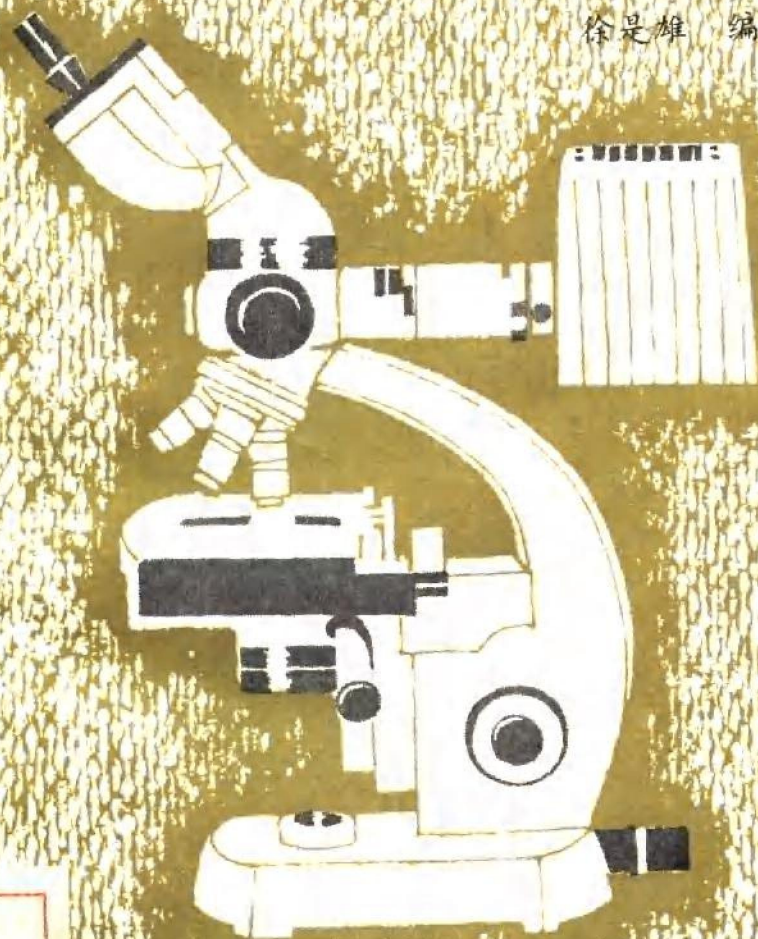


植物细胞学技术

徐是雄 编著



农业出版社

内 容 简 介

本书是香港大学植物系徐是雄博士撰写。书中着重介绍了一些植物细胞学常用的技术,包括光学显微镜、电子显微镜、荧光显微技术、免疫细胞化学、组织化学、塑料包埋等技术。书中除了扼要地叙述方法外,还谈到一般的原理。可供大专院校教师、农、林、医学科学研究人员从事细胞学、组织学及植物解剖学研究做参考。

植 物 细 胞 学 技 术

徐是雄 编著

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092毫米32开本 4.75印张 2插页 94千字

1983年12月第1版 1983年12月北京第1次印刷

印数 1—6,000册

统一书号 16144·2666 定价 0.78元

前 言

1980年和1981年暑期，我先后在北京大学和华南农学院讲授植物细胞学技术。这本小书是根据我的讲稿整理出来的。植物细胞学技术所涉及的范围相当广泛，而做报告的时间则都有限制，因此只能选择一些本人比较熟悉的题目来讲，片面性是在所难免的。所以希望读者把它作为一本“入门书”参考。由于编者的教研任务繁重，虽然花了一些时间加以整理，但书中错漏之处，相信还是很多的，希望读者批评指正。

