

实用生物学 制片技术



内 容 提 要

本书介绍了生物学制片技术的必要基础理论知识, 以及常用的动物、组织、胚胎、种子植物、孢子植物的制片技术, 还介绍了植物显微化学鉴定方法。书中所介绍的方法中, 有不少是作者多年实践经验的总结, 颇有参考价值。

本书可供综合大学、师范院校生物系和农、林、医等有关专业开设生物制片技术课用, 也可供中专有关专业师生和制片工作者、生物科学工作者参考。

实用生物学制片技术

曾小鲁 主编

*

高等教育出版社 出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷一厂 印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 11 字数 262,000

1989 年 5 月第 1 版 1989 年 5 月第 1 次印刷

印数 00 001—2 440

ISBN 7-04-000829-7/Q·54

定价 3.75 元

前 言

随着科学技术的发展,生物学的研究手段日益先进,组织化学、细胞化学和电子显微镜等新技术,正在逐渐被越来越多的生物学工作者所掌握。但是,较早建立的生物学制片技术并未过时,它仍然是生物学工作者教学、科研的基本技术。然而,全面(包括动物、植物及微生物)、系统的介绍生物学制片技术的书籍,目前尚属少见。为此,特向读者献上本书,以满足高等院校生物学系及农、林、医等有关专业师生、生物学制片工作者、中等专业学校及中学生物教师的需要。

在1958年,江西大学生物学系就创办了“生物制片厂”,生产各种动物、植物及组织学玻片标本,供应高等院校及中等学校,近年来,产品还销往香港。因此,在多年的工作实践中,我们积累了一些经验。本书除介绍必要的基础理论知识外,主要介绍各种制片方法,而其中不少方法也就是我们多年实践经验的总结。生物学制片方法很多,我们所选择的都是常用动物、植物、组织学及胚胎学,比较容易而又能获得成功的一、二种方法。希望本书能成为生物学工作者有用的参考书。

本书第一章及第二章的第一至四节由戴惠娟编写,第二章的第五至八节及第三、四章由曾小鲁编写,第五章的第一至五节由程景福编写,第五章的第五节及第六章由徐汉卿编写。最后由曾小鲁统稿。有关染色理论内容承江西大学化学系曾汉维审阅,第六章承江西大学生物学系余名苍审阅,特此致谢。本书若有不妥之处,望读者予以批评指正。

编 者

1987年4月

目 录

第一章 制片用的主要设备	1
第二章 生物玻片标本制作的方法	19
第一节 概述	19
第二节 取材、固定、固定液	21
第三节 染料、染色液	45
第四节 制片常用的药剂	67
第五节 石蜡切片法	75
第六节 火棉胶切片法	85
第七节 冰冻切片法	89
第八节 整体装片法	93
第三章 常用实验动物的制片方法	94
第一节 动物石蜡切片常用的苏木精曙红染色法	94
第二节 常用实验动物的制片方法	97
一、草履虫装片	97
二、水螅整体装片	100
三、水螅切片	101
四、水螅神经网的显示法	101
五、涡虫整体装片、切片及消化系统的显示	103
六、华枝睾吸虫装片	104
七、绦虫头节及节片的装片	105
八、猪带绦虫囊尾幼虫装片	107
九、钩虫整体装片的制作	108
十、蛔虫横切片的制作	109
十一、寄生虫卵的制片	110
十二、蚯蚓横切片	112
十三、螨类标本的制片法	113
十四、人虱装片	115

十五、蜜蜂足装片	116
十六、蜜蜂口器装片	116
十七、昆虫气管装片	117
十八、昆虫复眼表面观装片	117
十九、蚜虫装片	118
二十、果蝇唾液腺染色体的制片	119
二十一、与蛔虫卵示细胞分裂的制片	120
二十二、蛙胚各时期整体装片及切片的制作	123
二十三、鸡胚各时期整体装片及切片的制作	126

