

目 录

一、引论	1
二、制片的准备工作	4
(一) 各种制片用的基本设备和常用试剂	4
(二) 制作切片时应注意的事项	14
三、制片的一般原则	17
(一) 固定作用与固定剂	17
(二) 脱水作用与脱水剂	33
(三) 其他试剂	36
(四) 染色原理与常用染料	57
(五) 染色方法及各种染色剂	68
四、植物的一般制片方法	88
(一) 整体封固法	88
(二) 离析法	91
(三) 透明法	95
(四) 涂片法(压片法)	98
(五) 徒手切片法及简单的显微化学试验方法	107
(六) 滑走切片机切片法	123
(七) 冰冻切片法	128
(八) 石蜡切片法	130
(九) 木材切片法	139
(十) 薄切片法	142

五、显微制片发展史	155
(一) 切片机的发明和改进	156
(二) 制片过程的改进	163
(三) 染色与染料	173
(四) 其他	180

一、引 论

植物组织制片技术是植物结构生物学的重要组成部分,它的产生极大地推动了植物组织学(植物解剖学)的发展。同时也促进了植物学的其他一些学科,如植物形态学、植物细胞学和植物胚胎学的发展。

各种植物显微技术,还能直接为其他部门的生产与科研服务,例如在农业(农作物的形态建成、杂交育种和病虫害的防治等)、林业(木材的鉴定、处理和加工等)、药用植物研究以及建筑、纺织、造纸等领域,显微技术已经做出了巨大的贡献。又如在军工、法医、考古等许多研究和应用领域,都需要应用显微技术,作为一种鉴定或验证的手段。

人类很早就已利用自然界中生长的植物,并认识到根、茎、叶、花等方面的形态,但是对于植物结构上的观察,一直到显微镜发明以后才开始。起初用于显微镜观察的方法是十分简陋的。到了19世纪,物理学及化学随着工业革命有了重大的发展以后,在观察生物的方法上,也起了一个革命性的改变。目前一般应用的一些显微技术,可以说在上世纪末叶及本世纪初期就已奠定了基础。19世纪末,随着工、农业生产的进一步发展,也促进了制片技术学的发展。这时期无论在制片原理的阐明或各种方法的创造上,都有很多的贡献,特别在新兴人工合成(煤焦油提炼)染料工业的推动下,为制片技术(尤其是染色方法)的改进,创造了条件。当时许多从事植物学的研究者,同时

也都是优秀的技术工作者。因为这个关系,植物学上各种学说的建立与技术上的改进互相促进,使植物形态学、组织学及细胞学得到迅速发展,并且为生产实际提供了不少解决问题的新方法。

到目前为止,多年来已创造的许多制片方法,可适用于特定的材料和一定的观察目的。例如单细胞的、丝状的及薄的叶状体,以及幼小的胚胎等都可以不经切片,进行整体的制片;易于分离的组织可以在载玻片上压散或涂成一层,染色后制成压片或涂片;复杂的及大块的组织,通常可用徒手或用滑走切片机切成薄片;不太坚硬的材料在切片前还可以埋藏在包埋物质(例如石蜡或树脂)中,然后切片。为了了解器官、组织与细胞中的物质含量和性质,以及确定这些物质的分布部位,可以应用各种显微化学试剂测定方法。总之,制片的方法是繁多的。由于不断改进、不断创新,目前一般常用的方法已多达几十种,这里只介绍几个基本的方法。掌握了这几个基本方法以后,其他许多方法是容易理解和掌握的。

制片的方法虽然很多,但是其共同特点和基本要求,不外乎要求尽量保持原来的结构,切成适当的厚度,以及应用各种染色方法,使内部清晰易见,并且能使制片保持长久、不变形、不褪色。

我们在开始学习制片技术之前,还必须先了解两点:

