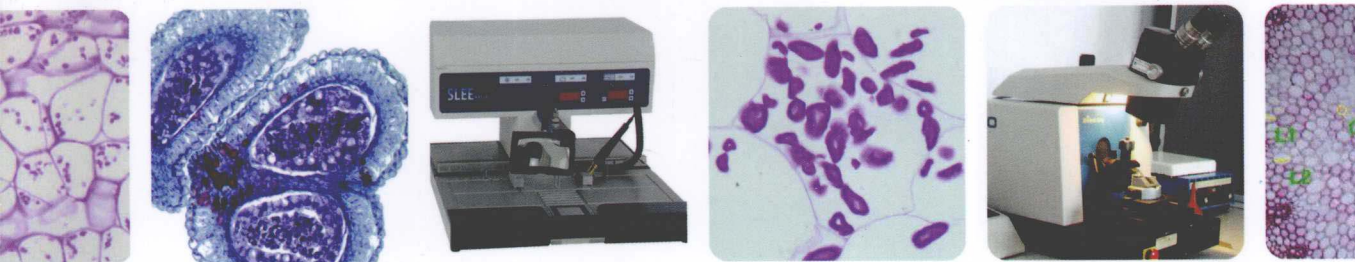


普通高等教育“十二五”规划教材



植物细胞 与组织研究方法

叶宝兴 毕建杰 孙印石 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

植物细胞 与组织研究方法

叶宝兴 毕建杰 孙印石 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

植物细胞与组织研究方法是生物类、大农学类的大学生、研究生的一门重要课程,也是一门重要的实验技术。本书根据编者多年的教学、科研积累以及实验技能整理而成。主要介绍植物细胞与组织研究中广泛应用和实用的内容和方法,包括植物制片技术(如石蜡切片、半薄切片、木材切片、徒手切片、印痕技术、离析技术、涂压技术等)、植物组织与细胞化学、各种显微技术(如正置显微技术、倒置显微技术、荧光显微技术、体视显微技术、显微操作技术等)、图像采集、图像处理、全书图文并茂,既系统地介绍了当今植物细胞与组织的研究方法,又突出了实验技术要点。

本书可作为农林院校植物生产类本科生、研究生各专业的参考书,亦可供综合性大学、师范类大学生物类师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物细胞与组织研究方法/叶宝兴,毕建杰,孙印石
主编. —北京:化学工业出版社,2011.3
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-10207-2

I. 植… II. ①叶…②毕…③孙… III. ①植物-细胞培养-研究方法-高等学校-教材②植物-组织培养-研究方法-高等学校-教材 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 254282 号

责任编辑:尤彩霞

装帧设计:关 飞

责任校对:宋 玮

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张 12½ 字数 320 千字 2011 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 36.00 元

版权所有 违者必究

《植物细胞与组织研究方法》

编写人员

主 编 叶宝兴 毕建杰 孙印石

参 编 (以汉语拼音顺序排列)

毕建杰 段祖安 高新起 郭启芳 韩秀兰

孔兰静 彭卫东 强 薇 宋 莹 孙印石

谭秀山 王 超 王淑静 姚 建 叶宝兴

赵法茂 祝丽香

前言

植物细胞与组织的研究方法是一门理论与实践紧密结合的实验生物学课程。随着生命科学的发展以及学科间的交叉与渗透,植物细胞与组织的研究不仅是经典植物学研究的必备技术,而且已成为现代遗传学、现代园艺学、分子生物学、植物与微生物分子互作等研究的重要技术。为了探索积累经验,近年来在学校生命科学学院和研究生处的支持下,我们对该课程的教学体系、教学条件、教学内容和教学方法等做了相应的调整、补充和改革,以全面提高研究生的实践教学、帮助学生在理解实验原理的基础上熟练掌握关键技术,培养学生综合分析能力。由于形成新的教学体系和教学内容,不少师生都向研究生处反映,希望编写一本既全面而又实用的研究工具书。为了满足这一要求,我们聘请了在该领域研究上有丰富实践经验的专家撰写了这本研究生教材。

本书在内容上既反映了显微技术的较新成就,又注重切合当前教学实际需要。书中第一篇介绍植物细胞与组织研究特别是植物制片的基本原理,从制片原理、制片过程、染色原理、染色过程等全方位进行详细的阐明。第二篇介绍常用的植物制片技术,既包括传统的切片技术(如石蜡切片、徒手切片、半薄切片等)、非切片技术(涂压制片、整体制片、透明制片、离析制片等),同时又介绍了植物显微化学相关原理、技术[如细胞壁成分显示与测定、蛋白质显示与测定、脂类显示与测定、核酸(DNA)显示与测定、糖类染色与测定等]。本书还简要介绍了部分现代植物生理学、遗传学等相关领域的部分研究技术,如细胞器(叶绿体、线粒体、液泡)分离、染色、观察技术、DNA显色分析技术等。

对于显微观察、摄影方面,本书着重介绍常用的正置显微镜、倒置显微镜、体视显微镜、荧光显微镜等显微镜的基础原理、镜体结构、使用操作等。介绍图像捕获原理及显微拍摄软件的使用、显微图像的基本处理、数据测定。