第四章 几种主要的细胞器、组织和器官的制片方法.....129

一、线粒体的制片法	129
二、高尔基体(内网器)的制片法	132
三、上皮组织的制片法	133
(一) 单层扁平上皮装片	133
(二) 单层柱状上皮切片	134
(三) 复层扁平上皮切片	134
(四) 假复层纤毛柱状上皮切片	134
(五) 变移上皮切片	135
四、疏松结缔组织伸展片(平铺片)	135
五、网状纤维的显示	138
六、巨噬细胞(组织细胞)的显示	141
七、肥大细胞的显示	142
八、致密结缔组织(腱)切片	144
九、透明软骨切片	144
十、弹性软骨(切片)的制片法	145
十一、骨(骨密质)磨片	146
十二、血液涂片	149
十三、平滑肌分离装片	151
十四、骨骼肌切片	154
十五、心肌切片	155
十六、脊髓的神经细胞涂片	157
十七、脊髓横切片	158
十八、大脑和小脑皮质神经元的显示	161
十九、突触的显示	166
二十、有髓神经纤维切片的制作	167
二十一、环层小体装片及切片	169

二十二、运动神经终板的制片	170
二十三、动脉、静脉横切片	173
二十四、大动脉切片的制作	173
二十五、淋巴结切片的制作	174
二十六、脾脏切片的制作	174
二十七、味蕾切片的制作	175
二十八、胃壁切片的制作	176
二十九、小肠切片的制作	176
三十、小肠 Paneth 氏细胞的显示	177
三十一、肠嗜银细胞或银亲合细胞的显示	177
三十二、唾液腺切片的制作	179
三十三、肝脏切片的制作	180
三十四、肝 Kupffer 氏细胞(星状细胞)的制片	180
三十五、肝脏胆小管的显示	181
三十六、肝糖原的显示	183
三十七、胰腺切片的制作	185
三十八、气管横切片的制片	186
三十九、肺切片的制作	187
四十、肾切片的制作	188
四十一、肾球旁细胞颗粒的显示	188
四十二、睾丸切片的制作	190
四十三、卵巢切片的制作	191
四十四、甲状腺滤泡旁细胞("C"细胞)的显示法	191
四十五、垂体切片的制作	192
四十六、肾上腺切片的制作	194
四十七、皮肤切片的制作	195
四十八、眼球切片的制作	196
四十九、内耳切片的制作	198
五十、动物器官内血管注射切片的制作	200

第五章 常用实验植物的制片方法203

第一节 植物石蜡切片常用的番红固绿染色法	203
第二节 植物的徒手切片法	205
第三节 植物材料的涂片法与压片法	207
第四节 常用实验种子植物的制片方法	210
一、洋葱鳞片叶表皮装片	210
二、胞间连丝的制片法	211

三、线粒体的制片法	214
四、导管分离装片	215
五、桔果皮分泌腔制片法	216
六、洋葱根尖纵切片(示细胞有丝分裂)	217
七、蚕豆根的初步生构造横切片	220
八、蚕豆根的次生构造横切片	221
九、玉米根尖纵切片	222
十、玉米老根横切片	223
十一、大叶黄杨茎尖纵切片	224
十二、南瓜茎纵切片及横切片	225
十三、向日葵茎横切片	227
十四、棉茎横切片	228
十五、桑皮孔切片	228
十六、椴树三年生枝横切片	229
十七、松木材三剖面切片	230
十八、水稻茎横切片	231
十九、玉米茎纵切片及横切片	232
二十、海桐叶片横切片	232
二十一、棉叶片横切片	233
二十二、水稻叶片横切片	234
二十三、松针叶横切片	235
二十四、蚕豆叶下表皮装片示气孔	235
二十五、百合花药横切片	237
二十六、水稻花药横切片	237
二十七、花粉母细胞减数分裂涂片	239
二十八、松花粉粒装片	240
二十九、花粉粒萌发装片	241
三十、与尾松孢子叶球纵切片	243
三十一、百合子房横切片	244
三十二、水稻子房纵切片	245
三十三、荠菜角果纵切片	245
三十四、小麦颖果纵切片	246
第五节 常用实验孢子植物的制片方法	247
一、绿色裸藻装片	247
二、颤藻装片	249
三、念珠藻装片	250
四、项圈藻制片	251

