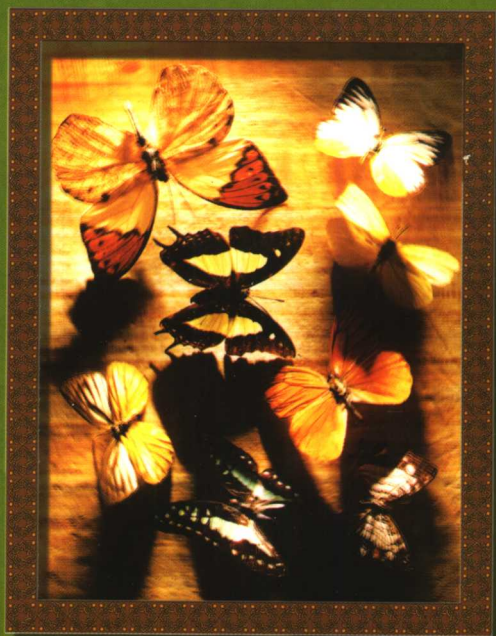


生物标本技术

主编 郑明顺 姜玉霞 金志民

主审 曲秀春 杨春文



东北林业大学出版社

生物标本技术

主编 郑明顺 姜玉霞 金志民
主审 曲秀春 杨春文

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物标本技术/郑明顺, 姜玉霞, 金志民主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004. 3

ISBN 7-81076-546-9

I. 生... II. ①郑... ②姜... ③金... III. 生物—标本 IV. Q-34

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 014585 号

内 容 简 介

本书系统地介绍了生物学科常用标本的采集、制作和保藏技术, 包括生物显微标本, 植物标本, 低等无脊椎动物及昆虫、鸟类、兽类标本等知识, 介绍了生物科学绘图及应用等方面的内容, 附有插图 73 幅。

本书可作为高等师范院校、综合性大学生物专业及农、林、医学院校相关专业生物标本技术课程的教科书, 也可作为生物及相关专业科学研究及学习的参考书。

责任编辑: 倪乃华

封面设计: 彭 宇



NEFUP

生物标本技术

Shengwu Biaoben Jishu

主编 郑明顺 姜玉霞 金志民

主审 曲秀春 杨春文

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

黑龙江省地质测绘印制中心印刷厂印装

开本 850 × 1168 1/32 印张 9.625 字数 240 千字

2004 年 3 月第 1 版 2005 年 7 月第 2 次印刷

ISBN 7-81076-546-9

Q·104 定价: 19.20 元

前 言

生物标本技术是生物教育专业的大学生应该掌握的一项专业技能。学习和掌握生物标本技术,不仅是师范院校生物系大学生将来从事中学生物教学工作的需要,也是开展科学研究、普及推广生物知识的需要。牡丹江师范学院生物系于2001年首次开设了《生物标本技术》课程,得到了学生的欢迎和认可,使学生在掌握丰富文化知识的前提下,更有过硬的专业技能,以提高从师素质,适应社会发展的需要。但目前有关生物标本技术内容的专门教材或参考书很少,有关这方面的知识都零散地分布于各个学科的文献上,不便于学生的学习和掌握。为此,任课的几位老师决定根据自己教学和科研过程中积累的文献资料及制作标本的技术和经验,同时参考相关文献编写一本适合师范院校生物专业特点的《生物标本技术》教材,以满足教学工作及学生学习的需要,同时也可作为从事生物科学研究的参考资料。

《生物标本技术》作为教材,不仅要反映生物标本技术的基础理论知识,同时还要十分重视技能的培养和实践操作,特别是要与中学生物教学的实际内容结合起来,使学生不仅掌握了一门实践技能,也为从事中学生物教学及将来生物科学研究打下基础。此外,还要与本学科专业特点结合,使学生在学习生物标本技术的同时丰富和拓展相关学科的知识内容,使教材具有科学性、系统性、实用性和前沿性。

参加教材编写的教师有三位:郑明顺副教授(完成绪论、第二章、第五章、第六章和第七章第一节的编写)、姜玉霞副教授(完成第一章、第三章和第七章第二节的编写)和金志民讲师(完成第四章的编写)。初稿完成后,由姜玉霞同志统稿,全书由曲秀春教授

