

高等学校教学用书

现代生物学 实验技术

张启元 等编



北京师范大学出版社

高等学校教学用书

现代生物学实验技术

张启元 等编

北京师范大学出版社

高等学校教学用书
现代生物学实验技术
张启元 等 编

*

北京师范大学出版社出版
新华书店总店科技发行所发行
中国科学院印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 19.125 字数: 475 千
1992 年 4 月第 1 版 1992 年 4 月第 1 次印刷
印数: 1—2 300

493

ISBN 7-303-01390-3/Q·28

定价: 5.00 元

本书编者(按章节顺序排序)

张启元	李素文	张鸿卿	凌世瑜
王秀奇	袁玉信	何忠效	张崇浩
张铁恒	云自厚	魏 群	李成文
鲍家驹	刘忠敏	黄远樟	陈贤欽

序

新技术和新仪器设备的发展,对现代生物学的进展起着十分重要的作用。本世纪 30 年代,电子显微镜的出现使我们可以看到细胞内部亚显微结构;40 年代层析技术和电泳技术的兴起大大地推动了生物大分子分离纯化及结构测定的工作;同位素示踪技术的应用使我们洞悉生物体细胞中新陈代谢变化的内幕;近些年来,DNA 重组技术、单克隆抗体技术、微量化学技术与设备,以及电子计算机技术的综合应用,不但使生物科学的研究进入了一个崭新的水平,而且大大缩短了理论与实践之间的距离。例如人类基因组全结构的研究,只有在染色体分离技术、分子克隆技术、脉冲电泳技术、人造酵母染色体技术、限制性内切酶 DNA 片段多样性技术、快速 DNA 顺序测定技术和电子计算机技术等技术条件成熟的今天,才有可能着手开展。所有这些都说明,掌握现代生物学常用的实验方法和研究技术,对于生物科学工作者来说是十分必要的。

《现代生物学实验技术》一书的主要目的,就是为综合性大学理科、师范、医药及农业大学的生物学及其相关专业的研究生和高年级本科生提供一本教材,也可供从事生物学及其他相关学科的工作人员参考。

本书是根据北京师范大学生物系 1983 年以来为本系各专业研究生开设的“现代生物学实验技术”实验学位课编写的讲义,经修改整理而成的。每章内容均包括方法的基本理论、方法原理、技术特点和基本操作要求,最后还附有实验及主要参考文献。本书编者绝大部分为本系各教研室的教师,个别章节邀请外单位同志编写,全书的统一编审工作由吴国利完成。

在本书的出版过程中,得到了学校领导、自然科学处及师大出版社的大力支持,长期负责本课程教学组织工作的武爱老师和师大出版社责任编辑杨江城副编审为本书出版做了大量的工作,在此一并表示感谢。

由于编者的水平有限,有关内容的选择又较多地考虑教学上的需要,故难以满足各界读者的要求,请批评指正。

吴国利 1991 年 10 月
于北京师范大学生物系

目 录

序言

第一章 超薄切片技术	1
一、固定、脱水	1
二、浸透包埋、聚合	5
三、切片及切片的安放	7
四、染色	13
第二章 显微镜光度术	18
一、显微镜吸收光度术	18
二、显微镜荧光光度术	23
三、显微镜反射光度术测量放射自显影银粒的反射光	29
实验一 孚尔根染色测定小鼠肝细胞和精细胞的 DNA 含量	31
实验二 对同一细胞内 DNA RNA 和蛋白质相对含量的显微荧光光度测定	36
实验三 对小鼠艾氏腹水癌细胞放射自显影银粒的测量	37
第三章 动物细胞培养	38
一、组织培养的概念	38
二、组织培养技术的出现和发展	38
三、组织培养的基本条件	40
四 培养方法	43
五、细胞株系	45
实验一 原代培养	48
实验二 细胞常规保种法(传代培养)	50
实验三 淋巴细胞杂交瘤技术及单克隆抗体	52
第四章 植物组织培养	56
一、植物组织培养的概念和意义	56
二、植物组织培养的理论基础	58
三 植物组织培养方法简介	60
实验一 植物激素对植物器官发生的作用	65
实验二 花药培养	66
实验三 植物细胞的悬浮培养	66
第五章 超离心技术	68
一、离心原理	68
二、沉降系数	70
三、离心方法	73
四、仪器设备及操作	78
五、各种离心机的应用	80
实验一 细胞器的分离及其标志酶的测定	80
实验二 用蔗糖密度梯度离心分离 RNA 混合物	87
第六章 薄膜氧电极测溶氧技术	89