五、衣藻装片	252
六、团藻装片	254
七、水绵装片	256
八、无隔藻装片(示有性生殖器官)	257
九、硅藻壳装片	258
十、细菌三型涂片	259
十一、发网菌孢子囊装片	261
十二、酵母菌装片	261
十三、青霉装片及切片	263
十四、黑根霉装片	264
十五、白锈菌制片	265
十六、杆锈菌制片	266
十七、伞菌菌盖切片	267
十八、地衣原植体横切片	268
十九、地钱叶状体横切片	268
二十、地钱生殖托纵切片	269
二十一、藓精子器和颈卵器纵切片	270
二十二、藓带孢子体的植株装片	271
二十三、藓孢蒴纵切片	272
二十四、藓原丝体装片	272
二十五、石松茎横切片	274
二十六、蕨地下茎横切片	274
二十七、石松孢子叶穗纵切片	275
二十八、卷柏孢子叶穗纵切片	276
二十九、蕨孢子叶横切片	277
三十、蕨孢子囊装片	278
三十一、蕨原叶体装片	278
三十三、蕨生殖器官纵切片	279
第六章 植物显微化学鉴定法	280
第一节 概述	280
一、植物显微化学鉴定的特点和意义	280
二、植物显微化学鉴定的注意事项	280
第二节 植物显微化学主要鉴定方法	282
一、植物细胞中常见贮藏物的鉴定	282
(一) 淀粉	282
1. 碘-碘化钾法	282

(1) 营养器官中淀粉粒的鉴定	283
(2) 花粉粒中淀粉粒的鉴定	283
(3) 子房中淀粉粒的鉴定	284
(4) 颖果中淀粉粒的鉴定	284
2. 碘-水合氯醛法	285
3. 高碘酸-Schiff 反应法	285
(二) 葡萄糖、果糖	287
1. 硫酸铜-酒石酸钾钠法(Fehling 反应法)	287
2. 硫酸铜-柠檬酸钠法(Benedict 测定法)	288
3. 盐酸苯肼 醋酸钠法(脎反应法)	288
(三) 蔗糖	289
1. 盐酸-Fehling 反应法	289
2. 转化酶法	290
(四) 菊糖	290
1. 酒精法	290
2. 麝香草酚-硫酸法	291
(五) 蛋白质	291
1. 碘-碘化钾法	291
2. 曙红法	292
3. 硝酸法(肼黄反应法)	292
4. 硫酸铜-氢氧化钠法(双缩脲反应法)	292
5. 氯化汞-溴酚蓝法	293
6. 氢氧化钠-茚酚法	293
(六) 油脂	294
1. 苏丹 III (或苏丹 IV) 法	294
2. 氢氧化钾法(皂化法)	294
二、植物细胞中特殊内含物的鉴定	295
(一) 鞣质	295
1. 三氯化铁法	295
2. 硫酸铁法	296
3. 明胶法	296
4. 重铬酸钾法	296
5. 美蓝法	296
(二) 树脂	297
1. 醋酸铜法	297
2. 草酸铜法	297
(三) 橡胶	298

1. 苏丹 III(或苏丹 IV) 法	298
2. 溴法	298
3. 油溶棕法	299
(四) 挥发油	299
(五) 钙盐	300
1. 醋酸法	300
2. 硫酸法	300
3. 醋酸铜-硫酸铁法	300
三、植物细胞中色素的鉴定	300
(一) 叶绿体色素	300
1. 氢氧化钾法	301
2. 氢氧化钾-硫酸综合法	301
(二) 花青素	301
1. 氨-盐酸法	302
2. 烟碱法	302
四、植物细胞中核酸的鉴定	302
(一) 脱氧核糖核酸	302
1. 根尖涂压制片中 DNA 的鉴定	303
2. 花粉母细胞压片中 DNA 的鉴定	304
3. 器官、组织石蜡切片中 DNA 的鉴定	305
(二) 核糖核酸	305
五、植物细胞中酶的鉴定	307
(一) 细胞色素氧化酶	307
(二) 过氧化物酶	308
1. 联苯胺-过氧化氢法(I)	309
2. 联苯胺-过氧化氢法(II)	310
(三) 酸性磷酸酶	310
1. 醋酸铅-硫化铵法	310
2. 硝酸锆-硫化铵法(Gonori 法)	311
(四) 碱性磷酸酶	311
(五) 三磷酸腺苷酶(ATP 酶)	313
六、植物细胞壁组分的鉴定	313
(一) 纤维素	314
1. 碘-碘化钾法	314
2. 碘-硫酸法	314
3. 氯化锌-碘法	314