及杨春文教授审阅。

在本书的编写过程中,我们得到了牡丹江师范学院生物系及牡丹江师范学院有关部门的大力支持和关怀,在此表示衷心感谢。

由于编者知识有限,经验不足,因此难免有错误及不当之处,敬请读者批评指正。

编 者

2003年9月于牡丹江师范学院

目 录

绪 论	1
第一章 生物显微标本制作技术	3
第一节 生物显微制片的基本原理	3
第二节 常用生物显微标本的制作方法	32
第二章 植物标本制作技术	72
第一节 植物材料的采集与制备	72
第二节 植物浸制标本的制作	102
第三节 植物干制标本的制作	113
第四节 植物标本的保管、维修和邮寄	120
第三章 昆虫标本制作技术	122
第一节 昆虫标本的采集	122
第二节 昆虫标本的制作	146
第四章 动物液浸标本的制作	177
第一节 动物液浸标本制作概述	177
第二节 无脊椎动物采集及整体液浸标本的制作	182
第三节 脊椎动物采集及整体液浸标本的制作	200
第四节 动物整体解剖液浸标本的制作	226
第五节 动物个体发育液浸标本的制作	239
第五章 动物剥制标本的制作	242
第一节 动物剥制标本制作概述	242
第二节 动物剥制标本制作的基本步骤和要求	246
第三节 脊椎动物剥制标本制作实例	250
第六章 动物骨骼标本的制作	264
第一节 动物干制骨骼标本的制作	264

第二节 骨骼系统透明标本的制作·····	268
第七章 生物科学绘画·····	271
第一节 生物科学绘画概述·····	271
第二节 生物科学绘画技术·····	281
主要参考文献·····	302

绪 论

一、生物标本技术的内容

生物标本技术是生物学研究的一门基础学科，其主要内容包括基础性的研究技术及应用技术，如各种生物标本的采集与制作技术、生物显微技术、生物绘图技术等。

生物标本的采集和制作是古老的传统技术，随着生物学的发展和科学技术的进步，生物学的研究方法和手段有了很大的变化，技术水平有了很大的提高，但在基础性的研究和教学中，生物标本的采集和制作技术仍然在发挥着重要作用。

生物显微技术也是传统的核心技术之一，它是植物解剖学、动植物组织胚胎学、细胞生物学、微生物学等许多生物学分支学科赖以发展的基础技术之一。

电子显微镜技术、生物摄影技术、生物多媒体技术等已在其其他相关课程中学习，为了避免重复，本门课程不予涉及。

在生物标本技术中，我们将主要研究生物标本的技术方法，即各种生物标本的采集与制作技术，同时对生物标本技术的理论（如标本保色原理、标本固定、染色原理）也做相应的介绍，以便使学生既掌握基础理论，又具有实际操作技能，并且能够举一反三，巩固和发展标本技术。

二、生物标本技术在生物学中的地位

回顾生物学的发展史，我们就会发现，没有生物标本的采集与制作技术，人们就无法对生物进行深入研究，就不会有动植物的丰富知识；没有日益发展的显微技术，就不会有现代的细胞

生物学和分子生物学。正是不断发展的生物标本技术，为生物学的研究提供了科学技术及研究方法，促进了对生物学一些分支学科的研究，这充分说明生物标本技术是生物学的基本科学研究技术。

生物学教学除了采用普通的教学技术外，还必须采用自己特有的教学技术，如标本、模型、挂图、显微摄影、幻灯、多媒体技术等，这些特有的教学技术多数都属于生物标本技术这门课程的内容。

掌握生物标本技术，不仅可以提高生物教师制备直观教具的能力，还可以提高教师的实验教学能力。生物教师可以充分利用现有条件，因地制宜，因陋就简，制作出理想的直观教具，促进教学质量的提高；他们可以通过自己制作标本、模型，进行实验材料的栽培、培养，为生物教学提供丰富的实验材料，不断改善实验室的条件，保证实验教学的顺利进行。