一、基本原理	89
二、氧电极测氧仪的装配和使用	89
三、溶氧测定技术的应用	92
实验一 线粒体活性的测定	92
实验二 光合和呼吸速率的测定	96
实验三 过氧化氢酶活性的测定	97
第七章 离子交换层析	100
一、基本原理	100
二、层析条件的选择	101
三、操作步骤	105
第八章 气相色谱分析技术	108
一、引论和基本原理	108
二、气相色谱仪	110
三 气相色谱分析技术在生物学中的应用	117
实验一 乙烯的气相色谱分析	119
实验二 脱落酸的气相色谱分析	120
附: 气相色谱-质谱联用分析	121
第九章 高效液相色谱法	128
一、引论	128
二 高效液相色谱法的类型及分离原理	129
三、高效液相色谱的固定相和流动相	130
四、高效液相色谱仪	132
五、分离方法及色谱条件的选择	136
实验一 反相高效液相色谱法测定植物体内的细胞分裂素	137
实验二 昆虫或蛱蝶类蜕皮激素的高效液相色谱分析	138
第十章 聚丙烯酰胺凝胶电泳	140
一、基本原理	140
二、平板聚丙烯酰胺凝胶电泳	149
实验一蛋白质的分离纯化及纯度鉴定	152
第十一章 印迹法	155
印迹法的基本原理和方法	155
印迹法实验(蛋白质免疫印迹)	157
第十二章 蛋白质的免疫标记技术	161
一、酶标记抗体技术	161
二、生物素亲合素免疫标记试剂的制备方法与技术	165
三、胶体金标记抗体技术	168
实验 辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 的制备	172
第十三章 基因工程技术	174
一、载体	174
二 目的基因	179
三 目的基因和载体的连接	181
四、重组 DNA 分子导入宿主细胞和特异性克隆的筛选及分析	183
实验一 质粒 DNA 的快速分离	185

实验二 限制性内切酶消解质粒 DNA	186
实验三 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段	187
实验四 缺口翻译法标记探针	188
实验五 Southern 转移杂交	189
第十四章 放射性核素示踪技术	191
一、基本原理	191
二、放射性样品的测量仪器及方法	196
三、液体闪烁测量技术	199
四、放射自显影术	211
五、竞争放射分析	219
六、放射卫生防护	225
实验一 定标器的使用及 G-M 计数管坪曲线的测定	230
实验二 几何位置对测量的影响	233
实验三 放射性核素制剂的开瓶、稀释和分装	233
实验四 ^{169}Yb -柠檬酸在小鼠体内的分布	234
实验五 整体放射自显影	235
实验六 组织和细胞放射自显影	236
实验七 液体闪烁测量方法	237
实验八 液体闪烁计数器效率的确定——淬灭校正	238
实验九 皮质醇放射免疫分析	239
附录	
一、常用放射性核素表	242
二、部分常用放射性核素半衰期校正表	246
三、放射性核素衰变因子 $e^{\lambda t}$ 的数值表	250
第十五章 生命科学中的计算机技术	251
一、引论	251
二、科学计算	251
三、计算机辅助教育	252
四、计算机模拟	254
五、在生命科学实验室中的应用	256
六、计算机图像处理技术	259
七、计算机信息处理功能的应用	265
八、生命科学中的现代化管理	266
第十六章 生物学文献检索与利用	270
一、主要文献	270
二、文献检索与利用	286
三、计算机文献检索	295

第一章 超薄切片技术

为了研究细胞组织的精细结构，甚至是分子、原子的排列，需要借助电子显微镜作为观察工具。电镜以电子束作光源。电子束的穿透能力是有限度的，在常规透射电镜的工作电压(50—100KV)的情况下，所观察的样品厚度最多不能超过 0.1μ ，而一般生物样品约 10μ 左右，电子束是穿透不过去的。加之，生物组织的主要成分之一为水，当生物样品放入电镜的时候，镜体高真空在 10^{-5} 托以上，会使样品发生严重脱水现象，改变组织内部的空间构型，失去原有生物组织的结构。而构成生物样品的元素大多为轻元素，如 C、H、O₂、P、N 等，这些元素之间散射电子的能力相差无几，反差很弱，而难以观察。因此，要考虑到使样品获得足以让电子束穿透，并代表原来活体状态且加强反差，必须制备非常薄的切片，一般在 $1000\text{ \AA}$ 以下，通常称超薄切片，才能获得高分辨率的超微结构图象。超薄切片方法是电镜技术中最基本的方法，是其它一切制片方法的基础(如电镜细胞化学、电镜放射自显影等)，所制样品能观察到绝大多数的生物超微结构。因此，本章对超薄切片法作为最基本的技术介绍。其制备过程如下(图 1-1)。

