于固定剂不易透入材料内部，因此应用注射法，将固定剂用注射器注入动物的体腔或其他管腔内，进行固定。注射用的固定剂应选择作用比较缓和的，例如福尔马林、铬酸或苦味酸等。

固定方法虽然简单，但偶一不慎往往会使标本不合规格。现在根据作者的經驗，提出下列几点，希望同志们注意：

第一、固定剂种类不同，有的可以长久保藏，但有的久藏以后会失去效用，必须临用前配制。

第二、固定海产动物时，固定剂配方内所开列的蒸馏水，应以

海水代替。但固定剂內如果含有与海水接触后即生沉淀的药品时，例如苦味酸及重铬酸钾等，那么仍用蒸馏水，不必改用海水。

第三、固定剂虽易杀死小型动物，但对大型动物往往无效，因此后者須先杀死，然后再取下其身体的所需部分，投入固定剂內进行固定。杀死动物时，最好斩断头部，要尽量避免用麻醉剂，因为麻醉剂能使細胞內部的結構发生变化。

第四、有的材料特別敏感，与固定剂接触后立即縮成一团，这类材料應該利用热的固定剂处理，或者先麻醉，然后再固定。

第五、材料必須新鮮，死亡已久的动物是不能用的。

第六、材料須保持清洁，表面帶有血液等不洁之物时，宜先用生理食盐水洗除。

第七、材料不宜太大，一般应不厚于3毫米，否則不仅內部难以固定，并且在各項后續处理时，药剂也难进入。

第八、皮肤与腸壁等薄膜状的材料，在固定时极易卷縮，須用仙人掌等植物的刺将其固着在軟木或其他小木片上。

第九、固定剂如果混浊不清，或固定時間已經超过12小时，那么就須更换新液。

第十、固定时，材料下沉，会与容器底部接触，这样一則使固定剂难以进入材料下部，二則材料固定以后，其形状往往改变，因此容器底部宜衬垫棉花。

第十一、固定时，材料如果浮在上面，可用綫的一端系住材料，另一端挂一重物（不能用金属做成的重物），使材料下沉。此外也可用空气唧筒，抽去材料內部的空气，使之下沉。

第十二、固定剂用量不該过多，也不宜过少；过多浪费，过少則效果不良。其量一般为材料体积的25~30倍。

第十三、除少数固定剂，其固定時間可以任意延长外，固定一般不可过时，否則就会引起材料收縮、形成大量沉淀、染色力减退以及硬度太大而不宜切片等不良后果。

第十四、固定的久暫与溫度有密切关系，增加溫度虽然可以縮短固定時間，但固定剂容易蒸发，并可能引起其他变化，因此一般宜在室溫下进行固定。不过有时为了某种特殊目的，也可适当加溫或降溫。

二、配制固定剂的原药

蛋白质是細胞的主要成分，配制固定剂的原药以能否促使蛋白质生成明显的沉淀而可分为沉淀性与非沉淀性两大类。前者包括酒精、木精、苦味酸、鉻酸、升汞、氯化鉍与氯化錳等；后者包括福尔馬林、未酸化的重鉻酸鉀和四氧化鐵等。至于醋酸，虽对核蛋白有极强的沉淀作用，但不能促使其他蛋白质发生沉淀。現在将配制固定剂的各种原药及其与制片有关的性能簡單介紹如下：

(一)福尔馬林(HCHO) 甲醛(蟻醛)在常溫下是一种臭而无色的气体，其35~40%水溶液称为福尔馬林。福尔馬林受热以后能产生一种白色固体，叫做聚甲醛 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ，由一百个以上的甲醛分子合成。因此福尔馬林應該裝在有色的玻璃瓶內，以避免日光的照射。

福尔馬林极易氧化成为甲酸(蟻酸)，因而我們应用的福尔馬林常带酸性。虽然这对于固定材料无关紧要，但正由于其容易氧化成为甲酸，因此福尔馬林与鉻酸、重鉻酸鉀或鐵酸所配成的复合固定剂不能久藏。

制片时，常常需用中性福尔馬林。通常的福尔馬林虽带酸性，但只要加入少許碳酸鎂、碳酸鈣、碳酸鉀或碳酸鈉中和以后，就呈中性了。这种中性福尔馬林只能保藏一段時間，不久又恢复酸性。蒲福特氏改用磷酸二氫鈉 $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 或磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 与磷酸氫鈉 $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ 等緩冲剂，能使福尔馬林的酸硷度长久保持于7.0。蒲福特氏的配方如下：