徐是雄

1982年3月

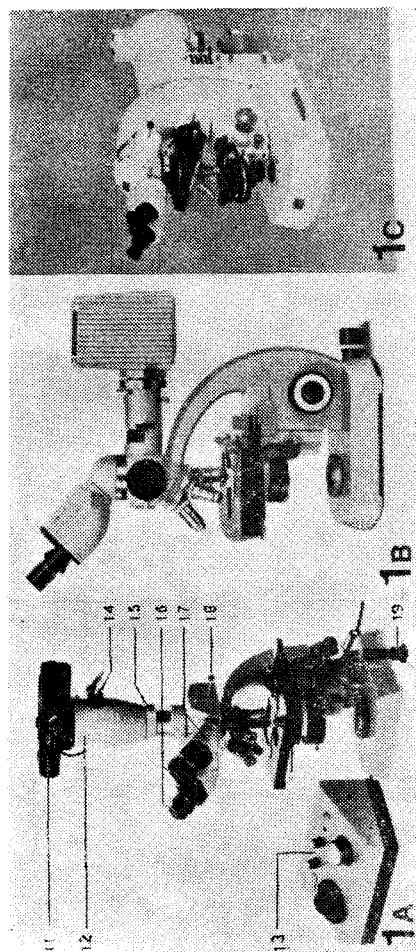


图 1A, 1B, 1C 为 Option (即西德的 Carl Zeiss) 研究用光学显微镜。1A 和 1B 为比较便宜的研究用光学显微镜。1C 为相当昂贵的“万能”光学显微镜。根据我个人的经验如果配有一套 1A (明场 + 相差) 以及一套 1B 表面荧光 + 干涉系统, 所需要的价钱要比买一台“万能”的还要便宜, 而且使用起来更方便。最好 1A 和 1B 上都加配一幅自动照相系统, 其中一幅放黑白底片, 另一幅放彩色。如能这样配套, 比买一台“万能”的可以达到更高利用率。1.1 = 照相机 (可以自动卷底片); 1.2 = 照相机下吊装置; 1.3 = 曝光控制系统; 1.4 = 测光仪; 1.5 = 衔接照相机系统与目镜管的螺丝圈; 1.6 = 目镜; 1.7 = 供目镜和放照相机的三头筒装置; 1.8 = 转换光方向的机制; 1.9 = 供校正影像焦距的放大镜 (放在目镜上观察)。注意: 现今的新式照相系统, 都无需要在照相机下, 另外装一个供校正影像的目镜。因为双目镜的焦距与照相机的焦距是一样的, 所以只要在双目镜中看到清晰的影像, 便可以马上按钮 (在 1.3 上) 拍照, 跟着照相机便会自动卷片, 供拍第二张照, 快速方便。

