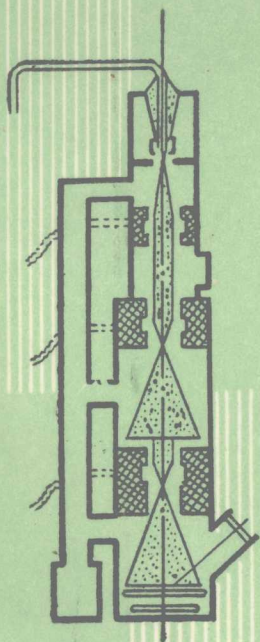


# 植物电镜技术

蒋虎祥 田金仙 编著



南京大学出版社

# 植物电镜技术

蒋虎祥 田金仙 编著

南京大学出版社

1990·南京

## 内 容 提 要

本书内容丰富、新颖，除了有超薄切片、扫描电镜样品制备等基本制样技术之外，还新增入植物电镜厚切片制作技术、各种冷冻制样技术以及X-射线显微分析用的样品制作法等。本书可作为综合性大学生物系及农林院校植物电镜技术课程的教材，也可供广大生物电镜工作者参考使用。

## 植 物 电 镜 技 术

蒋抗程 卞金仙 编著

\*

南京大学出版社出版

(南京大学校内)

江苏省新华书店发行 江苏省句容印刷厂印刷

\*

开本：787×1092 1/32 印张：10.625 字数：237千

1990年12月第1版 1991年6月第1次印刷

印数 1—1500册

ISBN 7-305-00671-8

Q·4 定价2.30元

## 前 言

自然科学常常伴随着实验仪器和实验技能的发展而发展。电子显微镜（简称电镜）的出现推动了许多学科，尤其是生物学和医学的发展。现代电镜正以其高分辨率、高放大倍数和多功能的优点继续向生物学的各个分枝渗透。作为生物学和农、林、医学方面的学生，很有必要了解或掌握一些电镜技术方面的知识，以便于阅读这方面的文献资料 and 进行生物超微结构的研究。

我校在60年代初建立电镜室和摸索电镜样品制作法，并为学生开设实习和参观，1973年正式开设“生物电镜技术”课程至今。我们在教学和科研中了解到：制作植物电镜样品的方法与制作动物电镜样品的方法是颇为不同的；许多生物电镜技术书常是偏重动物和医学方面的，对植物方面的叙述甚少，更无一本可作教材的植物电镜技术书。

本书在编写之初，得到我系朱洪文教授的指导；在初稿完成后，曾请南京林业大学电镜室黄金生副教授审校。对于他们的帮助，在此一并致谢。

由于编者水平有限，书中缺点、错误在所难免，期望同行及广大读者批评指正。

蒋虎祥

1988年12月于南京大学生物系

# 目 录

<b>第一章 生物显微技术的发展和电子显微镜</b>	
技术的广泛应用	( 1 )
第一节 生物显微技术的发展	( 1 )
第二节 电子显微镜在生物学上的应用	( 6 )
一、病毒学方面	( 6 )
二、细胞学方面	( 7 )
三、植物学方面	( 7 )
四、分子生物学方面	( 8 )
五、病理学方面	( 8 )
六、环境污染和职业病研究方面	( 8 )
七、考古学方面	( 8 )
参考文献	( 9 )
<b>第二章 透射式电子显微镜的基本原理和结构</b>	( 10 )
第一节 电子枪	( 10 )
第二节 电磁透镜	( 12 )
第三节 图像观察和记录系统	( 18 )
第四节 真空系统	( 19 )
第五节 供电系统	( 22 )
参考文献	( 24 )
<b>第三章 超薄切片技术</b>	( 25 )
第一节 概述	( 25 )
第二节 取材和细切	( 27 )
第三节 固定	( 29 )