三、生物标本技术的学习方法

生物标本技术是一门技术科学，内容丰富，实践性强，除生物学知识外还常涉及物理学、化学、美学等多门科学的理论和方法，必须采用科学的、正确的学习方法。

(1) 要有严谨的科学态度。生物标本技术这门课程技术性、实践性极强，许多技术方法程序复杂，必须以严谨的科学态度和实事求是的踏实作风去学习和操作，严禁马虎大意。

(2) 理论联系实际。生物标本技术既重视理论的指导作用，更重视技术的操作性和实践性，学习时既要深入地了解各种技术的原理、法则和相关知识，又要努力钻研技术，积极积累经验，在实践的基础上，不断改进、提高技术水平。

第一章 生物显微标本制作技术

第一节 生物显微制片的基本原理

生物显微标本是指将肉眼不易观察到的生物材料按照一定要求制成生物制片，在显微镜或解剖镜下进行观察和研究用的生物标本。如微生物的个体形态、动植物组织、器官的形态和结构等，都可通过一定的方法和步骤进行处理，制成显微玻片标本进行研究和观察。生物显微标本根据生物材料的性质和来源不同，制作方法、使用的仪器、设备、工具和步骤也不同。

一、生物显微制片的分类

(一) 切片法

切片法是用切片刀或刀片将各种组织切成薄片制成玻片标本的方法。可分为以下几种。

1. 徒手切片法

徒手切片法是指手拿刀片或剃刀，把新鲜或贮备的材料切成薄片的制片方法。

徒手切片法的优点是：不需切片机等贵重仪器，有一片刀片或剃刀就可进行切片；制片简单、迅速，能及时观察植物生活组织结构和颜色。徒手切片一般用于植物制片的临时观察，在农、林、师范院校及中学应用十分广泛；在组织化学实验和做永久制片之前，也常用此法检查材料是否符合要求而决定取舍，以免造成时间与药品的浪费。徒手切片的缺点是：微小、柔软、含水过多以及坚硬的材料很难用此法切成薄片；不经过严格的操作训练易切成薄厚不匀或不完整的切片；切出的片子厚于切片机切

片；不适合对植物子房及胚胎等材料做连续切片。

2. 石蜡切片法

石蜡切片法是用石蜡浸透到组织中进行包埋，然后用旋转切片机将蜡块切成薄片而制成切片，是较常用的制片方法。石蜡切片一般需经过取材、固定、冲洗、脱水、透明、包埋、切片、贴片、脱蜡、复水、染色、脱水、透明、封藏等步骤。

3. 火棉胶切片法

用火棉胶将经过处理的材料浸透、包埋、切片等制成玻片标本的方法称火棉胶切片法。

火棉胶切片法的优点是：能弥补石蜡切片的不足，不适合用石蜡包埋的材料可用火棉胶包埋，而且组织收缩较少；特别适合于脑、眼球等大块组织；制片步骤比石蜡切片简便。其缺点是：浸胶与包埋所需时间较长（用真空泵抽气机进行火棉胶浸脱可缩短包埋时间），切片较厚（一般 $20\sim 40\ \mu\text{m}$ ），而且不易制成连续切片。

火棉胶又称硝化纤维，易燃不易爆，易溶于丙酮、丁香油、苯甲酸甲酯、醋酸丁酯及无水纯酒精与乙醚的混合液，遇氯仿变硬，遇水变成乳白色，不溶于氯仿与酒精的混合液。火棉胶遇甲醛易变硬且不能再溶解，故切勿与其接触。

市场上出售的火棉胶有固体、絮状和液态三种。配制火棉胶溶液时必须把容器洗涤烘干。固体火棉胶要切成细条或小块烘干后再用。一般以无水酒精与乙醚等量混合液为溶剂，以火棉胶为溶质，配成4%、6%、8%及12%的火棉胶溶液；盛火棉胶溶液的瓶口要涂上凡士林密封，防止挥发。配好的火棉胶溶液应是淡黄色半透明或无色透明的液体；如含有水分，则成为白色乳状的混合液，不能透入组织，必须风干后再用；火棉胶溶液应避免阳光照射和受热，否则会变质；火棉胶溶液不能直接包埋苦味酸固定的组织，因为苦味酸有软化火棉胶的作用，只有将苦味酸彻底冲洗干净后，才能用火棉胶浸透和包埋。火棉胶切片制作要经过