本书内容丰富,汇集了经典植物细胞学、细胞生物学及植物细胞工程中多种常用的研究方法,可供农林院校的相关专业研究生和科学工作者参考。

由于编者水平有限,书中难免有疏漏之处,敬请广大读者指正批评。

编者
2010年8月

目 录

第一篇 植物细胞与组织制片原理

1 植物制片的目的和方法	2	2.8.3 树脂性封固剂	28
1.1 植物制片简介	2	2.8.4 其它封固剂	28
1.1.1 植物制片目的	2	3 常用染色剂及染色方法	29
1.1.2 植物制片方法	2	3.1 常用染色剂	29
1.2 植物制片常用仪器、用具、药品	2	3.1.1 苏木精 (Haematoxylin)	29
1.3 植物制片一般流程	7	3.1.2 洋红 (Carmine)	32
1.3.1 一般制片	7	3.1.3 番红 O (Safranin Y 或 Safranin A)	34
1.3.2 石蜡/半薄切片	7	3.1.4 亮绿 (Light Green)	34
1.4 植物制片相关常用技术	7	3.1.5 固绿 (Fast green)	34
1.4.1 清洁技术	7	3.1.6 孔雀绿 (Malachite Green)	35
1.4.2 封边与封片 (藏) 技术	8	3.1.7 甲基绿 (Methyl Green)	35
1.4.3 切片刀的磨刀技术	9	3.1.8 碘绿 (Iodine Green)	35
2 植物制片的原理	10	3.1.9 结晶紫 (Crystal Violet)	36
2.1 选材	10	3.1.10 橘红 G (Orange G)	36
2.1.1 材料的选择	10	3.1.11 曙红 (Eosin)	36
2.1.2 材料的切取	10	3.1.12 真曙红 (Erythrosin)	37
2.2 杀死、固定与保存	11	3.1.13 中性红 (Neutral red)	37
2.2.1 杀死、固定与保存	11	3.1.14 酸性品红 (复红) (Acid fuchsin)	37
2.2.2 固定的基本原理	12	3.1.15 碱性品红 (复红) (Basic Fuchsin)	37
2.2.3 常用的固定剂	13	3.1.16 刚果红 (Congo Red)	38
2.2.4 固定操作注意事项	19	3.1.17 甲苯胺蓝 (Toluidine blue)	38
2.3 洗涤	21	3.1.18 甲基蓝 (Methyl blue)	38
2.3.1 洗涤的作用	21	3.1.19 亚甲基蓝 (Methylene Blue trihydrate)	39
2.3.2 洗涤的方法	21	3.1.20 苏丹Ⅲ (Sudan Ⅲ)	39
2.4 脱水剂与脱水	21	3.1.21 苏丹Ⅳ (Sudan Ⅳ)	39
2.4.1 脱水	21	3.1.22 苯胺蓝 (Cotton Blue)	39
2.4.2 常用的脱水剂	22	3.1.23 地衣红 (Orcein)	40
2.5 透明剂与透明	23	3.1.24 天青石兰 (Celestine Blue)	40
2.5.1 透明的作用	23	3.1.25 苦味酸 (Picric Acid)	40
2.5.2 常用的透明剂	23	3.1.26 俾斯麦棕 (Basic Brown)	40
2.6 制片	24	3.1.27 玫瑰红 (Rhodamine)	41
2.7 染色剂与染色	24	3.1.28 詹纳斯绿 (Janus Green)	41
2.7.1 染色的发现与染色原理	24	3.1.29 红四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetra- zolium chloride)	41
2.7.2 染色剂的概念与性质	25		
2.7.3 染色剂的种类	26		
2.8 封固与封固剂	27		
2.8.1 水溶性封固剂	27		
2.8.2 糖浆封固剂	27		

3.1.30 间苯三酚 (Phloroglucinol dihydrate)	42
3.2 染色方法	42
3.2.1 染色方法的种类	42
3.2.2 常用的染色方法与步骤	43

3.3 染色中必须注意的几个问题	51
3.3.1 染色液浓度	51
3.3.2 染色温度与时间	51
3.3.3 固定液对于染色的影响	51
3.3.4 染色时应注意的几个问题	52

第二篇 植物细胞与组织制片方法

4 石蜡切片法	54
4.1 取材、固定、保存、洗涤	54
4.1.1 取材	54
4.1.2 固定	54
4.1.3 冲洗	54
4.2 脱水、透明	54
4.2.1 脱水	54
4.2.2 透明	56
4.3 浸蜡	56
4.4 包埋	57
4.4.1 包埋方法	57
4.4.2 包埋石蜡选择	57
4.5 修块、切片	58
4.5.1 修块、粘固	58
4.5.2 组织切片机的结构及操作步骤	59
4.5.3 切片注意事项	60
4.6 粘片、展片、烤片(烘片)	61
4.7 脱蜡、复水、染色、脱水、透明	62
4.8 封片	63
5 半薄切片技术	64
5.1 水溶性树脂包埋	64
5.1.1 GMA 包埋法	64
5.1.2 Quetol 523 包埋	66
5.1.3 JB-4 包埋	67
5.1.4 Lowicryl K ₄ M 包埋法	69
5.2 环氧树脂包埋法	69
5.2.1 环氧树脂包埋的机制和配方	69
5.2.2 材料洗涤、脱水	71
5.2.3 渗透与聚合	72
5.3 修块和切片	72
5.3.1 修块	72
5.3.2 切片刀	72
5.3.3 切片注意事项	73
5.4 染色	73
6 非切片制片	74
6.1 暂时封藏	74
6.1.1 简易观察制片	74
6.1.2 孢子及花粉粒萌发观察制片	74

