

SHENGWUYIXUE
DIANJINGYANGPIN
ZHIBEI FANGFA
生物医学电镜样品制备方法



戴大临 张清敏 主编
天津大学出版社

生物医学电镜样品制备方法

戴大临 张清敏 主编

Y512/08

天津大学出版社

(津)新登字012号

生物医学电镜样品制备方法

戴大临 张清敏 主编

天津大学出版社出版

(天津大学内)

天津市宝坻县第四印刷厂印刷

新华书店天津发行所发行

开本: 787×1092 毫米 1/32 印张: 8 5/8 字数: 192千字

1993年12月第一版 1993年12月第一次印刷

印数: 1—4000

ISBN 7-5618-0588-8

Q·6

定价: 5.80元

生物医学电镜样品制备方法

主编 戴大临 张清敏

编委 (以姓氏笔划为序)

孔立生 加拿大卡尔加里大学生物系
王秀玲 南开大学生命科学学院电镜室
方盛国 四川师范大学电镜室
张庆长 天津医学院电镜室
张清敏 南开大学中心实验室
郭世宜 南开大学生命科学学院电镜室
郭建民 贵州师范大学生物系
樊廷玉 南开大学生命科学学院电镜室
戴大临 西南师范大学生物系电镜室

前 言

随着电子显微镜（以下简称电镜）在生物医学研究中逐渐广泛的应用，需要专业电镜工作者和非专业电镜工作者不断提高样品制备的实际技能。尤其是应用研究工作者，当希望对一种材料作多方面观察了解时，由于受到专业范围和实验条件的限制，往往感到缺乏实践经验，难于针对特定研究材料着手选择制定合适的样品制备的实验方案。从一定程度上讲，要想获得可靠的电镜观察数据，成功的样品制备起着决定性的作用。故此，对有一定基础理论知识而缺乏实践经验的非专业电镜工作者来说，一本能针对不同材料和研究目的，提供实际样品制备实例的技术参考书，无疑是有益的。同时，对于大专院校有关专业师生，和医学院生理、病理以及临床医生也可提供更多的方便。

基于实用的目的，本书尽量给出每一具体实例的详细步骤、技术关键和注意事项，并在侧重基本方法的同时，编入了国内外电镜生物样品制备方面的最新资料。如能引起更多的年轻工作者的兴趣，进而大胆探索出更新更好的方法，将不负本书编写的初衷。

本书所收集的方法主要参考Hayat的“Basic Electron Microscopy Technigues”；Robinson等的“Methods of Preparation for Electron Microscopy”；Lewis和Knight的“Staining Methods for Sectioned Material和Kaehler

主编的“Biological Electron Microscopy I、II、III”等书，同时结合我国的具体情况编写而成。白景文（天津医学院电镜室）教授在百忙中审阅了全书，天津大学出版社魏秉哲先生对于本书的编辑和出版给予了热情的帮助和支持，文艺同志（西南师范大学生物系）在资料整理和誊清工作方面作了大量工作，谨此一并致谢。

限于作者业务水平和实践经验，书中错误与不当之处在所难免，恳请读者批评指正。

编者

1992.6

目 录

前 言	(1)
第一章 概述	(1)
第二章 浸没固定	(4)
2.1 藻类(新鲜的淡水藻)	(4)
2.2 海藻类(单细胞海藻)	(5)
2.3 细菌	(5)
2.4 细菌	(7)
2.5 骨(脱钙的)	(7)
2.6 心肌	(8)
2.7 软骨(未经脱钙的)	(9)
2.8 单层培养细胞	(10)
2.9 染色体	(11)
2.10 纤毛虫	(12)
2.11 卵子与合子	(13)
2.12 胚胎	(14)
2.13 眼睛	(15)
2.14 具鞭毛的微生物	(15)
2.15 游离细胞	(16)
2.16 叶	(17)
2.17 叶片(原位固定)	(17)
2.18 肝	(18)
2.19 肥大细胞	(19)
2.20 神经	(19)
2.21 神经元(高锰酸钾固定)	(20)
2.22 神经元(戊二醛和四氧化钨)	(21)

