

基本知识和技能

一、腊叶标本的制作

(一)标本的压制

将采得的标本，压在标本夹（夹板）内。适当的时间（依据材料的不同而异）后用纸更换并加整理。整理时要使花、叶展平，姿式美观，不能使多数叶片重叠，要压有正面叶片，也要压有反面叶片。落下来的花、果或叶片，要用小纸袋装好，袋外写上该标本的采集号，并与标本放在一起，以后贴在台纸上。标本与标本之间必须隔数层吸水纸，夹在标本夹内，并加适当的压力，用粗绳将标本夹捆起，放在通风处。次日换干纸时，必须再仔细加工、整理标本。以后每日均需更换于纸至少 1 次，并应随时再加整理。在第三日换干纸后，可增加压力（夹有 250 ~ 300 份标本一夹的标本夹，可施加压力 12 259 ~ 14 710kPa），捆紧标本夹后放在日光下，使水分迅速蒸发以防止标本变色过度或发霉。通常在北方干燥地区，约换干纸 7 ~ 8d 后，标本即可干燥。若遇阴雨天，可用微火烘烤。换下的湿纸，要及时放日光下晒干或用火烤干，以备换纸时用。肉质的球茎、鳞茎、果实可切开压制。南方多雨地区，每日应换干纸 2 次，并可放在微火上烘烤。已干的标本要及时提出另放，即每隔 1 张单纸放 1 张标本。并应将同号标本放在一起，外用一张单纸夹起，在夹纸的右下角，写上该号标本的采集号。最后小心地将每包标本用细绳捆好，放在干燥通风处。

(二)标本的消毒

野外带回的标本或外单位交换来的标本，可能带有害虫卵或真菌孢子。故在标本入柜之前必须进行消毒。消毒方法可用含升汞（氯化高汞）0.2% ~ 0.5% 的乙醇溶液放在搪瓷盘内，将标本浸透静置 5min 左右，用竹夹夹取，放在干的吸水纸中，压干后即可上台纸。升汞有剧毒，操作时应注意房间要通风，切忌用手直接操作，要带橡胶手套和口罩，操作后要洗手，以免中毒。剩余消毒液要妥善保管。

(三)标本的装订

已经消毒的标本，用毛笔将胶水（最好用植物胶）刷在标本背面，花的部分不必上胶以便解剖观察花部形态。然后移至贴台纸上（可用约 40cm × 30cm 的厚卡片纸），稍加压力，放置使干。贴时应注意在左上角和右下角分别留出贴野外记录签和定名签的位置，然后用纸条（或线）将叶片和植物粗壮部分穿钉固定在台纸上即成。

(四)标本的鉴定

标本经过分科、分属和分种鉴定后,可将定名签贴在台纸右下角,野外记录签贴在左上角,最后可加贴 1 张薄而韧性强的封面衬纸,以免标本间互相摩擦损坏,这样即成为完整的标本。随后将同种植物标本放在一起,用一种夹夹起(可用牛皮纸按台纸大小制作),并在种夹外注明该种植物学名,按科、属顺序放入标本柜中密闭保存。柜中可放入一些樟脑球防虫。整个标本室可用硫酸氟或溴代甲烷熏蒸消毒,但消毒后要打开窗户通风数日方可进入。

二、显微镜的使用与保养

(一)显微镜的类型

显微镜是研究植物细胞结构、组织特征和器官构造最常用的重要仪器。显微镜的类型很多,主要分为光学显微镜和电子显微镜两大类。根据其功能的不同,光学显微镜又分为普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜和荧光显微镜等。

1. 普通光学显微镜是由一组光学放大系统和机械支持及调节系统组成,以可见光作光源,用玻璃制作透镜的显微镜,可分为单式显微镜与复式显微镜两类。单式显微镜由一个透镜组成,放大倍数在 10 倍以下。构造稍复杂的单式显微镜为解剖显微镜,是由几个透镜组成,其放大倍数在 200 倍以下。复式显微镜至少由 2 组以上透镜组成,是植物形态解剖实验最常用的显微镜,其有效放大倍数可达 1 250 倍,最高分辨力为 $0.2\mu\text{m}$ 。