6.2 整体制片	75
6.2.1 甘油法	75
6.2.2 甘油冻胶法	76
6.2.3 甘油-二甲苯法	76
6.2.4 糖浆法	77
6.2.5 水封藏法	77
6.2.6 松节油法	77
6.3 涂压制片	77
6.3.1 涂压法的基本步骤	78
6.3.2 植物花粉母细胞的涂片法	79
6.3.3 植物根尖、茎端的压片法	79
6.4 离析制片	81
6.4.1 硝酸-氯化钾离析法 (Schaltze 法)	81
6.4.2 铬酸-硝酸离析法 (Teffrey 法)	81
6.4.3 乙酸-过氧化氢离析法	81
6.4.4 煮沸法	82
6.4.5 盐酸-草酸离析法	82
6.4.6 氨水离析法	82
6.4.7 氢氧化钠离析法	82
6.4.8 乙醇-盐酸离析法	83
6.4.9 次氯酸钠法	83
6.5 透明制片	83
6.5.1 乳酸-苯酚透明法	83
6.5.2 氢氧化钠透明法	83
6.5.3 冬青油透明法	83
6.5.4 甘油透明法	84
7 植物细胞与组织显微测定	85
7.1 碳水化合物显微测定	85
7.1.1 高碘酸-希夫反应——显示多糖 (淀粉粒及细胞壁纤维素等)	85
7.1.2 碘-碘化钾反应——显示淀粉粒	86
7.1.3 氯化铁羟胺反应——显示果胶	86
7.1.4 氯碘化锌反应——显示纤维素	87
7.1.5 氯代亚硫酸盐法——显示 木质素	87
7.1.6 苯胺蓝荧光法——显示胼胝质	87

7.1.7	亚硫酸铁反应——显示单宁	88	7.5.1	联苯胺反应——显示过氧化 物酶	101
7.1.8	银还原法——显示维生素 C	88	7.5.2	氯化三苯四氮唑 (TTC) 法——显示脱氢酶	102
7.2	脂类显微测定	89	7.5.3	四氮唑盐反应——显示琥珀酸 脱氢酶	102
7.2.1	苏丹染料染色法——显示全部 脂类	89	7.5.4	Nadi 反应——显示细胞色素 氯化酶	102
7.2.2	Nile 蓝法——显示中性脂肪及 酸性类脂	90	7.5.5	铅沉淀法——显示酸性磷 酸酶	103
7.2.3	锇酸染色法——显示中性不饱和 脂类	90	7.5.6	钙-钴沉淀法——显示碱性 磷酸酶	103
7.2.4	酸性氧化苏木精法——显示 磷脂	90	7.5.7	铅沉淀法	104
7.2.5	过甲酸-希夫法——显示不饱和 键脂类	91	7.5.8	钙皂沉淀法——显示酯酶	106
7.2.6	丙二醇苏丹法——显示类脂	91	7.5.9	靛蓝法——显示酯酶	107
7.3	蛋白质的显微测定	92	7.5.10	邻苯二酚法——显示多酚 氧化酶	107
7.3.1	汞-溴酚蓝法——显示总蛋白质	92	7.6	细胞壁成分显微测定	107
7.3.2	茚三酮 (或四氧嘧啶)-希夫 反应——显示总蛋白质	92	7.6.1	纤维素测定	107
7.3.3	氯胺-T-希夫试剂反应——显示 总蛋白	93	7.6.2	木质素测定	108
7.3.4	固绿染色法——显示总蛋白质 或碱性蛋白	93	7.6.3	角质、栓质测定	109
7.3.5	偶联四唑反应——显示含色氨酸、 组氨酸和酪氨酸的蛋白质	94	7.6.4	果胶质测定	109
7.3.6	重氮化偶联反应——显示含酪氨 酸蛋白质	94	7.7	活体染色	109
7.3.7	Sakagushi 反应——显示含精氨酸 蛋白质	95	7.7.1	线粒体活体染色	110
7.3.8	对二甲氨基苯甲醛反应——显示 含色氨酸蛋白质	96	7.7.2	液泡活体染色	110
7.3.9	铁氰化铁法——显示蛋白 质-SH 基	96	8	其它切片技术	111
7.3.10	汞橙 (RSR) 法——显示 蛋白质-SH 基	97	8.1	徒手切片	111
7.3.11	巯基乙酸-铁氰化铁法——显示 蛋白质-SS 基	97	8.1.1	徒手切片法的应用及优缺点	111
7.3.12	过甲酸-希夫试剂反应——显 示-SS 基蛋白质	98	8.1.2	徒手切片操作过程	111
7.3.13	过甲酸-Alcian 蓝法	98	8.1.3	过程小结	112
7.4	核酸的显微测定	99	8.2	滑走切片	112
7.4.1	孚尔根反应——显示 DNA	99	8.2.1	滑走切片方法和步骤	113
7.4.2	甲基绿-派洛宁 (焦宁) 染色 法——显示 DNA 与 RNA	99	8.2.2	材料的软化处理方法	113
7.4.3	苏木精色法	100	8.3	蒸汽切片	114
7.4.4	铁矾-苏木精染色	101	8.4	冰冻切片	114
7.5	酶的显微测定	101	8.4.1	冰冻的原理	114
			8.4.2	利用专用冰冻切片机和干冰 进行切片	115
			8.4.3	切片过程	115
			8.4.4	半导体式冷冻切片机	115
			8.4.5	恒冷箱式冷冻切片机	115
			8.5	木材切片	116
			8.5.1	直接切片	116
			8.5.2	包埋切片	117