4. 碘-氯化锂法	315
(二) 木质素	315
1. 番红法	316
2. 间苯三酚法	316
3. 硫酸苯胺(或盐酸苯胺)法	316
4. 氯化苯胺法	317
5. 氯-亚硫酸法	317
6. 甲基红法	317
(三) 角质和木栓质	317
1. 氯化锌-碘法	318
2. 苏丹 III 法	318
3. 硫酸法	319
(四) 果胶质	319
1. 钨红法	319
2. 美蓝法	319
3. 羟胺-氯化铁法	320
4. 联苯胺-萘酚法	320
(五) 硅质	321
附录一、生物制片常用的染料	322
附录二、生物制片常用的化学试剂	325
附录三、化学试剂的规格	331
附录四、参考资料	332

第一章 制片用的主要设备

一、显微镜

显微镜是制片时最常用的仪器。制片室内不需要高级显微镜，但应备有下列显微镜：一台较旧而镜头尚好的显微镜，用于检查切片刀和切片染色情况；一台普通显微镜，用于观察切片的显微结构；一台实体显微镜，用于观察所取材料的好坏和取材的精确部位，以及检查玻片标本的半成品。

二、石蜡包埋工具

(一) 恒温箱 用于浸蜡、烤片及染色加温等，温度调节范围在 $37-60^{\circ}\text{C}$ 之间。市售的各式电热恒温箱均可。

(二) 包埋箱(熔蜡箱)
电热恒温箱虽可用于浸蜡包埋，但实际使用时还不如自制包埋箱方便。自制包埋箱(图1)的热源来自上方的灯泡，由于灯泡可悬挂在高低不同的位置上，从而可调节箱内的温度。灯泡的高度最好控制在使蜡杯内的石蜡保持在上部熔化，下部凝结的状态，这时的温度是浸蜡的最适温度。

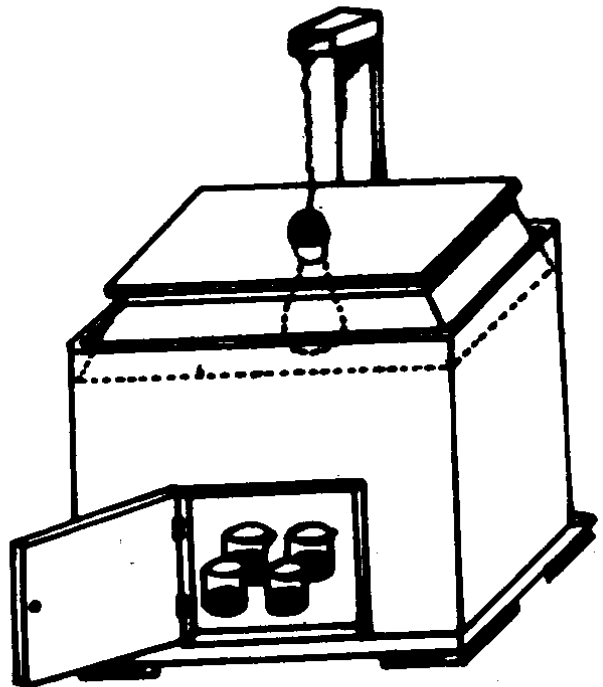


图1 浸蜡用的木质包埋箱

(三) 包埋铜框(图 2) 为两块“L”形的铜或铝块。包埋时将它置于一块铜板或玻璃板上，根据组织块的大小移动铜(铝)块，这样便围成一个长方形或正方形框，用于包埋组织块。