固定：处死动物，取出组织，经固定把细胞间的联系，细胞器的全部精细结构尽可能真实地保存下来。

脱水：从组织中除去全部水份，并用一种能与水也能与渗透液相混溶的惰性液体取代水。

浸透包埋：用另一种溶液或混合液取代脱水液而渗入组织，这种溶液很容易硬化成固体，此固体具有足够弹性与硬度，可切出 $600\text{ \AA}$ 左右的平滑切片。

聚合：使渗入组织里的渗透液变硬，以便形成一个能牢固地支持组织的固态基质，而不混乱其空间联系。

切片：把带有组织的固定基质切成 $600\text{ \AA}$ 左右的超薄切片。

安放：把切片移至样品支持载网上，以便放入电子显微镜中观察。

切片染色：使载网上的切片和重金属溶液反应，来增加组织成分的不同电子散射能力(反差)。

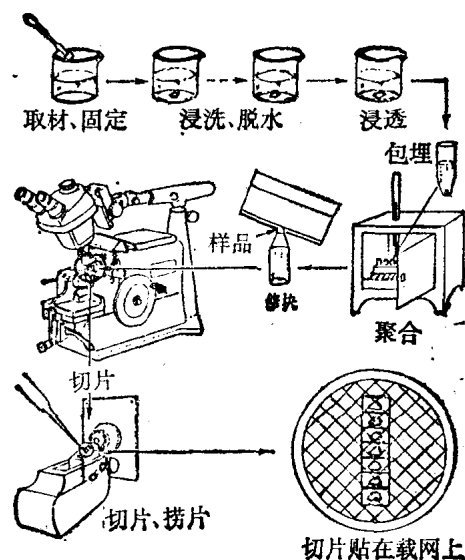


图 1-1 常规超薄切片技术图解

一、固定、脱水

(一) 固定的原理

固定中的第一个问题是获得正常生命状态下的细胞。当固定液到达组织后，第二个问题

是确保它能穿过细胞外的结缔组织和细胞的原生质膜，并尽可能立即扩散到整个细胞质和核质中。当固定液通过细胞时，原生质的粘液胶体蛋白质变成有弹性的硬凝胶体。由于固定液和原生质液间存在渗透压的差异，可能引起细胞器的破裂效应，固定液与原生质接触处发生化学反应可能释放出 H^+ 引起 pH 变化。因此，在固定液中除去使蛋白“变性”和凝胶化而起固定作用的物质外，还应包括下述两种成分：

(1) 中性盐或其他惰性物质使溶液和组织液等渗。

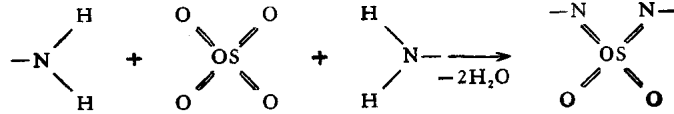
(2) 缓冲液，以“吸收”释放出来的 H^+ 和 OH^- 离子，并避免固定液与组织液混合时引起固定液稀释。缓冲液中的盐类用以增加固定液的渗透压。

实际上，没有哪一种物质能完成固定所要求的全部功能， OsO_4 是理想物质，它与蛋白质发生化学结合形成交链来稳定蛋白质，为近乎完美的细微结构保存剂。它与细胞所有的成份都能发生化学结合，钼留在固定的细胞中牢牢附着在它所稳定的结构上。由于它能产生较好的电子反差，因此，几乎可以刻画出细胞的结构。

OsO_4 (四氧化钼)，误称为钼酸。为淡黄色晶体，有强刺激味，分子量为 254.2，熔点为 $41^\circ C$ ，沸点 $131^\circ C$ ，其水溶液为中性。 OsO_4 为强氧化剂，它对氮的巨大亲合力决定了它对细胞质各种结构及其含物的活跃的影响。

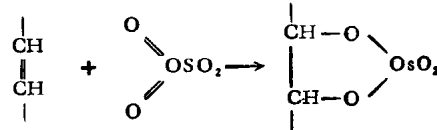
OsO_4 对生物材料的作用分两个阶段

第一阶段：细胞结构的迅速固定。 OsO_4 与含氮基团和氨基成分结合：

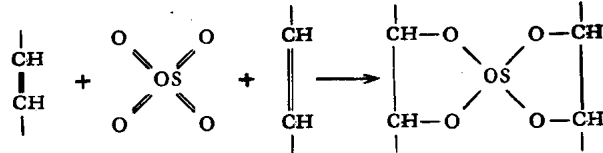


其化合过程也可在没有脱氧作用的情况下进行。

(1) OsO_4 与一个碳链的化合：



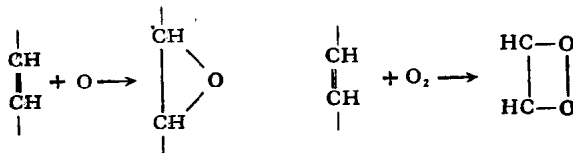
(2) OsO_4 与两个相邻碳链的化合：



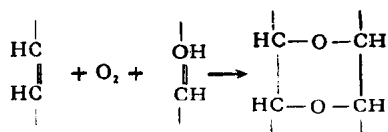
这些复合物的形成会使多肽链上或多肽链间的 NH_2 基得到固定。

第二阶段： OsO_4 表现出氧化剂特性。形成含有环氧基的化合物 $\begin{array}{c} \text{C}-\text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$ 和第一个碳