2.23	花粉粒	(21)
2.24	花粉粒 (连同花药)	(22)
2.25	根	(23)
2.26	种子	(23)
2.27	皮肤	(24)
2.28	粘液霉菌	(25)
2.29	精细胞	(25)
2.30	精子 (人或动物的精液)	(26)
2.31	精子	(27)
2.32	牙齿 (经脱钙的)	(28)
2.33	木材 (包含有形成层的)	(30)
2.34	酵母菌	(31)
第三章 微管灌注固定		(32)
3.1	一般方法	(32)
3.2	中枢神经系统	(33)
3.3	心脏	(36)
3.4	肾	(38)
3.5	肝脏	(39)
3.6	肺	(40)
3.7	肌肉 (大鼠后肢骨骼肌)	(43)
第四章 细胞和细胞器的分离与固定		(45)
4.1	刷状缘	(45)
4.2	高尔基体	(47)
4.3	分离的肝细胞	(48)
4.4	微体	(49)
4.5	微体 (光滑或粗糙的)	(50)
4.6	线粒体 (植物的)	(51)
4.7	细胞核	(52])

4.8	细胞核	(53)
4.9	细胞核(最幼小的)	(54)
4.10	原生质膜	(56)
4.11	核糖体(游离的)	(58)
第五章 包埋		(59)
5.1	脱水、渗透及聚合的常规方法	(59)
5.2	包埋剂配方	(60)
5.2.1	Araldite	(60)
5.2.2	低粘度环氧树脂	(60)
5.2.3	Durcupan	(61)
5.2.4	Epon812	(62)
5.2.5	GMA(Glycole Methacrylate)	(62)
5.2.6	Maraglas	(63)
5.2.7	混合树脂	(64)
	(1) Epon-Araldite	(64)
	(2) Epon-DE736	(64)
	(3) DER 332-DE732	(64)
	(4) Epon-聚硫橡胶LP-8(Thiokol LP-8)	(65)
	(5) 异丁烯酸-苯乙烯(Methacrylate -Styrene)	(65)
5.2.8	Rigolac	(66)
5.2.9	Spurr混合液	(66)
5.2.10	vestopal	(66)
第六章 快速固定与包埋		(67)
6.1	动物组织	(67)
6.2	植物组织	(68)
第七章 保存脂类的特殊包埋		(69)
7.1	乙醇-Epon	(69)

7.2 氨基塑料.....	(69)
7.2.1 戊二醛—卡巴肼混合物.....	(69)
7.2.2 戊二醛—尿素.....	(70)
7.2.3 戊二醛—尿素—乙二醇甲基丙烯酸酯 (GMA) 共聚体.....	(71)
第八章 切片	(72)
8.1 超薄切片的干涉色与切片的厚度.....	(72)
8.2 切片程序.....	(72)
8.2.1 材料、工具.....	(72)
8.2.2 方法.....	(73)
8.3 切片缺陷及补救办法.....	(74)
8.4 冷冻切片.....	(81)
8.4.1 动物或病理组织 (经过固定的)	(81)
8.4.2 动物组织 (未经固定的)	(81)
8.4.3 植物组织 (经过固定的)	(82)
8.4.4 植物组织 (未经固定的)	(83)
第九章 厚切片的染色	(84)
9.1 用于植物组织的天青B	(84)
9.2 天青 B—亚甲兰.....	(84)
9.3 硷性品红—亚甲兰.....	(85)
9.4 苏木精—焰红B	(86)
第十章 染色	(88)
10.1 Alcian 兰 (爱尔新兰)	(88)
10.2 铋.....	(88)
10.3 碘化铋.....	(89)
10.4 铟.....	(89)
10.5 碘.....	(90)
10.6 铁.....	(90)

10.7	铜	(91)
10.8	铅	(92)
10.8.1	醋酸铅	(92)
10.8.2	醋酸铅	(92)
10.8.3	柠檬酸铅	(92)
10.8.4	柠檬酸铅	(93)
10.8.5	柠檬酸铅	(94)
10.8.6	氢氧化铅	(94)
10.8.7	氢氧化铅	(94)
10.8.8	氢氧化铅	(95)
10.8.9	酒石酸铅	(96)
10.9	四氧化钨	(96)
10.10	磷钨酸	(97)
10.11	高锰酸钾	(97)
10.12	钨红	(97)
10.13	银	(98)
10.13.1	高碘酸—银	(98)
10.13.2	高碘酸—铬酸—银	(99)
10.14	钍	(99)
10.15	醋酸双氧铀	(100)
10.16	醋酸双氧铀	(100)
10.17	钒	(101)
第十一章 负染色		(102)
11.1	病毒和噬菌体	(102)
11.2	细菌	(103)
11.3	细菌片断	(103)
第十二章 普通细胞化学		(104)
12.1	酸、碱基团	(104)

