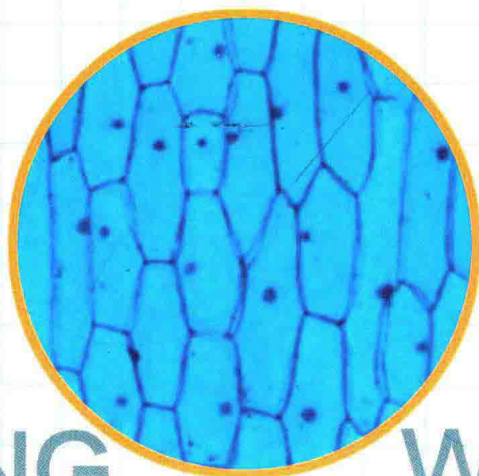


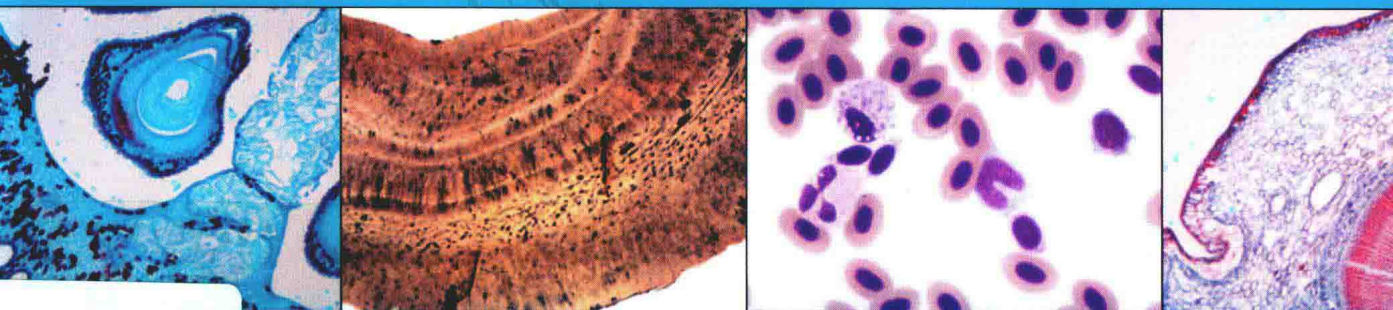
新理念新技术
生物实验教材

生物 显微技术实验教程



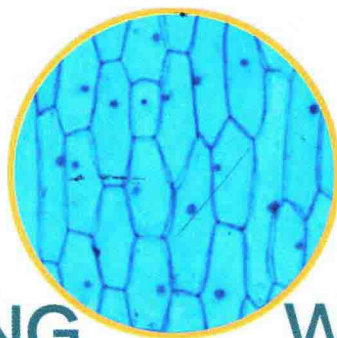
SHENG WU
XIANWEI JISHU SHIYAN
JIAOCHENG

主 编 ◎ 金 丽 蒲德永 黄 静 王志坚



西南师范大学出版社
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

生物 显微技术实验教程



SHENG WU
XIANWEI JISHU SHIYAN
JIAOCHENG

主 编 ◎ 金 丽 蒲德永 黄 静 王志坚



西南师范大学出版社
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

生物显微技术实验教程 / 金丽等主编. — 重庆 :
西南师范大学出版社, 2019.3

ISBN 978-7-5621-9720-1

I. ①生… II. ①金… III. ①生物显微镜—实验—高等学校—教材 IV. ①TH742.1-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第046321号

生物显微技术实验教程

金 丽 蒲德永 黄 静 王志坚◎主 编

责任编辑: 杜珍辉

责任校对: 熊家艳

装帧设计:  闰江文化

排 版: 重庆大雅数码印刷有限公司·黄金红

出版发行: 西南师范大学出版社

网址: www.xscbs.com

地址: 重庆市北碚区天生路2号

邮编: 400715

电话: 023-68868624

经 销: 全国新华书店

印 刷: 重庆荟文印务有限公司

幅面尺寸: 195 mm × 255 mm

印 张: 7.5

字 数: 110千

版 次: 2019年3月 第1版

印 次: 2019年3月 第1次印刷

书 号: ISBN 978-7-5621-9720-1

定 价: 38.00元

前言

P R E F A C E

生物显微技术是用各种显微镜观察和辨认微小生物形态和生物精细结构的方法和技术,在许多学科的教学和科研工作中,有着重要的作用。生物显微技术是高等院校生物学各专业的基础内容。近些年的相关参考书多是理论方面的,实践操作方面的指导性教材或参考书很少见。为适应现代生物教学的需要,编者在实际工作中收集、整理和参考有关资料,结合实验中的经验、体会和研究结果,结合本科生操作基础起点低的实际情况,按照生物显微技术发展的客观情况编写了这本综合性的实用实验指导参考书。这本书中的方法简便易行,容易获得较好结果,非常适合初学组织制片的本科生和研究生使用。