2. 相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差(即相位差)转化为光强差的特种显微镜。其特点是利用光的干涉现象,将人眼不可分辨的相位差转化为人眼可以分辨的振幅差,从而使活体透明标本清晰可见。

3. 暗视野显微镜是一种通过观察样品受侧光照射时所产生的散射光来分辨样品细节的特殊显微镜。其特点是不让光束由下至上地通过被检物,而是将光线改变途径,使其斜射投向被检物,使照明光线不直接进入物镜,利用被检物体表反射或衍射光而形成明亮图像。当照明光有足够的强度而背景黑暗时,这些散射光便可通过物镜和目镜被观察到,从而分辨出普通光学显微镜所不能分辨的 $0.004\sim 0.2\mu\text{m}$ 大小的细节。

4. 荧光显微镜是一种通过观察样品受紫外线照射后所产生的荧光来分辨不同类型样品的特殊显微镜。多用于细菌的鉴别。

5. 电子显微镜使用电子束作光源的一类显微镜。电子显微镜以特殊的电极和磁极作为透镜代替玻璃透镜,能分辨相距 0.2nm 左右的物体,放大倍数可达 80 万 ~ 120 万倍,其分辨力比光学显微镜大 1 000 倍,是观察超微结构的重要精密仪器。

(二)普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜是由一组光学放大系统和机械支持及调节系统组成(图 1-1)。

1. 机械支持及调节系统显微镜的机械部分,是整个显微镜装配的骨架,它是安装光学放大系统的基座。显微镜的机械部分包括镜座、镜柱、镜臂、载物台、物镜转换器、镜筒和调焦装置等。

(1) 镜座:镜座是显微境的基本支架,支持整个镜体,使显微镜放置稳固。

(2) 镜柱:镜座上面直立的短柱,支持镜体上部的各部分。

(3) 镜臂:弯曲如臂,下连镜座,上连镜筒,为取放镜体时手握的部分。直筒显微镜臂的

下端与镜柱连接处有一活动关节，可使镜体在一定范围内后倾，便于观察。

(4) 载物台（镜台）：为放置玻片标本的平台，中央有一通光孔。两旁装有一对压片夹，或装有标本移动器，一方面可固定玻片标本，同时可以用标本移动器（或称推进器），转动旋钮，可以使标本前、后、左、右移动。有的标本移动器带有标尺，可指明标本所在位置。

(5) 物镜转换器：为接于镜筒下端的圆盘，可自由转动。盘上有 3~4 个安装物镜的螺旋孔。当旋转转换器时，物镜即可固定在使用的位置上，保证物镜与目镜的光线合轴。

(6) 镜筒：为显微镜上部圆形中空长筒，其上端置目镜，下端与物镜转换器相连，并使目镜和物镜的配合保持一定距离。镜筒能保护成像的光路和亮度。物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化，不但放大倍率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

(7) 调焦装置：用以调节物镜和标本之间的距离，得到清晰的物像。在镜臂两侧有粗、细调焦螺旋各 1 对（弯筒显微镜的调焦螺旋在镜柱两侧），旋转时可使镜筒上升或下降，大的 1 对为粗调焦螺旋，旋转 1 圈可使镜筒移动 2mm 左右。小的一对为细调焦螺旋，旋转 1 圈可使镜筒移动约 0.1mm。

(8) 聚光器调节螺旋 在镜柱的一侧，旋转它时可使聚光器上下移动，借以调节光线强弱。

2. 光学放大系统由成像系统和照明系统组成。成像系统包括物镜和目镜，照明系统包括反光镜和聚光器。

(1) 物镜：安装在镜筒前端物镜转换器上的透镜。利用光线使被检物体第一次造像，因而直接关系和影响成像的质量，对分辨力有着决定性的影响。物镜可分低倍、高倍和油浸物镜 3 种。物镜的性能可以从物镜外壳上标志着的数值孔径（numerical aperture，简称为 NA）大小来表示。数值孔径的大小又是衡量一台显微镜分辨力强弱的依据。不同放大倍数物镜的数值孔径范围如表 1 所示。

