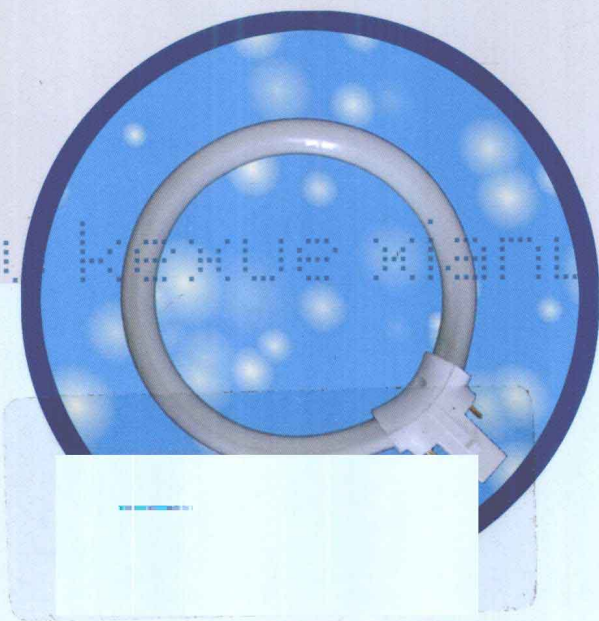




生物科学 显微技术

◎ 杨星宇 杨建明 主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



生物科学 显微技术

主编：王德明 副主编：王德明



生物科学显微技术

主 编	杨星宇	杨建明
副主编	彭 宇	杨艳燕
编 者	汪平尧	

华中科技大学出版社
中国·武汉

内 容 简 介

本书从生命科学专业学生掌握基本理论、基本方法、基本技能的实际出发,结合目前国内高等院校(特别是地方普通院校)的客观条件,为提高学生的实验动手意识及动手能力,从而强调生物显微技术的教学和实验训练而编写的。本书从生物显微技术的发展史、显微技术的基本设备使用、显微切片技术、显微荧光染色技术、显微操作技术、显微摄录像技术六方面较为全面地讲述了现代生物显微技术的基本内容,与以往教材相比较,本书增添了显微操作术、数码成像等新内容。经过作者教学实验证明,本书是一本比较符合普通高校目前客观条件和学生实际需要的生物显微技术读本,可作生物学实验室手册或工具用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物科学显微技术/杨星宇 杨建明 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2010.10
ISBN 978-7-5609-6668-7

I. 生… II. ①杨… ②杨… III. 生物学-显微术 IV. Q-336

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 202650 号

生物科学显微技术

杨星宇 杨建明 主编

策划编辑:周芬娜

责任编辑:梅进伟

封面设计:刘 卉

责任校对:朱 玢

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:武汉佳年华科技有限公司

印 刷:湖北恒泰印务有限公司

开 本:710mm×1000mm 1/16

印 张:12.75

字 数:266 千字

版 次:2010 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:24.00 元



华中出版

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

前 言

生物学显微技术(biological microtechnique)是从16世纪末以后,随着显微镜的发明和化学染料工业的发达而发展起来的,它的产生直接导致了细胞生物学、动植物胚胎学、微生物学的产生和发展,若没有显微镜的出现,就无所谓显微技术。显微技术简单理解,就是在显微镜所能观察的范围内进行的一切实验操作和其产生的原理知识及方法技术。显微技术的进一步发展,是超显微技术,也称电子显微镜技术或纳米技术,顾名思义就是指在电子显微镜所能观测的尺度内所进行的实验方法技术。

目前生物学显微技术主要包括显微观察、显微切片、显微照相、显微组织化学、显微操作、微室培养等,并由基本的实验观察技术发展出显微操作技术,如显微打孔、显微切割、细胞融合、核移植、细胞器移植,等等。生物学已是一个实验性很强的学科,一个想进入生物学领域的人,不了解生物学一些最基本的实验技术方法,是不可想象的。利用显微镜进行观察,一下使人的视力极限(0.1 mm)提高到了 $0.2\ \mu\text{m}$;利用显微操作器,人们几乎可以随意地握持微小的细胞和组织块进行切割、打孔和外科手术;显微分光光度计可以检测单个细胞中化学成分及数量;激光共聚焦显微镜不仅能三维立体重建成像,与计算机结合进行Z、Y、X三轴CT扫描,还能实现光切片,把 $1\ \mu\text{m}$ 厚的生物显微切片材料进一步光切片至 $1/20\ \mu\text{m}$ 、 $1/200\ \mu\text{m}$,甚至单层分子级;环境扫描电子显微镜的应用更是省去了许多繁杂的实验步骤,可直接观察含水鲜活的生物材料。当今生物学中所运用的各种新仪器、新方法真可谓层出不穷、日新月异,新技术还在不断涌现,想要跟上形势、跟上发展,必须重视实验技能的学习和掌握。这本生物科学显微技术读本的推出,是生物科学入门级实验技能实训教材,学生若能认真完成该书中的实验内容、操作训练,一定会大大提高自己的实验动手能力和增强实验兴趣。掌握了这些最基本的方法和技术,无疑为日后的深入应用和科研打下一个良好的基础。