一、固定的目的	(29)
二、固定液、缓冲液和附加剂	(29)
三、缓冲液及其配制	(30)
四、固定液及其配制	(37)
五、固定的方法	(44)
第四节 漂洗和脱水	(57)
一、漂洗和脱水的程序	(57)
二、组织块染色	(60)
第五节 浸透和包埋	(61)
一、包埋介质概述	(61)
二、浸透和包埋的方法	(72)
第六节 切片	(78)
一、载网及其清洗法	(78)
二、支持膜及其制作法	(80)
三、修整包埋块	(86)
四、制作玻璃刀	(88)
五、金刚刀的使用与保养	(92)
六、超薄切片机	(94)
七、切片操作步骤	(96)
第七节 染色	(99)
一、醋酸铀染色	(100)
二、柠檬酸铅染色	(101)
第八节 操作程序举例	(103)
一、水稻叶片和荔枝花药样品制备	(103)
二、花生叶片样品制备	(104)
三、真菌菌丝及其宿主植物根组织样品制备	(104)
参考文献	(105)

<b>第四章 植物塑料厚切片技术</b> .....	( 107 )
<b>第一节 概述</b> .....	( 107 )
<b>第二节 环氧树脂厚切片制作法</b> .....	( 109 )
<b>第三节 环氧树脂厚切片染色法</b> .....	( 112 )
一、天青B染色 (Hoefert, 1968) .....	( 112 )
二、碱性品红和亚甲蓝染色 (Sato and Sha- moto, 1973) .....	( 113 )
三、苏丹B黑染色 (Parham and Kaustinen, 1976) .....	( 113 )
<b>第四节 乙二醇甲基丙烯酸酯厚切片制作法</b> .....	( 114 )
<b>第五节 GMA厚切片染色法</b> .....	( 118 )
一、甲苯胺蓝染色法.....	( 118 )
二、酸性品红和甲苯胺蓝染色法.....	( 119 )
三、苏木精染色法.....	( 119 )
<b>参考文献</b> .....	( 120 )
<b>第五章 负染色技术</b> .....	( 121 )
<b>第一节 负染色的一般概念</b> .....	( 121 )
<b>第二节 负染色液的配制</b> .....	( 123 )
<b>第三节 负染色方法</b> .....	( 125 )
一、滴染法.....	( 125 )
二、喷雾法.....	( 126 )
三、漂浮法.....	( 127 )
<b>第四节 一些生物样品负染色操作法举例</b> .....	( 127 )
一、蛋白质分子和核糖体的负染色.....	( 127 )
二、病毒的负染色.....	( 129 )
三、细菌的负染色.....	( 130 )
<b>参考文献</b> .....	( 130 )

<b>第六章 复型技术和投影技术</b> .....	( 132 )
第一节 复型技术中的基本方法.....	( 132 )
第二节 投影技术.....	( 134 )
一、投影的基本概念.....	( 134 )
二、投影所用的蒸发材料.....	( 136 )
第三节 蒸发的方法.....	( 137 )
第四节 复型和投影样品制作法举例.....	( 139 )
一、小颗粒样品的复型法(perkins and koehler, 1978).....	( 139 )
二、云母底子技术(Hall, 1966年的修改法)	( 141 )
参考文献.....	( 141 )
<b>第七章 冷冻固定技术</b> .....	( 143 )
第一节 冷冻固定的目的和意义.....	( 143 )
第二节 生物样品内的水和结冰.....	( 144 )
第三节 植物样品的预处理.....	( 145 )
一、分离的细胞和细胞成分的预处理.....	( 145 )
二、植物组织和器官的预处理.....	( 148 )
第四节 冷冻的方法.....	( 149 )
一、浸没法.....	( 149 )
二、喷雾冷冻法.....	( 152 )
三、样品喷射冷冻法.....	( 153 )
四、液体石蜡法.....	( 153 )
五、夹心冷冻法.....	( 154 )
六、金属接触法.....	( 154 )
参考文献.....	( 155 )
<b>第八章 冷冻干燥技术</b> .....	( 157 )
第一节 冷冻干燥的基本原理.....	( 157 )