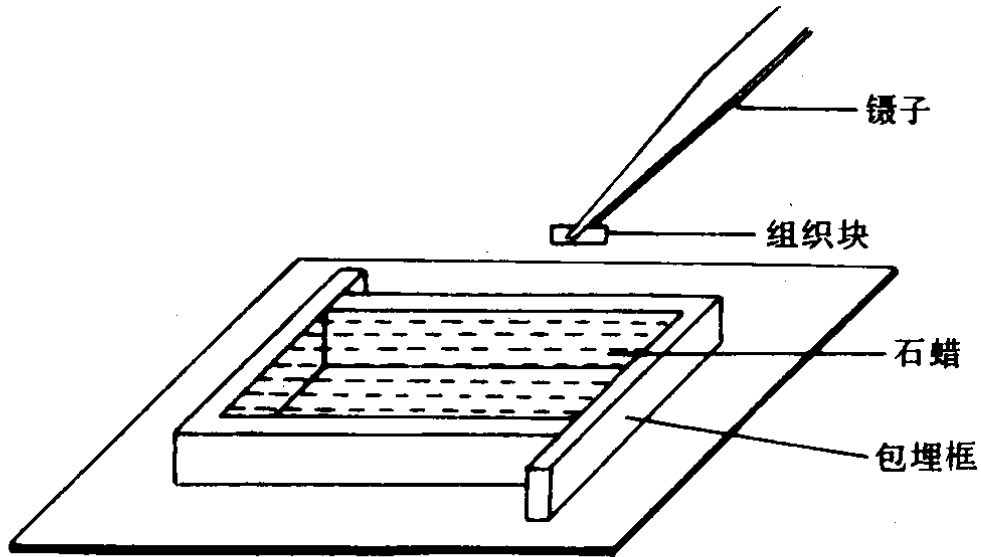


图 2 包埋铜框

(四) 熔蜡锅 用于熔化石蜡。可用木柄有嘴的奶锅代替。

三、切片工具

(一) 切片机 切片机是制作各种组织切片必不可少的精密仪器。切片机的种类很多，常用的切片机有下列几种：

1. 旋转切片机 (rotary microtome) 此种切片机 (图 3) 最适于切石蜡切片，故又称为石蜡切片机。但装上冷冻装置，也可作冰冻切片。

这种切片机的刀架固定不动，夹物器可作上、下垂直和前、后运动。借夹物器后面的微动装置控制切片的厚度。机轮旋转一次，夹物器就随着上、下运动一次，并按所调节的切片厚度向前推进一次。当蜡块与刀口接触时，就切出一片蜡片，连续旋转就切出连续的蜡带。

目前，有的旋转式切片机，如联邦德国 Leitz 1510 型旋转式

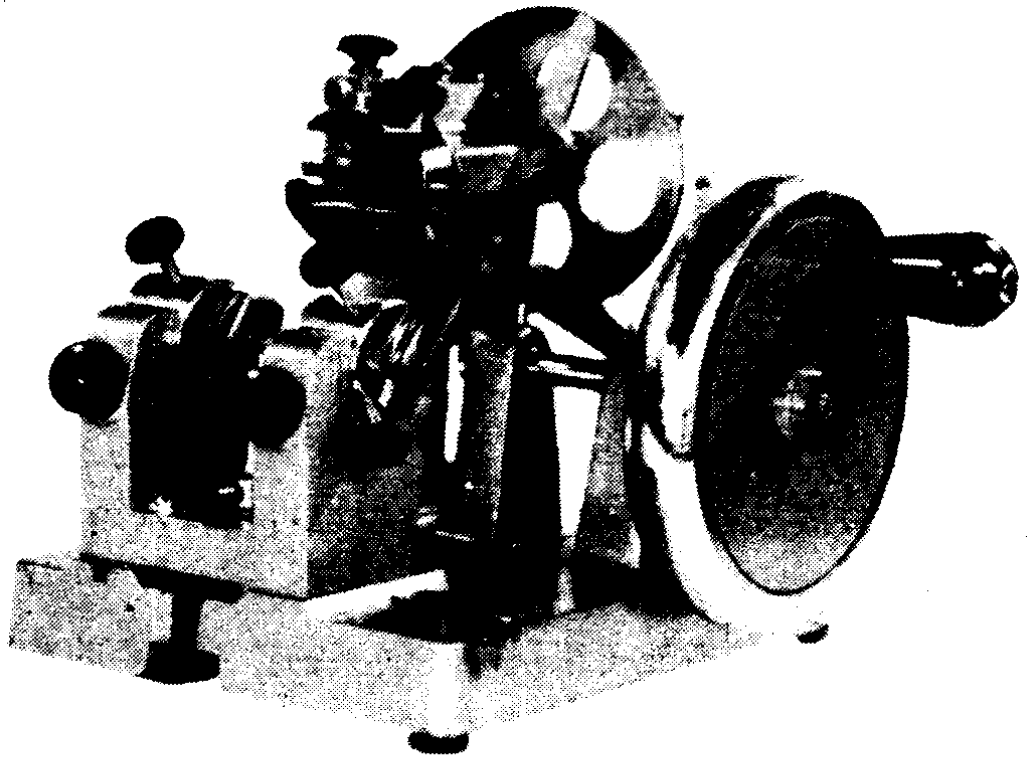


图 3 旋转式切片机
(上海产 202 型)

