

製片技術原理

John R. Baker 著

于 宗 瀚 譯

商 務 印 書 館



製 片 技 術 原 理

John R. Baker 著

于 宗 瀚 譯

陳閱增 王應天 張宗炳校訂

商 務 印 書 館



本書內容提要

本書是根據 John R. Baker 所著的 "Cytological Technique" 一書編譯的。原書是一本著名的關於細胞學製片的專書。它的特點：一般製片學書籍只是敘述了製片的技術與步驟，而本書則敘述了製片的原理，對於顯微技術中所用藥劑的化學性格和化學作用，有詳細的敘述。生物學工作者掌握了這些原理，對於新的材料、新的藥劑，都可以靈活運用，創造新的方法，成功地作好製片。本書的內容不僅是細胞學研究的基礎，並且也適用於組織學及病理學的研究工作。

製片技術原理

于宗瀚譯

★版權所有★

商務印書館出版

上海河南中路二一號

中國圖書發行公司發行

商務印書館北京廠印刷

*(62253)

1953年9月初版 版面字數136,000

印數1--2,000 定價¥11,000

校譯者言

這本書是英國牛津大學動物學講師貝克 John R. Baker 所著的，這本譯本是依照 1945 年原書第二改正版所編譯的。原書是米素 (Methuen) 生物學專冊之一，是一本極有名的關於細胞學製片的論著。一般關於生物學及細胞學製片的書籍多半是只講技術及製片步驟，而對於其中的原理往往是十分簡略的。例如，蓋育氏 (Guyer) 的動物製片學 (Animal Micrology) 是一本最常用的書，但是書中對於製片的原理幾乎全部不提。張伯倫氏 (Chamberlain) 的植物組織製片學對於原理方面也只有簡單的敘述。校譯者所著的‘生物學製片學’(商務印書館出版) 也有同樣的缺點。這部是因為一般的生物學製片的課程中，都不注重原理方面，而是一個純粹技術的實習。因此，從這一方面來看，這本書是有它的特長的，可以補足一般這一類書籍之不足。

正因這本書的重點是在顯微技術的原理方面，它的特點是：(1) 對於顯微技術中所用的藥劑，不論是固定劑、染色劑、透明劑或封藏劑，都對於它們的化學性格、化學作用(尤其是對細胞及體素各部份構造的反應)有詳細的敘述，使人能了解為什麼對於這一種體素要用這種的固定劑，用了有什麼好處，為什麼對於這一種體素不能用另一種固定劑。例如，在一般製片學及顯微技術的書籍，大家只是知道染結締組織用什麼染料，固定精巢用什麼固定劑，但是“為什麼”往往是不知道的。又例如，有的固定劑對於蛋白質起沉澱作用，有的固定劑對於蛋白質便不起沉澱作用；它們在用途上顯然是不一樣的，但是一般製片學書上是不加區別的；因而用的人只能按照書上所說該用什麼固定劑使用什麼，而不

能按照固定劑的性質靈活地運用。又例如，有的染色劑的染色作用是化學作用，有的只是物理或電力的吸附作用，一般製片學書上也很少提到（當然有些染色作用還沒有完全明瞭），因而使用的人也不知道為什麼染這種細胞構造一定要用這種染料才合適。這些例子，說明了從固定劑、染色劑等等的化學性格及化學作用的了解，我們便能進一步真正地掌握了顯微技術的方法，不僅是‘知其然而不知其所以然’死硬的技術手續，而變為按照一定的原理靈活地運用。

（2）由於各種藥劑的化學性格、化學作用的敘述，不僅是使製片的人了解了為什麼用它們，在什麼場合、什麼情形下用它們，同時也使製片的人能自己配合成新的固定劑、染色劑等等。關於這一點，著者自己在原文中一再提到，許多生物學家因為不了解染色及固定的原理，犯了好些“令人可笑”的錯誤；有的甚至於把一種還原劑同一種氧化劑配合在一起。他們根本不知道，他們配合的藥劑早已起了化學作用，失去了他們所希望起的作用。同樣的，固定劑與染色劑的配合，染色劑與封藏劑的關係等等，都只有從這些藥劑的化學性質中才能了解。用了某一種固定劑，為什麼用某些染色劑便不易染上，用了什麼染色劑在什麼封藏劑中便容易褪色，這許多原則上的了解對於製片學及顯微技術的應用都是大有幫助的。