第三篇 显微镜与显微技术

9 显微镜简介	120
9.1 显微镜分类	120
9.2 显微镜基本原理	121
9.2.1 透镜成像的基本知识	122
9.2.2 显微镜光学系统成像	122
9.3 显微镜光学技术参数	123
9.3.1 透镜分辨率	123
9.3.2 分辨极限与放大率	123
9.3.3 景深	124
9.3.4 焦距和角孔径	125
9.3.5 色差	125
9.3.6 齐焦距	126
9.3.7 同轴度	126
9.3.8 覆盖差	126
9.3.9 工作距离	126
9.3.10 镜像亮度	127
10 常用显微镜	128
10.1 正置显微镜	128
10.1.1 机械部分	128
10.1.2 光学部分	132
10.1.3 照明系统	137
10.1.4 显微镜维护与保养	139
10.2 倒置显微镜	140
10.2.1 倒置显微镜简介	140
10.2.2 Olympus-XI 71 倒置显微镜	141
10.2.3 透射光明场观察步骤	148
10.2.4 相衬观察 (使用 IX2-ILL100 照明柱)	148
10.2.5 微分干涉衬 (DIC) 观察 (使用 IX2-ILL100 照明柱)	149
10.2.6 简易偏光观察 (使用 IX2-ILL100 照明柱)	151
10.3 体视显微镜的原理、结构与使用	151
10.3.1 体视镜光路	151
10.3.2 普通变焦体视镜	152
10.3.3 Olympus SZX16 型解剖镜	155
10.4 荧光显微镜	158
10.4.1 荧光原理	158
10.4.2 荧光显微镜原理	159
10.4.3 荧光显微镜结构	161
10.4.4 荧光显微镜使用	162
11 显微图像捕获及处理	165
11.1 显微图像捕获	165
11.1.1 显微图像捕获	165
11.1.2 Olympus DP71 图像捕获系统	166
11.2 图像处理	175
11.2.1 图像数字化	176
11.2.2 位图的有关术语	176
11.3 Image-Pro Plus 图像处理软件	180
11.3.1 Image-Pro Plus 窗口	181
11.3.2 Image-Pro Plus 操作	182
附录	185
参考文献	191

第一篇 植物细胞与组织制片原理

植物细胞与组织制片技术是植物结构生物学的重要组成部分，是从事植物生物技术、植物细胞学、结构植物学、植物生殖生物学、植物发育生物学等研究的必要技术基础，现已成为生物学工作者常用的一门实验技术。在现代生命科学领域的植物器官发育、遗传育种、分子鉴定、作物与病原菌互作、资源植物研究、林木材性鉴定等多方面的研究都需要应用制片技术。随着基因组学、分子生物学等相关研究的不断深入，植物显微技术与其结合应用的需求日益突出。不同研究需要、不同植物材料，需要不同的植物细胞与组织制片方法。本篇介绍常用的植物制片基本原理，包括制片目的、制片方法、制片器材、常用工具、染色剂种类、染色方法等。

1 植物制片的目的和方法

1.1 植物制片简介

1.1.1 植物制片目的

人类对于植物的研究发展至今,已从对于植物整体、根、茎、叶、花、果实等宏观形态、器官的观察、研究,经过植物的组织、细胞水平的研究,发展至现代分子水平的研究。对于组织、细胞及更深入的结构层次,绝大部分自然状态的植物材料并不能够直接用于研究操作、进一步的微观研究。要对植物微观结构进行研究(器官解剖观察、花芽分化、授粉受精、贮藏营养观测、染色体观察等),就必须将原先体积大、透明性差的植物材料进行特殊的处理,使其体积变小、厚度变薄、透光性增强而能够有可能用于显微观察。在进行显微观察时,如何区分生活或死亡的组织与细胞的不同显微结构(如细胞壁、细胞膜、细胞核、细胞质、各类细胞器、染色体等)、同一显微结构的不同组成成分(纤维素、果胶、蛋白质、糖类等)以及如何对某一具体的结构、成分进行特定观察,则需要对样品材料进行不同的染色处理,使各结构、成分吸附特定染料或发生化学反应而呈现不同颜色,进行区分。

植物制片就是要将较大的、不透明的、难于进行显微观察的植物材料进行各种特定处理,使其成为可以在显微镜下观察的、小而薄、完整透明、可明显区分不同结构和成分而又保持原先结构、状态的实验材料。

1.1.2 植物制片方法

为实现不同的观察目的,就要对不同的实验材料进行特定的制片处理。制片技术既有徒手切片、石蜡切片、半薄切片、木材切片、涂片、压片等传统的制片、染色方法,又有与其他现代技术相结合的新技术,如组织化学技术、免疫组织化学技术、原位杂交技术等。

根据制片后细胞生活状态,可将制片技术分为活体制片、杀死制片。活体制片可用于细胞存活的鉴定、线粒体活体观察、液泡系活体观察、细胞器提取观察、培养观察、荧光观察等。

根据制片保存时间,可将制片技术分为临时制片和永久制片。

根据制片过程是否使用刀具,可将制片技术分为切片技术和非切片技术。切片技术包括徒手切片、木材切片、火棉胶切片(现已不再使用)、蒸汽切片、冷冻切片、石蜡切片、半薄切片、超薄切片等;非切片技术有整体制片、透明制片、涂片、压片、离析制片、培养制片、印痕制片等。

1.2 植物制片常用仪器、用具、药品

(1) 显微镜 植物细胞、组织研究中,各类显微镜用于选择观察样品、检查切片蜡带、检查刀口、临时检片、切片后镜检、显微结构观察、显微测量、显微摄影等。常用的显微镜

有普通光学显微镜、倒置显微镜、体视显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、扫描电子显微镜、透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜等众多不同类型、不同用途的显微镜。部分显微镜的原理、使用将在第9~10章进行详细介绍。

(2) 切片机

① 旋转切片机 用手摇动旋转轮进行切片的显微切片仪器。一般由刀架、刀片、螺旋转杆、样品夹和摇把等组成。样品夹持部分(夹物器)可上下移动、前后推进,而刀片夹持部分则固定不动,切片时依靠样品材料随着夹持部分上下运动并向前推进而进行切片。旋转轮转动一次,组织块就按预设的切片厚度向前推进而切下一片切片。如果被切样品是石蜡包埋块,连续旋转手轮就可切出连续的蜡带。安装冷冻装置后可用于制备冷冻切片。有的旋转式切片机和一般旋转切片机有所不同,样品夹持部件可以作上、下垂直运动,但不能作前、后推进移动,而其刀架可借助微动装置的控制而作前后移动:切片时,机轮每旋转一次,刀架按调节好的切片厚度向前推进一次,完成切片。开放式切片机切片厚度范围常为1~25 μm ,封闭式切片机切片厚度范围则为1~50 μm 。