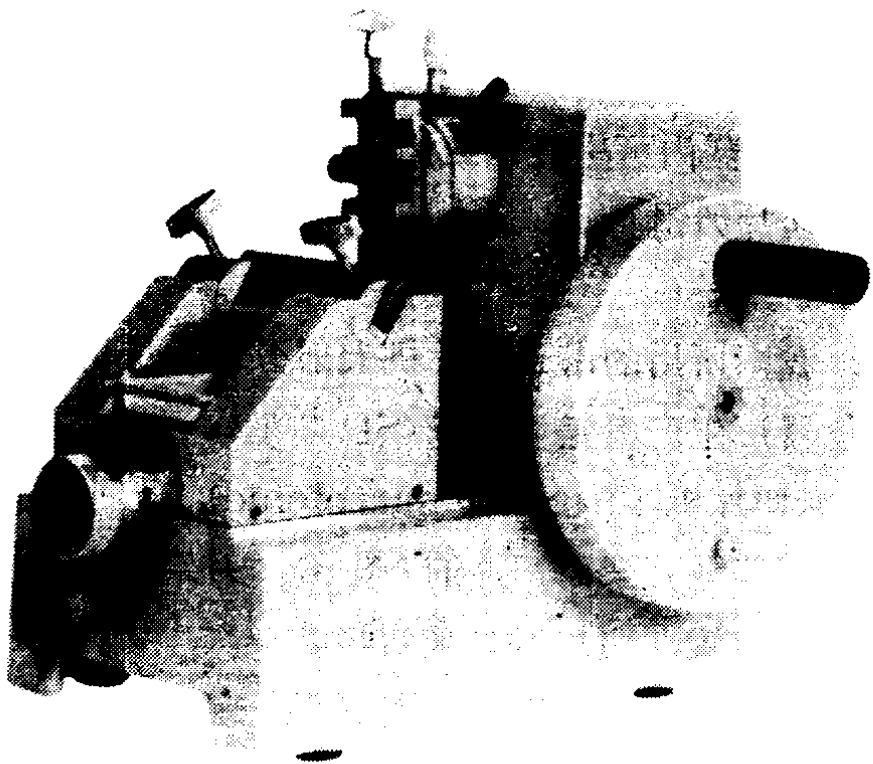


图 4 旋转式切片机
(联邦德国 Leitz 1510 型)

切片机(图4)和一般旋转切片机有所不同。它的夹物器可作上、下垂直运动,但不能作前、后移动;它的刀架借微动装置的控制可作前、后移动。机轮每旋转一次,刀架按调节好的切片厚度向前推进一次,从而切出蜡片。

近年来,我国已能生产多种型号的旋转切片机,且质量不错,如上海仪表厂生产的YL3型,山东医疗器械厂生产的LX-75型,上海医疗器械四厂生产的202型及209型都很好用。

2. 滑走切片机(sliding microtome) 这种切片机适于切火棉胶包埋块,故又称火棉胶切片机。但也可切制未经包埋的材料,如木材、木质茎和草质茎等。

这种切片机的刀架可以滑动,而夹物器是固定的。夹物器的下面连接着控制切片厚度的微动装置。当刀架在滑行轨道上滑行一次时,通过微动装置就可使夹物器向上升高一定的高度,这个高度也就是厚度计所调节的切片厚度。因此,切片刀每滑行一次就可切下一片一定厚度的切片。

联邦德国 Lietz 1207 型滑走切片机配有一只液体滴加器(图5)。根据需要,器内可盛装水或酒精,并可调节液体流出的速度。调好后,当切片刀滑行时,液体就会从小管中流出,滴加在切片刀和材料上。