第二节	冷冻干燥操作程序	.....	(159)
	参考文献	.....	(162)
<b>第九章</b>	<b>冷冻取代技术</b>	.....	(163)
第一节	概述	.....	(163)
第二节	冷冻取代液	.....	(165)
第三节	最简单的冷冻取代装置	.....	(166)
第四节	冷冻取代操作程序	.....	(168)
一、	制备冷冻取代样品的超薄切片	.....	(168)
二、	米勒的冷冻取代操作程序	.....	(169)
	参考文献	.....	(170)
<b>第十章</b>	<b>冷冻超薄切片技术</b>	.....	(171)
第一节	概述	.....	(171)
第二节	冷冻超薄切片机	.....	(173)
一、	低温恒温箱式冷冻超薄切片机	.....	(173)
二、	冷冻附件式冷冻超薄切片机	.....	(174)
第三节	冷冻超薄切片操作程序	.....	(179)
一、	取材和预处理	.....	(180)
二、	把样品装在支持物上	.....	(181)
三、	冷冻	.....	(182)
四、	把样品装到超薄切片机上	.....	(183)
五、	切片及后处理	.....	(184)
	参考文献	.....	(187)
<b>第十一章</b>	<b>冷冻复型电镜技术</b>	.....	(188)
第一节	概述	.....	(188)
第二节	冷冻蚀刻机简介	.....	(190)
第三节	冷冻复型操作程序	.....	(193)
一、	取材和预处理	.....	(193)

二、冷冻	(194)
三、断裂	(197)
四、蚀刻	(197)
五、喷镀	(199)
六、分离和清洗复型膜	(200)
第四节 断裂面及其命名	(202)
第五节 冷冻复型技术在植物学研究中的应用	(204)
参考文献	(206)
<b>第十二章 植物电镜细胞化学技术</b>	(207)
第一节 电镜细胞化学技术的基本原理和实践	(207)
第二节 酶的电镜细胞化学技术	(209)
一、酶细胞化学简况	(209)
二、酶定位方法举例	(210)
第三节 多糖的电镜细胞化学技术	(214)
一、钉红染色法	(215)
二、羟胺-氯化铁法	(215)
三、胶体金属法	(216)
四、高碘酸氧化法	(216)
第四节 外源凝集素技术	(219)
一、标记凝集素	(221)
二、固定组织和细胞	(221)
三、凝集素和细胞结合	(222)
四、电镜观察	(223)
参考文献	(223)
<b>第十三章 植物免疫电镜技术</b>	(225)
第一节 免疫定位技术发展简史	(225)
第二节 抗原和抗体	(227)

<b>第三节 免疫电镜实验程序</b> .....	( 229 )
一、制备抗原.....	( 230 )
二、制备抗血清.....	( 231 )
三、分离抗体.....	( 233 )
四、标记抗体.....	( 235 )
五、制备组织.....	( 238 )
六、免疫定位(染色).....	( 238 )
七、定位后处理.....	( 240 )
八、解释实验结果.....	( 240 )
<b>第四节 免疫电镜技术在植物学研究中的应用</b> ...	( 241 )
参考文献.....	( 242 )
<b>第十四章 植物电镜放射自显影技术</b> .....	( 244 )
<b>第一节 放射自显影技术的基本概念和发展简史</b>	( 244 )
<b>第二节 电镜放射自显影实验操作程序</b> .....	( 247 )
一、引入同位素.....	( 247 )
二、制备超薄切片.....	( 256 )
三、自显影.....	( 258 )
参考文献.....	( 264 )
<b>第十五章 扫描电子显微镜</b> .....	( 265 )
<b>第一节 扫描电镜的发展和应用</b> .....	( 265 )
<b>第二节 扫描电镜的原理和结构</b> .....	( 267 )
一、电子束的产生.....	( 269 )
二、扫描原理.....	( 271 )
三、二次电子信号的产生、检测、放大和显示	( 273 )
<b>第三节 扫描电镜的性能特点</b> .....	( 275 )
一、景深大,图像的立体感强,特别适用于具有 复杂空间构型的粗糙表面成像.....	( 275 )

二、放大倍数的范围广	( 275 )
三、样品制备比较容易, 而且可观察大块的和厚的样品	( 276 )
四、在观察时样品可在样品室中被转动和平移, 这便于在不同角度和位置观察样品的各个区域	( 276 )
五、利用的信号种类较多	( 276 )
参考文献	( 278 )
<b>第十六章 植物扫描电镜样品制作法</b>	( 280 )
<b>第一节 制样操作的一般程序</b>	( 280 )
一、取材	( 280 )
二、清洁	( 281 )
三、固定	( 281 )
四、脱水	( 282 )
五、干燥	( 282 )
六、把样品粘到样品台上	( 282 )
七、喷镀	( 284 )
<b>第二节 制样的方法</b>	( 286 )
一、活体观察法	( 286 )
二、新鲜样品直接观察法	( 287 )
三、冷冻样品直接观察法	( 287 )
四、空气干燥法	( 288 )
五、冷冻干燥法	( 289 )
六、临界点干燥法	( 290 )
七、导电染色法	( 294 )
八、断裂法	( 296 )
<b>第三节 关于某些样品的制备</b>	( 299 )
一、大的样品	( 299 )