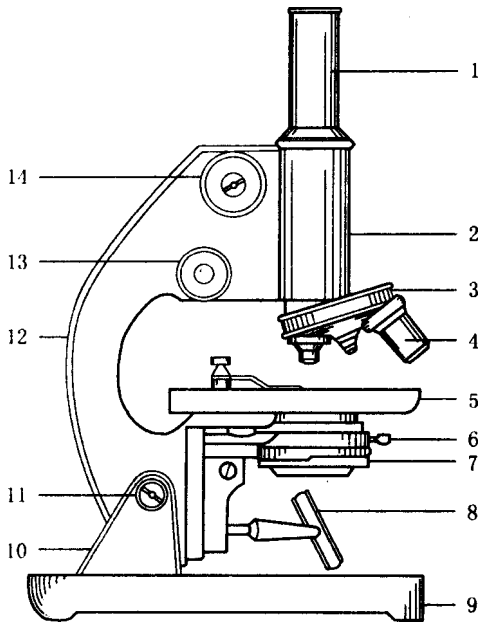


图 1-1 普通光学显微镜
1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜
5. 载物台 6. 聚光器 7. 虹彩光圈 8. 反光器 9. 镜座 10. 镜柱 11. 倾斜关节 12. 镜臂
13. 细调焦螺旋 14. 粗调焦螺旋

表1 不同放大倍数物镜的数值孔径

物镜倍数			物镜倍数		
数值孔径			数值孔径		
低倍物镜	1×~6×	0.04~0.15	高倍物镜	25×~63×	0.35~0.95
中倍物镜	6×~25×	0.15~0.40	油浸物镜	90×~100×	1.25~1.40

物镜的放大倍数愈高，它的工作距离愈小，即物镜最下面透镜的表面与盖玻片上表面间

的距离就越小。所以使用时要特别注意。

(2) 目镜：安装在镜筒上端，目镜的作用是把物镜放大的实像再放大一次，并把物像映入观察者的眼中。其上刻有放大倍数，如 $5\times$ 、 $10\times$ 和 $16\times$ 等。目镜的结构较物镜简单，普通光学显微镜的目镜通常由 2 个透镜组成，上端的一块透镜称“接目镜”，下端的透镜称“场镜”。上下透镜之间或在两个透镜的下方，装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”，物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处，所以其上可安置目镜测微尺。

(3) 反光镜：是普通显微镜的取光设备。反光镜是个圆形的两面镜。一面是平面镜，能反光；另一面是凹面镜，兼有反光和汇集光线的作用。反光镜具转动关节，可作各种方向的翻转，将光线反射在聚光器上。

(4) 聚光器：聚光器安装在载物台下，由聚光镜和虹彩光圈等组成，其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物象获得明亮清晰的效果。聚光器可以上下移动以调节视野的亮度，使焦点落在被检物体上，以得到最适亮度。