② 滑走切片机 适于火棉胶包埋块(早期使用,现已不用)的切片,也可切制未经包埋的材料,如木材、本质茎和草质茎等。滑走切片机的刀架滑动、夹物器固定。夹物器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。切片机的切片厚度常标为1~40 μm ,某些推动式切片机既能推拉一次切削一片切片,又能推拉数次切削一片切片,可以切削刻度范围外的极厚切片,植物显微实验用于滑走切片、火棉胶切片、冰冻切片及蒸气切片等。

③ 冰冻切片机 专用于冰冻切片,通常就在滑走切片机或旋转切片机上装一冷冻装置,一般为二氧化碳钢瓶(包括液体 CO_2 钢管、输气管及冷冻头等)、半导体制冷器或自动冷冻机等。新鲜组织或已固定的组织经制冷后即可切片,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,厚度范围1~30 μm 。半导体制冷器是利用半导体温差电制冷原理制成的。它能使标本与切片刀同时冷冻,其制冷效果可达-40 $^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 切片机的附属设备

① 切片刀 有不同长短的样式,目前多用二面平直而短的切片刀,110mm、120mm长的主要用在旋转切片机上;185mm长的用在滑走切片机上。附刀柄及弹簧夹的短切片刀,供磨刀、荡刀用。切片刀大多是采用高等级的钢材锻造,钢材质量直接决定着切片刀的软硬度,进而影响切片质量及切片刀刃的使用期限。全套的切片刀是由切片刀、刀裤、刀柄3件组成的。切片刀有头、体、尾之分,同时又有刀刃、刀面和刀背之分。通常刀刃是相对于磨刀和荡刀而言,刀面和刀背是对切片操作而言的。

常用的切片刀有平凹型切片刀、双凹型切片刀、刨型切片刀、平面型切片刀等。

a. 平凹型切片刀(A型) 切片刀一面带有凹陷,另一面为直面,刀面较薄,刀面凹陷度较大,凹面处可以存留一些乙醇或其他液体,一方面保持刀刃湿润,另一方面也可使标本块表面处于湿润状态,有利于切片。多用于滑走切片机。

b. 平凹型切片刀(B型) 切片刀一面略带有凹度,较平凹型刀的凹面要浅一些,另一面为直面,多用于推拉式和轮转式切片机进行石蜡切片。

c. 双凹型切片刀(D型) 切片刀两面均有凹度,可用于石蜡切片。

d. 刨型切片刀 切片刀的外形如同刨木头的刨刀一样,为硬度很强的金刚刀。主要用

于树脂包埋的标本（如硬度高的含钙骨标本）。

e. 平面型切片刀（C型） 又称为双平面切片刀，切片刀刀身两面均为平面，呈“楔形”，最早是冰冻切片使用的切片刀。是石蜡切片和冰冻切片最常使用的切片刀。

刀柄的一端有螺纹，可旋入切片刀一端的螺旋孔中。磨刀时将刀柄装上便于持刀，切片时将刀柄取下。刀壳也叫刀背夹，是一种金属或硬塑料制的半圆形具有弹性的鞘。磨刀和磨刀（荡刀）时将刀的背部插入刀壳中，使刀口保持一个适当的斜面进行磨刀或磨刀。由于制片者磨、磨刀的方法、力度各异，因此尽可能各人有自己专用的切片刀。每把刀都应配有专用的刀壳，这样不仅能精心保管且有利于使用。切片刀在用过后须擦拭干净，还须涂上一层凡士林或液体石蜡，以防生锈，并装入切片刀盒中妥为保存（图 1-1）。

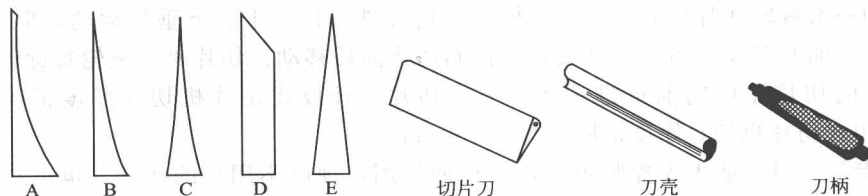


图 1-1 常用切片刀及配件

A 平凹型（A型）；B 平凹型（B型）；C 双凹型；D 刨型；E 平面型

② 玻璃刀 1950 年 Latta 与 Hartman 提出用玻璃破碎面自然形成的刀刃代替钢刀进行薄片切片，后来玻璃刀广泛用于制备半薄片、超薄切片。玻璃刀制作方便，来源丰富，价格低廉，但刀刃脆弱，易风化，不耐用，必须现用现做，不能长期保存，而且不能重复使用。制备玻璃刀的材料应选用硬质玻璃，含硅量在 72%~75% 以上，内应力较小，侧面观应透亮呈微黄或微绿色，内部不含杂质或小气泡。

切片刀使用时，间隙角和刀角影响切片的质量。间隙角是刀的切缘和样品块的面之间形成的角。当切片一切下来以后，要求样品块迅速、准确离开刀背。原则上，间隙角应该越小越好（只要在切片以后，样品块不和刀背接触），大间隙角的刀将是刮下切片而不是切下，这样产生震颤；太大的间隙角还能引起刀的碎裂。间隙角一般保持在 $2^{\circ} \sim 5^{\circ}$ 范围内。