全书分为生物显微技术发展史、显微镜及其附属设备、显微切片技术、显微荧光染色技术、显微操作技术和显微记录方法六部分及附录延展,与以往同类书籍相比较,增添了显微技术发展史、显微操作术、数码成像和显微技术相关网站链接等新内容。

本书的出版曾得到湖北省自然科学基金重点项目(2008CDA082)、湖北省科技厅研究与开发计划项目(2009EGB003)、武汉市人事局武汉市创新人才开发基金(武人[2008]84号)、湖北省品牌专业生物科学特色专业建设项目(080—015602)的资助,并得到湖北大学生命科学学院领导的大力支持和帮助,在此致以最诚挚的谢意。

该书的作者均是多年从事生物科学教学和科研的教师或实验技术人员,有着丰

富的实验教学经验和实践经验;杨星宇编写第三、四章,彭宇编写第二章,杨艳燕、汪平尧编写第六章,杨建明编写第一、五章并负责全书统稿整理。由于编者水平有限,书中难免存在不足,敬请读者批评指正。

编 者

2010.6.16 于武汉

目 录

第 1 章 显微技术发展历史	(1)
1.1 显微镜的发明史	(1)
1.1.1 显微技术的概念.....	(1)
1.1.2 显微镜的发明史.....	(1)
1.2 显微解剖切片机发展史	(3)
1.3 染色技术发展史	(6)
1.3.1 显微技术的用具及其方法演进.....	(6)
1.3.2 染色技术发展史.....	(7)
第 2 章 显微镜及其附加设备	(10)
2.1 显微镜的光学原理.....	(10)
2.1.1 显微镜的光学原理	(10)
2.1.2 显微镜的光学性能	(12)
2.1.3 复式显微镜的光学原理	(13)
2.2 显微镜的基本构造.....	(14)
2.2.1 物镜	(14)
2.2.2 目镜	(17)
2.2.3 聚光镜	(19)
2.2.4 载物台和光源	(20)
2.3 生物光学显微镜的种类.....	(21)
2.3.1 生物光学显微镜	(21)
2.3.2 其他观测附件	(29)
第 3 章 显微解剖及切片技术	(34)
3.1 生物显微解剖的一般方法.....	(34)
3.1.1 切片法	(34)
3.1.2 非切片法	(35)
3.2 解剖工具——切片机.....	(36)
3.2.1 切片机概述	(36)
3.2.2 切片机的使用方法	(39)
3.3 切片技术方法.....	(41)
3.3.1 材料的采集与分割	(41)
3.3.2 固定与固定剂的配制	(41)

3.3.3	洗涤和脱水	(48)
3.3.4	透明	(52)
3.3.5	透蜡和包埋	(54)
3.3.6	切片和贴片	(58)
3.3.7	脱蜡	(60)
3.3.8	染料和染色	(60)
3.3.9	封藏	(69)
3.4	冰冻切片技术	(71)
3.4.1	使用仪器	(72)
3.4.2	冰冻切片制片方法	(72)
3.5	半超薄切片技术	(74)
3.5.1	使用仪器	(74)
3.5.2	半超薄切片制片方法	(74)
第4章	荧光显微技术和荧光染色	(82)
4.1	荧光显微技术的原理、方法和应用	(82)
4.1.1	荧光的产生及种类	(82)
4.1.2	荧光的机理	(85)
4.1.3	荧光显微技术的特点及运用	(85)
4.2	荧光染色技术	(89)
4.2.1	染色原理	(89)
4.2.2	荧光染色原理	(91)
4.2.3	组织细胞的染色	(92)
4.2.4	荧光素	(93)
4.2.5	免疫荧光细胞化学染色方法	(97)
4.3	荧光素的选用	(100)
4.4	荧光显微镜	(103)
4.4.1	荧光光源	(105)
4.4.2	光的吸收和滤光片	(107)
4.4.3	滤光片的性能	(109)
4.4.4	滤光片的使用方法	(110)
4.4.5	荧光显微镜的光路系统	(111)
4.5	荧光显微摄影术	(112)
4.5.1	荧光标本制作中的要求	(113)
4.5.2	荧光显微观察及摄影	(113)
4.6	荧光显微镜的应用	(115)
4.6.1	直接免疫荧光法	(116)