(5) 虹彩光圈：装在聚光器内，它可以开大和缩小，影响成像的分辨力和反差。拨动操作杆，可调节光圈大小，控制通光量。

(三) 显微镜的使用方法

1. 观察前的准备

(1) 显微镜从显微镜柜或木盒内取出时，要用右手紧握镜臂，左手托住镜座，保持镜体直立，平稳地将显微镜搬运到实验桌上。严禁用单手提着镜臂走，防止目镜滑出。

(2) 将显微镜放在自己身体的左前方，离桌子边缘约 10cm，右侧可放记录本或绘图纸。用显微镜观察时，必须用双眼，切勿紧闭一眼。要反复训练用左眼窥镜，右眼作图。

(3) 对光：一般可利用日光灯或自然光做光源，避开直射阳光。直射阳光会影响物像的清晰度，损坏光源装置和镜头，并刺激眼睛。对光时先把低倍镜转到中央，对准载物台上的通光孔，然后在左眼观察目镜中视野的同时转动反光镜，使视野的光线最明亮最均匀为止。如果靠近光源，或光线较强时，宜用平面的反光镜；如果光源较远或光线较弱时，宜用凹面的反光镜。当在镜筒内见到一个圆形而明亮的视野时，再利用聚光镜或虹彩光圈调节光的强度，使视野内的光线均匀而明亮。

2. 低倍镜的使用 镜检任何标本要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定要观察的位置。

(1) 放置切片 升高镜筒，把玻片标本放在载物台中央，使材料正对通光孔，然后用压片夹压住载玻片的两端。

(2) 调整焦点：两眼从侧面注视物镜，并慢慢按顺时针方向转动粗调焦螺旋，使镜筒徐徐下降至物镜离玻片约 5mm 处。用左眼或双目注视镜筒内，同时按反时针方向转动粗调焦螺旋使镜筒上升，直到看见清晰的物像为止（注意不可在调焦时边观察边下降镜筒，否则会使物镜和玻片触碰，压碎玻片，损伤物镜）。如一次看不到物像，应重新检查材料是否放在光轴线上，重新移正材料，再重复上述操作过程直至物像出现和清晰为止。

为了使物像更加清晰，此时可轻微转动细调焦螺旋使物像最清晰。当细调焦螺旋向上或向下转不动时，即表明已达极限，切勿再硬拧，而应重新调节粗调焦螺旋，拉开物镜与标本间的距离，再反拧细调焦螺旋，约 10 圈左右（一般可动范围为 20 圈）。有的显微镜可把微调基线拧到指示微调范围的两条白线之间，再重新调整焦点至物像清晰为止。

(3) 低倍镜的观察：焦点调好后，可根据需要，移动玻片使要观察的部分在最佳位置上。找到物像后，还可根据材料的厚薄、颜色、成像反差强弱是否合适等再调节，如视野太亮，可降低聚光器或缩小虹彩光圈，反之则升高聚光器或开大光圈。

3 高倍物镜的使用

(1) 选好目标：因高倍物镜只能将低倍视野中心的一部分加以放大，故在使用高倍镜前应在低倍镜中选好目标并移至视野的中央，转动物镜转换器，把低倍物镜移开，换上高倍物镜，并使之与镜筒成一直线(因高倍镜工作距离很短，操作要小心，防止镜头碰击玻片)。

(2) 调整焦点：在正常情况下，当高倍物镜转正之后，在视野中即可见模糊物像，只要稍调细调焦螺旋，即可见到最清晰的物像。

初用一台显微镜时，要注意它的高、低倍物镜是否能如上述情况能很好配合，如果高倍物镜离盖玻片较远而看不到物像时，则需重新调整焦点。此时应从侧面注视物镜，并小心转动粗调焦螺旋使镜筒慢慢下降到高倍物镜头几乎要与切片接触时为止，(小心勿压碎玻片标本和损坏镜头)，然后再由目镜观察，同时转动粗调焦螺旋，稍微升高镜筒至见到物像后，换调细调焦螺旋，使物像更加清晰为止。

(3) 调节亮度：在换用高倍镜观察时，视野变小变暗，所以要重新调节视野的亮度，此时可以升高聚光器或放大虹彩圈。

4. 油镜的使用在使用油镜之前，也要先用低倍镜找到被检部分，变换成高倍镜调整焦点，并将被检部分移到视野中心，然后再换用油镜。油浸物镜的工作距离(指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离)很短，一般在 0.2mm 以内，再加上一般光学显微镜的油浸物镜设有“弹簧装置”，因此使用油浸物镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本制片，使物镜也受到损害。