總之假如說一般製片學的書籍是只敘述了製片的技術與手續，那麼這本書是敘述製片的原理。因此，這本書是在理論上把顯微技術提高了一步。讀了一般製片學的書籍可以製片，也可以製出很好的片子，但是只能依照陳規，按步就班去做，而對於新的材料，便不容易做好，也不會想出新的方法來。讀了這一本書便可以了解製片手續的原理，因而對於新的材料、新的藥劑都可以按照這些原理去試驗。對於一個生物學研究工作者來說，這本書實在是極有用處的。原作者說，這本書本

來也是由高級細胞製片學的講義改寫成的。我們認為，一般生物學工作者學了製片或顯微技術之後，能讀一下這本書，是大有益處的。

但是這本書當然也有些缺點。首先，它不能作為一本製片學的教科書來讀，因為它關於製片技術的方法，敘述得是不够的。其次，在理論方面，書中也有缺點。例如，在敘述到固定劑、染色劑的化學構造的時候，就有共振論的說法；在敘述到染色質的性質的時候，又提到了基因學說。正因為如此，我們沒有直譯而改用了編譯，在翻譯的過程中，把這些不正確的地方刪去，或是把某些應修改的地方作了適當的改正。

全書是由北京大學生物系于宗瀚同學翻譯了初稿，然後由陳閱增先生、王應天先生及我把全書各章作了校對及修正。最後，再由我把全文順理了一下，作了最後一次修改。但是，書中可能還有錯誤，希望讀者們多提出意見，加以指正。

張宗炳

北京大學生物系

一九五二年九月二十六日

目次

校譯者言

第一章 緒言	1
第二章 關於固定的一般說明	17
第三章 簡單固定液	34
第四章 混合固定液	69
第五章 顯微切片術	85
第六章 染色	105
第七章 封固	141
第八章 染色體、線粒體和高爾基體的製片法	148
名詞對照表	161
人名對照表	166

製片技術原理

第一章 緒 言

和細胞學一樣，細胞學技術的內容是極為廣泛的。在這樣的一本小冊子裏即使力求淺顯也不能概括它的全部。因此我將只描述用以在顯微鏡下顯示多細胞動物構造的永久製片法，特別是切片法。細胞學的其他各方面有着驚人的發展。最顯著的可以說是線粒體以及其他的細胞結構的明確分離，這個技術應該歸功於本斯萊和赫耳(1944)的先進的工作。1829 年拉斯陪爾和 1890 年艾特曼所用的舊技術現已經改善，使我們又有了顯微燃燒術和凍乾法。顯微解剖術使我們能夠真確地鑽研生活細胞。組織化學也有着很大的進展，由切片中可以真實地看出各種酵素的存在，而紫外光分光攝影術告訴了我們很多的關於核蛋白在細胞內的分佈情形。電子顯微鏡使我們對於了解細胞更細微的構造有了希望，而同時愛克斯光也正在用來顯示蛋白質的超過一般顯微鏡所能顯示的結構詳情。我們可以相信在不久的將來很可能仍有與這些事實同樣驚人的進展出現。在盛極一時的近世細胞學研究中，談及普通的染色製片似乎是很平凡的。可是雖然如此，細胞學得之於切片染色似乎仍是比得之於其他技術為多。任何懷疑此點的人應該試想一下如果沒有這種方法的幫助我們能知道多少關於染色體的知識。無論我們的興趣集中於細胞學的那一部分，我們似乎都應該知道這門學問的基礎，這却只有求助於染色切片了。此外，了解了有關製作切片的