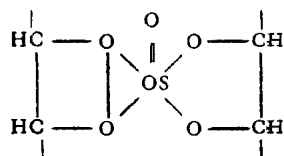
链的过氧链：



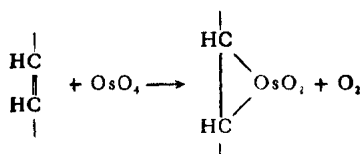
或在两个碳链间形成氧桥：



OsO_4 在水溶液中,与不饱和的类脂化合物在两个酸性链间形成牢固的键,形成假定的鞣酸的 H_4OsO_n 的双醚。



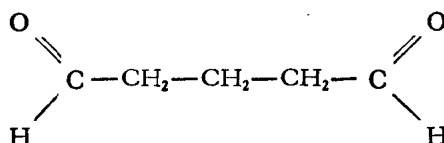
在某些反应中, OsO_4 仅被还原为二氧化化合物



许多蛋白质和类脂与 OsO_4 反应的产物都易溶于水,特别是经长时间固定后更易溶解。但其渗透慢,因之外层材料受到固定剂作用时间比内层长,材料长时间停留在 OsO_4 溶液中会引起一些脂蛋白复合体溶解,使组织变脆,其与醇类、醛类发生反应而生成沉淀,因此必须清洗后才能进入醇类中脱水。

OsO_4 水溶液如贮存时间过长,或沾染油污时还原成 OsO_2 (钨黑),显黑色而失效。因此,配制时所用器皿必须清洗干净,绝不能有油污。由于其为剧毒,其蒸气对角膜及呼吸道粘膜有害,配制时要先将装 OsO_4 小瓶(或安瓿)洗净,将其放入一洁净的棕色瓶内,并内可装 25ml 或 50ml 蒸馏水(一般按配制 2% OsO_4 原液用),摇荡棕色瓶,使装 OsO_4 小瓶(或安瓿)打碎在瓶内即可。配毕保存在 0—4℃ 为宜。由于四氧钨溶液溶解较慢,可于使用前 1—2 天配制。

戊二醛为一种五碳醛,有两个醛基 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), 其结构式为:



其特点为渗透入组织较快,保持细胞的精细结构好,恰可弥补 OsO_4 固定之不足。

戊二醛溶液中除单体外,还有多聚体存在,在 pH 等于 8 时,单体大量聚合成白色沉淀物。

单体借它的醛基吸水成亚甲基二醇 $-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ 而起固定作用。固定组织作超薄切片一般用

4% 溶在磷酸缓冲液中, pH = 7.4, 因戊二醛有两个醛基,在固定时,约有 10—15% 的分子只有一端与组织基团结合,而其他一端醛基游离,因而呈非特异性的过碘酸雪夫反应 (PAS)。此种假阳性 PAS 反应可用醋酸安尼林(安尼林 10ml, 加醋酸 90ml) 处理去除。

(二) 固定液及浸洗液的配制

钨酸渗透慢，因之外层材料受到固定剂作用的时间比内层长。材料长时间停留于钨酸溶液中会引起一些脂蛋白复合体溶解。

1. 0.2M 二甲砷酸钠缓冲液:

$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4.28g, 加水至 100ml, pH7.2—7.2,
0—4℃保存备用。

2. 0.1NHCl

3. 0.1N NaOH } 为调整pH用。

4. 巴比妥醋酸等渗缓冲浸洗液:

A 液: 巴比妥钠	2.94g	B 液: NaCl	8.06g
醋酸钠 $3\text{H}_2\text{O}$	1.94g	KCl	0.42g
重蒸水加至	100ml	CaCl_2	0.18g
		重蒸水加至	100ml

0—4℃条件下保存备用

A 液 10ml B 液 3.4ml 0.1NHCl 11ml

重蒸水加至 50ml, 在 pH7.2—7.4, 0—4℃条件下保存备用。

5. 1/15M 磷酸缓冲液原液: 配磷酸缓冲的戊二醛固定液及浸洗液用。

A 液: 1/15M KH_2PO_4	B 液: 1/15M Na_2HPO_4
KH_2PO_4 1.816g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.5g
重蒸水加至 100ml	重蒸水加至 100ml