至今,我国所用的滑走切片机大部分仍靠进口,国内仅有山西医学院仪器厂生产滑走切片机(SD-2型、三用)。

3. 冰冻切片机(freezing microtome) 此种切片机夹物器固定,是来回移动刀架而切片的(图6)。刀架下面连接有调节切片厚度的微动装置,切片刀每来回移动一次,材料块就按厚度计所调节的切片厚度升高一次,因而获得一定厚度的一片切片。这种切片机需配有冷冻装置,一般为二氧化碳钢瓶、半导体致冷器或自动冷冻机等。新鲜组织或已固定的组织,经致冷后即可切片,

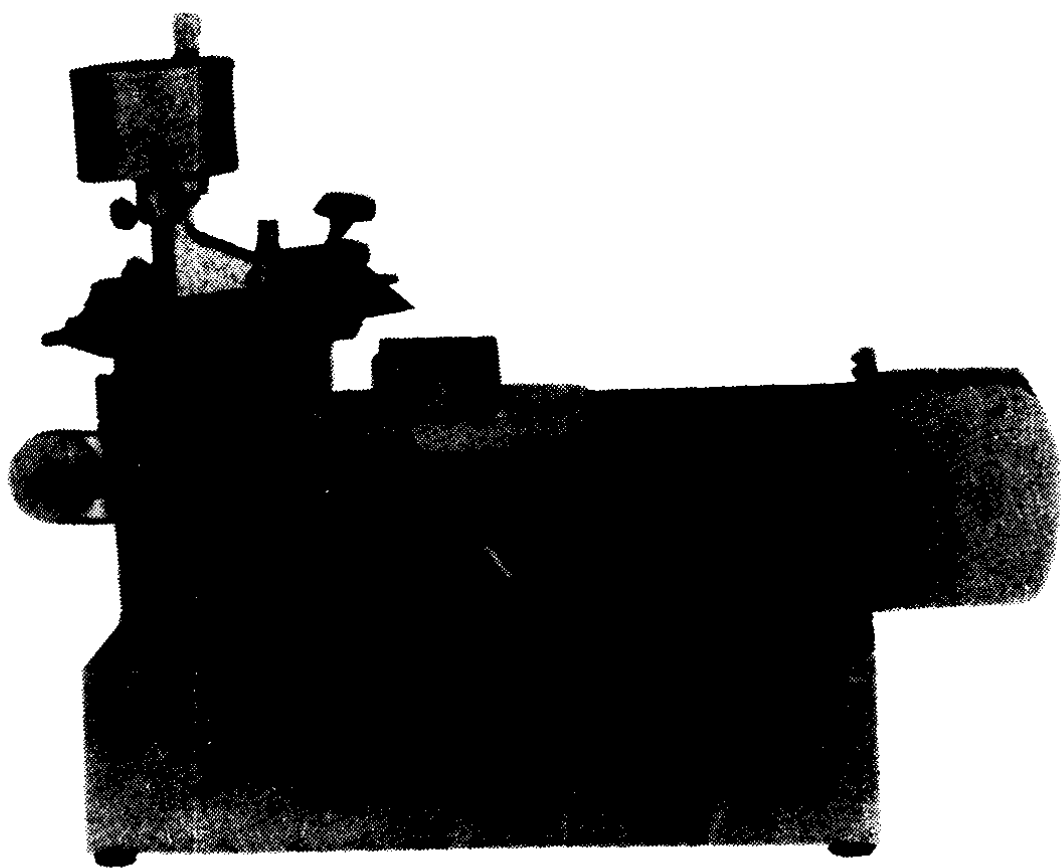


图 5 滑走切片机 (联邦德国 Leitz1207 型)