取材、固定、冲洗、脱水、浸胶、包埋、切片、染色和封片过程。

4. 冰冻切片法

冰冻切片法是利用冷冻装置使组织内部及其周围的水分结冰，使组织变硬后用切片机切片的制片方法。

冰冻切片的优点是：比石蜡切片和火棉胶切片制法简单，省时间，组织收缩小，易保持组织生活时的状态，也能保持细胞中的脂肪类以及某些酶类的活性；有些制作冷冻切片易碎的材料，用明胶包埋后再进行切片可减少脆裂；冰冻切片放入水中能自行展开或直接贴片晾干后进行染色。其缺点是：切片容易破裂；不易制成很薄的切片，也不易制作连续切片。冰冻切片适合含水较多的材料，特别是适用于神经系统浸银染色制片。组织化学多用此法制片。

5. 半薄切片法

用超薄切片机切出 $1\sim 2\mu\text{m}$ 厚的切片，称为半薄切片或光学切片。这种切片放在滴有蒸馏水的载片上，在酒精灯上加热至 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ ，使切片展开、烘干，加上一滴甘油，盖上盖玻片直接用光镜观察，也可在染色后加一滴甘油进行封片观察。这种方法主要用于制作电镜超薄切片时，确定包埋块切片方向和部位，判断组织固定和包埋的质量。

半薄切片法的优点是：半薄切片比石蜡切片薄，细胞重叠少，结构清晰度高，在高倍镜下视野清楚，细胞界限分明；切片制做起来较容易、简单，组织收缩小。其缺点是：染色较难，组织块面积小，不能切成连续的切片。

半薄制片既不同于电镜制片，也不同于石蜡制片，而是将这两种制片方法的特点结合起来形成的制片方法。我国在半薄切片技术方面虽有所发展，但没有广泛应用到教学中去。现在有不少的教学单位正在研究怎样将半薄切片应用到教学中，使电镜制片与光镜制片技术衔接起来。

(二) 非切片法

非切片法是将小型动植物或较大动植物的一部分或其组织不用刀切成薄片而制成玻片标本的方法。优点是组织的各个部分不被切断，保持原有的形态；制作方法比较简单。缺点是标本被挤压时会使某些结构的正常位置关系有所变动，需使用新鲜材料。非切片法可包括整体装片、离析材料装片、涂片、压片、铺片、撕片、磨片等。

1. 整体装片法

整体装片法是指对于小的动植物体或较大动植物体的某一部分，不经切片而直接制成玻片标本的方法。如昆虫的口器、昆虫的触角、水螅、藻类等。

2. 涂片法

对于液体或半流动性的材料，不能切片而直接将材料在载玻片上涂成一均匀薄层，再经固定染色制成标本的方法，称为涂片法。如血液、精液和细菌等。

3. 压片法

将一些柔软的材料置于载玻片上，盖上盖玻片后，用一定的压力将标本压碎和压开，制成玻片标本的方法，称为压片法。

4. 磨片法

磨片法主要用于含有钙盐等矿物质成分比较坚硬的材料制片，先用磨石磨成薄片，再封固成玻片标本。如脊椎动物的牙齿、骨，软体动物的贝壳，珊瑚虫的骨骼及化石等。

5. 铺片法

铺片法是将一些成膜状结构的标本展平放在载玻片上，再经固定、染色制成玻片标本的方法。如肠系膜等材料。

6. 分离法

分离法是为了观察研究组织或器官里的单个细胞或纤维的形状，必须设法使细胞与细胞间质分离，将细胞各自分离开，再经染色制成玻片标本的方法。一般可分为化学分离法和撕碎法。