4.6.2	间接免疫荧光法	(116)
4.6.3	补体免疫荧光法	(117)
4.7	荧光细胞化学	(118)
第5章	显微操作技术	(119)
5.1	显微操作仪	(119)
5.1.1	显微操作仪的显微镜	(120)
5.1.2	显微操作仪	(120)
5.2	细胞显微注射实验	(124)
5.2.1	材料、设备的准备	(124)
5.2.2	方法与步骤	(124)
5.2.3	植物外源基因导入实生苗实验基本流程示意图	(125)
5.3	显微切割与摘取实验	(125)
第6章	显微记录方法	(127)
6.1	胶片显微照相术	(127)
6.1.1	照相原理和照相机的构造	(127)
6.1.2	感光材料	(129)
6.1.3	滤色镜	(134)
6.1.4	曝光和放大率	(137)
6.1.5	暗房技术	(138)
6.2	数码显微摄影技术	(147)
6.2.1	数码相机的结构和性能	(148)
6.2.2	数码相机和普通相机的区别	(152)
6.2.3	数码显微摄影的要素	(154)
6.2.4	数码显微摄影的白平衡控制	(156)
6.2.5	数码摄影的微距拍摄	(157)
6.2.6	数码显微摄影方法	(158)
6.2.7	数码相片的计算机处理	(160)
附录A	显微技术相关网络链接	(163)
附录B	常用试剂、溶液的配制方法	(165)
附录C	生物学实验室各种培养液的配制	(169)
附录D	常用缓冲液的配制	(178)
附录E	常用染色液和指示剂的配制	(181)
附录F	常用消毒液的配制	(189)
附录G	常用洗液的配制	(190)
附录H	普通固定离析液的配制	(192)
参考文献		(193)

第 1 章 显微技术发展历史

1.1 显微镜的发明史

1.1.1 显微技术的概念

生物学显微技术是基于生物学基础理论知识,以生物体为材料,在光学显微镜观察的范围内所开展进行的实验操作技术,它主要包括生物的组织、细胞化学,生物的显微制片技术,生物的显微观察,测量绘图及显微摄影技术,显微注射、切割、挑离等显微操作技术,相应的辅助技术还应包括各种显微镜的使用和保养,相应设备仪器的使用和保养等。作为技术,它是从 16 世纪末期以后,随着显微镜的发明和化学染料工业的发达而发展起来的,它的产生和发展有力地推动了动植物形态学、动植物解剖学的发展,并直接导致生物细胞学、动植物胚胎学、微生物学的产生和发展。可以认为,从 1665 年英国物理学家罗伯特·虎克(Robert Hooke, 1635—1703)用削笔小刀将木栓切成薄片,在他自己制造的一架筒式显微镜(放大 40~140 倍)下观察发现并命名软木(木栓)细胞(cell)开始(《Micrographia》, Robert Hooke, 1665),就产生了显微技术(microtechnique),罗伯特·虎克因此也被公认为世界上第一位显微技术学家。可以设想,如果没有显微镜的出现,就无所谓显微技术,显微技术简单地讲,就是在显微镜所能观察的范围内的一切实验操作和其产生的原理知识及方法技术。

生物显微技术(biological microtechnique)是指在显微镜的观测范围内用生物材料作实验对象的专门技术。显微技术的再发展是超显微技术,也称电子显微镜技术,顾名思义是指在电子显微镜所观测范围内的实验方法技术,本教材所述的主要是生物显微技术。

1.1.2 显微镜的发明史

学习生物显微技术,自然而然会首先想到显微镜是何人发明的?切片机最初是什么样的?一开始人们是怎样制片、镜检?等等。这些必备工具及技术发明创造,代表和反映了生物显微技术发展的里程碑,查找考证这些实物和资料可能是相当费力的,然而作为一般了解,对于启发思路,促进显微技术发展,无疑是有益的。