福尔馬林	100.0 毫升
磷酸二氫鈉(或磷酸二氫鉀)	4.0 克
磷酸氫鈉	6.5 克
蒸餾水	100.0 毫升

福尔馬林虽不能使蛋白质沉淀，但能与蛋白质分子結合而生成化合物，这是福尔馬林固定作用的基础。此外，福尔馬林又具有强大的杀菌力，能保存材料使其不至于腐烂；同时还有硬化材料的性能。不过材料在福尔馬林中浸漬時間过久，其染色力减退，且由于硬化太甚，往往难以切片。

(二) 醇类

1. 酒精(乙醇)(C_2H_5OH) 酒精为无色液体，通常市場上出售的有純酒精与普通酒精两种，前者濃度为 95~98%。酒精是一种还原剂，容易被氧化成为乙醛，然后再变成醋酸，因此不宜用之于含有鉻酸、重鉻酸鉀或鐵酸的复合剂中。

酒精的固定性能在于促使蛋白质沉淀，但对蛋白质仅有变性作用，而无化合作用。此外，酒精也具有保存和硬化材料的性能，其主要缺点在于吸收水分，能使材料收縮。

2. 木精(甲醇)(CH_3OH) 木精由木材干餾制成，是一种无色的液体，易燃，同时又极毒，使用时要特別小心。其固定性能与酒精相似。

(三) 金属化合物

1. 升汞(氯化汞)($HgCl_2$) 升汞剧毒，使用应特別謹慎。这种化合物容易和其他金属合成錯合物，因此凡是含有升汞的固定剂，要避免与解剖針等金属器具接触。升汞对蛋白质具有极大的沉淀性能，杀死力强，这是升汞固定的基础，但它并不与蛋白质化合。

材料經過升汞类固定剂处理以后，内部产生一种沉淀，固定時間愈长，沉淀也就愈多。这种沉淀性质虽不十分清楚，但不溶于

酒精,对切片与染色都有妨碍,必须用碘酒(70%酒精加碘至呈葡萄酒色为度,或50%酒精10毫升加碘1克)或碘液(300毫升蒸馏水加2克碘化钾和1克碘)处理,使其变成碘化汞而可溶解于酒精中,以便除去。比较精细的切片,为了获得优良的染色效果起见,材料除去升汞沉淀以后,还须浸渍于0.25~0.30%硫代硫酸钠的水溶液中约5~10分钟,以除尽残留的碘。至于硫代硫酸钠本身可借蒸馏水冲洗除去。

2. 氯化铂(PtCl_4) 氯化铂是一种红褐色结晶体,易溶于水,形成水合酸。氯化铂固定细胞质效果不良,但对静止细胞核的固定效果很好。这种性能正与铁酸相反,因此二者常混合使用,互补缺点。

3. 氯化镉(CdCl_2) 氯化镉是一种白色结晶体。镉与汞都是同族元素,氯化镉的固定作用与氯化汞一样,也能使蛋白质沉淀。其优点在于使高尔基氏体在后续处理中易为金属银着色。

4. 铬酸(H_2CrO_4)与重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 三氧化铬(CrO_3)为紫黑色固体,是一种酸酐,容易吸收水分而变成铬酸,因此装三氧化铬的玻璃瓶,其瓶口须以石蜡密封,以免受潮。在制片室中,可将三氧化铬预先溶解于水中,配成已知浓度的铬酸备用。铬酸是一种强氧化剂,可以迅速还原成为三氧化二铬,因此不能与酒精、福尔马林等混合使用。在固定时,铬酸能沉淀蛋白质。

重铬酸钾是制片常用的药品,为橙黄色结晶体,可溶于水,其水溶液呈弱酸性。重铬酸钾也是一种氧化剂,其氧化强度虽不如铬酸,但也不应与酒精混合使用。与福尔马林则可混合,不过其混合剂不能长久保藏。使用重铬酸钾以进行定固时可分两种不同的情况:一种是酸化的重铬酸钾,例如加适量的醋酸,生成铬酸,以沉淀蛋白质;另一种是未酸化的重铬酸钾,它并不能使蛋白质沉淀,但能使蛋白质不溶于水,同时使其不为酒精所沉淀,因而材料能保存得和生活时一样。此外,未酸化的重铬酸钾对类脂体还有