12.2	羟基.....	(104)
12.3	核酸(一般的).....	(106)
12.3.1	三氯化铟.....	(106)
12.3.2	钨酸钠.....	(106)
12.3.3	醋酸双氧铀法.....	(107)
12.4	DNA.....	(107)
12.4.1	Feulgen—六亚甲四胺银法.....	(107)
12.4.2	Feulgen—Schiff—乙醇钨法.....	(108)
12.5	RNA.....	(110)
12.6	蛋白质.....	(111)
12.6.1	丙烯醛.....	(111)
12.6.2	磷钨酸.....	(112)
12.6.3	含硫氢基蛋白质.....	(113)
12.6.4	碱性蛋白质.....	(113)
12.7	碳水化合物.....	(114)
12.7.1	过碘酸—六亚甲四胺银.....	(114)
12.7.2	氨基硫脲—蛋白质酸银.....	(115)
12.7.3	过碘酸—碱性铋.....	(116)
12.8	酸性粘液.....	(117)
12.8.1	甘油—氯化铁氨法.....	(117)
12.8.2	胶体铁法.....	(117)
12.8.3	胶体钍法.....	(118)
12.9	脂类.....	(119)
12.9.1	乙醇—Epon法.....	(119)
12.9.2	戊二醛—卡巴肼法.....	(119)
12.9.3	戊二醛—尿素法.....	(120)
12.9.4	戊二醛—尿素—乙二醇甲基丙烯酸酯(GMA) 共聚体法.....	(121)

12.10	无机离子	(122)
12.10.1	钠离子	(122)
12.10.2	钙离子	(123)
12.10.3	磷酸盐离子	(123)
12.10.4	氯化物离子	(124)
12.10.5	重金属离子	(124)
第十三章 酶细胞化学方法		(126)
13.1	酶细胞化学方法	(126)
13.2	酸性水解酶	(128)
13.2.1	酸性磷酸酶	(128)
13.2.2	酸性单核苷酸酶	(129)
13.2.3	核苷酸二磷酸酶	(129)
13.2.4	硫酸酯酶	(130)
13.3	ATP 水解酶	(131)
13.3.1	三磷酸腺苷酶	(131)
13.3.2	腺苷酸环化酶	(132)
13.4	其它磷酸酶	(133)
13.4.1	碱性磷酸酶	(133)
13.4.1.a	钙离子捕获	(133)
13.4.1.b	胞苷一磷酸底物法	(134)
13.4.1.c	枸橼酸盐螯合	(135)
13.4.2	葡萄糖—6—磷酸酶	(136)
13.4.3	硫胺素焦磷酸酶	(137)
13.5	脂酶	(138)
13.5.1	钙—胆酸钠	(138)
13.5.2	铅—乙酰二硫化物	(139)
13.6	过氧化物酶	(140)
13.7	过氧化氢酶	(141)

13.8	琥珀酸脱氢酶	(142)
13.9	细胞色素氧化酶	(143)
13.10	多酚氧化酶	(143)
13.11	乙醇酸盐脱氢酶	(144)
13.12	纤维素酶	(145)
13.13	DOPA—氧化酶	(147)
13.14	α -羟酸氧化酶	(147)
13.15	递氢酶	(149)
13.16	乳酸脱氢酶	(149)
13.17	氨基肽酶	(150)
13.18	γ -谷氨酰转肽酶	(152)
13.19	转氨酶	(153)
13.20	鸟氨酸氨基甲酰转移酶	(154)
第十四章	免疫细胞化学方法	(156)
14.1	免疫细胞化学方法常规处理程序	(156)
14.2	抗体的分离提纯	(158)
14.2.1	抗体片断	(158)
14.2.1.a	单价 Fab 碎片	(158)
14.2.1.b	$F(ab')_2$ 碎片	(159)
14.2.2	特异性抗体	(160)
14.2.2.a	戊二醛直接交联法	(160)
14.2.2.b	蛋白A亲和层析法	(162)
14.3	标记物的制备	(162)
14.3.1	胶体金	(162)
14.3.1.a	白磷还原	(162)
14.3.1.b	白磷还原	(163)
14.3.1.c	抗坏血酸还原	(163)
14.3.1.d	枸橼酸三钠还原法	(164)