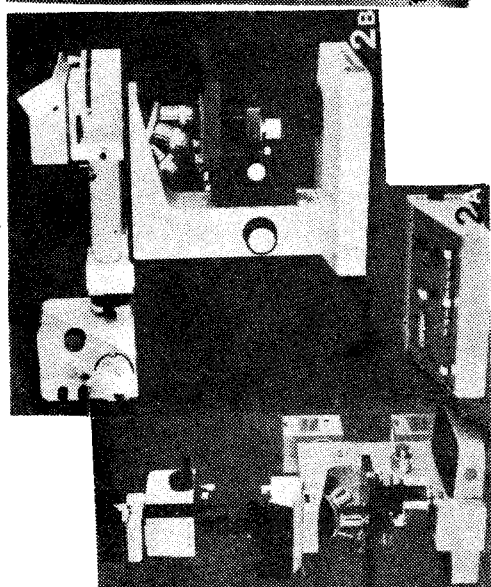


图 2A, 2B 为 Leitz (西德) 研究用光学显微镜外形。2A 为装有照相系统的光显微镜。2B 为表面荧光显微镜。

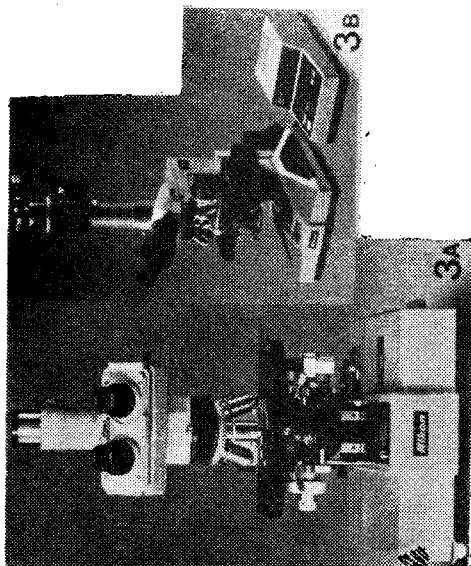


图 3A, 3B 为 Nikon (日本) 研究用光学显微镜外形。3A 正面观。3B 装有自动照相系统的光显微镜。

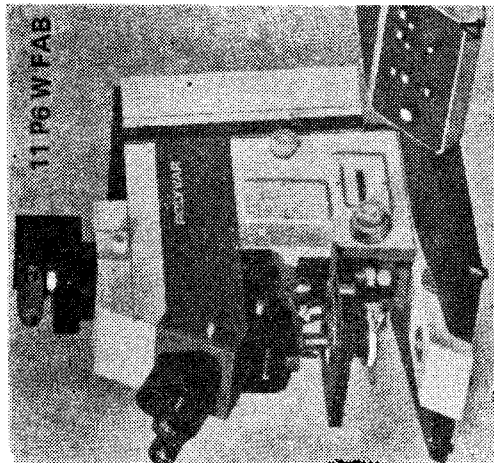


图 4 为 Reichert (奥地利) 研究用
“万能”光学显微镜。

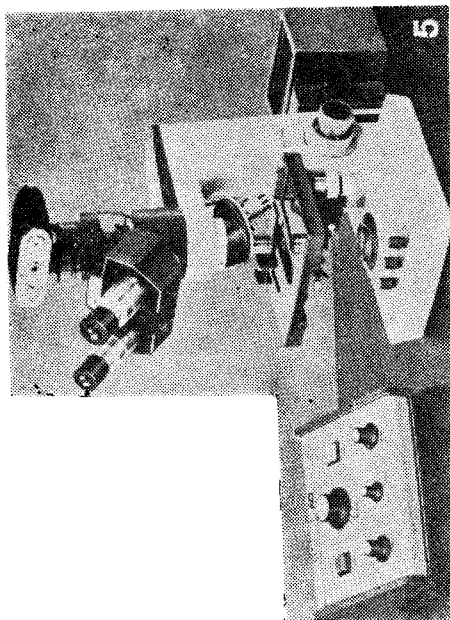


图 5 为 AO (美国) 研究用光学显微镜。

目 录

前言

一、光学显微镜.....	1
I. 明场（或明视场）显微镜	1
II. 暗场（或暗视场）显微镜	12
III. 相差显微镜	13
IV. 干涉显微镜	16
V. 偏振光显微镜	17
VI. 荧光显微镜	19
VII. 显微照相.....	23
二、电子显微镜	30
I. 透射式电镜	30
II. 冰冻蚀刻法	32
III. 扫描电子显微镜	36
IV. 干燥材料方法	41
V. X射线微区分析.....	47
三、荧光显微技术.....	52
I. 染色体显带技术	52
1. 阿的平（Quinacrine）染色体Q带技术	52
2. 在同一染色体上显现Q带和C带技术.....	53
3. 改良的Q带技术	54
4. 吖啶橙显带染色法	55
5. Hoechst33258 染色法（即33258-H 法）	55
6. D-带技术	57