极强的固定作用。

含铬的固定剂透入材料很慢，固定时间宜长。经这类固定剂处理过的材料，必须用流水洗去铬酸或重铬酸钾，否则难以染色。同时含铬的固定剂极易氧化，能生成一种不溶性的低氧化物，因此材料须置暗处固定，固定毕，也不能直接移入酒精中，以免发生沉淀。

5. 钒酸(四氧化钒) (OsO_4) 钒酸为淡黄色结晶体，容易挥发，其蒸气剧毒，应用时切宜小心。也易溶解于水，但其水溶液不显酸性而呈中性。

钒酸密封于小玻璃管内，通常配成 2% 水溶液应用。配时先预备一细口有色玻璃瓶，内装所需的蒸馏水，然后将小玻璃管外面的标签除尽揩净，并以锉刀锉破玻管，随即将钒酸连同玻管一并投入细口瓶中。瓶口不能用软木塞或橡皮塞，而只能用玻璃塞，以免钒酸被软木屑与橡皮屑等还原而失去效用。钒酸溶液若未用完，则应将瓶塞紧闭，用石蜡密封，并置暗处，避免日光与高温，以防止其挥发与还原。不过时间一久，药力终究要逐渐减退，最后还原，生成黑色二氧化钒沉淀，此时不可再用。

钒酸是一种强氧化剂，极易还原成为黑色二氧化钒。在制片上就利用这种特性使其被脂肪还原而显黑色。同时也正由于这种特性，钒酸不能与酒精或福尔马林混合使用。此外，材料用钒酸固定毕，必须先以流水冲洗，不能直接移入酒精中。

钒酸的固定作用与未酸化的重铬酸钾一样，不使蛋白质沉淀，而使蛋白质成为不溶于水的胶冻，同时也可防止因酒精而产生的凝聚现象。总之，钒酸可把材料固定得很均匀而保持其生活时的原状，但它的透入力很弱，因此只能处理小块材料，对较大的材料作用往往仅达表层。同时，除铁苏木精与蕃红外，用钒酸类固定剂处理过的材料难以用一般染料染色。

(四) 酸类

1. 苦味酸(2, 4, 6 三硝基酚) [$\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$] 苦味酸是

一种黄色結晶体, 受热容易爆炸, 为安全計, 最好預先配成飽和溶液备用。其溶解度因水溫而不同, 冷水的溶解度約为 0.9~1.2%。苦味酸可与任何药品混合使用, 但能使材料强烈收縮, 这是它最大的缺点。

苦味酸的固定作用在于能和蛋白质化合而生成沉淀, 这种沉淀可溶于水, 因此以苦味酸类固定剂处理过的材料不能直接用水, 而必須用 70% 酒精冲洗。冲洗时, 酒精內若加少許碳酸鋰, 則苦味酸更易洗除, 因苦味酸与碳酸鋰作用以后, 生成一种易溶于水的盐类。

2. 醋酸(乙酸)(CH_3COOH) 醋酸为一种具有强烈臭气的无色液体。通常市場上出售的为 36~40% 醋酸水溶液。純醋酸称为冰醋酸, 其濃度达 99.5% 以上, 当气溫 16.7°C 时, 即成无色結晶。

醋酸杀死力虽然很强, 但会使材料膨脹。醋酸的固定作用在于能够沉淀核蛋白, 使靜止核中的染色质成为清楚的块状体, 然而对于細胞质內的蛋白质則无固定作用。

3. 三氯醋酸(CCl_3COOH) 三氯醋酸是一种无色結晶体, 其固定性能大致与醋酸类似。

4. 硝酸(HNO_3) 通常所用的濃硝酸, 其濃度約为 65%。硝酸杀死力极强, 能沉淀蛋白质, 但材料在其强烈的作用下, 容易損坏, 因此一般只用于不易杀死的細胞。

5. 硫酸(H_2SO_4) 常用的濃硫酸濃度約为 98%。硫酸杀死力也极大, 同样能沉淀蛋白质, 但由于其强烈的吸湿性与氧化性, 对材料起破坏作用, 一般只用于胚胎的固定, 因为胚胎細胞比較不易杀死。

(五) 補助药品 这类药品在固定时不常应用, 同时其主要作用不是固定材料。

1. 哥罗仿(氯仿、三氯甲烷)(CHCl_3) 哥罗仿是一种无色液