显微镜(microscope)一词,是 1625 年由法布尔首先提出来并使用的,一直沿用

至今,成为这类仪器的定名。显微镜的使用时间,至今无确切的记载。因为它是古代透镜研磨工匠们的集体智慧和后人不断改进的产物。透镜的磨制早在公元 12 世纪就有人在进行了(如阿拉伯人 Al-Hagen),而显微镜最初的开拓者是英国的狄更斯(Digges)和荷兰的詹森父子(Hans and Zachrias Janssen)。詹森父子在 1590 年制造了世界上第一台放大率约 20 倍以内的原始显微镜。1609 年意大利物理学家、天文学家伽利略(Galileo)制造并定名为望远镜,次年又制造了具有物镜、目镜及镜筒的复式显微镜,并把整个光学系统固定在一个支架上进行调焦,观察微小的物体。1611 年德国天文学家开普勒(Johannes Kepler)说明了显微镜的原理。近代显微镜的原形可能是在 1628 年前后由舒纳(C·Scheiner)在开普勒设计原理基础上制造的。17 世纪中叶后,显微镜的制造有了较大的发展。当时的欧洲宫廷贵族将此作为一种装饰或高级玩具而互相炫耀。而英国的物理学家罗伯特·虎克正是在这种情况下于 1665 年制造了一台设有基本的简易装置,性能稍高并有物镜与目镜之分,能放大到 140 倍的复式显微镜(见图 1-1)。他用这台显微镜观察栎木软木塞切片,发现了许多小蜂房状结构,他把每一个小蜂房空间称之为“细胞”(cell)。至此,“细胞”这一名词开始运用。在虎克的发明后不久,微生物创始人、植物解剖学家荷兰人安东尼·范·雷文霍克(Antony Van Leeuwenhoek, 1632—1723)创造出放大率约达 280 倍的显微镜,还用他自己发明的显微镜观察了微生物和血球等,并发现了细菌(1683)。在他的一生中制造了约 400 台显微镜,为显微镜的改进作出了巨大贡献。荷兰雷敦大学博物馆至今还珍藏了一台他的显微镜。1695 年荷兰学者惠更斯(Christian Huygens)设计并制造出结构简单但效果更好的双透镜目镜——惠更斯目镜。这种目镜至今仍广泛地应用于各种普通型显微镜上。如果把 16 世纪末划为显微镜的发明时代,那么 17 世纪、18 世纪就是显微镜不断得到制造和实际应用的时代,不过在此期间还没从基本理论上来解决显微镜的设计制造和改进等问题。直到 19 世纪中叶,杰出的德国物理学家、数学家及光学大师——耶拿大学的教授恩斯特·阿贝(Ernst Abbe, 1840—1905)提出了显微镜的完善理论,说明了其成像原理、数值孔径等问题。受卡尔·蔡斯(Carl Zeiss, 1866—1888)厂主的邀请,在 1866—1876 年期间,他作为蔡斯光学工厂的一名合股人,发明并制造了消色差物镜和油浸物镜等。他对光学玻璃、光具、显微镜的设计制造和改进作出了重要贡献。从 19 世纪至 20 世纪上半叶,欧洲的一些科学家主要是致力于提高显微镜的分辨率及观察效果,设计和制造出了反射镜、消色差物镜、大数值孔径物镜、油浸物镜、石英玻璃校正的复消色差物镜、暗场聚光镜、偏光附件及补偿目镜等光学部件,使显微镜的性能不断得到提高并扩大了其应用范围,同时显微镜的造型也日趋完善。随后又利用光波的特性和规律对成像光路作了改进,如 1902 年艾夫斯(E. Elvess)奠定了现代双目镜的基本系统。1935 年荷兰学者泽尼克(Frits Zernike)发现相衬原理,成功地将相衬法用于显微镜上,于 1941 年在德国的蔡斯(Carl Zeiss)厂诞生了第一台相衬显微镜。他对显微镜中的光学信息进行了有效的处理,从而获得了 1953 年度的诺贝尔奖。从此以后,显微镜就有了明



图 1-1 罗伯特·虎克制造使用的显微镜

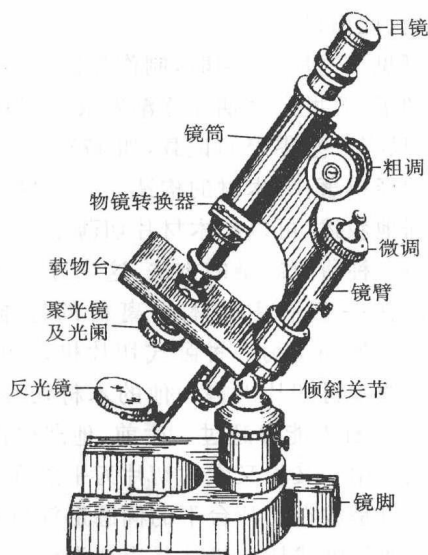


图 1-2 19 世纪 80 年代的 Zeiss 显微镜

场、暗场、相衬、偏光、干涉、紫外、荧光、体视、倒置等类型的发展。光学显微镜的机械部件的基本构型约在 19 世纪 80 年代完成定型(见图 1-2)。目前使用的小型生物研究显微镜几乎全部保持着 19 世纪 80 年代 Zeiss 显微镜的原型。