物理和化學知識是對於細胞學的各方面都有用的。

我寫此書的指導原則是儘量少講方法，但對所講的則儘量描寫詳實。對於所用試劑的性質等也要儘量報導。有人可能感到不能從本書中迅速查到各種技術。確是如此，因為這不是一本製方書，製方書是很多的，它們是適用於一種目的的，而本書的目的却與之不同。在本書中我當儘量解釋這些方法的原理，並且也徹底地儘可能地把它們的實際應用告訴給那些耐心的、願意知道所以然的讀者們。

一切充斥於文獻中的不合理的方法都謹慎地刪去了。很多工作者發表了固定液和其他藥劑的處方，但是却不談及這些處方是經過怎樣

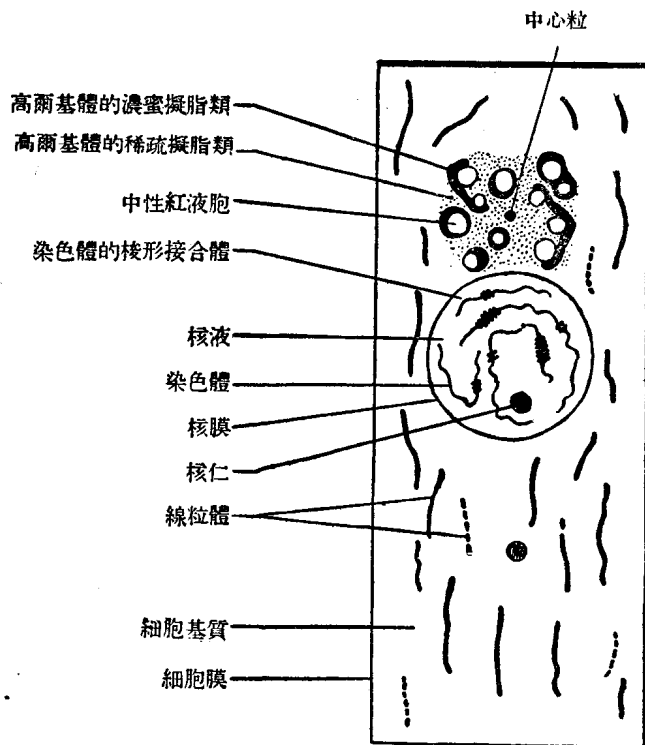


圖 1 未分化的上皮細胞的圖形，顯示所想像的平常構造。

的研究而得到的。他們沒有有力的證據說明這些藥劑爲甚麼比別的好，他們也不說明在試驗時是否曾試過各種不同分量的比例，如果是試過的話，結果又是如何。他們常是混合了氧化劑與還原劑，或酸性及鹼性的物質。所得的結果有多少是由於原來藥劑的作用，有多少是由於發生反應之後的作用便無法知道。用這種不合理的方法常會得到圓滿的結果，但是這種結果却不能合理地解釋清楚，並且這樣的結果也並不比合理方法的結果更好。因此之故，我刪去了很多有名的和有用的技術。我希望細胞學技術真正地成爲一種科學的學科，也希望沒有一

個人會想發表一種新技術而竟然對所用物質沒有充分的知識，沒有考慮在它們之間反應的可能性，或不能說出根據甚麼實驗結果使他選用這些藥品，使他按照一定的分量來配製。

因爲種種原因，多細胞動物的生活細胞是很難研究的。我們除非把細胞分離開來，否則便不能清楚地觀察它。但是若想將細胞與細胞分離，除非用各種殺死的藥劑外，一般是不可能的。即使我們選到了一種能够仔細觀察的活細胞，我們仍將會遇到困難，因爲其中成分大多是透明無色的，它們的唯一區別只是折光度的微小不同而已。如果耐心地用我們所有的方法在平常和暗視野照射裝置下，即可見到如圖 2 所示的結構。這些結構在離體的而仍浸在體液裏的細胞內，不必用任何的固定液或染料即可看到。圖 1 表示