6. 1/15M 磷酸缓冲浸洗液

1/15M A 液	5ml
1/15M B 液	20ml
蔗糖	2.05g

改变 A 与 B 比例, 调 pH 至 7.2—7.4

7. 2% OsO_4 原液, 配制方法如前述。

8. 0.1M 二甲砷酸钠缓冲的戊二醛固定剂。一般固定组织用 2.5% 至 5% 戊二醛固定剂, 固定细胞用 1% 或 2.5% (商品戊二醛多为 25%, 有的为 50%)。pH7.2—7.4, 0—4℃保存备用。

9. 磷酸缓冲的 4% 戊二醛固定液

A 液	10ml
B 液	50ml
25% 戊二醛	12ml

调 pH7.2—7.4, 戊二醛最终为 4%。保存于 0—4℃备用。

10. 巴比妥醋酸等渗缓冲的 1% OsO_4 固定液。

巴比妥醋酸等渗缓冲 A 液	10.0ml
巴比妥醋酸等渗缓冲 B 液	3.4ml
0.1NHCl	11.0ml
2% OsO_4	25.0ml
重蒸水加至	50.0ml

11. 用 Hanks 液配制固定液与浸洗液, 可获较好效果。且方法简便。

Hanks 液配制

应用液	贮存液(用时稀释 10 倍)	
NaCl	8g	40g
KCl	0.4g	2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g (另溶)	1g
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	0.12g	0.6g
KH ₂ PO ₄	0.06g	0.3g
葡萄糖(无水)	1g	5g
CaCl ₂	0.14g (另溶)	0.7g
蒸馏水至	1000ml	500ml
用 0.7% NaHCO ₃ 调 pH 至 7.2—7.4。		

(三) 取材固定

组织离体后易迅速自溶,这些变化在光镜下不明显,而在电镜下则相当显著,破坏了细胞原有的超微结构。电镜标本须从活体取材,取材后争取在 1 分钟内把组织切成 0.5 毫米大小的小块,在 4℃ 冰箱中固定。取材时,将动物麻醉,暴露所需脏器,将固定液滴在欲取的器官组织上,剪下一小块组织,放在滴有固定液的纸片上,迅速用刀片将其切成 0.5 毫米以下的小块,再将此小块用牙签移至装有固定液的小瓶中,进行固定。固定步骤如下:

1. 前固定: 用 4% 戊二醛固定 0.5—2 小时。
2. 浸洗: 如用二甲砷酸缓冲戊二醛固定,可用巴比妥醋酸等渗缓冲液洗。如用磷酸缓冲戊二醛固定,可用含蔗糖磷酸缓冲液浸洗。浸洗时间 30 分钟,换两次。(此处可保存过夜)
3. 后固定: 1% 锇酸固定液固定。
4. 浸洗。

(四) 脱水

脱水的目的在于: 用既能和水也能和包埋单体相混合的液体来代替样品中所有的游离水。使用最广的脱水剂为乙醇,因其在超薄切片过程中不会变硬或变脆。可用乙醇系列或丙酮系列脱水。以丙酮为例,50%、70%、90% 各 10—15 分钟左右。纯丙酮 2—3 次,每次 10—20 分钟。90% 丙酮以前皆在冰箱内(0—4℃)进行,100% 以后室温进行。其中除 70% 丙酮或 70% 酒精可稍长时间放置,其它浓度皆不宜放置过久,以免细胞水分大量丢失或引起收缩、膨胀、组织变脆,影响切片质量。

二、浸透包埋、聚合

(一) 原理

与一般组织切片方法相同,要使样品中的细微结构在切片过程中得到良好的支持,切片能连续完整。样品脱水后包埋在一定介质中,制成切片时其厚度一般不大于 800 Å。包埋物质应具备下述条件:

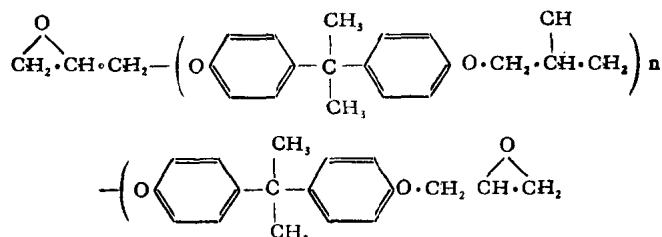
1. 单体状态应为低粘度,以便自由地渗入标本。
2. 能与脱水物质(醇、丙酮)完全混溶。
3. 聚合前后体积不变。
4. 与包埋于内的研究材料一齐聚合后便于制作超薄切片。
5. 不影响标本成象质量,对电子散射截面小。