近代,由于新技术、新理论应用在显微镜中,20 世纪 60 年代中期又研制出诺马斯基(Nomarski)微分干涉相衬显微镜,它在许多学科的研究工作中已显示出其优越性。目前各类显微镜及显微技术都还在不断发展,无论是在光源、光路设计、多用途附件联机使用等方面都还不断有新的改进。为了提高显微镜的使用效果,扩大其应用领域,使传统的显微镜从单纯的目视、人为定性判断向客观的定量、自动化方面发展,显微镜开始渐渐与其他仪器设备配合使用,例如,它和摄像系统联机组成摄影显微镜,和电视摄像机联机组成电视显微镜,和分光仪联机组成显微分光光度计、图像仪,和计算机联机组成显微图像分析仪等。由此可见,显微镜的发展还尚无止境,相应的显微技术也在不断发展。

1.2 显微解剖切片机发展史

最初对显微镜下所观察的材料处理是非常粗糙原始的,如撕碎、粘涂等。1665 年罗伯特·虎克在他著名的《显微镜图志》一书中提到他用削鹅毛笔的小刀,将木栓切成薄片再观察。之后,1682 年英国的植物学家格雷韦(Nehemiah Grew, 1641—1712)出版了世界上最早的一本《植物解剖学》一书,对显微镜观察所需要的大量植物材料,他只笼统地说到他是用刀斜切、直切、横切来制作的,并提到对于观察植物的各细微部分,显微镜和刀子是必需的;有些材料不用刀子,就用撕碎、破裂等方法来分割

材料,仅此而已。

可见 17 世纪中期时,制作显微镜所观察的材料方法仅仅只是原始的徒手操作,一直到了 18 世纪后期才逐渐发展出了用机械手段进行切片,其产生演进的过程比较模糊,只有一些零碎的记载,如 1770 年著名的木材解剖学家 John Hill(1716—1775)在他的经典著作《木材的构造》一书中提到的,由他首次发明制作的一种圆筒式切片机。据他叙述,可以把木材片切薄至 $12.7\ \mu\text{m}$ 。他在书中还叙述了将木材进行离析,来作为一种研究纤维的方法,这一方法在 1812 年经过 Moldenhawer 改进,发展成为至今还在一直沿用的木材离析的标准方法。Hill 逝世的那一年(即 1775 年),Custance 发明了另一种卧式切片机,并用这一自己设计的切片机,制作出在当时最为优良的木材切片出售。他的木材切片曾风行 30 年,其切片的精致水平在他死后 50 年都未有人能够超过。生前,他严格保密他的机械,死后才被人发现。原来,他的切片机是用一又长又大的切片刀平放在切片台上,用手推动可以斜向地切割木本材料。材料是放在切片台下的椭圆形深坑里,由一系列螺旋杆控制,固定上升切片。可以认为他的卧式切片机就是当今滑动切片机的最早雏形。1787 年 Adams 设计出一种比 Hill 圆筒式切片机和 Custance 卧式切片机更易操纵,切片更好的切片机,并把它作为一种商品在 18 世纪末期大量出售。1830 年前后,Pritchard 又制造了一种切片机,这可能是继 Hill、Custance 和 Adams 切片机之后的第 4 种著名的切片机。

上述四种切片机是比较早期的著名例子。其实从 19 世纪初期以后,切片机的制造就有了许多种,在此不一一赘述。至于切片机(microtome)这一通用名称,于 1839 年法国的 Chevalier 的著作中首先提到。切片机的首创问题,还有很多争论。而“显微镜切片学”这一名词,是在 1885 年出版的李氏《显微切片学家手册》(Lee, The Microtomist's Vade—mecum, 1885)问世后,才正式被肯定下来,该书也是国际上被公认的现代显微技术的最早、最著名的典籍(从 1885 年出版以来,到 1950 年已经过 11 次修订再版)。

另外,关于手持切片机(hand microtome)、冷冻切片机的产生和发展情况也需补充一点。1853 年英国的 Currey 在翻译德国 Schacht 的《植物显微镜学》时,吸取了 Schacht 的原来设计,提出了一些改进的想法,并由另一位名叫 Ross 的人用铜管制成了一种中间用一螺旋杆推动材料上升而切片的机械,当时称 Ross 切片机。1855 年又由一位名叫 Ravier 的人在 Ross 切片机上加装一圆盘,用于支持切片的刀子。如此,Ravier 切片机就成了一种上面有一圆盘,焊接在下面的铜管上,圆盘中央有一孔,直通下面铜管,管筒内可装入所切树木枝干等材料,放材料的下面有一螺旋杆装置,转动螺旋杆就推动材料上升,在圆盘上用剃刀或其他切片就可进行徒手切片了。这一装置原理,一直应用到今天的手持切片机上。手持切片机再加以改进就成了台式切片机(table microtome),原理还是一样,但可放置在桌上,切片时稳定性更好,进料装置的调节精密度也更高了一些。据载这种简单小型的台式切片机,最早是于 1856 年由一个叫 Welcker 的人设计并制作的。这种台式切片机在 19 世纪后期曾风