使用油镜时，可先在盖玻片上滴加一滴香柏油，才能使用。用油镜观察标本时，绝对不许使用粗调焦螺旋，只能用细调焦螺旋调节焦点。如盖玻片过厚，必须换成薄片方可聚焦，否则会压碎玻片，损伤镜头。

油镜使用后，应立即以拭镜纸蘸少许清洁剂[乙醚和无水乙醇(7:3)]的混合液擦去镜头上的油迹。

5. 收镜观察结束，应先升高镜筒，转动物镜转换器，使物镜镜头与通光孔错开，取下玻片，再降下镜筒，并将反光镜还原成与桌面垂直，擦净镜体，罩上防尘罩。仍用右手握住镜臂，左手平托镜体，按号放回镜箱中。

(四) 指针的安装及测微尺的使用

1. 安装指针的简易方法如果新购置的显微镜没有指针，可以自行安装。具体方法是先将目镜的上盖旋下，剪取 5~10mm 一段头发，用镊子夹住，在另一头蘸上加拿大树胶，将其粘贴在目镜内壁的金属铁圈上，并使指针的尖端位于视野的中央，稍干后，旋紧上盖即可使用。

2 测微尺的使用

(1) 镜台测微尺：一种特制的载玻片，中央有一个具刻度的标尺，全长为 1mm，共分 100 小格，每小格长 0.01mm，即 10 μ m(图 1-2)。

(2) 目镜测微尺：放在目镜内的一种标尺，为一块圆形的玻璃片，直径 20~21mm，上面刻有不同形式的标尺有直线式和网格式两种，测量长度一般用直线式，共长 10mm，分成 10

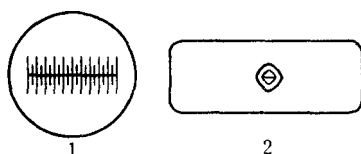


图 1-2 镜台测微尺

标尺的放大 2. 具标尺的载玻片

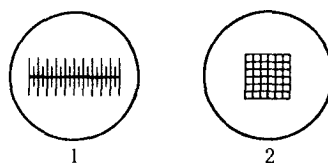


图 1-3 目镜测微尺

1. 直线式 2. 网格式

大格,每大格又分成 10 小格,共 100 小格(图 1-3) 网格式测微尺用于计算数目和测量面积(图 1-3)。

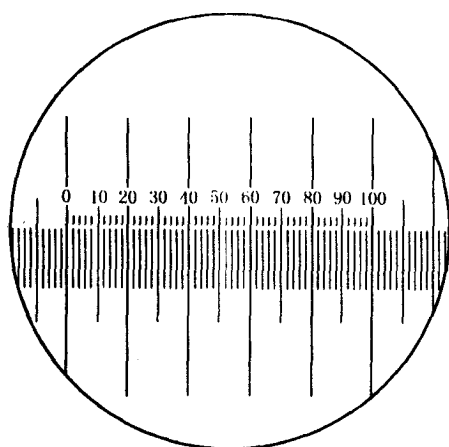


图 1-4 目镜测微尺每格实际长度的测定

目镜测微尺每格的实际长度(μm)

$$\begin{aligned} & \text{两重合线间镜台测} \\ & \text{微尺的格数} \times 10 \mu\text{m} \\ & = \text{目镜测微尺的格数} \end{aligned}$$

(3) 细胞及细胞内含物等的测量：先将目镜测微尺装入目镜内的铁圈上,用镜台测微尺标化。标化时,转动目镜,移动镜台测微尺,使两种量尺的刻度平行,并使它们的一端重合,再找出另一端的重合刻度,分别记录目镜测微尺和镜台测微尺重合范围内的刻度,计算出目镜测微尺每小格在该物镜条件下所相当的大小(μm)。如用 $5\times$ 目镜和 $40\times$ 物镜,测得目镜测微尺的 100 格,等于镜台测微尺的 50 格,即目镜测微尺在这一组合中每格实际长度为 $5\mu\text{m}$ 。测量时,以目镜测微尺测量被检物的小格数,乘以每小格的大小(μm)即得。如果用不同倍数的目镜,必须重新标化和计算(图 1-4)。