14.3.1.e	乙醇—超声波还原法	(164)
14.3.1.f	硼氢化钠还原	(165)
14.3.1.g	鞣酸—柠檬酸钠还原	(165)
14.3.2	铁蛋白提纯	(166)
14.4	抗体标记	(167)
14.4.1	异源免疫球蛋白吸附法	(167)
14.4.2	PAg法	(170)
14.4.3	铁蛋白标记抗体	(171)
14.4.3.a	间苯二甲基二异氰酸盐(XC)	(171)
14.4.3.b	甲苯2,4—二异氰酸盐(TC)	(171)
14.4.3.c	对, 对'二氟—间, 间'—二硝基二苯矾 (FNPS)	(172)
14.4.3.d	戊二醛偶联	(172)
	一步法	(172)
	两步法	(172)
14.4.4	酶标记	(174)
14.4.4.a	对, 对'二氟—间, 间'—二硝基二苯矾 (FNPS)	(174)
14.4.4.b	戊二醛一步法	(175)
14.4.4.c	戊二醛两步法	(175)
14.5	免疫细胞化学染色	(176)
14.5.1	胶体金标记物	(176)
14.5.1.a	环氧树脂超薄切片	(176)
14.5.1.b	低粘度树脂包埋超薄切片	(177)
14.5.1.c	Low K ₄ M 快速包埋超薄切片	(178)
14.5.1.d	Low K ₄ M 包埋超薄切片	(179)
14.5.1.e	冷冻超薄切片	(180)
14.5.1.f	PAg染色法	(182)

14.5.2	铁蛋白标记抗体的免疫电镜染色	(182)
14.5.2.a	细胞表面或细胞外抗原	(182)
14.5.2.b	细胞内抗原	(183)
	(1) GMA 包埋	(183)
	(2) BSA 交联包埋	(184)
	(3) 冷冻超薄切片	(185)
14.5.2.c	亚细胞碎片	(186)
14.5.2.d	组织培养细胞	(186)
14.5.2.e	病毒和大分子	(187)
14.5.3	酶标记抗体	(187)
14.5.3.a	细胞表面或细胞外	(187)
14.5.3.b	组织或细胞内抗原	(188)
14.5.3.c	冷冻厚切片	(189)
14.6	对照试验	(190)
14.6.1	特异性抗体封闭	(190)
14.6.2	特异性抗原吸收	(190)
14.6.3	非特异性对照	(190)
第十五章	放射自显影	(191)
15.1	半薄切片	(191)
15.2	超薄切片	(192)
15.2.1	环套敷膜法	(192)
15.2.2	平板法(平基法)	(193)
15.2.3	孔膜法	(194)
第十六章	分子生物学电镜实验技术	(195)
16.1	蛋白质大分子的负染	(195)
16.1.1	染色剂	(195)
16.1.2	滴染法	(196)
16.1.3	混染法	(196)

16.2	核酸大分子铺展	(196)
16.2.1	双链DNA和RNA	(197)
16.2.2	含单链区的DNA分子	(198)
16.2.3	单链RNA	(198)
16.2.4	扩散法	(200)
16.2.5	无蛋白质的铺展法	(200)
16.3	核酸的变性与杂交	(201)
16.3.1	部分变性	(202)
16.3.2	DNA—DNA异源双链技术	(203)
16.3.3	RNA—DNA杂交	(204)
16.4	核酸与蛋白质的复合物	(205)
16.4.1	蛋白质与双链DNA特异序列的结合	(205)
16.4.2	蛋白质与单链RNA的特异序列的结合	(206)
16.5	染色质铺展	(207)
16.5.1	一步释放法	(207)
16.5.2	米勒法	(207)
16.6	原位杂交技术	(209)
第十七章	金属投影与复型	(212)
17.1	投影	(212)
17.1.1	一次投影	(212)
17.1.2	二次投影	(213)
17.1.3	旋转投影	(214)
17.1.4	铂—碳锥形投影	(214)
17.2	复型	(215)
17.2.1	一级复型	(215)
17.2.2	二级复型	(215)
17.3	冷冻断裂(蚀刻)复型	(216)
第十八章	扫描电镜样品制备	(220)