首先,在制片工作中,可能遇到很多不同的情况,我们应该善于运用制片的一些基本原理和方法,根据材料的特征和观察的目的,同时考虑到实验室的设备、时间的方便等来决定应用什么方法,而且必须因地制宜、灵活地加以应用。目前制片学上的方法,不能说是尽善尽美的,我们还可以在应用中加以改进。

另外,在制片的时候常会碰到很多困难,甚至会失败,这时绝不要气馁。如果是试剂、仪器设备上的困难,应该设法用代用品来替代使用;如果是制片标本不能如意或制片过程中某一些步骤不能顺利进行,应该仔细地找出原因,努力克服。

二、制片的准备工作

从事植物制片以前,必须有一些准备工作。下面将简单地介绍一些基本设备和注意事项,作为初学时的参考。

(一) 各种制片用的基本设备和常用试剂

植物制片有各种方法,每种方法的进行过程,需要有一定的设备。了解了这些设备以后,也可以就地取材,用较简单的日常用具或物品代替。例如作植物徒手切片用的剃刀,标准的刀刃要求两面平直,而通常所用的则是两面下凹的。但是为了购置方便,已多用这种两面下凹的或其他种类的剃刀。不过,不论用什么形式的剃刀,要求必须十分锋利。一般还可使用剃须刀片。至于染色试剂,在不得已时,也可用有些日常医药用品代替。例如紫药水可以替代结晶紫溶液,碘酒稀释后可代替碘-碘化钾溶液等等。这些将在有关章节中予以讨论。

1. 基本设备

(1) 一般仪器

● 电热温箱 (incubator): 有各种容积。平常可调节温度 $25-180^{\circ}\text{C}$, 误差一般不超过 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。电热温箱通常有两种隔热方式: 一种在箱壁双层中间垫以隔热材料; 另一种在双层壁之间灌入适当温度的热水, 作为隔热所需, 称为水浴温箱, 此种性能较好。

制片时需要两个温箱: 一个较大, 一个较小。较大的一个, 可调节温度到 $25-50^{\circ}\text{C}$ 左右, 作为萌发种子、酶促反应、离析

材料以及较低温度的浸蜡等用。较小的一个,可调节温度到60—75℃,用以浸蜡或快速离析材料。

如果没有温箱,也可用较简便的办法代替,例如石蜡制片法中的高温(65—70℃)浸蜡,即可自制“亭子灯”。使用此种自制溶蜡“灯”时,必须在灯下放置一块隔热材料,以免烧坏台面,引起意外事故。

需用较低温度(25—45℃)时,也可以“因材施教”,自制土温箱,或用一般孵蛋箱代替。

- 冰箱(refrigerator): 制片所用材料,有时需要在低温(0—3℃)下处理或保存。如无冰箱,也可用天然冰冷却。

- 显微镜(microscope): 平常需用一台较简单的(或废旧的)显微镜,以作制片时临时检片之用。另一台应稍好些,作为最后研究观察之专用,制片过程中一般应避免将其用于检查染色情况。

- 双筒解剖镜(stereoscopic microscope): 此种显微镜立体感较强,用于解剖实物。不过放大倍数较低,只宜作一般实物的观察。

- 转动切片机(rotary microtome): 石蜡切片法必须应用切片机。通常为了便于进行连续切片,多用转动切片机,这种切片机有各种式样。

- 滑走切片机(sliding microtome): 专为切制木材或其他较硬材料(例如小麦粒、玉米粒等)之用。平常冰冻切片和棉胶切片也多用此种切片机。滑走切片机也可作石蜡切片之用,但作连续切片不如转动切片机方便。

- 切片刀(knife): 有各种刃式和长短,平常多用两面平直的。用在转动切片机上的稍短(110 mm或120 mm长),用在滑走切片机上的较长(185 mm)。

● 冰冻切片机(freezing microtome):通常是在滑走切片机上装一冷冻装置。切片刀及切片操作,基本上与使用滑走切片机相似。

● 电热温台(hot plate):为了展平蜡带或烤干制片都需温台,普通多用电热温台。也可用合适的铜板或铁板自制温台,一端用酒精灯烧热即可。如果在一边下面做一小水箱,加热水箱,效果更好。台面或做成三角形,在长尖一端烧热,温度较易控制,但容易倾跌。只要注意控制好温度,此种“烫板”也很好用。