(五)显微镜的保养

1. 随时保持清洁机械部分可用软毛巾擦拭。

光学部分的灰尘必须用镜头毛刷拂去,或用吹风球吹去,再用拭镜纸轻擦,切忌用手指或其他粗糙物如纱布等擦拭,以免损坏镜面。

2. 做好‘四防’工作

(1) 防潮：显微镜应放在干燥的地方。如果长期放在潮湿的地方不使用,透镜容易发霉,不仅影响成像质量,还会腐蚀透镜表面,造成透镜损坏,显微镜的金属部分也容易生锈。特别在高温多雨季节,一定要采取防潮措施。不经常使用的显微镜,擦拭干净后放在镜箱内保存。镜箱内一般都要有 1~2 袋干燥剂,要经常检查干燥剂是否失效。在使用过程中也要注意防潮,特别是临时装片,水分切勿过多,观察时不能倾斜显微镜或倾斜角度过大,以免水流到显微镜上,万一水沾在镜身上,要及时擦干。冬季在低温的环境中进行观察时,观察者呼出的水汽会在镜臂上凝聚成水珠,也要及时擦拭干净。

(2) 防腐蚀：显微镜不要与腐蚀性的酸类或碱类化学物品放在一起,观察液体标本时,一般都要盖上盖玻片,如液体中有酸碱或腐蚀性化学物质时,要特别小心,观察完后要立即擦净镜头和载物台。

(3) 防热：显微镜不应在阳光下曝晒,以免造成损坏。

(4) 防撞击：搬动显微镜时千万不可碰撞。如遇机件失灵,使用困难时,绝不可强行转

动,更不能任意拆修,应立即报告指导教师解决,以免造成损坏扩大。

三、中药显微标本的制作技术

中药显微标本片根据制作目的的不同可分为临时制片、半永久制片和永久制片 3 种。临时制片是供临时观察中药显微构造用,一般不作保存,制片简单,封藏剂(装置液)为水、稀甘油、水合氯醛等。半永久制片常用于需要保存一段时间的中药制片,保存时间为 3~12 个月,制片的封藏剂常用甘油冻胶。永久制片是作长期保存的标本片,如标准中药的标本片等,制作工序多,时间较长,制片的封藏剂常用加拿大树胶。

(一)徒手切片法

徒手切片法是中药显微鉴定中最常用的制片方法之一。其特点是工具简单、操作简便,无需特定场所,随看随制。切片用具有单面刀片、双面刀片、镊子、培养皿等。适用对象为中药横切面组织观察、纵切面组织观察、显微化学反应观察等。

1. 临时制片法

(1) 取材:根据鉴定的要求,选取有代表性的药材样品进行制片。根类药材分别在根头部、根中部和较细的尾部取材;根茎类药材和茎类药材一般在节间取材;叶类药材分别在叶基、叶中和叶端三处中脉部位取材。其他有特殊要求的,根据具体要求取材。

徒手切片用的材料,一般可用单面刀片切成约 2cm 长的短段。

(2) 切片 将刀片和材料在水中湿润,用左手拇指和示指夹持材料,示指略高于拇指,用环指(无名指)或小指从下部托住材料。右手食指和拇指持刀片,从左前方向右后方平行地、较快地拉拽刀片,材料即被切下。连续切下几片后,把刀在盛水的培养皿中轻轻荡涤,使材料由刀片荡入水中。切片后,需调整左手所持材料高度。重复上面操作,直到切出满意的切片为止,即肉眼看去呈半透明状的切片。