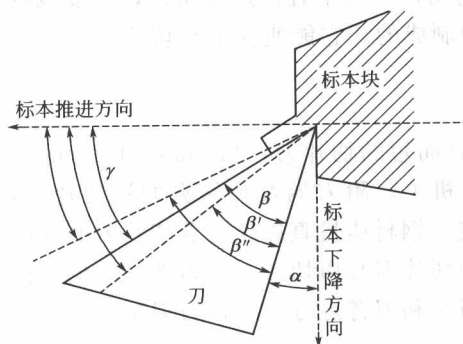


图 1-2 玻璃刀角度特征

α -间隙角； β -刀角； β' -小于 45° 的刀角；

β'' -大于 45° 的刀角； γ -倾斜角

虚线表示切片前后标本块运动方向

在切片中所涉及到的另一个重要的角度是刀角（图 1-2）。刀角对减小压缩有重要作用。如果正方形的玻璃被精确地平分，刀角应该和划线的角度相同，理论上可获得这种 45° 。但操作中用钳子要如此精确地破裂方块玻璃并获得具有 45° 角的刀，几乎是不可能的。实际上，在刻线的末端总是要发生弯曲的。所以，通常获得的大多数刀角大约是 52° 。将刻线划在 35° 和 55° 之间，用制刀机制刀，能获得刀角在 $35^{\circ} \sim 55^{\circ}$ 范围内的高质量的并且质量一致的刀。这个范围对切大多数生物材料是合适的。

手工制刀时，把选好的宽 2.5cm，厚 5~6mm 的玻璃条洗净擦干，用旋转式玻璃划割器或钻石刀在玻璃条上以 2.5cm 的距离横向划痕，用台钳或平口钳从划痕处断开，制成 $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 的玻璃块。在玻璃块上用玻璃刀划一对角线的割线，割线两端的玻璃侧面为刀口，因此应该是新断面，平滑无皱纹。用两把平口钳分别夹住划痕两侧玻璃用力拉开即得

两把接近 45° 角的玻璃刀。

③ 磨刀石 一般准备粗磨刀石与细磨刀石，供切片刀磨刀使用。

④ 荡刀皮 一般为皮革制的，有长条带形与长方形两种，供荡刀用。

(4) 玻璃制刀机 最初的玻璃刀多用手钳滑断玻璃条的方法制备，成功率低、质量也不高。1962 年第一台玻璃制刀机问世，给切片工作带来很大方便。

Leica EM KMR3 玻璃制刀机用平衡断裂的方法来制刀，确保 3 种厚度的玻璃条：6.4mm、8mm 和 10mm，都能制造完美的玻璃刀。制刀步骤如下：

- ① 把玻璃条放在点击停止的精确定位 (图 1-3-B)；
- ② 降低压断头压紧玻璃条 (图 1-3-C)；
- ③ 推按钮，执行一个准确的划痕，慢慢旋动旋钮直到玻璃断裂，玻璃断裂后，划痕机制自动回到原位，为下一次划痕做好准备 (图 1-3-D)；
- ④ 玻璃断裂后，划痕轮自动回到原位 (图 1-3-E)；
- ⑤ 制刀机的抽屉确保取玻璃刀安全、方便 (图 1-3-F)。

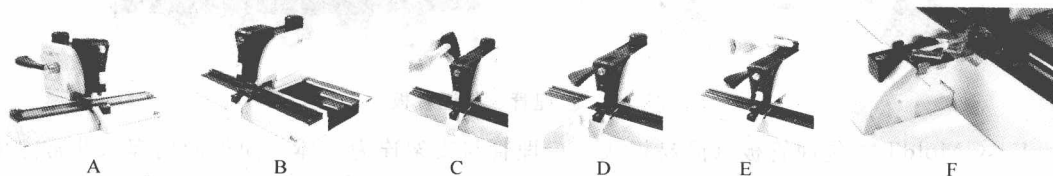


图 1-3 Leica EM KMR3 玻璃制刀机及制刀过程

(5) 恒温箱 用于熔蜡、浸蜡、烤片、树脂渗透、聚合等。

(6) 电温台、水温台或组织摊烤片机 用于展片、烤片等。也可用合适的铜板或铁板自制温台，在一端用酒精灯烧热。

(7) 电冰箱 低温下处理、保存样品及其他低温处理。

(8) 抽气设备 用于样品固定时抽气。

(9) 包埋装置

① 包埋框 包埋框为两块“L”形的铜块或铝块。包埋时将它置于一块钢板或玻璃板上，根据组织块的大小移动铜（铝）块，这样便围成一个长方形形成正方形框，用于包埋组织块 (图 1-4)。

② 包埋板 多孔的硅胶或塑料包埋板，用于塑料树脂包埋。如国产硅胶 21 孔包埋板，淡蓝色，板大小为 $72\text{mm} \times 66\text{mm} \times 6\text{mm}$ ，孔大小为 $14\text{mm} \times 5\text{mm} \times 3\text{mm}$ ，可以与 Epon812、Spurr 试剂盒等树脂包埋盒配套使用。EMS 硅胶平包埋板，板呈乳白色，白硅胶具有很强的抗裂性，与普通的硅胶板相比，它突出的特性是可重复使用率高，而广泛使用在环氧树脂作为包埋剂的包埋试验中，底部较好的透明性能使得样品可以很好地定位于孔中间；单头锥形，锥形顶大约 2mm 高，板块 $14\text{mm}(L) \times 5\text{mm}(W) \times 4\text{mm}(H)$ 。

EMS 塑料平包埋板，由聚乙烯制造，与大多数包埋介质不反应，包埋块很容易取出；当此板与 Cocoon 盒子配套使用时，可以用来做厌氧聚合树脂包埋用品，如 LR Write 树脂平板包埋便可使用；可以重复使用，孔大小 $12\text{mm}(L) \times 5\text{mm}(W) \times 3.5\text{mm}(D)$ ，板大小 $94\text{mm} \times 56\text{mm} \times 14\text{mm}$ (图 1-5)。