行一时。至于冷冻切片机,需要说明的是冷冻切片机的发明是与冷冻切片的发现和冷冻切片方法的思考分不开的。1859年由 Stilling 编著的《脊髓结构的新观察》一书中,详细介绍了他自己的发现,即他在 1842 年 1 月 24 日晚上,偶然将一块人的脊髓忘记在实验室窗槛上,次日清晨发现已冻成了硬块,他用此冷冻后的脊髓做了徒手横切片,放在 15 倍的显微镜下观察,清楚地看到了脊髓上的放射束状神经与其中中央束,他立即意识到此法是揭开脊髓奥秘的关键,随后他用这一方法做了大量的脊髓研究并出版了上述这本书。他发现的这一冷冻切片方法,对动物软组织切片是非常有用的,可惜当时的冷冻方法还没能较好地与切片机件相结合。一直到了 1871 年才有了新突破,一位叫 Rutherford 的人,在他的切片机上夹持材料的周围设置了一冷冻槽,槽内加入 0.75% 盐水和冰块,这样就起到了冷冻材料的作用,但其冷冻程度不易控制,冷冻的材料往往切片时易成冰屑碎开,后来他又进行了改进,在切片时向刀刃吹冷气,并用阿拉伯树胶液代替水作材料包埋剂,这样切片时材料就不碎了,这种方法一直沿用到今。1876 年 Hughes 设计出一种用乙醚(ether)挥发扩散吸热的方法来冷冻材料的切片机,但由于乙醚有极强的麻醉性,并易燃烧,且制造装置也不容易,所以极大地限制了其应用范围。直到 20 世纪初,1901 年由 Bardeen 将乙醚改为用液态二氧化碳(CO_2)作为冷冻剂之后,才进入到冷冻切片机的一个新时代,这种应用二氧化碳从一个可控制的喷管喷出,利用其扩散适当冷冻材料后切片的机械,一直沿用到今。20 世纪 60 年代以后,出现了应用半导体或其他电制冷装置,逐渐代替了笨重的液态二氧化碳钢瓶和与之联结的软管等附件,大大方便了其运用。近年来又出现了全封闭电制冷精密冷冻切片机,其冷冻室能保持在 $-40 \sim -30^\circ\text{C}$,切片厚度在 $2 \sim 20 \mu\text{m}$ 之间可调,并且可进行全自动切片,这种切片非常适于细胞化学和组织病理学快速检测制片需要。

当今在生物学上所用最多的切片机是滑动切片机(sliding microtome)和旋转式切片机(rotary microtome),这两种类型切片机的最大区别在于:滑动切片机是刀动,而材料不动,切片刀较长较大,适合作稍大稍硬材料,如木材切片等;而旋转式切片机是材料动,刀不动,适合作石蜡切片等。国内许多单位进口切片机常见的有美国 AO (American Optical Corporation)滑动切片机(见图 1-3)、旋转式切片机(见图 1-4)和

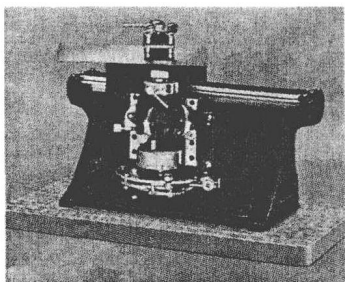


图 1-3 AO860 滑动切片机

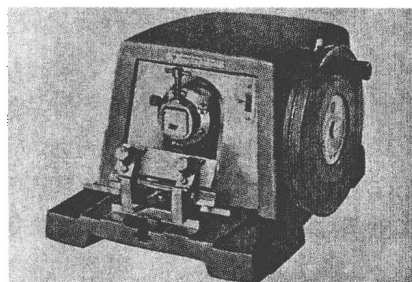


图 1-4 AO 旋转式切片机

Leitz 转动切片机。50 年代初我国仿制生产切片机最早的是上海双钱公私合资有限公司生产的一种双钱牌切片机。现已有多家厂家生产切片机,如浙江金华无线电厂生产的半导体冷冻切片机、山西医学院仪器厂生产的电制冷推拉切片机、浙江象山科学精密仪器厂生产的振动式切片机等。国际上名牌产品除美国的 AO 系列、德国的 Leitz 系列外,还有英国的 Shandon 系列和日本岛津制作的系列产品。这些系列产品中,数德国 Jung 切片刀和美国的 AO 切片机及 Shandon 磨刀机等最为优良。另外在这些切片机系列中产生并发展出了 Shandon 和 AO 等牌号的组织自动脱水机、处理仪、包埋仪及许多专门的零配附件。至今,人们已能利用超薄切片机切制出仅有 $0.1\ \mu\text{m}$ 左右厚的切片,以供电子显微镜观察需要。由此可见,切片机及相应的配件还正处于不断改进、不断发展的阶段,我们认识到这一点,正是为了更好地掌握、使用和完善我们手中的工具,以满足不断提出的工作需要。