本书共分4章。第1章是常用试剂与溶液,介绍了常用试剂、常用缓冲液、常用固定液、常用染色液和常用封藏剂;第2章是非切片法制片实验,包括7种制片方法,16个实验;第3章是切片法制片实验,包括4种制片方法,5个实验;第4章是常用染色方法,包括11种光学显微镜观察常用的染色方法和2种透射电子显微镜观察常用的染色方法。本实验指导偏重于技术操作而非理论参考,并附有彩色组织照片,对于学习组织制片方法和提高染色技术水平有一定的帮助。

因编者水平有限,时间较紧,在编写过程中难免有遗漏及错误之处,敬请批评指正。所引用的文献在书末以参考文献的方式列出,文中未能一一表述,敬请原作者见谅。

在本书编写过程中,张耀光教授提供了指导与帮助,特此致谢。

目录

CONTENTS

Part 1

第1章

常用试剂 与溶液

第1节 常用试剂	002
第2节 常用缓冲液	005
第3节 常用固定液	011
第4节 常用染色液	020
第5节 常用封藏剂	027

Part 2

第2章

非切片法 制片实验

第1节 整体制片法	030
实验一 原生动物的整体制片	030
实验二 吸虫的整体制片	033
实验三 昆虫附属结构的整体制片	035
第2节 涂片法	038
实验一 血细胞涂片	038
实验二 花粉母细胞减数分裂涂片	042

第3节 印片法 044

实验一 造血组织印片——观察血细胞的发育与有丝分裂 ... 044

实验二 膀胱内膜印片——观察无丝分裂 047

第4节 铺片法 049

实验一 肠系膜铺片 049

实验二 疏松结缔组织铺片 052

实验三 洋葱表皮铺片 054

第5节 压片法 056

实验一 双翅目幼虫唾液腺染色体制片法 056

实验二 植物根尖压片法 059

第6节 分离法 061

实验一 平滑肌分离制片法 061

实验二 木本植物茎的分离制片 064

第7节 磨片法 066

实验一 动物骨骼的磨片 066

实验二 植物石组织的磨片 070

Part 3**第3章****切片法制片
实验****第1节 徒手切片法 074****第2节 石蜡切片法 076**

实验一 动物组织石蜡切片 076

实验二 植物组织石蜡切片 080

第3节 木材切片法 084**第4节 冷冻切片法 088**

P_{art 4}

第 4 章

常用染色 方法

第 1 节 光镜观察常用染色方法 092

第 2 节 电镜观察常用染色方法 109

主要参考文献..... 112

常用网址推荐..... 112



第1章

生物显微技术实验教程

常用试剂与溶液

为了使实验正确和顺利进行，避免实验过程中发生忙乱而出错，实验过程中所需的药品、试剂等须在实验开始前准备好。配制和保存过程中需要注意以下事项：

(1) 注意个人安全。进入实验室首先开启排气扇，穿上实验服。实验过程中要保持双手清洁，避免药品、试剂接近眼、鼻等。

(2) 要处理好易燃易爆化学试剂，以防失火；易潮解的试剂，保存在干燥缸内，以防潮解失效。

(3) 取用剧毒药品必须带一次性手套。如出现剧毒药品试剂等打碎漏洒等情况及时汇报。

(4) 配制强酸、强碱时一定要注意安全，取用酸类时应特别小心，将酸慢慢倒入水中，并不断用玻璃棒轻轻搅拌使之与水混合，切不可将水倒入酸中，以免发生危险。

(5) 所有配制的溶液、染料、试剂必须及时贴上瓶签，注明名称、成分、配制日期和保存温度等。有些染料和试剂有一定的有效期。配制时还要注意用量，以免造成浪费。倾倒试剂时，应把标签对着手心，以免药剂沾污标签，导致试剂无法辨认或混淆。