7. R-带技术	57
8. AMD + DAPI显带法	58
II. 其它荧光技术	59
1. 染DNA技术	59
2. 染“胼胝质”技术	60
3. 染花粉技术	61
4. 显示Ca ⁺⁺ 梯度技术	62
5. 染β-葡聚糖技术	62
6. 一些染细胞壁的荧光染料	63
7. 活体染色技术	63
8. 原生质体染色	64
9. 染膜脂技术	64
10. 染蛋白质技术	65
III. 荧光染料衬染(对染)	65
四、免疫细胞化学技术	71
I. 免疫荧光定位技术	73
1. 抗原的制备	73
2. 抗体的专一性或特异性能的测试	75
3. 用荧光标记抗体	76
4. 抗原与抗体—荧光标记的结合	76
5. 植物标本的制备	77
II. 免疫电子显微镜定位技术	78
III. 在植物体上做免疫定位的技术	79
IV. 免疫定位膺象	80
V. 免疫定位技术在植物上的应用	81
VI. 单克隆抗体(monoclonal antibodies) 技术	83
五、组织化学技术	89
I. 细胞酶化学(enzyme cytochemistry) 技术	89
1. 冰冻切片	89

2. JB4-GMA低温包埋法	90
3. 酶定位方法	93
II. 凝聚素或外源凝集素(Lectin)技术	96
1. 标记凝聚素	101
2. 固定组织或细胞	103
3. 凝聚素和细胞的结合	104
4. 电镜观察	104
III. 扫描电镜细胞表面标记技术	105
六、供光、电镜应用的塑料包埋剂	110
I. GMA塑料包埋剂	110
II. Lowicryl塑料包埋剂	113
七、附录	117
I. 供应电镜用试剂、染料、配套仪器等的一些外国厂家名 称和地址	117
II. 一些供应各种试剂、染料等的外国厂家名称和地址	118
III. 供应电镜试剂、免疫试剂、放射物质的一些外国厂家名 称和地址	120
IV. 供细胞化学实验用的缓冲液配方	123
V. 固定液配方	137
VI. 一些常用的荧光染料的激发光与荧光波段的特征	139

一、光学显微镜

I. 明场（或明视场）显微镜

最常用的光学显微镜为明场（bright field）显微镜。图 1.1 为一幅明场显微镜的剖面图。从图中我们可以看到一幅供研究用的明场显微镜，基本上需要具备以下几种配件：(A) 光源；(B) 聚光镜；(C) 物镜；(D) 目镜。下面扼要地介绍一下这些配件的性能和功用〔1〕〔2〕。

(A) 光源 供光学显微镜用的光源有好几种，表 1.1 列出了一些常用的灯源及其适用范围。

(B) 聚光镜 聚光镜的类型有好几种。但基本上可以分为两大

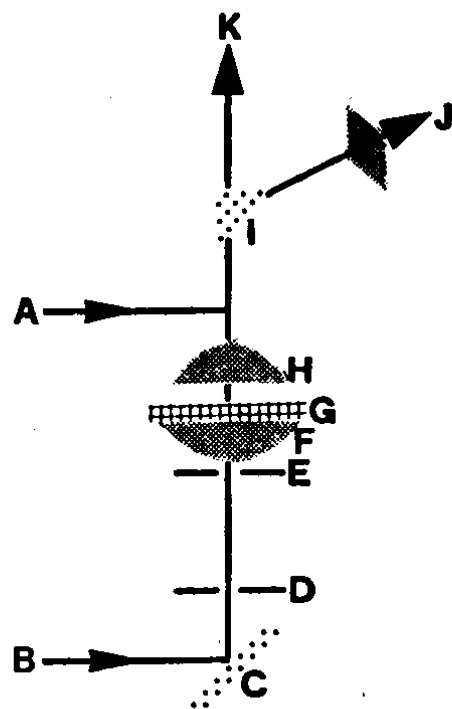


图 1.1 光学显微镜的结构图
A—投射光源；B—透射光源；C—反射镜；D—视场孔径光栏；E—聚光镜孔径光栏；F—聚光镜；G—标本；H—物镜；I—棱镜；J—目镜；K—照相系统。