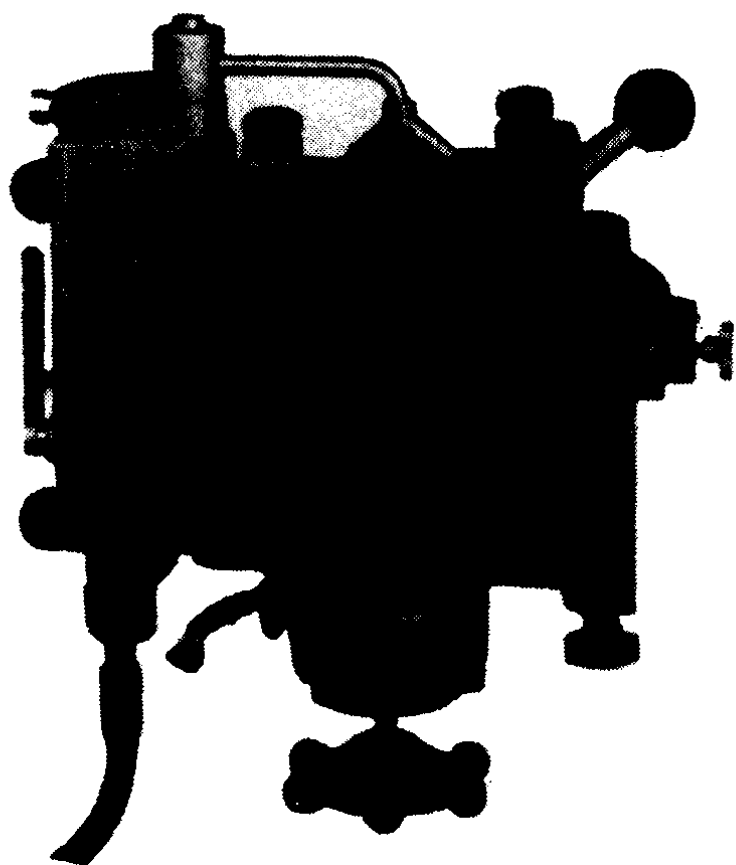


图 6 冰冻切片机

因而适用于切制临床病理组织快速检查及组织化学研究用的切片。冰冻切片机不易切出较薄的切片，且不宜作连续切片。

半导体致冷器是利用半导体温差电致冷原理制成的。操作时先接通进、出水橡皮管，保证水路畅通，再接通电源。使用完毕则先切断电源再断水。青海无线电一厂生产的 BL-3 型生物切片半导体冰冻机(为北方型机器厂,由整流电源和半导体致冷器组成,该机可配用各种切片机进行冰冻切片。BL-3A 型和 BL-3B 型为南方型生物切片半导体冰冻机,适于南方炎热地区使用。BL-3C 型是附有带水循环系统的机器。国内除青海无线电一厂生产冰冻切片机外,还有金华无线电厂生产的 BLQ 型及山西医学院仪器厂生产的 SD-2 型。

联邦德国 Lietz 电子自动冷冻机的优点是能连续而快速地更换材料块，适用于大量的病理组织检查，但价格昂贵。

(二) 切片刀

1. 切片刀的种类 切片刀是切片机的关键部件。切片刀有以下种类(图 7)：

(1) 双凹形刀 即 A 型刀。刀的两面内凹，一般用于石蜡切片。

(2) 平凹形刀 即 B 型刀。刀的一面平直，另一面内凹。平

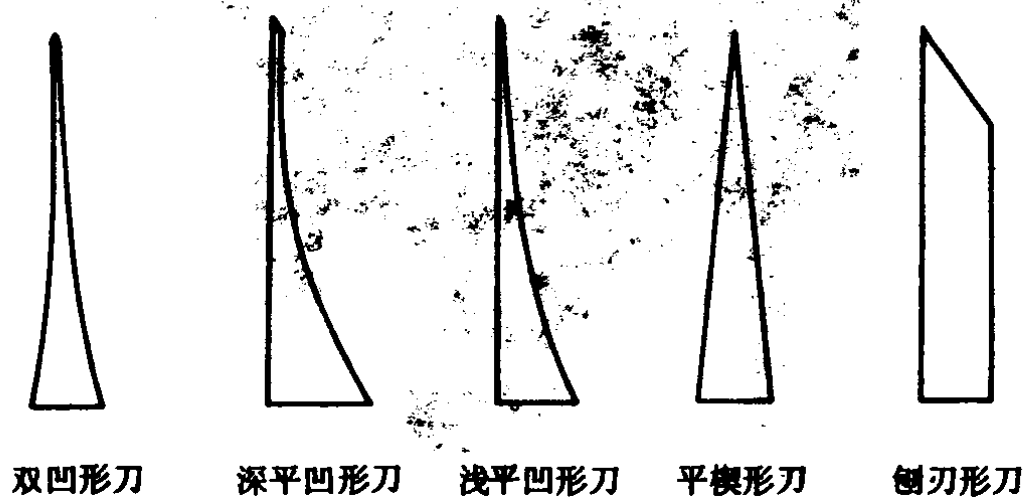


图 7 切片刀的种类