● 磨刀石(hone, honing stone, sharpening stone):通用青石和黄石,也可用平常较细的磨刀石。最好能备一块较粗的和一块较细的(可用旧砚台石代用)。

● 荡刀皮(honing strop):一面附有帆布的较好。不过,现在很少使用。

● 剃刀(razor):用通常刀刃两面下凹的即可。如找代用的,刀刃不能太厚,否则不易切成薄片。现在多用单面剃须刀片代用。

● 放大镜(magnifier):用 $5\times$ 或 $8\times$ 的即可。最好用固定式的,不要三片(或两片)折叠的。

● 天平(balance):通常的三梁秤(triple beam balance),灵敏度在10mg的就已够用,也可用称中草药的戥子代替。

(2) 玻璃器皿

● 载玻片(slide):通用的为 $25\text{mm}\times 75\text{mm}$,厚度在1.1—1.5mm左右。载玻片太薄容易破碎,而且不符合一般显微镜的要求。如果太厚(超过2mm),由于高倍接物镜(例如油镜)焦距很短,无法用作细胞学制片。

● 盖玻片(cover glass):有圆形、方形或长方形等许多规

格。平常,方形的多用 18mm^2 或 22mm^2 两种;长方形的视需要可备用 $22\text{mm} \times 30\text{mm}$ 、 $22\text{mm} \times 40\text{mm}$ 等等。植物制片中较少用圆形盖玻片,如使用时,也多用直径 18mm 的。

- 染色缸(staining jar): 通常有立式(两种)和横卧式(一种)三种试样。立式较普通,容量较小,也比较节省药液,但是只有5个凹槽,一次只能装厚片5片,薄片则可利用背靠背的方式放入8片(两端最好只放一片)。

还有一种立式染色缸,一次可装厚片10片,或背靠背装薄片18片,但容易倒翻,而且口盖也不严密,现已较少使用。

横卧式染色缸放置切片最为平稳。每缸可放厚片10片或薄片18片。缺点是用药液较多,而且口盖不严密,药液容易蒸发。

- 酒精灯(alcohol lamp): 除购买外也可自制,但必须具有随时能盖灭火焰的盖子,以保安全。

- 培养皿(petri dish): 有各种直径和高度不同的规格。平常可按需要备有 $100\text{mm} \times 15\text{mm}$ 的数套及直径较小的数套,视情况而定。

- 染色碟(syracuse watch glass): 通常用底径为 6.5cm 的一种。也可用浅碟代替,但要设法防止蒸发。

- 量筒(cylinder): 一般备有 25、100、1000ml 的三种即可。

- 漏斗(funnel): 可备用上口直径 55mm 和 100mm 的两种。

- 试管(test tube): 通用口径 $20\text{mm} \times 150\text{mm}$ 的。

- 小酒杯(small wine cup): 此为石蜡切片中浸蜡所必需,通常就用瓷制小酒杯。为了节省石蜡,不必太大,以口径 4cm 左右的较为合适。

● 烧杯 (beaker): 备有 25、50、100、200、500、1000 ml 等几种, 较为方便。

● 广口瓶和细口瓶 (wide-and narrow-mouthed bottles): 各种容积 (30—1000 ml), 视需要备用。

● 树胶瓶 (balsam bottle): 有几种式样。通用的有密封的外盖。这种树胶瓶, 如果放置较久不用, 容易胶住外盖, 难以打开。若被加拿大树胶胶住, 不能打开时, 用强力撬开或火烤, 往往会使瓶口破裂。较妥善的方法是将全瓶放置在废二甲苯中, 使之没过瓶盖, 放置几天以后取出, 轻轻旋动外盖即可。注意避免废二甲苯溅入。