(3) 装片:选择较完整的切片。将载玻片斜向浸入水中,用镊子轻轻地把切片移至载玻片中央,取出后用白布擦尽两面的水渍,在材料上滴加装置液 1~2 滴。镊取盖玻片,使盖玻片一边接触装置液边缘,待装置液沿边缘扩散后渐渐盖下盖玻片,以防止产生气泡。装片后如装置液过多,流溢到盖玻片以外,要用吸水纸将多余的装置液吸去,以免盖玻片滑动和浸浊显微镜,如装置液少,没有在盖玻片下充满,可用滴管在盖玻片的边缘小心将装置液滴入,使其充满。如在显微镜下观察有气泡存在,可用解剖针轻轻压迫盖玻片,使里边气体逸出,如气泡太多,将会影响观察效果,这样的装片必须重新制作。

2 永久制片法徒手切片经过脱水、染色、透明、封藏等过程,可制成永久制片。

(二)表皮撕片法

表皮撕片法是为了观察表皮细胞垂周壁、气孔及其类型、毛茸等显微特征而采用的一种制片方法。制片用具有无齿镊子、解剖针、培养皿等。适用对象为中药叶的上下表面,草本茎、花冠表面的组织观察。

1. 临时制片法左手拇指和示指夹持叶片,必要时可用中指由下方托住叶片。右手持镊子,用尖部在叶片适当部位插入,撕取表皮一小块,浸入盛水的培养皿中。左手持洁净载玻片,将载玻片一端斜向浸入水中,靠近撕下的叶表皮,右手持镊子或解剖针,将叶表皮移到载玻片上,擦尽载玻片两面的水渍,加装置液 1 滴,加盖玻片即成。

2 永久制片法将撕下的表皮经固定、脱水、染色、透明、封藏等过程,可制成永久制片。整个操作可在培养皿中进行。

制片方法:在培养皿中进行,分别加入 30% 乙醇 5ml(1min)、40% 乙醇 5ml(1min)、50% 乙醇 5ml(1min)、番红乙醇(50%)染色液 5ml(2~6h)、65% 乙醇 5ml(1min)、75% 乙醇 5ml(1min)、85% 乙醇 5ml(1min)、固绿乙醇(95%)染色液 5ml(0.5min)、95% 乙醇 5ml(1min)、无水乙醇 5ml(1min)2 次、无水乙醇-二甲苯混合液(1:1)5ml(1min)、二甲苯 5ml(1min)2 次,取材料于载玻片上,滴加加拿大树胶,盖上盖玻片,贴上标签即成。

(三)粉末制片法

粉末制片法是针对破碎的和粉末状的中药而采用的一种制片方法,是中药显微鉴定中常用的制片方法之一。制片用具主要有镊子、解剖针、试管、离心机、玻璃棒等。适用对象为粉末状药材,粉末中药制成的丸、散、膏、丹等中成药,易破碎的中药材以及贮藏年久而变得十分疏松的药材。

1 临时制片法

(1) 水装片法 取过 60 目筛的中药粉末少许,置载玻片中央,加水 1 滴,用解剖针拨匀并使它浸润粉末,再加 1~2 滴水后盖上盖玻片即成。本法适用于观察淀粉粒。

(2) 水合氯醛透化装片法:取粉末少许,置载玻片中央,加水合氯醛液 1 滴,用解剖针拨匀并使它浸润粉末,在酒精灯上加热,沸即离火,再加水合氯醛液 1 滴,用解剖针拨匀,再加热,如此反复 3 次。离火,加稀甘油 1~2 滴,拌匀,盖片即成。本法用于观察除淀粉粒和菊糖外的大部分组织、细胞和细胞后含物。

2. 永久制片法取粉末适量于离心管中,加入 50% 乙醇 5ml,5~10min 后离心,倾去乙醇,加番红染色剂 2ml,用玻棒轻轻搅动使分散,静止 2~6h,离心,倾去染剂,加入 70% 乙醇 5ml,1~5min 后离心倾去乙醇液,加入固绿乙醇溶液 2ml,30s 后即离心,倾去染剂,依次经 95% 无水乙醇 2 次、无水乙醇-二甲苯混合液(1:1)1 次,二甲苯 2 次,每次 1~5min。最后用吸管吸取材料于载玻片上,滴加加拿大树胶,盖上盖玻片,贴上标签即成。