(6) 用过的废酒精、二甲苯等要分别倒入指定的瓶中，回收。所有固体废物、酸类、染料等应倒在废物桶或废液桶内，不能倒入水槽中。

第 1 节 常用试剂

1. 各种浓度乙醇

在组织制片过程中会用到 15%~100% 的各种不同浓度的乙醇,常称为梯度乙醇。实验室常以 95% 乙醇来配制各级低浓度乙醇,因纯乙醇是由 95% 乙醇再蒸馏而成,价格较贵,一般都不用它来稀释。

配制方法: 配制 70% 乙醇时,可取 95% 乙醇 70 mL 再加入蒸馏水至 95 mL 即可。同理,如以 90% 乙醇来稀释成 70% 乙醇时,可取 90% 乙醇 70 mL 再加入蒸馏水至 90 mL 即可。

总之,无论用哪种高浓度的乙醇来稀释,稀释成多大浓度就取多少毫升的乙醇,然后用蒸馏水加至该乙醇原有浓度数相同的体积即可。

2. 酸性水 (或酸性乙醇)

1% 酸性水溶液: 浓盐酸 1 mL, 蒸馏水 99 mL。

1% 酸性乙醇溶液: 浓盐酸 1 mL, 70% 乙醇 99 mL。

用于染色过程中的分色。分色后要经自来水充分冲洗组织,以除去所含的酸,再作其他处理。

3. 碱性水

0.1% 氨水或 0.01 g/mL 碳酸锂水溶液。常用于酸性水分色后以中和残存的酸,使组织恢复至中性。

4. 蛋白甘油

将鸡蛋钻孔用滴管吸出蛋白 (不要混入蛋黄) 盛于小烧杯中,用细玻璃棒将其打成浓厚的白色泡沫状,倒入量筒内,停留片刻,将上面的白沫滤去,然后加入等

量的甘油，并加入一小粒麝香草酚（thymol）（约1%）以防腐。分成小瓶储存备用。

蛋白甘油用久后黏附能力会逐渐减弱，尤其在夏天气温高时更容易变质失效。因此，最好隔1~2个月配制1次。

5. 甘油明胶

明胶	1 g
蒸馏水	100 mL
甘油	15 mL
石炭酸	0.5~1 g



先将明胶浸入热蒸馏水中，隔水加温使其融化，然后加入甘油及防腐剂（石炭酸），混合均匀后过滤即成。植物制片多用甘油明胶为粘贴剂。它的黏性较大，且不易着色。

6. 生理盐水

以氯化钠（NaCl）0.85~0.90 g 溶于蒸馏水，再定容至 100 mL 而制成的生理盐水即 0.008 5~0.009 0 g/mL 生理盐水，适用于哺乳动物；0.007 5 g/mL 生理盐水适用于鸟类；冷血动物用 0.006 5 g/mL 生理盐水；海水动物用 0.015~0.026 g/mL 生理盐水。

7. Ringer 液

氯化钠	9 g
氯化钾	0.42 g
氯化钙	0.25 g
蒸馏水	1 000 mL



如用于冷血动物，将氯化钠改成 6.5 g。

8. 甘油乙醇液

配方：甘油 50 mL，50% 乙醇 50 mL。

用木材制作切片时，常用此液作为木材的软化剂。也常用此液来浸泡包埋的蜡块。石蜡包埋的蜡块，如果组织较硬或较大，不容易切出时，可用刀片将被切面的材料削去一部分，将蜡块材料削出面向下，半浸泡于甘油乙醇液中。浸泡时间一般在 1 d 以上，时间长一点也无妨。有时把蜡块浸泡 7~10 d，更好切片。

9. 碘酒

每 100 mL 的 70%~75% 乙醇内加碘 2.5~5.0 g。碘酒可用于经含氯化汞的固定液固定的标本所制的切片，以去除标本中的汞结晶；也可作杀菌消毒剂。

10. 清洁液

配方

重铬酸钾	100 g
浓硫酸	100 mL
自来水	1 000 mL

专用于清洗玻璃器皿。先将重铬酸钾溶于热水，待冷后缓缓加入浓硫酸。千万不可将水溶液倒入浓硫酸。加浓硫酸时要边加边用玻棒轻轻搅拌，以免局部沸腾溅出。

第2节 常用缓冲液

1. 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液

(1) 储备液 盛放于棕色瓶内, 4℃保存。

A 液: 磷酸氢二钠 0.02 mol, 加蒸馏水至 100 mL。

B 液: 磷酸二氢钠 0.02 mol, 加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液 具体配制见表 1-1。