1.3 染色技术发展史

1.3.1 显微技术的用具及其方法演进

显微技术的发展除主要依赖于显微镜和切片机这 2 种仪器设备外,还包括载玻片(slide)、盖玻片的使用,制片方法技术的改进,固定剂、脱水剂、包埋介质、封固剂及染料的利用,等等。据 Bonanni(1691)书中描述,最早用以观察的载玻片是在象牙片或硬木片中间钻孔,孔中安上二片云母片,然后将所要观察的材料夹在平卧显微镜的物镜与灯光之间进行观察。18 世纪后期(1780—1790)有人把嵌上的云母片改为薄玻璃片。19 世纪初期(1820—1825)废去了硬木片,而直接在一块玻璃片上贴上有孔的纸片,将材料放入孔内后,再用剪成圆形小块的云母片覆盖在上面,或者用 2 片玻璃片夹入有孔纸片和材料,这可以说就是使用载玻片的雏形了。19 世纪中期后,基本上都已用一片玻璃片作为载玻片使用了,但其宽度、厚薄最初却差别很大,直到 19 世纪末才逐渐日趋一致。现今标准化的载玻片长宽为 $75\ \text{mm} \times 25\ \text{mm}$,厚度为 $0.96 \sim 1.06\ \text{mm}$,或 $1.16 \sim 1.27\ \text{mm}$,然后又发展出有凹形的载玻片和刻槽方格等特殊用场的载玻片,其大小厚薄就比较多样了。至于盖玻片,即如上述所提到的,最初(17 世纪末)是由云母片来充当的。18 世纪中期后就有人开始利用玻璃盖玻片来代替云母片了,如 1774 年木材解剖学家 Hill、1825 年法国的 Chevalier 制片就已用到了盖玻片,不过他们当时只是临时性地使用。直到 19 世纪中期,随着各种树脂类封固剂的应用,盖玻片才成为永久制片所必需的物体,形状有圆形、方形、长方形等多种类型,但厚薄不统一。至目前盖玻片的国际标准厚度为 $0.17\ \text{mm}$,允许范围在 $0.16 \sim 0.18\ \text{mm}$,不合这一规格的盖玻片会产生覆盖差(difference of cover glass)影响成像质量。

染色片架和染色缸的研制始于 1895 年,由 Borinmann 首先创制出一种长条形、

可装 60 片的染色片架,再放入一长条玻璃缸进行染色。后在 1897 年由 Coplin 又重新设计出一种直接把玻片插入中间有四条纵槽,可装 4 片或背靠背装 8 片的玻璃染色缸,特称之为“科普林染色缸”(Coplin staining jar)。我们今天所用的染色缸与 100 多年前创制的完全一样,有卧式、立式之分(见图 1-5)。染色架、染色缸、培养皿(petri dish)、烫板、包埋模具、温台、温箱等都是从 19 世纪末期后逐渐发展起来的。

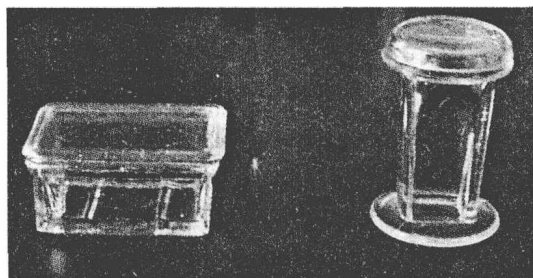


图 1-5 卧式和立式染色缸

1.3.2 染色技术发展史

如果新鲜的组织材料不经过处理,就会干枯萎缩,就会改变细胞、组织原来的状态,所以需要预先进行固定处理。切片中没有介质渗入细胞中作衬垫,柔软的材料就不能切成薄片,这就涉及脱水剂、渗透剂、包埋剂的使用。据说预处理最早于 1666 年, Malpighi 将人脑煮熟变硬后,再刷上墨水,以利观察各部分的结构,这可视为将生物材料有意识地作预先变性处理再加以结构观察的开始。而植物学上最早是从 John Hill(即 Hill 圆筒式切片机发明者,1770 年)用其沤制方法预先处理木材材料开始的。他的做法是将木材劈成小条(分割),装在柳条篮中,放入小溪里,使木条沤制变软,再将这变软的小木条投入明矾水中处理,清洗、漂白,待干后,再投入酒精中固定硬化储存。他还记述到,沤制变软的木材如不经过这样固定、硬化处理就易变质,等等。这可视为是一种最早较粗糙的软化、固定再硬化处理切片的方法。