二、小的样品	( 300 )
三、软的样品	( 303 )
四、硬的样品	( 304 )
参考文献	( 307 )
<b>第十七章 植物样品的X-射线显微分析</b>	<b>( 309 )</b>
<b>第一节 电子探针的特点和应用</b>	<b>( 309 )</b>
一、测定植物体中天然存在的元素	( 311 )
二、探查植物体内离子的运输途径	( 311 )
三、研究植物激素的作用	( 312 )
四、植物矿质营养研究	( 312 )
五、细胞化学方面的研究	( 312 )
<b>第二节 波谱分析法和能谱分析法</b>	<b>( 313 )</b>
一、波谱仪	( 314 )
二、能谱仪	( 316 )
<b>第三节 植物X-射线显微分析样品制作法</b>	<b>( 318 )</b>
一、常规制作法	( 318 )
二、沉淀法	( 321 )
三、空气干燥法	( 323 )
四、冷冻超薄切片法	( 323 )
五、冷冻干燥法	( 324 )
六、冷冻取代法	( 324 )
七、冷冻含水样品的直接分析法	( 325 )
参考文献	( 326 )

# 第一章 生物显微技术的发展和电子 显微镜技术的广泛应用

## 第一节 生物显微技术的发展

人类为了利用自然和改造自然，就必须认识和了解生物的结构和功能。人类对生物结构的认识，有着一段漫长的历史。在很长的时间内，人们只能凭藉肉眼本身进行观察。但是人的眼睛有个生理限制，就是在最佳反差和照明的条件下，在距离25cm远的地方，人眼睛只能分辨约0.1mm大小的物体或物体上的结构细节，这使人们看不见比这视觉极限更加细微的结构。后来人们学会了使用放大镜，可以把物体放大后进行观察。1590年，荷兰的詹森（Z. Janssen）发明第一台复式光学显微镜，引起科技界的重视。从此，人们借助光学显微镜，开拓出新的视野，有了许多新的发现。例如，1665年，英国物理学家虎克（Robert Hooke）用自己设计的光学显微镜观察软木薄片，发现了植物细胞。17世纪末，荷兰生物学家列文虎克（Leeuwenhoek）证明动物也有细胞结构。此后，显微镜逐渐在各学科广泛应用。1780年，美国的亚当斯（A. N. Adams）发明切片机，提供了用显微镜观察生物组织的技术手段。在不断革新光学显微镜的基础上，19世纪建立了细胞学、组织学、血液学、病理学和微生物学等。这对生物学、医学和生产实践起着很大的推动作用，给人们带来无数的福利，丰富着人类的知识宝库。

随着显微镜在各个领域中的广泛应用，促进了显微镜本身的不断改进；随着物理学、化学和数学的发展，显微镜也在不断完善。人们还根据需要，制成各种类型的光学显微镜，例如紫外光、红外光、偏振光、荧光、金相、暗视野、相差、万能等显微镜。可是显微镜也有个限制，这个限制就是光波的波长较长，当物体的直径小于光波波长之半时，光波容易绕过物体前进，产生衍射现象，致使比光波半波长小的物体不能通过显微镜被分辨清楚。也就是说，显微镜的分辨本领受到光波波长的限制。所谓分辨本领，也称分辨率或分辨力，就是人眼或显微镜等能分辨开物体上最近距离两点的距离，常用这个距离 $d$ 来表示， $d$ 越小，分辨率越大。1874年，德国的阿贝（E. Abbé）根据可见光在样品上的衍射现象，提出了光学显微镜分辨率的公式：