表 1-1 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液的配制

pH	A 液/mL	B 液/mL	pH	A 液/mL	B 液/mL
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3

2. $\frac{1}{15}$ mol/L 磷酸盐缓冲液

(1) 储备液 盛放于棕色瓶内, 4℃保存。

A 液: 磷酸氢二钠 $\frac{1}{15}$ mol, 加蒸馏水至 1 000 mL。

B 液: 磷酸二氢钾 $\frac{1}{15}$ mol, 加蒸馏水至 1 000 mL。

(2) 应用液 具体配制见表 1-2。

表 1-2 $\frac{1}{15}$ mol/L 磷酸盐缓冲液的配制

pH	A 液/mL	B 液/mL	pH	A 液/mL	B 液/mL
5.29	2.5	97.5	6.81	50.0	50.0
5.59	5.0	95.0	6.98	60.0	40.0
5.91	10.0	90.0	7.17	70.0	30.0

续表

表 1-2 $\frac{1}{15}$ mol/L 磷酸盐缓冲液的配制					
pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
6.24	20.0	80.0	7.38	80.0	20.0
6.47	30.0	70.0	7.73	90.0	10.0
6.64	40.0	60.0	8.04	95.0	5.0

3. 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液

(1) 储备液。

A 液：Tris 0.02 mol，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：HCl 0.02 mol（约 1.7 mL），加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

应用液以 A 液 25 mL 加相应 B 液（见表 1-3），再加蒸馏水至 100 mL 即成。

表 1-3 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液的配制			
pH	B 液 /mL	pH	B 液 /mL
7.2	22.1	8.2	11.0
7.4	20.7	8.4	8.3
7.6	19.2	8.6	6.1
7.8	16.3	8.8	4.1
8.0	13.4	9.0	2.5

4. 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液

(1) 储备液。

A 液：Tris 0.02 mol，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：HCl 0.01 mol（0.84 mL），加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

应用液以 A 液 10 mL 加相应 B 液和蒸馏水（见表 1-4）即成。

表 1-4 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液的配制					
pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL	pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL
7.19	18	12	8.23	9	21
7.36	17	13	8.32	8	22
7.54	16	14	8.41	7	23
7.66	15	15	8.51	6	24
7.77	14	16	8.62	5	25
7.87	13	17	8.74	4	26

续表

表 1-4 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液的配制					
pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL	pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL
7.96	12	18	8.92	3	27
8.05	11	19	9.10	2	28
8.14	10	20	—	—	—

5. 0.2 mol/L 醋酸缓冲液

(1) 储备液。

A 液：冰醋酸 1.2 mL (0.02 mol)，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：醋酸钾 2.72 g (0.02 mol)，加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

具体配制见表 1-5。

表 1-5 0.2 mol/L 醋酸缓冲液的配制					
pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
3.6	92.5	7.5	4.8	41.0	59.0
3.8	88.0	12.0	5.0	30.0	70.0
4.0	82.0	18.0	5.2	21.0	79.0
4.2	73.5	26.5	5.4	14.0	86.0
4.4	63.0	37.0	5.6	9.0	91.0
4.6	51.0	49.0	5.8	6.0	94.0

6. 枸橼酸-磷酸氢二钠缓冲液

(1) 储备液。

盛放于棕色瓶内，4℃保存。

A 液：0.1 mol/L 的枸橼酸液，即枸橼酸 0.01 mol，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：0.2 mol/L 的磷酸氢二钠液，即磷酸氢二钠 0.02 mol，加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

具体配制见表 1-6。

表 1-6 枸橼酸-磷酸氢二钠缓冲液的配制					
pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
2.2	98.0	2.0	5.2	46.0	54.0
2.4	93.5	6.5	5.4	44.0	56.0
2.6	89.0	11.0	5.6	42.0	58.0