树胶瓶也可以找其他大小合适的玻璃瓶代用, 但需防止树胶液挥发。

● 滴管及滴瓶 (dropper and dropping bottle): 可视需要, 酌量置备若干。

(3) 其他用具

● 剪刀 (scissors): 有多种规格, 最好有一大一小的平剪和一二把小弯剪。

● 镊子 (forceps): 视需要置备几把, 在进行染色体压片时, 要求使用较精细的镊子。

● 解剖刀 (scalpel): 有各种规格, 可选合适的置备。

● 解剖针 (dissecting needle): 可以用缝衣针自制。选取粗细合适 (直径约 7—8 mm 左右) 的小木棍, 锯成 10 cm 长, 将缝衣针的后眼扳断, 然后用钳子夹住后部, 将针嵌入小木棍的一端中央即成。

● 毛笔 (writing brush): 用通常的中楷笔即可, 只作刷下蜡屑和刷去蜡屑之用。如用旧笔, 必须将残墨洗净后方可使用, 否则残留墨屑会影响石蜡制片。

● 刀片 (blade): 即平常剃须刀片, 有单面的和双面的两种。切较硬的材料, 宜用单面刀片。

● 小木块 (small wood block): 石蜡切片用的小木块, 可用较硬的木材, 锯成 $2\text{cm} \times 2\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 或稍小的长方块。在方形的一面上, 锯出纵横沟纹, 以便固着石蜡。

2. 常用试剂

本书介绍的各种方法所用试剂, 并未全部列上。此处只列举平常容易购置的试剂和一般 3—6 个月的需要量, 作为建立一个小型制片实验室时参考。其中有的还可因陋就简, 觅取代用。

(1) 一般试剂

95% 酒精 (工业用)	
(ethanol, ethyl alcohol, alcohol)	5 L
无水酒精 (纯酒精) (absolute alcohol)	2 L
甲 醇 (methanol)	2 L
甲 醛 (formaldehyde)	500 ml
福尔马林 (37% 甲醛) (formalin)	2 L
醋 酸 (乙酸) (acetic acid)	2 L
丙 酸 (propionic acid)	1 L
三氧化铬 (chromium trioxide)	250 g
高锰酸钾 (potassium permanganate)	200 g
苦味酸 (picric acid)	250 g
重铬酸钾	
(potassium dichromate, potassium bichromate)	500 g
氯 仿 (chloroform)	2 L
乙 醚 (ether)	1 L
甘 油 (glycerin)	500 ml

乳 酸 (lactic acid)	500 ml
硫 酸 (sulfuric acid)	2 L
硝 酸 (nitric acid)	1 L
盐 酸 (hydrochloric acid)	2 L
氢氧化钠 (sodium hydroxide)	500 g
氢氧化钾 (potassium hydroxide)	500 g
氯酸钾 (potassium chlorate)	100 g
氯化锌 (zinc chloride)	100 g
氯化钙 (calcium chloride)	200 g
氯化铁 (ferric chloride)	200 g
氯化汞 (升汞) (mercuric chloride)	100 g
偏亚硫酸钠 (或钾)	
(sodium or potassium metabisulfite)	250 g
高碘酸 (periodic acid)	50 g
碘 片 (iodine plates)	100 g
碘化钾 (potassium iodide)	500 g
铁 矾 (iron alum)	500 g
对二氯苯 (paradichlorobenzene)	250 g
间苯三酚 (phloroglucin)	25 g
溴酚蓝 (bromophenol blue)	10 g
正丁醇 (nor-butylalcohol)	250 ml
叔丁醇 (tertiary butyl alcohol)	1—2 L
丙 酮 (acetone)	500 ml
苯 (benzene)	500 ml
二甲苯 (xylene, xylol*)	2 L