1867 年以前的制片染色全为单染(即用一种染料染色制片)。1867 年 Schwartz 用苦味酸胭脂红染色后,开创了双重染色法。1891 年 Flemming 用沙黄、结晶紫、橘黄完成了三重染色法。现在植物制片中常用的 Johansen 四重染色法是美国斯坦福大学的 Johansen 于 1940 年提出的。实际上,染料在我国很早就开始利用了。我们的祖先早在黄帝时代至周朝初期(公元前 1122 年至公元前 225 年),继巢丝织布之后,就用靛青、铅粉、朱砂、雄黄、石膏等进行织物印花染色了。1676 年英国从印度传入织物印花技术时,已是中国的明末清初。中国的靛青(蓝靛)染料在中世纪(10—14 世纪)时就由阿拉伯商人带至并销售于欧洲。

至于将染色应用于显微技术方面,据近代学者 Lewis 1942 年考证,最早应用染料将组织着色的是雷文霍克(Leeuwenhoek),他于 1714 年致英国皇家学会的一封信

(1719 年出版)中,提到用藏红花(saffron)浸液染色比较好观察肥牛肉与瘦牛肉的肌肉纤维。Trembly 报导将水螅(hydra)饲喂各种染料液后,可得染色的标本。而在植物学方面,最早应用于染色观察的还是植物解剖学家 John Hill,他将胭脂虫(coccus cacti)粉溶于酒精,然后过滤,将滤液染植物的枝干组织。他还用一种所谓的“媒染方法”促使组织着色,即先将小条木材浸在乙酸铅(铅糖)溶液中浸泡 2 天后,转入氧化钙(生石灰)与三硫化二砷(雌黄)的混合液浸泡 2 天,无色的小木条逐渐呈深褐色,制片后再镜检观察就可看到原本无色的木材结构清楚地显现出来了。随后,1838 年 Ehrenberg 用上述的胭脂红染液及靛青染液对微生物染色,1849 年 Goppert 及 Cohn 又进行了柔曲丽藻(*nitella flexilis*)细胞内容物染色观察,1854 年 Hartig 用胭脂红染液染各种植物材料。而被德国人推崇为“染色之父”的 Gerlach(主要是动物组织细胞的染色),他的一篇组织学中使用染色法的重要文章发表时已是 1858 年。无可否认,文章发表的染色理论具有重大意义,但染料的应用却早在文章发表之前许多年就开始了。

由上述可见,最早开始使用的染料全是天然染料(主要直接来自于动植物体),如胭脂红染料(卡红、洋红)、苏木精、靛青、地衣红、藏红花、茜草黄等。1856 年 18 岁的 Perkin 在合成奎宁试验时首先从煤焦油中的苯胺(aniline 也称亚尼林)原料中合成得到了一种不纯净的染色物质,他称之为苯胺紫(mauve)。他的这一发现开辟了人工合成染料工业的新领域。与此同时,人工染料(或称煤焦油染料,苯胺染料)的利用也极大地影响到生物显微技术的染色方面的发展。

Perkin 在发明合成苯胺染料的同年又合成了碱性品红(1856 年),之后陆续合成了番红(1859 年)、甲基紫(1861 年)、曙红(1871 年)、甲基绿及亚甲蓝(1876 年)、酸性品红(1877 年)、橘红 G(1878 年)、苏丹Ⅲ(1880 年)、结晶紫(1883 年)。相应的把这些染料引入到生物显微技术中进行制片染色的最早创始人及应用开始年代如表 1-1 所示。

表 1-1 合成染料年代信息

染料合成年代/年	人工染料名称	引入应用的年份/年	引入应用的作者
1856	紫丁香苯胺 (lilacaniline 同苯胺紫)	1862	Beneke(染动物组织)
1862	苯胺蓝	1863	Frey
1856	碱性品红	1863	Waldeyer、Frey、Roberts
1861	苦味酸	1863	Roberts
1861	甲基紫	1875	Carnil
1871	曙红	1875	Fischer
1859	番红	1877	Ehrlich
1871	甲基绿	1877	Calberla
1871	俾士麦棕	1878	Weigert