二、生物显微制片的步骤

无论是切片法还是非切片法，一般都要经过以下几个步骤：
取材→固定→冲洗→染色→脱水→透明→封片。

(一) 取材

取材是制片的第一步，生物材料不同，取材的原则也不同。

1. 植物材料的取材

主要是注意季节性。植物材料在切割时，因所做的切面不同，观察的结构就会不同，一般可分为两类：

(1) 横切面：刀的切向与根、茎的长轴垂直，即过根、茎横断面的切面。横切片可观察自外向内的各种组织。

(2) 纵切面：刀的切向与根、茎的长轴方向平行的切面。穿过中心点与其半径吻合的切面称半径切面，可观察到茎中各种组织纵走的情形和髓的排列、厚度等；沿植物体的表面与其半径成直角的切面称为切线切面。

2. 动物材料的取材

动物材料的取材应遵循以下原则：

(1) 选择合适的处死方法，动作要迅速，防止动物细胞自溶。活的动物需进行处死，其方法有麻醉法、空气栓塞法、击头法、断头法、股动脉放血法等。

(2) 取材要完整。应尽量包括各脏器的全部组织或重要结构。如对消化管进行取材时应包括粘膜、粘膜下层、基层和外膜四层结构。

(3) 选择合适的切割方向。如对肠进行观察一般采用横切；对小肠皱襞、肾、淋巴等的观察一般采用纵切；而对肝、脾、腺体等结构的观察纵、横切均可。

3. 生物组织取材的注意事项

(1) 为防止组织自溶、沉淀、凝固和腐败等现象发生，取材前应选择和配制合适的固定剂，及时对生物材料进行固定和保

存。

(2) 取材应遵循准确、典型、完整和适时的原则。

(3) 研究正常结构应选择健全而有代表性的部分；研究病变结构除选择病变部位外，还应选择正常健全部位进行对照观察。

(4) 取材工具要锋利，取材动作要迅速而准确。

(5) 做好取材记录，包括采集时间、地点、标本名称、年龄、性别、部位、断面及固定液等内容。

(二) 固定

在生物显微制片中，用某种方法以最快的速度将细胞杀死并保持原有的形态结构及其组成称为固定。固定的作用在于保存组织内细胞的形态结构及其组成，使细胞各部分在染色时容易着色，既适于切片又能长期保存。

固定液的种类很多、性质各异，使用时应根据材料的特点进行选择。固定剂按其组成可分为两大类：单纯固定剂和混合固定剂。

1. 单纯固定剂

只含一种化学成分的固定剂为单纯固定剂。

(1) 酒精：也称乙醇，是一种良好的杀生及固定剂，常用浓度为 70%~100%。酒精渗透组织的速度很快，脱水性强，因此用它作杀生及固定剂所需时间很短，小型菌类仅需 1~2 min，洋葱根尖、百合花药等小型材料需 15~30 min，大型材料也只需 1~2 h；缺点是能使原生质发生轻微的收缩和硬化，但植物的细胞壁仍能保持原来形状。

酒精可以凝固蛋白质，但不能沉淀核蛋白，故用酒精固定的标本染色时细胞核着色不良；酒精能溶解大部分脂类，所以研究细胞内的脂类物质时不能用酒精固定；一般也不用酒精固定高尔基体和线粒体；酒精冰点极低，不易作冷冻切片的固定剂。酒精是一种还原剂，能被氧化成醋酸，因此不能与铬酸、钨酸及重铬酸钾等氧化剂配合成固定剂。酒精与福尔马林、醋酸、丙酸和甘

油混合使用效果较好。

(2) 福尔马林 (37%~40% 的甲醛): 甲醛是一种气体, 溶于水成为甲醛水, 通称福尔马林。固定和保存材料所用的溶液浓度是指福尔马林的百分比, 一般常用浓度为 10% 的福尔马林液, 其配方是福尔马林溶液 10 ml (即 37%~40% 的甲醛溶液 10 ml), 加蒸馏水 90 ml 即可。所以 10% 的福尔马林实际只含 3.7%~4.0% 的甲醛。