续表

表 1-6 枸橼酸 - 磷酸氢二钠缓冲液的配制					
pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
2.8	84.0	16.0	5.8	40.0	60.0
3.0	79.0	21.0	6.0	37.0	63.0
3.2	75.0	25.0	6.2	34.0	66.0
3.4	71.0	29.0	6.4	31.0	69.0
3.6	67.5	32.5	6.6	27.5	72.5
3.8	64.0	36.0	6.8	23.0	77.0
4.0	60.5	39.5	7.0	18.0	82.0
4.2	58.0	42.0	7.2	13.5	86.5
4.4	55.5	44.5	7.4	10.0	90.0
4.6	52.5	47.5	7.6	7.0	93.0
4.8	50.0	50.0	7.8	5.0	95.0
5.0	48.0	52.0	8.0	2.5	97.5

7. 巴比妥钠 - 醋酸盐缓冲液

(1) 储备液。

A 液：0.1 mol/L 巴比妥钠 - 醋酸盐液，即巴比妥钠 2.94 g，醋酸钠 1.94 g，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：0.1 mol/L 盐酸，加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

应用液以 A 液 5.0 mL 加相应 B 液和蒸馏水即成（见表 1-7）。

表 1-7 巴比妥钠 - 醋酸盐缓冲液的配制					
pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL	pH	B 液 /mL	蒸馏水 /mL
3.6	28.0	8.0	6.2	14.0	22.0
3.8	26.0	10.0	6.8	13.0	23.0
4.0	25.0	11.0	7.0	12.0	24.0
4.2	24.0	12.0	7.2	11.0	25.0
4.4	22.0	14.0	7.4	10.0	26.0
4.6	20.0	16.0	7.6	8.0	28.0
4.8	19.0	17.0	8.0	6.0	30.0
5.0	18.0	18.0	8.2	4.0	32.0
5.2	17.0	19.0	8.6	1.5	34.5
5.4	16.0	20.0	9.2	0.5	35.5

8. 柠檬酸缓冲液

(1) 储备液。

A 液：柠檬酸 0.01mol，加蒸馏水至 100mL。

B 液：柠檬酸钠 0.01mol，加蒸馏水至 100mL。

(2) 应用液。

具体配制见表 1-8。

表 1-8 柠檬酸缓冲液的配制

pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
3.0	46.5	3.5	4.8	23.0	27.0
3.2	43.7	6.3	5.0	20.5	29.5
3.4	40.0	10.0	5.2	18.0	32.0
3.6	37.0	13.0	5.4	16.0	34.0
3.8	35.0	15.0	5.6	13.7	36.3
4.0	33.0	17.0	5.8	11.8	38.2
4.2	31.5	18.5	6.0	9.5	40.5
4.4	28.0	22.0	6.2	7.2	42.8
4.6	25.5	24.5	6.4	5.0	45.0

9. 0.2 mol/L 硼酸缓冲液

(1) 储备液。

A 液：硼酸 0.02 mol，氯化钠 0.005 mol，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：硼酸钠 0.005 mol，加蒸馏水至 100 mL。

(2) 应用液。

具体配制见表 1-9。

表 1-9 0.2 mol/L 硼酸缓冲液的配制

pH	A 液 /mL	B 液 /mL	pH	A 液 /mL	B 液 /mL
6.77	9.7	0.3	8.41	5.5	4.5
7.09	9.4	0.6	8.51	5.0	5.0
7.36	9.0	1.0	8.60	4.5	5.5
7.60	8.5	1.5	8.69	4.0	6.0
7.78	8.0	2.0	8.84	3.0	7.0
7.94	7.5	2.5	8.98	2.0	8.0
8.08	7.0	3.0	9.11	1.0	9.0
8.20	6.5	3.5	9.24	0	10.0
8.31	6.0	4.0	—	—	—

10. 二甲胍酸钠 - 盐酸缓冲液

(1) 储备液。

A 液：0.2 mol/L 二甲胍酸钠液，即二甲胍酸钠 0.2 mol，加蒸馏水至 100 mL。

B 液：0.2 mol/L 盐酸液，即盐酸 1.7 mL，溶于 100 mL 蒸馏水。

(2) 应用液。

以 A 液 25 mL 加相应 B 液（见表 1-10），再加蒸馏水至 100 mL 即成。

表 1-10 二甲胍酸钠 - 盐酸缓冲液的配制			
pH	B 液 /mL	pH	B 液 /mL
5.0	23.5	6.4	9.2
5.2	22.5	6.6	6.7
5.4	21.5	6.8	4.7
5.6	19.6	7.0	3.2
5.8	17.4	7.2	2.1
6.0	14.8	7.4	1.4
6.2	11.9	7.6	0.9