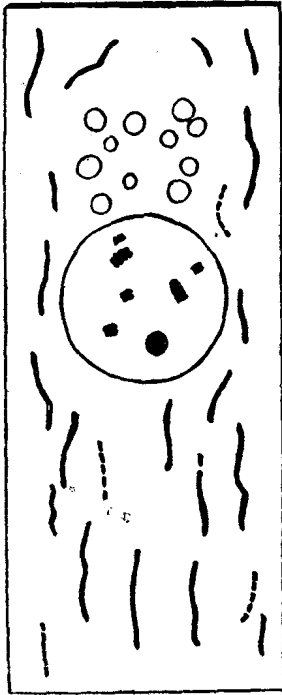


圖 2 圖形表示尚未分化的上皮細胞仍在生活狀態時所能看到的情形。

在顯微鏡下能見到的可以適當地被認為是存在於生活細胞中的情形，而圖 3 是表示用普通保存液或固定液處理後且經過切和染的薄切片中所呈現的情形。

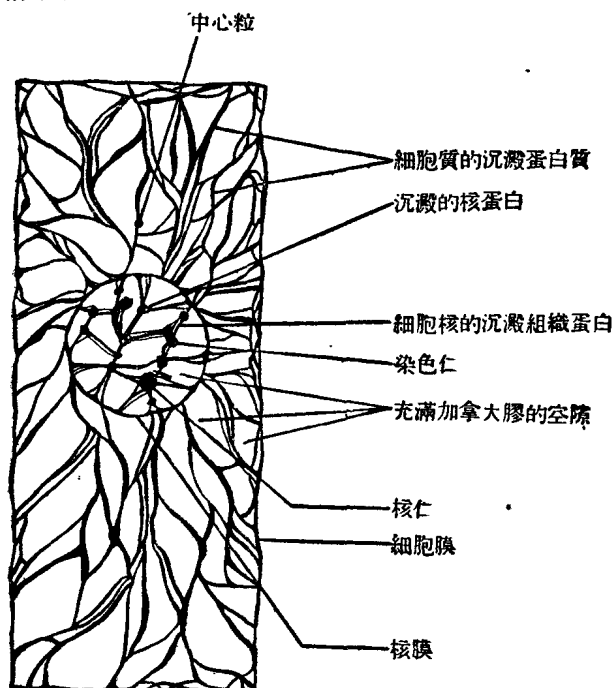


圖 3 未分化的上皮細胞在被一種蛋白質沉澱劑固定，並被切割、染色及封固後的圖形。

以上數圖所示都是一個未分化的上皮細胞。細胞的構造可藉本書中以後各章所述之方法研究。各種細胞結構的化學成分可藉細胞化學的測定研究，並可根據我們對蛋白質化學的知識而得出推論來，因為在細胞中除水分外蛋白質是最豐富的物質。

水在細胞質中約佔 85%，細胞質雖為流體，但在細胞中的流動性質却並不像‘牛頓式’完整液體。水中含有溶解的鹽和糖。鹽的陽離子主要是鉀和鎂，陰離子主要是磷酸根，還有些重碳酸根(勞瑞，1943)。

鹽類大約維持 pH 6.8—7.0。

細胞質中蛋白質總計約佔重量的 8%，可是蛋白質分子是很大的，在原生質裏，每有 18000 個水分子才有一個蛋白質分子（司旁斯勒和貝斯，1942）。1928 年米有首先指出原生質的蛋白質是具有兩種形式的（參考米有，1940）。一種是球蛋白和白蛋白的單獨的或‘球形’的分子。每個分子大概與水有一定的方式相聯而使整個細胞基質形成乳狀液。每個分子可以有 40% 的水與之相聯，且其直徑可達 $50\text{\AA}$ 〔註 1〕（司旁斯勒和貝斯，1942）。另一種在細胞質中被認為是‘結構’式或纖維蛋白質。這些是很長的分子，長約 $1,000\text{\AA}$ （雖然僅有 $10\text{\AA}$ 寬 $4.5\text{\AA}$ 厚）。西福來（1942）的名言：‘打算用球形的分子達成原生質的物理性質猶如要求織布的人用沙而不用線來紡織一樣。’纖維分子是被認為以各種不同的化學鍵而彼此相連，並且也與其他分子相連，因此形成一種‘刷子堆’，其中的長分子無秩序地指向各個方向（弗萊魏斯令，1940）。纖維蛋白質在細胞質中形成結構的架子，同時也說明了為甚麼細胞質有張力和彈性，細胞質的滯性也大部依靠此種纖維蛋白質。因為細胞質流動時長的分子常要趨向於平行排列，這便說明了細胞質在某些情形下顯示出的雙折射現象。結構蛋白質遠不如球形蛋白質容易被溶液去掉，班加和斯村特-紀約紀（1940）即曾指出。就是因此之故我們對於纖維蛋白質是相當無知的。在研究原生質的蛋白質時，我們總是不自覺地選擇了那些活動的，也就是容易達到目的的去研究。毛爾（1942）指出我們不可認為這些原生質內的纖維蛋白質是很相似於常見的細胞外的纖維蛋白質，譬如絲，因為尋常細胞質的纖維蛋白質對於熱及電解質是很敏感的。對於熱和電解質抵抗力最大的是‘伊里布欣