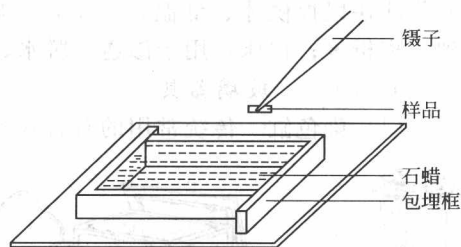


图 1-4 石蜡包埋框 (改编自陈继贞, 2004)

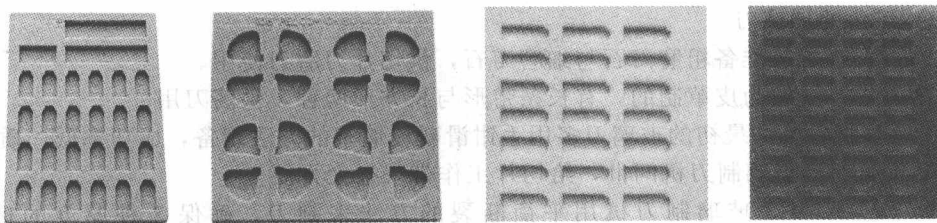


图 1-5 包埋板

③ 包埋管 由聚乙烯等材料制成的直径较小的具盖小管，平底或尖底，用于塑料树脂块的包埋，可重复使用至少 2~3 次。有的需要配制支架，有的可自行站立，无需支架（图 1-6）。

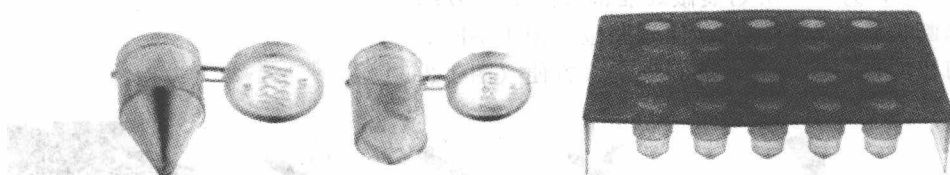


图 1-6 包埋管、包埋管板

Easy-Mold™ 包埋管板（简易板式）包埋管与支架连为一体，使得使用起来非常方便，并且包埋效果更好。不需要另外的管架；管底部透明，在聚合反应前，可以手动调整样品在管中的位置；可以得到通用型号的包埋块；管架高，使得管的底部的空气流通性能很好，特别适合于聚合反应；包埋管的密封简单易行，通常叠放即可密封；包埋管底部柔软，用手指轻推即可取出包埋块；管架可以书写，便于标记，每个管子都有序列编码，也可以用作包埋块的存贮盒产品的技术参数，每个 Easy-Mold 有 2×10 个管子，每 5 个一排，2 排一组编码（1~10），共 4 排。

(10) 其他设备 酒精灯；离心机，供作快速沉淀分离等之用，如作离体切片；制冰机，制作冰块以提供冰、低温；天平，称取各种试剂、药品；恒温水浴锅，用于原位杂交、酶解、离析等；摇床，用于渗透、脱水、脱色等；火柴；玻璃板等。

1.2.1.2 玻璃器具

(1) 染色缸 传统常用的有直式 5 片装、卧式 10 片装两种玻璃染色缸。现在有高方形 9 片装、方形 10~60 片装玻璃染色缸，25 片装塑料染色缸、高温染色缸等众多类型、通用、专用染色缸（图 1-7）。

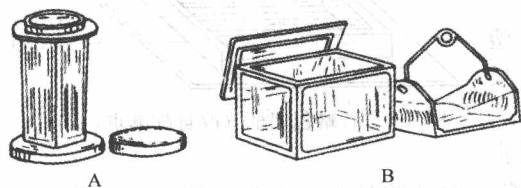


图 1-7 染色缸

(2) 染色碟 除石蜡切片外其他制片可在染色碟中进行染色。也可用小培养皿代替。

(3) 载玻片 现常用的规格为 $(75 \sim 76) \text{ mm} \times (25 \sim 26) \text{ mm}$ ，厚度为 $1 \sim 1.2 \text{ mm}$ ，平整、无杂质无条痕、边缘光滑、无色为佳。此外有凹槽载玻片，供悬滴培养观察用。

(4) 盖玻片

方形： $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$ 、 $20 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ 、 $22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$ 、 $24 \text{ mm} \times 24 \text{ mm}$ 。

长方形： $22 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 、 $25 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ 、 $25 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ ，供作连续切片用。

圆形：直径 18 mm 。

盖玻片的厚度 $0.13 \sim 0.17 \text{ mm}$ 。

- (5) 量筒 10mL、25mL、50mL、100mL、200mL、500mL 等不同容量。
 - (6) 烧杯 50mL、100mL、200mL、500mL、1000mL 等不同的容量。
 - (7) 试管 一般用规格为 20mm×70mm。
 - (8) 小瓶 30mL 广口瓶、药用玻璃瓶、5mL 离心管等,用于材料的杀死、固定。
 - (9) 试剂瓶 应备有各种容积(从 30~500mL)试剂瓶。存放固定液、脱水剂、染色剂等,最适用的规格为 500mL。可用盛装乙醇的玻璃瓶回收使用,乙醇挥发后无需清洗或只需简单清洗,棕色避光,容量适宜,节约、方便、实用。
 - (10) 洗瓶。
 - (11) 滴瓶与滴管。
 - (12) 漏斗。
 - (13) 树胶瓶 应带有密封的外盖。
- 1.2.1.3 一般用具
- (1) 放大镜。
 - (2) 解剖器 包括解剖刀、解剖针、剪刀、镊子等。
 - (3) 剃刀与刀片 作徒手切片用,刀片为单面保安刀片、双面刀片。
 - (4) 温度计。
 - (5) 毛刷、去污粉、肥皂等 用以洗刷用具。
 - (6) 毛笔 切片时用以取片。
 - (7) 切片盘 存放蜡带。
 - (8) 切片盒 存放切片用。
 - (9) 载蜡器 规格应根据不同切片机的要求而定,一般为小硬木块。
 - (10) 小酒杯 小瓷杯,口径 3~4cm 为宜。用于浸蜡、塑料树脂混合等。
 - (11) 其他 石棉网、保温漏斗(过滤石蜡用)、取蜡铲、纱布、绸布、记号笔(标记)、软木塞、钢丝夹(染色时夹取切片)、药匙、滤纸、试纸、标签、称量纸、移液器、玻棒等。