表 1.1 一些适宜光学显微镜用的灯

光源	色温最高可达	摄影适用
6 V 5 W (低电压灯)	2400°K	黑白底片
6 V 15 W (低电压灯)	2850°K	黑白底片
6 V 30 W (低电压灯)	3400°K	黑白底片和人工光源彩色底片
12 V 60 W (低电压灯)	3400°K	黑白底片和人工光源彩色底片
12 V 50 W (钨卤素灯)	3400°K	黑白底片和人工光源彩色底片
12 V 100 W (钨卤素灯)	3400°K	黑白底片和人工光源彩色底片
20 V 150 W (氙 灯)	6000°K	黑白底片 (需用中性滤光片来减低光强度); 用自然光感光彩色底片
50—200 W (汞 灯)	专供荧光显微镜用	高速感光底片其它与氙灯同

注意：每一家供应显微镜的厂家都有专用的灯，所以在购置时最好了解清楚厂家提供的灯的性能和类型。

类：一类为干燥聚光镜系统(dry condenser system)，其数值孔径(N.A.)一般都较低：有 0.45、0.6、0.7 等，最高能到达0.9；另一类为浸油聚光镜，其数值孔径可高至1.3—1.4，与具有高数值孔径的石英系统物镜 (fluorite systems) 平场复消色差物镜 (planapochromats) 配合来用效果最好。但如不用油，最高 N. A. 则只能到达 1；所以不论是明场物镜，相差物镜或干涉物镜系统，如果用高N.A. 物镜，必须将聚光镜加以油浸，才能得到最佳效果的。其次，在每一聚光镜外壳上都刻有数值孔径的数值，所以在使用显微镜时，要注意聚光镜的数值孔径，是否与物镜的数值孔径匹配，只有这样才能得到好的分辨率（或鉴别率）和清晰度。

(C) 物镜 物镜是光学显微镜中最重要的部件，因为它直接决定了显微镜的质量和性能。下面介绍一下几种不同

类型的物镜:

(1) 消色差物镜 (achromats) —— 这种物镜没有完全消除色球差 (chromatic和spherical aberration), 因此不适宜用来做显微摄影。

色差 (chromatic aberration) 的形成, 主要是由于光波长不一, 以及透镜的厚薄不一所导致的偏差 (图 1.2a)。消色差物镜虽然对色差有所校正, 但剩余色差还是较大。

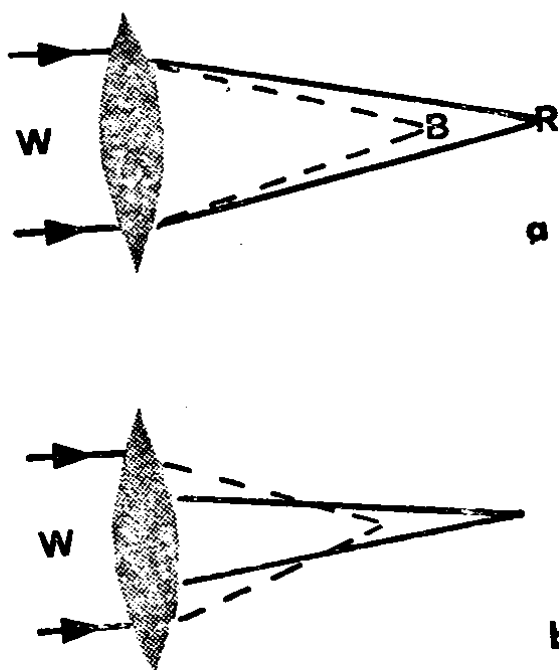


图 1.2a 色差的形成。当白光经过透镜以后, 各种颜色的光便分解开来。各种颜色光由于波长不一样 (有长有短), 故此形成的象焦位置便有差别 [譬如图中的红光 (R) 和蓝光 (B) 的焦点就不一样]。这种象焦位置之差, 叫做“位置色差”或“轴向色差”。