〔註 1〕 $10,000\text{\AA}$ Angstrom 單位 ($\text{\AA}$) = 1μ 。若兩條線之距離小於 $2,000\text{\AA}$ ，則不能在顯微鏡下分辨清晰。

蛋白' (本斯萊, 1943; 赫耳, 1943)。它不溶於鹽水但可用 0.5N 的氫氧化鈉提取。有些學者認為 '胞漿蛋白' 是另一種結構蛋白質, 其特性為不溶於生理鹽水而溶於 10% 氯化鈉。然而梅斯基和鮑利斯脫 (1943) 提出說這種纖維狀且呈膠黏性的物質實際上就是來自細胞核, 為生活細胞質所沒有的核蛋白。

有些細胞學者認為擬脂類是彌散着分散在細胞質裏的, 雖然對於這種說法並沒有可靠的證據。這些分散的擬脂類是被認為與蛋白質相聯的。卵磷脂能在一種 '兩性離子' 形式下存在, 正負電荷彼此相距 $7\text{\AA}$ 。斯旁斯勒和貝斯 (1942) 指出這樣的距離正好是蛋白質中鄰近的氨基酸殘基之間的距離。所以卵黃精可以變為接近兩個鄰近的, 相反電荷的氨基酸殘基。關於組成原生質的各種分子的形狀及大小, 讀者可參閱上述各學者的論文。

細胞質中被認為是懸浮着一團極小的含有擬脂類的顆粒或 '微體'。因為它們的直徑只有 $0.05-0.3\mu$, 所以通常在顯微鏡下是看不見的, 其大小只能藉間接法估計, 事實上, 我們不能確定它們是成顆粒狀存在於生活細胞中。克勞德 (1941, 1943) 曾用離心法把它們分離出來, 成為不黏稠的、透明的固膠體, 其中因核黃素的存在而呈琥珀色。微體有時可達整個細胞質的 25%。它們主要是由核糖核蛋白和磷脂類組成。

在此處有離題而論核蛋白的必要。染色體之所以如此容易染色, 亦即所以獲得 '染色體' 之名, 完全是由於其中含有核酸之故。它是五烷糖、磷酸和含氮鹼所組成的一種等分子的化合物。核酸的含氮鹼是屬於尿酸一類的物質。染色體中核酸的五烷糖是特別的, 其中有一個 OH 基被 H 所替換, 因此只有四個氧原子而不是五個。這個糖的名字 '去氧核糖' 即指明此點, 而含有這個糖的核酸就叫去氧核糖核酸, 核酸與