* xylol: 商用通称, 指“混合二甲苯”。

甲 苯 (methylbenzene, toluene)	1 L
丁香油 (clove oil)	100 ml
香柏油 (雪松油) (cedar oil)	100 ml
冬青油 (wintergreen oil)	500 ml
松节油 (turpentine oil)	500 ml
石炭酸 (苯酚) (carbolic acid, phenol)	500 ml
鞣 酸 (单宁酸) (tannic acid)	200 g
苯胺油 (aniline oil)	200 ml
一溴萘 (bromonaphthalene)	100 g
秋水仙碱 (colchicine)	25 g
8-羟基喹啉 (8-hydroxyquinoline, oxine)	25 g
皂角苷 (saponin)	25 g
硫代硫酸钠 (海波) (sodium thiosulfate)	500 g
醋酸铜 (乙酸铜) (copper acetate)	50 g
过氧化氢 (20%) (hydrogen peroxide)	250 ml
锇 酸 (osmic acid)	1—5 g
溶纤剂 (cellosolve)	500 ml
二氧杂环己烷 (dioxane)	500 ml
氨 水 (ammonia liquor)	500 ml
水合氯醛 (chloral hydrate)	500 g
麝香草酚 (百里酚) (thymol)	25 g
阿拉伯胶 (Arabic gum)	200 g
明 胶 (gelatin)	200 g
石 蜡 (paraffin)	2—2.5 kg
加拿大树胶 (Canadian balsam or Canada balsam)	200 g
火棉胶 (celloidin)	500 g
油派胶 (euparal)	100 g
乙二胺 (ethylenediamine)	500 ml

(2) 染料

苏木精 (hematoxylin)	25—50 g
番 红 (safranin)	25—50 g
洋 红 (carmine)	25 g
地衣红 (orcein)	10 g
橘红 G (orange G)	25 g
苏丹Ⅲ 或Ⅳ (Sudan III or IV)	25 g
俾斯麦棕 (Bismark brown)	25 g
中性红 (neutral red)	25 g
亮 绿 (light green)	25 g
固 绿 (fast green)	25 g
碱性品红 (basic fuchsin)	50 g
酸性品红 (acid fuchsin)	25 g
结晶紫或龙胆紫 (crystal violet or gentian violet)	25 g
甲基绿 (methyl green)	25 g
亚甲蓝 (methylene blue)	25 g
苯胺蓝 (aniline blue)	25 g
曙 红 (eosin)	25 g
天 青 (azur)	25 g
钌 红 (ruthenium red)	10 g
氯唑黑 (chlorazol black)	25 g

(3) 薄切片法应用试剂

戊二醛 (glutaraldehyde) (25%)	500 ml
丙烯醛 (acrolein)	500 ml
环氧树脂 Epon 812 (商品名)	500 ml

环氧丙烷 (propylene oxide)	500 ml
乙二醇甲基丙烯酸酯 (GMA, glycolmethacrylate)	500 ml
聚(乙)二醇 (Poly, polyethylene glycol)	200 g
Spurr 环氧树脂	
(ERI-4206, VCD, vinylcyclohexene dioxide)	250 g
六甲酸酐 (MNA, methyl nadic anhydride)	500 g
3-二甲氨基苯酚	
(DMP-30, 3-dimethylaminomethylphenol)	100 g
过氧化苯酰 (benzoyl peroxide)	25 g
DER 树脂	
(DER-736, diglycidyl ether of polypropylene glycol)	450 g
NSA 固化剂 (noncyl succinic anhydride)	450 g
DDSA 固化剂 (dodecenylsuccinic anhydride)	450 g
DMAE 加速剂 (2-dimethylamnoethanol)	100 g
甲基丙烯酸丁酯 (methyl butylacrylate)	300 ml
苯乙烯 (phenylethylene)	200 ml
山梨醇 (sorbitol)	25 g
二甲肿酸钠 (sodium cacodylate)	100 g
多聚甲醛 (paraformaldehyde)	100 g
三硝基甲苯酚 (trinitroresol)	25 g
甲氧基丙烷 (2, 2-dimethoxypropane)	500 g
磷酸氢二钠	
(disodium, hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)	500 g
磷酸二氢钠 (sodium biphosphate, NaH_2PO_4)	500 g
亚硫酸氢钠 (sodium bisulfite, NaHSO_3)	500 g
磷酸 (phosphoric acid, H_3PO_4)	100 g