6. 聚合体对电子轰击稳定。

目前的包埋剂还没有能同时满足上述各种要求的。如甲基丙烯酸酯类（即常用的有机玻璃材料），有较好的机械性能，但聚合时对本标本有损伤，造成变形；同时，在电子轰击下易升华。除特殊需要一般已不使用。环氧树脂为目前较常用的物质，但其具有较大的电子散射截面，降低成象的反差。

（二）常用的包埋介质

1. 环氧树脂：有两类化学反应基团，环氧末端基团和沿链的长度隔开的氢氧基团。结构式为



其中环氧末端基团是很容易应变的三元环，很容易打开，并与其它含活性的氢原子基团，特别是胺类相结合。当一个胺基附加到一个环氧树脂上时，头尾分子将联结在一起，形成一种长链聚合物。假如把树脂、胺和酸酐的混合物一起加热，将发生三维聚合作用，按链的长轴及横轴交链，形成一种非常稳定、含有聚酯和聚醚的抗热、抗溶的惰性物质。

实验室内常采用的包埋剂为国产的环氧树脂 618，与进口产品 Epon 812。

2. 硬化剂：一般选用琥珀酸酐和苯二甲酸酐，常用的硬化剂为十二烷基琥珀酸酐（Dodecylsuccinic anhydride, DDSA）（软化）与甲基内次甲基邻苯二甲酸酐（methyl nadicahydride, 简称 MNA）。

3. 末端衔接交链剂叫触媒剂或加速剂，通常用 2、4、6-三（二甲氨基甲基）苯酚 2、4、6 Tri（di-methylaminomethyl）Phenol（简称 DMP-30）

（三）实验室常用包埋剂配制

1. Epon 812	6.2ml	} A 液	Epon 812	10.0ml	} B 液
DDSA	10.0ml		MNA	8.9ml	

A 液与 B 液充分混合后，用 0.25 毫升注射器加入 1—2% DMP-30 加速固化，边加边搅拌。

2.	夏季	冬季
Epon 812	51ml	25ml
DDSA	6.2ml	6.2ml
MNA	42.4ml	18.8ml
DMP-30	1.5—2.0ml	0.75—1.0ml
	100ml	50ml

（张伯毅实验室）

3. Epon 812	13ml
DDSA	8ml
MNA	7ml
DMP-30	0.42ml

（改良 Luft 法，Rowden and Lewis）

将包埋液按上述一定比例顺次加入，充分搅拌。

包埋过程切忌潮气,配制时所用器皿皆需于用前烤干。

4. 环氧树脂 618	6.0ml
十二碳烯基丁二酸酐	4.0ml
DMP-30	0.1ml
苯二甲酸二丁酯	0.3—0.5ml

(上海第一医科大电镜室配方)

5. 环氧树脂 618	1g
顺丁烯二酸酐	25%
苯二甲酸二丁酯	15%
二乙基苯胺	2—3%

(科学院生物物理所电镜室用配方)

用此配方标本经乙醇脱水后,再经环氧丙烷 15 分钟。以后渗透用环氧丙烷与包埋液混合。环氧丙烷:包埋液 1:1, 2 小时;环氧丙烷:包埋液 1:3, 2 小时;纯树脂包埋液 2 小时;聚合。

6. 甲基丙烯酸酯:

甲基丙烯酸甲酯(硬剂)

甲基丙烯酸丁酯(软剂)

过氧化苯甲酰为聚合剂。必须在乙醇中保存于暗处,用前充分干燥,放置滤纸上,在 37℃ 温箱中放置 15—30 分钟,每 100ml 甲、丙单体中加入 1 克,于 45—60℃, 12—18 小时。

甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸丁酯,易于渗透经醇或丙酮充分脱水的组织。丁酯比例多时,聚合成软块;甲酯比例多,聚合成硬块。将这两种单体以不同剂量配合,可得到期望的硬度。

本实验室一般采用甲酯与丁酯比例为:夏天 1:4,冬天 1:9。

单体浸透时间勿超过 2 小时, 30 分钟换一次。注意过氧化苯甲酰后加(1—1.5%)。

(市售甲基丙烯酸酯中含有氢醌,使用前应用 2% NaOH 清除掉。方法是用分液漏斗加入甲酯或丁酯与等量 2% NaOH,用力振荡,氢醌溶于 NaOH,溶液呈棕红色,于漏斗下层,弃去,洗至无色再洗去 NaOH,最后用脱水剂如无水硫酸钠吸去水分。)