各種蛋白質化合成核蛋白，但這些蛋白質或者是不將核酸分子內所含的磷酸全部中和，或者是本身就是酸性的，所以此整個化合物仍為酸類（某些種精蟲的核蛋白是例外，因其中蛋白質是強鹼性的）。就是由於核蛋白的酸性，所以遇到所謂之‘鹼性’染料時才能發生強烈的反應。某些核酸，名為核糖核酸，其中五烷糖帶有五個氧原子，這種核酸十分奇異，既不能為鹼性染料強烈着色，也不表現染色體中核酸的一般的組織化學反應。然而，我們仍可根據它們對紫外光中某些波長的吸收作用而鑑定它們為核酸。1879年弗萊明開始用‘染色質’這個字表示細胞核及染色體內易為鹼性染料染上很深顏色的物質。（染色體本身俟九年後方得名。）這是一個舊的名字，但至今仍然有用，而且我在本書中仍將用它表示去氧核糖核酸和蛋白質的酸性化合物。但應該聲明，根據一些權威學者所說，游離的核酸是存在於完全形成的染色體之內的。若是如此，則此字的意義應該擴大而包括未化合的去氧核糖核酸。‘無色核蛋白’一詞是核糖核蛋白的便名，表明它們對染色質染料缺乏特殊親合力。因此微體也可以說是含有大量的核蛋白。

以上所提到的細胞物質在普通顯微鏡下觀察生活細胞時是看不見的。若想顯示它們，先須靠膠體化學和愛克斯光及紫外光分析的方法，另外還有離心分離和格許(1932)等人的凍乾法技術。現在我們要談一談在普通顯微鏡下觀察生活細胞時所能見到的結構了。

細胞質外被細胞膜。此膜是被認為含有連續擬脂類分子的一個薄層。這些分子在細胞的表面部分，碳氫部分向內而水化極組向外安排着。在緊靠細胞質部分，這些分子的排列是相反的，是極組朝着細胞質內。膜外層和內層的極組都吸附有蛋白質。這就是丹尼里(1942)所描述的細胞膜的構造。細胞膜的蛋白質據說是含有伊里布欣蛋白的(本斯萊, 1943)。

細胞基質裏含有三種‘成分’，這三種成分對於後生動物細胞的生命大概是不可少的，因為它們差不多是存在於多細胞動物的每個細胞中而且是自立生存的。這三種成分是線粒體、高爾基體與細胞核。

線粒體成線、棒或顆粒狀，外表光滑。同一細胞中的線粒體其直徑大致均等，並且不分枝。最值得注意的是很少看見過它們由較細的線或較小的顆粒生長起來的階段。這個時常被忽略了或強調得不够的事實正是上面所說的它們是自立生存體的最有力的證據。它們的繁殖是分裂，先變長然後舉行核分裂，有時線狀的線粒體可分成兩個或更多具有同樣直徑的短棒或顆粒。

雖然很久以前即有人看到過線粒體，但艾特曼(1894)是第一個仔細加以研究的人，並且發明了顯示線粒體的特殊方法。他誤認它們為‘基本生物體’，即生在原生質中的簡單生物。本達(1898)首先認為線粒體是細胞的一種成分，一種幾乎是普遍的細胞含有物，他告訴我們(1902)當他在各種動物的各種細胞中以及最後在分溝細胞及原生動物中都發現了線粒體，並且證明它們在細胞中是獨立存在的。在有絲分裂時，它們也仍是獨立的，因此他得到如下的總結：所謂細胞質的顆粒實代表動物細胞的一種特別成分。1898年7月29日他在柏林生理學會的會議上第一次規定了線粒體這個命名(本達，1898)。這是第一次他在鼠及盲蜘蛛的精細胞內所研究的，而後來又逐漸在很多不同綱動物的許多種細胞中發現。他說他發現了一種染線粒體的特殊方法。他說，“我願為線粒體保留一個地位，並將繼續研究，使之充實。”這是第一次使用線粒體這個名詞。本達在很多著作中遵守其諾言，包括已經提及的1902年的論文在內。事實上在最不相同的細胞的細胞質中，也確是含有線和顆粒的構造。這些線和顆粒可用特殊的方法顯示，並且也具有一些確定的性質。在某些情況之下，線形和粒形是可以互相改

變的。因此本達所用的‘線粒體’這個名詞是既方便又正確的。不幸法國的細胞學家，以其最不合乎法國的邏輯僅用 *Mitochondria* 一字代表顆粒形狀的構造，而用 ‘*Chondriosomes*’ (顆粒體) 一字為一般的名稱。