(二) 制作切片时应注意的事项

每个实验室都有许多规则,要求进入实验室的人自觉遵守。那些物理学、化学实验室的一般原则性规定,进行植物制片时也都适用。此外,再列举一些植物制片操作时应该注意的事项,作为初学制片的工作者参考。

- 开始工作之前,应该先仔细地阅读操作过程,以便有个一般性的了解。

- 实验室中各项物品,要力求保持清洁干净。仪器或零星用具及试剂等,要放置在一定的地方,切忌将各种试剂杂乱地堆放在桌子上或柜子内。

- 每个盛装试剂的瓶子必须贴上清楚的标签,或用有颜色的油漆写上名称。一般用红色表示酸性,蓝色表示碱性,黑色表示中性。如果是剧毒药品,应该特别标明。

- 不要单凭记忆猜想没有标签的试剂。如遇到没有标签的试剂,应该特别小心开启。不明来历的试剂,绝不能随便拿来应用。因为制作切片,从固定材料开始到做成永久制片为止,如中途用错试剂,就会前功尽弃,得不到预期的结果。

- 盛装各种试液的容器瓶塞,用完后要立即盖上,并且不要“张冠李戴”。试液倒出后,不能再将剩余的倒回去。

- 盛装试剂的瓶子,应该把瓶塞塞紧。如果塞不紧,有些试剂(如氯仿、乙醚等)就很容易挥发,甚至因挥发太强烈,而引起火灾,或使人中毒。有的因为塞得不紧,很容易从空气中吸进水分,引起潮解,而使试剂变质,或者难以处理(如铬酸、氢氧化钠等十分容易吸水)。

- 配完试剂后,用过的玻璃器皿,宜趁潮湿时在流水中洗净。因为有些试剂附在玻璃器皿上,干后就很难洗掉。

● 使用酸溶液,尤其是几种强酸,如硝酸、硫酸及盐酸,开瓶时需要格外注意。特别是长期未启用的强酸,瓶口容易粘结,如果猛力拉出瓶塞,容易将酸溅到身上引起损害,或者喷出强烈气体刺激眼鼻。比较妥当的办法是用一张废纸蒙住瓶口,然后拧开瓶塞。

● 稀释强酸(特别是硫酸)时,不能将水倒入强酸(切记),应该将强酸徐徐加入水中,并且不断用玻璃棒搅动;如反之(将水倒入酸中),浓酸稀释时产生的热量会导致含有酸气的水雾蒸腾逸出,造成伤害。

● 用氢氟酸(hydrofluoric acid)处理木材的时候,更需注意。因为氢氟酸的侵蚀性比一般的强酸都强烈,万一不小心,手指、衣物等沾染此酸时,应该及时用流水冲洗多次,或立刻浸入小苏打溶液中。

● 不要将杂物倒入水槽,尤其带有粘性的物质,如树胶、石蜡、棉胶等,因为这些物质很容易堵塞水槽。如必须将少量强酸或强碱倒入水槽,要先开放自来水管,然后徐徐倒入,不断用流水冲去,否则会侵蚀水槽及下水道,并会发生事故。大量废弃强酸或强碱必需另作妥善处理,不能倒入水槽。

● 最好手头同时备用数个常用滴管,专门标明用途,如酒精、二甲苯及各种染料等。特别是用作酸类、碱类及油类的滴管,更要标明清楚,不能混用。

● 取材固定时,必须事先大致了解材料的性质,然后选择固定剂。目前所用固定剂的穿透力都不如想象的那么大,所以应尽量避免固定大块的材料,能小就小,这样,容易使材料固定完全,而且也节省固定剂。

● 取得材料以后,需要迅速固定。如不及时处理,细胞容易变质,不但增加以后处理上的困难,而且所得到的结果也难