图 1.2b 球差的形成。当光线通过透镜时, 由于球面弯曲的关系, 中央的光线的焦点离透镜远, 而边缘的光线焦点则离透镜近。因此它们就不能聚焦在同一点上。这叫做球差。

另一种比较严重的透镜偏差叫球差。这种偏差的形成，是由于透镜的弯曲度的不一，使象面不能同时聚焦在一点上，造成象面弯曲（图 1.2b）。现今市面上也有经校正过的色球差物镜（即平场消色差物镜 planachromat）出售。但其成像效果则没有平场复消色差物镜来得好。

（2）平场复消色差物镜——这种物镜把消色差物镜所不能校正的二极光谱（secondary spectrum）也消除掉，因此剩余色差较消色差物镜少；同时又具备平场性能，所以这类物镜最适合供研究细胞用。表 1.2a 列出了一些各类物镜的特征；而表 1.2b 则列出了一些平场复消色差物镜的种类。

表 1.2a 一些物镜的被校正特征

物 镜 类 型	色 差 的 校 正	球 差 的 校 正
消色差物镜	二种光波（红、蓝）	一种光波（黄—绿）
半复消色差物镜	二种光波（红、蓝）	二种光波（红、蓝）
复消色差物镜	三种光波（红、蓝、绿）	二种光波（红、蓝）

表 1.2b 平场复消色差物镜的种类

放 大 率	数 值 孔 径	工作距离(毫米)*
干 燥 系 统 { 4 ×	0.16	2.5
10 ×	0.32	0.35
25 ×	0.65	0.14
40 ×	0.95	0.09
油 浸 系 统 { 40 ×	1.0	0.09
63 ×	1.4	0.09
100 ×	1.3	0.09

* 工作距离指的是从物镜最外面的一块透镜表面，至盖玻片表面的距离。从表中我们可以看到，物镜的放大率愈大，工作距离则愈小。

另外在使用这些物镜时,一定得应用 0.17 毫米厚度的盖玻片。因为这些物镜一般都是按这个盖玻片厚度来校正象差的(注意:0.17 毫米厚度相等于NO.1盖玻片。NO.0盖玻片最薄为0.1毫米;而NO.3则最厚,约为0.3毫米)。为了适应不同厚度的盖片,在有些高倍物镜上有时配有一个可以调控的校正光栏 (correction collar),这是专门用来校正不同盖玻片 (0.11—0.23 毫米范围) 厚度的偏差的。另外,在有一些物镜上还配有一个供调整暗视场 (dark-field) 明暗度的光栏 (iris),这在明场观察情况下得把它打开。

(3) 石英或萤石物镜系统 (fluorite system) ——这种物镜是专供用紫外光为激发光源来做荧光观察的。用石英做的物镜,不会吸收紫外光和不会产生自发荧光。这种物镜也可以有复消色差以及平场性能。还有一些石英物镜是专用甘油油浸的,这些物镜供荧光观察最为理想。有些厂家现时还提供同时适合三种不同液浸系统(即水、油、甘油)的物镜。

上面提到的各种物镜的类型和特征,一般都刻在物镜的外壳上,让我们可以一目了然。譬如,某一物镜的外壳上如刻有以下这些资料:

160/0.17

Pl Apo Oel 100/1.32

那么这些资料的意思分别是:

160——筒长 (毫米)(有些采用 170 毫米筒长)

0.17——应采用盖玻片厚度 (毫米)

Pl——平场物镜

Apo——复消色差物镜

Oel——需要油浸

100——放大率

1.32——数值孔径

(D) 目镜 目镜是用来观察和放大被检物被物镜所形成的象的。最常用的目镜有两种类型: (i) 惠更斯目镜 (Huyghenian type) 和(ii) 冉斯登目镜 (Ramsden type)。大多数用于观察用的目镜为惠更斯型。但如要在目镜中加测量用的分划板 (micrometer disk), 那么就得改用冉斯登目镜。现今一般供细胞研究用的目镜, 还包括以下一些性能: 平场 (flat-field)、广角 (wide-angle)、高焦点 (highpoint 供戴眼镜者使用)、摄影目镜等。另外, 还有一种补偿目镜 (compensating eyepiece), 它的垂轴色差是经校正过的。但在使用这种目镜时需要有匹配的物镜 (怎样选用适当的目镜和物镜, 应参考厂家的说明书)。