本斯里和赫耳(1934)首先將線粒體分離出來用作化學分析。在最早的分析中磷脂類的總量被估計得太低了。現在我們知道它們在化學組成上是與微體極相似的。它們所主要包含的是無色核蛋白與磷脂類(還有其他擬脂類)，但比起微體來，其磷脂類的比例是較少的(克勞德，1943)。由於核黃素的存在，分離出來的肉眼可見的線粒體團是黃色的。線粒體中含有氧化酵素，但其比例並不高於整個細胞所含有的(拉扎樂，1943)，而且尚無證據證明線粒體的功能主要的是酵素的功用。有時它們的反應指示出有巯氨基硫和維他命 A 的存在(布恩，1935；約葉—拉文，1935)。

線粒體是可以在生活細胞中不用任何染色而看到的，但高爾基體却比較不易看到，而且沒有固定的特性構造。實際上，正如蓋利孟(1941)所指出的，它是一種特徵模糊的細胞含有物。用複雜的技術可以顯示它們，這些技術是依靠它們在特殊條件下還原硝酸銀和四氧化鐵的能力，結果是它們本身變黑。然而這類技術並不是組織化學的檢驗。這是歐文斯和本斯萊所曾特別強調的(1929)。赫爾(1931)曾指出，這類技術會使細胞中各種不同的物體都變為黑色，而這些變黑的物質却不能確定地說都是高爾基體。特別是在某些原生動物中有些與伸縮泡以及相類的構造相連的嗜鐵物質，雖有人認為即是高爾基體，但却是難下定論的。然而在後生動物中幾乎每個細胞的核的附近都有看起來像是完全同源的構造存在。關於它的化學成分我們知道的是如此的少，而其形狀又是如此容易變化，以致於在大多數細胞中我們仍不能確

定它。

高爾基體是 1867 年拉凡立特聖喬治在蝸牛的生殖細胞中首先發現的(也可參看道格拉斯, 1935), 而帕拉諾(1885)却是首先藉着同樣的和其他細胞的研究而仔細地描述下來, 直到 1898 年高爾基才在貓頭鷹小腦的普金野細胞和其他神經細胞中發現類似的構造, 最初也並沒有想到可能高爾基的‘高爾基網狀中心’, 即相當於拉凡立特聖喬治和帕拉諾所研究的物體。

若是觀察有很好的高爾基體的生活細胞, 在高爾基區域所能看見的只是一羣大小不同的液胞(圖 2)。這些即所謂之中性紅液胞, 因為當細胞溶於很低濃度的中性紅裏的時候它們有分離出高濃度的這種生體染料的能力。液胞一字即寓意其為液體而非固體或半固體之‘顆粒’。中性紅染料是一種指示劑。液胞顯示紅色即表示其包含物質是酸性的。高爾基體的其他構造通常只能在被殺死並用特殊方法處理過的細胞中研究。高爾基體中具有濃密之擬脂類物質, 幾乎必定含有或組成卵磷脂和或腦磷脂。此種物質的分佈很不一致, 因此它所顯示的形狀常常不能確定是否是一種人為現象。此物質通常附着於液胞表面, 或完全或部分地包被液胞。有時能伸出不規則之線狀物從一個液胞連到另一個液胞上, 有時各液胞是分別地被圍繞着。當某液胞單獨地被圍繞時, 此物常在一側呈一新月形構造。除去中性紅液胞與濃密的擬脂類物質所佔空間外, 這個高爾基區域常充滿一種瀰散的擬脂類物質。在脊椎動物細胞中此區域常是很不清, 顏色漸變淡而連入濃密擬脂類物質。但在無脊椎動物中有時根本沒有, 而平常當顯現時却很清晰。

細胞所分泌的許多可以見到的物質, 有很多或者可以說絕大多數都是出現在高爾基區域。這些物質似是來自中性紅液胞之內, 而當完全形成時即離開高爾基區域。它們可以永久保留於細胞內(例如, 精