甲醛的渗透力较强, 固定组织后可使组织硬化程度显著、收缩减少, 但经酒精脱水后收缩很大。甲醛不能使白蛋白和核蛋白沉淀, 但可与蛋白质化合, 对脂肪、神经髓鞘的固定效果很好, 也可固定高尔基体、线粒体; 甲醛既可固定组织, 又可保存组织, 经固定的组织, 核染色较好, 胞浆染色较差, 一般染料都可染, 但以碱性染料更好。

(3) 醋酸: 又叫乙酸。能沉淀核蛋白, 对染色质或染色体的固定和染色效果较好; 不用于碳水化合物及脂类的固定和保存; 高浓度的醋酸会使高尔基体和线粒体破坏和变形, 所以一般常用 0.3% 以下的低浓度醋酸固定; 醋酸的渗透作用极强, 可使组织膨胀, 常与酒精、福尔马林、铬酸等容易引起组织变硬和收缩的液体混合使用。

(4) 铬酸: 为三氧化铬 (CrO_3) 的水溶液。能沉淀一切蛋白质, 凝固核酸, 增强核的着色能力; 能固定高尔基体、线粒体, 对脂肪无作用, 常用于细胞学材料的固定; 只有铬酸能固定多糖原, 使之不溶于水。

铬酸是一种强氧化剂, 不能与酒精、福尔马林等还原剂混合使用。铬酸常配成 2% 或 10% 的水溶液作为储藏液。铬酸固定材料的适宜浓度为 0.5%~1%; 铬酸的穿透速度快, 一般大小的组织块需固定 12~24 h, 硬化中度, 收缩较明显, 与其他药剂混合使用效果较好; 用铬酸固定组织时宜放于暗处以免蛋白质溶解。凡用铬酸或含铬酸的固定剂固定的材料必须用流水冲洗, 直

至组织中不含铬酸为止，如冲洗不净或直接投入酒精中，铬酸将被还原成绿色的氧化铬并发生沉淀，使染色困难。

(5) 苦味酸：是一种极毒的结晶，容易爆炸，为保证使用安全，实验室常配成饱和水溶液储存，也可溶于酒精、氯仿、苯、醚、二甲苯等溶剂中。苦味酸可沉淀一切蛋白质，其渗透速度较酒精和醋酸都慢，固定后收缩明显，但不使组织硬化，容易着色。苦味酸固定材料的浓度为饱和水溶液，材料经苦味酸或其混合固定剂固定后，不必经水冲洗可直接用 70% 酒精洗去黄色，在 70% 酒精中加入少量碳酸钾或氨水，可缩短洗掉黄色的时间。

(6) 锇酸：即四氧化锇 (OsO_4)，为淡黄色结晶，能溶于水。虽称为酸，但非酸类，其水溶液呈中性反应。锇酸价格昂贵，通常均以少量 (0.5 g 或 1 g) 装于封口的小玻璃管中出售。已配好的锇酸溶液中只要有极微量的有机物质存在即很快被还原成黑色而失去效用，所以在配制时必须十分小心，蒸馏水必须纯净。配好的锇酸溶液必须贮存在干净的有玻璃塞的滴瓶中。为了防止锇酸溶液还原，可用三种方法处理：①加入少量的碘化钠；②在 100 ml 1% 的锇酸水溶液中加入 10 滴 5% 的氯化汞；③加入适量的过锰酸钾直到溶液变成玫瑰色为止。如以后溶液又变为无色，可再加入更多的过锰酸钾。锇酸溶液易挥发，所挥发的气体能损害眼睛和粘膜，故需盖严，外包黑纸，存于暗处或冰箱中。

固定材料一般常用浓度为 0.5% ~ 2% 的锇酸溶液。此液能使蛋白质成均匀的胶状固定而不发生沉淀，也可以防止经酒精处理时蛋白质凝固。锇酸是脂类惟一的固定剂，常用于线粒体和高尔基体的固定。

(7) 碘：是一种很好的防腐剂，可与碘化钾制成良好的固定剂，是低等单细胞生物、群体生物及藻类植物等的良好固定剂。碘的渗透力强，固定后要用流水冲洗。

(8) 重铬酸钾 (K_2CrO_7)：为一种橙色结晶，有毒，能溶于水，不溶于酒精。是强氧化剂，不能与酒精、福尔马林等液混合