(四) 渗透包埋的操作过程

一般用丙酮与包埋剂 1:1 混合液过渡。纯包埋剂浸透分两次进行,一次在瓶内,一次在胶囊或包埋管内。第一次 0.5—4 小时,第二次 4 小时以上或过夜。纯包埋剂浸透可在 30℃ 温箱内进行,包埋剂不致固化,又能加速浸透,包埋剂处于均匀混合状态。实验室常用 2 号药用胶囊或特制的包埋用塑料小管。选择标本用牙签放入胶囊内,要放在底部正中位置上,放好后将样品标号放入胶囊内。

(五) 聚合

浸透后包埋的材料在 60℃ 温箱中聚合 24—48 小时, #618 包埋块色淡黄透明, Epon812 聚合块为褐黄透明。聚合后软硬适度的包埋块即可进行修块。如用胶囊包埋的组织块,则先用热水溶去胶囊,若用特制的包埋小管,可先用刀片将其划开,取出包埋块,进行修块。

三、切片及切片的安放

(一) 样品块的修整

在进行超薄切片前应先将样品块修成适当的形状和大小。修块的目的首先是除去组织周

围多余的包埋介质。由于含包埋组织的区域与不含组织区域硬度不同,经过修块尽可能除去组织外的包埋介质,使要切的部分硬度一致,易于切出良好的切片。形状大小合适的样品块易于形成理想的连续切片带。样品块表面形状可根据包埋材料的形状而定,通常修成梯形。如根据样品的形状与要求,正确地选择包埋模子,可使修块大大简化。在样品块面上,选择较好的结构部位上修出一个面积很小的($0.1 \times 0.5\text{mm}$),高度为 $30-50\mu$ 的小台,然后进行超薄切片,可得到满意的结果(图 1-2)。