显微镜的鉴别率

明场显微镜的鉴别率 (或分辨率) 是指把两物体分辨开的最小距离。影响鉴别率的因素有许多, 但主要受波长和数值孔径这两个因素的影响; 用公式来表示即:

$$\text{鉴别率 (R)} = \frac{0.61\lambda}{N.A.}$$

$$\left[\text{也可以写成 } R = \frac{\lambda}{2N.A.} \text{ 或 } \frac{1.22\lambda}{N.A. + N.A.} \right]$$

物镜 聚光镜

式中： λ = 所用的光线的波长；

N. A. = 数值孔径 (numerical aperture)。

从以上的公式我们可以看到，如要提高物镜的鉴别率，有两条途径：

(1) 减小所用光线的波长——大家都知道，白光是由七种色光组成的。其中红光波最长，紫光波最短。比紫光波还短的还有紫外线，但因为紫外线为不可见光，因此在一般的光学显微镜中都不能用，除非用紫外线显微镜。故此如要用减短光波长度，来增加光学显微镜的鉴别率是很困难的。

(2) 增加数值孔径(N. A.)——数值孔径是由两个参数组成的即：

$$N. A. = n \sin u$$

式中： n = 物空间介质的折射率；

u = 物方孔径角 (图 1.3)。

理论上如将物方孔径角扩至最大即： $u = 90^\circ$ ，

那么 $\sin u = \sin 90^\circ = 1$ 又假如只用干燥物镜系统，那么物镜与盖玻片之间的介质为空气，而空气的折射率为 1；在这种情况下 N. A. 的数值，最大只能达到 1。但事实上，一般的干燥系统物镜的 N. A. 都比 1 小。譬如比较高倍的干燥物镜 $63\times$ 也只能达到 N. A. = 0.85 而已。其次，如果我们把干燥系统的物方孔径角扩展得太大，那么我们还会碰到另外一个问题，就是在空气与玻璃盖片之间部分的光是会被折射回来而不进入物镜 (图 1.3)。如要克服这一困难，唯一的方法是用液浸系统来提高物镜的空间介质的折射率。譬如我们可以把物镜空间介质改换水浸系统或油浸系统 (图 1.3)。因为

水和油的折射率都比空气大（水的折射率为 1.333，香柏油的折射率为 1.515，甘油的为 1.473）。这就是为什么 100 倍的油浸物镜的数值孔径可高至 1.25 或 1.4 的缘故。

此外，封固剂的选择也很重要（这在观察不染色的活体标本或在相差显微镜下观察尤其重要），因为封固剂的种类很多。下面列出一些常用的封固剂的折射率^[3]：

水	1.333
酒精	1.362
酚（石炭酸）	1.385
水释甘油(10%)	1.397
甘油	1.473
油派胶	1.480
阿拉伯树胶	1.480 (1.514)
明胶（各种）	1.516—1.534
羟苯甲酸甲酯（methyl salicylate）	1.535
加拿大树胶	1.524 (1.530)
香柏油	1.533
水合氯醛	1.538
蔗糖	1.538 (1.565)
苏合香	1.580
苯胺油	1.584
一溴萘	1.657
雄黄	1.658
玻璃	1.50—1.75

知道了 N.A. 的重要性之后，让我们再来看一下 $R = \frac{0.61\lambda}{N.A.}$ 这一公式。假如我们用单色绿光照明，它的波长为 0.55 微米；又假如我们用 N.A. = 1.3 的油镜，那么代入