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

$d$ 为显微镜的分辨率，

$\lambda$ 为光的波长，

$n$ 为物体所在介质的折射率，

$\alpha$ 为物与物镜所成夹角的一半

（图1-1）， $n \sin \alpha$ 为物镜的数值孔径（镜口率）。

取光波的平均波长为5000

Å、 $n \approx 1.6$ （油浸）、 $\alpha = 90^\circ$ 。

（最大值）、 $\sin \alpha = 1$ ，得到

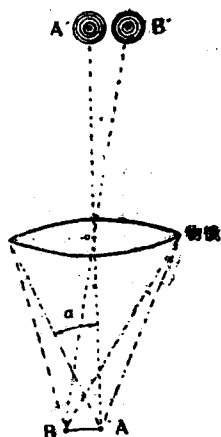


图 1-1 由于光的衍射性质，使二物点A、B的像是两组明暗相同的圆环A'、B'（仿孙铁勇，1955）

$$d = \frac{0.61 \times 5000 \text{ \AA}}{1.6 \times 1} \approx 2000 \text{ \AA} = 0.2 \mu\text{m}$$

这就是普通光学显微镜的分辨率。实验也证实了阿贝的理论：无论光学显微镜做得如何精巧，都无法突破这个极限。他在1878年就发表了如下具有科学预见的话：

“在今天的科学视野中，我们的视觉所能达到的观察范围，由于受到光的本性的制约而具有某种界限。由今天的知识获得的任何一种武器都不能突破这个界限。不言而喻，在这个世界上，凭现在我们所掌握的知识，自然界还存在着许多为我们所想像不到的东西，然而，今天无法突破的界限，到明天有可能用崭新的方法来超越它。这是我的信念。我相信，将来在追究物质世界的本质时，必然会出现远比今天的显微镜更强有力的有效观察器械。但是这种器械，除了它的名称以外，将与显微镜没有共同之处。”

本世纪初，阿贝宣布：“需要寻找合适的短波辐射来克服为衍射所限制的分辨率，显微术已经出现了止步不前的状态。”

1923年，法国科学家德布罗意 (L.V. de Broglie) 提出高速运动的电子具有波动性，并给出了波长的公式：

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

其中 $\lambda$ 为电子波长， $h$ 为普朗克常数 ( $6.62 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ )， $v$ 是电子速度， $m$ 是电子质量 ( $9.1 \times 10^{-28} \text{ g}$ )。

他还算出电子的波长可达 $0.05 \text{ \AA}$ ，这比可见光的波长要短得多。由此可以想到，如果能利用高速运动的电子流作光源而造出一台“电子”显微镜的话，那该多好呀！

1931年，柏林工科大学高压实验室的克诺尔 (Max



Knoll)和吕斯卡(Ernst Ruska)试制成功世界上第一台电磁式电子显微镜,雄辩地证明了利用电子束和磁场可形成与光学像相同的电子像。

也可以说那是一次知识的大爆炸吧!几乎与克诺尔和吕斯卡发明第一台电磁式电镜的同时,也有一些其他人研制出电镜。例如,1931年德国的勃吕契(Bruche)也在柏林利用静电场研制出世界上第一台静电式电镜;1932年,马尔登(L. Marton)在布鲁塞尔也研制成一台电镜,他在1934年拍得第一张植物叶片的电镜照片,在1937年拍得第一张细菌的电镜照片,引起人们很大的兴趣。1939年,德国的西门子公司生产了第一批商品电镜,导致英、美、苏、日等国相继开展电镜的研制工作。

上面提到的电镜,大都属于透射式电子显微镜。现在常用的加速电子的电压一般为60—100kV。被加速了电子透过样品,经过磁场或电场(电子透镜)放大投射到荧光屏上而成像。发展到今天,其分辨率可达 $1-2\text{ \AA}$ ,放大倍数可达100万倍。

普通的透射电镜的加速电压较低,电子的速度不够高,穿透力不太强。若把加速电压加大到500kV以上,则可制成超高压电镜。超高压电镜中电子束的能量极高,因而能穿透较厚的样品。普通的100kV透射电镜至多只能观察厚度为 $0.1\mu\text{m}$ 的样品,而1000kV的超高压电镜可以观察近 $10\mu\text{m}$ 厚的样品。也就是说,当加速电压增加10倍的时候,观察样品的厚度却提高了100倍。因为电子的穿透力高,运动速度快,对样品损伤小,则可以把细菌、组织培养细胞等放在薄膜制成的、密封的、里边潮湿的小室中进行活体观察。超高压电镜的其他优点是分辨率高、可得到物体的三维结构信息等。