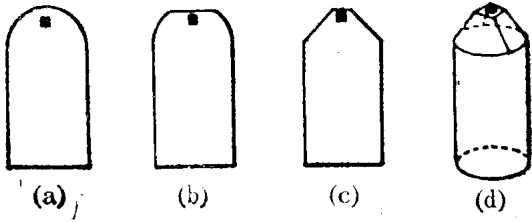


图 1-2 包埋块的修正

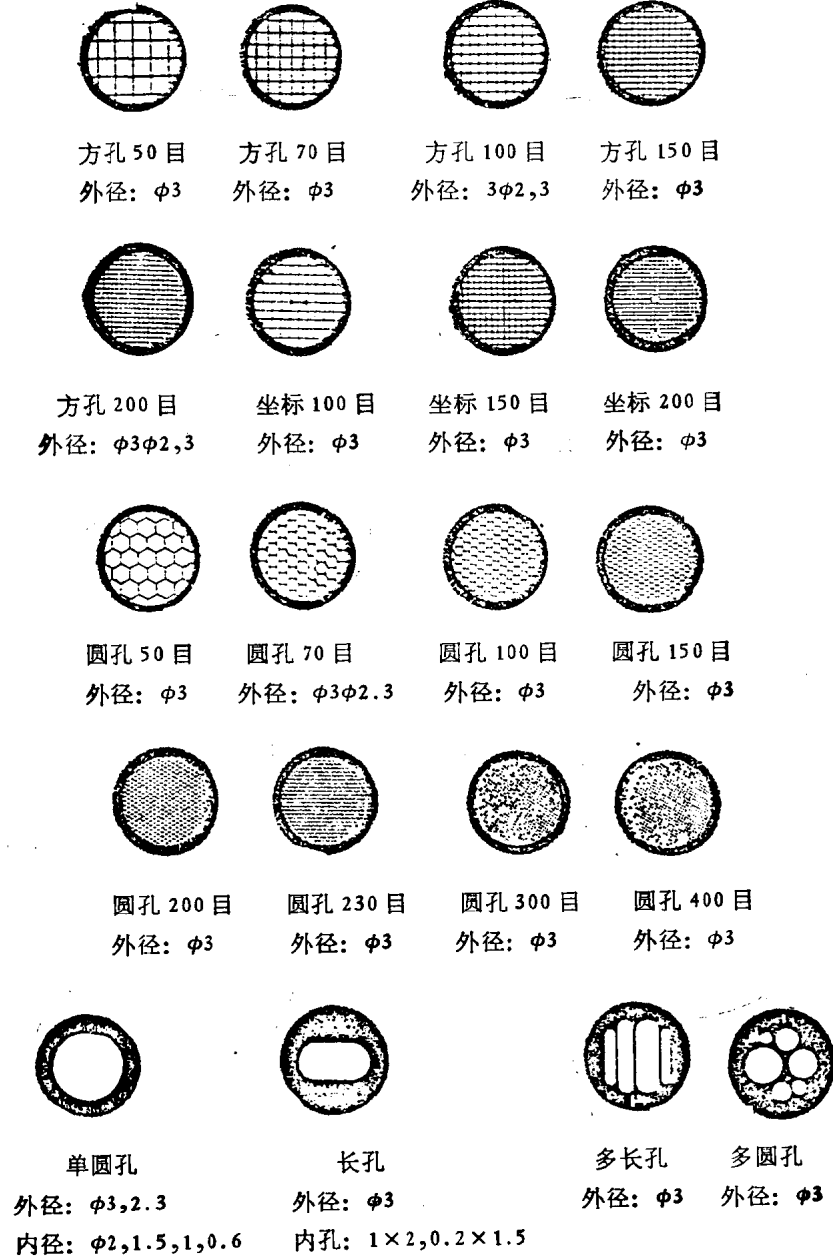


图 1-3 透射电子显微镜用载网

(二) 铜网的选择与清洗

铜网有多种(图 1-3),一般可选用国产 230、280 目铜网。新铜网用乙醇清洗,干燥备用。用过的铜网,先在醋酸戊酯中浸泡,再用乙醇洗 2—3 次,干燥后备用。铜网一般要制备载膜。有的亦可不作膜而直接捞片。

(三) 载膜的制备

1. 福尔瓦膜(Formvar 膜):

Polyvinylformal (聚乙烯醇缩甲醛, PVF) 0.25—0.3 克,用三氯甲烷配成 0.25—0.3% PVF 溶液,放冰箱中备用。

无水酒精加 Na_2SO_4 ,用作清洗载片。载片要洗净。

先将 PVF 溶液倒入量筒内(或用小标本瓶),溶液高度约为载玻片长 2/3。以载玻片在此溶液内浸 2—3 次,再在液面上停留 1—2 分钟,使膜平整,此膜自然干燥后,用刀片划切四周,划后在玻片上轻哈一口气,然后将玻片垂直浸入已备好的平皿的水中,此时可见膜漂浮于水面。将洁净铜网正面朝下摆在膜上,用玻片或用滤纸将此铜网与膜轻轻捞起,较简便的方法是将滤纸盖于膜上,迅速翻转即成。此时载网紧贴滤纸,而膜在载网上,即可放干燥器中备用。

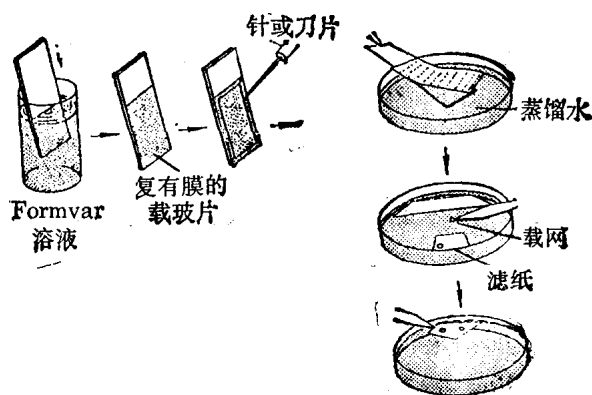


图 1-4 支持膜制作法示意图

2. 火棉胶—碳膜:

1% 醋酸戊酯火棉胶

下口平皿

制膜方法较简便,下口大平皿内,放置蒸馏水,用滴管将 1% 火棉胶一滴滴于水上,火棉胶迅即扩展成一薄膜。将第一张膜弃去不用,第二张膜即可使用。同上方法将铜网置于膜上,再用小块滤纸将网带膜翻转,则可得到较好的载膜,烤干。但火棉胶膜不耐电子轰击。因此,尚需在“真空喷镀仪”中喷镀碳膜,方能使用。

(四) 切片刀

目前超薄切片用的刀有钻石刀和玻璃刀两种。钻石刀刀刃平滑,切片时不易发生“刀痕”,也不必常更换刀刃,作连续切片有较大的优越性。但价格昂贵。一般实验室常采用玻璃刀,价格低廉,但不耐用,通常一把刀只能切一个包埋块。刀刃放置易氧化而影响刀的质量,故在切片前现作。由于刀的质量直接影响切片的质量,锐利平直的刀刃才能切出良好的超薄切片,钝刀不可能切出较薄的片子,刀刃上的任何缺陷会在切片上留有划痕,因此,应注意制备、挑选和保护好切片刀。

玻璃刀的制备有用制刀机及手工制刀两类。

1. 制刀机制刀:

(1) 制刀机:制刀机为制作玻璃刀的专用工具,有不同型号的商品。现介绍本实验室所用的 LKB 7800B 型制刀机(图 1-5)。

玻璃划割器:内装碳化钨砂轮。

夹头:上有两个固定小柱,压紧玻璃后,夹头通过小柱,在玻璃上产生向下压的力量。

断裂旋钮:与上述圆柱相连,扭动旋钮,产生向上顶的力量。