1.3 植物制片一般流程

1.3.1 一般制片

取材→杀死→固定→洗涤→前处理→切片/涂片/压片等→染色→脱水→透明→封片。

1.3.2 石蜡/半薄切片

取材→杀死→固定→洗涤→脱水→透明→渗透→包埋→修块→切片→粘片→展片→烤片、烘片→(脱蜡)→(复水)→染色→分色→脱水→透明→封片。

部分材料可进行整体染色,即固定后先染色再脱水、包埋、切片等。

各类制片方法将在第二篇详细介绍详细。

1.4 植物制片相关常用技术

1.4.1 清洁技术

植物制片技术过程中,须用各种玻璃器材,在开始工作之前,首先要把所用的玻璃器材彻底洗涤清洁。

1.4.1.1 玻璃器具的清洁

实验室常用的洗涤方法如下:

- (1) 将玻璃器具在肥皂水中浸泡, 加热煮沸 20~30min;
- (2) 将煮过的玻璃器具用自来水冲洗 20~30min;
- (3) 把初步洗过的玻璃器具在洗液 (清洁剂) 中浸泡 10~20min 或更长时间。

常用的洗液有如下两种:

① 硫酸—重铬酸钾洗液

配方一 重铬酸钾 20g, 浓硫酸 250mL, 水 250mL。

配方二 重铬酸钾 20g, 浓硫酸 30mL, 水 250mL。

配制时先将重铬酸钾溶解在浓硫酸中, 再边搅拌边慢慢加入水中。或将重铬酸钾加热溶解在水中后, 缓慢搅拌加入浓硫酸。

② 1%~2% 盐酸乙醇 1~2mL 浓盐酸加入 100mL 95% 乙醇中。

(4) 用镊子从洗液中取出来 (切勿用手, 以免烧伤皮肤), 在自来水中冲洗 20~30min, 再用蒸馏水冲洗 1~3 次。

用干净的白布或纱布擦干, 装好备用。

用过的洗液, 可以连续使用直至氧化变质变成青黑色。盛放洗液的容器要盖严密封, 防止氧化变质。

1.4.1.2 载玻片与盖玻片的清洁

载玻片与盖玻片是植物制片中最基本的器材, 其质量优劣和清洁与否, 会影响制片、染色及镜检效果。如果载玻片、盖玻片沾污尘埃或油脂, 不仅会在制片过程中发生切片材料的脱落、影响显微观察、拍照, 甚至会造成观察鉴别上的谬误。因此, 用于植物制片的载玻片与盖玻片, 在应用之前必须进行洗涤清洁。

(1) 新的载玻片与盖玻片的清洁 将新载玻片、盖玻片用清洁布擦干净后直接投到 95% 乙醇中, 浸泡 24h, 擦干后即可使用。或在 1%~2% 硝酸浸泡数小时后再用清水冲干净后移到 95% 乙醇中浸泡 12h, 然后擦干备用。

(2) 旧的载玻片与盖玻片的清洁 污物程度轻的可用饱和 NaOH 溶液浸泡 24h 后用流水彻底冲洗干净, 再移到 95% 乙醇中浸泡 24~48h 后擦干备用。

污物程度一般的, 可用浓 H_2SO_4 浸泡 30~60min, 用镊子取出在清水中彻底冲洗干净 (须 2~4h), 然后擦干移到 95% 乙醇中浸泡 24~48h 后擦干备用。

污物程度重的, 可先用洗液浸泡 2~4d 后, 清水洗净再移到肥皂水中浸泡 1~2d (或煮沸 30~60min), 再经清水彻底冲洗干净 (2~4h), 然后擦干移到 95% 乙醇中, 浸泡 1~2d 后擦干备用。

(3) 旧制片的载玻片与盖玻片的重新再用 制好的制片失去其保存价值, 或经镜检后不合格制片, 经处理可重新使用。将旧制片在二甲苯中 (可用废的二甲苯或废二甲苯与无水乙醇混合液) 浸泡 3~5d 或更长时间, 树胶溶解、盖玻片脱落后, 分别取出载玻片与盖玻片, 擦干后移到洗液中浸泡 2~4d。清水中冲洗后, 肥皂水中浸泡 1~2d 后取出, 再经清水彻底冲干净 (2~4h), 擦干后移到 95% 乙醇中, 浸泡 1~3d, 擦干备用。

1.4.2 封边与封片 (藏) 技术

1.4.2.1 临时制片封边

临时制片, 短期内保藏可用甘油、甘油胶及水溶性封藏剂封藏制片, 但必须将盖片的周围封边以密封。

(1) 石蜡封边法 是一种短期保藏的简便封片法。将石蜡加热熔融后, 用毛笔或解剖刀蘸适量石蜡在盖片的四周涂上均匀的一薄层, 或在解剖刀的刀柄上加些碎石蜡, 然后在酒精