(四)组织解离制片法

组织解离法是借药物的作用,将组织软化并使各组织细胞之间的果胶质被溶化而分离的一种制片方法,适用于观察各种细胞完整的形态。解离前,需将材料切成 1~3mm 的小片。

1. 临时制片法

(1) 氢氧化钾法 适用于组织柔软的材料,如叶、花、根尖等。

取材料薄片置试管或小烧杯中,加 5% 氢氧化钾溶液 2~5ml,水浴加热 20~30min,至用玻璃棒轻压材料能散开为度,倾去碱液,用水洗涤,取少量材料置载玻片上,用玻璃棒压碎后,以水合氯醛试液或稀甘油装片即成。

(2) 铬酸-硝酸法:适用于木化组织较多的药材,如木质的根、根茎类药材,木类药材等。

解离液的配制 取 10% 铬酸 1 份,10% 硝酸 1 份,等量混合。

取材料薄片置试管或小烧杯中,加解离液适量,浸泡 1~2d,夏天室温即可,冬天需加温到 30~40℃,至用玻璃棒搅拌轻压材料时能离散开为度,用清水离心洗涤数次,洗净酸液,取少量材料置载玻片上,用玻璃棒压碎后,以水合氯醛试液或稀甘油装片即成。

(3) 氯酸钾法:适用于木类、坚硬的果皮及种皮等药材。其特点是解离迅速,有漂白作

用,便于染色制成永久制片,但纤维素壁细胞大多被破坏。操作时需注意安全。

取材料薄片置小烧杯或试管中,加 60%硝酸 5ml,小火缓缓加热至微沸,移离火焰,加入少量氯酸钾粉,小火加热,待产生的气泡平息后,再加少量氯酸钾粉,小火加热,当材料呈白色絮状时停止,冷却,用水离心洗涤数次,洗净酸液,吸取少量材料置载玻片上,以水合氯醛试液或稀甘油装片即成。

2. 永久制片法取已解离的材料,置试管中,用 1%番红水溶液染色 2~6h,离心,倾去染液,经 30%、50%、70%、95%、无水乙醇、无水乙醇-二甲苯混合液、纯二甲苯 2 次,用干燥吸管吸取带材料的二甲苯 1 滴于载玻片上,滴加加拿大树胶 1 滴,盖上盖玻片即成。

(五)花粉粒及孢子制片法

花粉粒和孢子的观察常用于花类中药、全草类中药、蜜源植物以及蕨类植物的鉴定。为了清晰地看到花粉表面的纹饰和萌发孔等特征,在制片中有时需将内部的原生质体用化学试剂去除。

1. 临时制片法取花粉、花药或孢子囊群,放于载玻片中央,用玻璃棒压碎,去除花药残渣后滴加水合氯醛液 1 滴,用解剖针搅动,使气泡溢出,再滴加水合氯醛液 1 滴,盖上盖玻片即成。

2. 永久制片法取孢粉材料,干样品用冰醋酸软化,或用热水浸泡使其变软,用玻璃棒压碎,移至离心管内,加入冰醋酸,离心机离心,倾去上清液,加入新鲜配制的醋酸-硫酸(9:1)混合液约 3ml,在水浴上加热 1~2min,边加热,边用玻璃棒搅拌,待稍冷后离心,取沉淀,用水洗涤 2 次,再用甘油水(50:50)混合液浸 15min 后离心,倾出上清液。将离心管倒立在滤纸上,吸尽水液。装片时用解剖针取一小块甘油冻胶,放入离心管,接触沉淀物,使花粉粘在甘油冻胶上,取出并置于载玻片上,放在烫片板上加温,使甘油冻胶溶解。用解剖针把花粉搅均匀,盖上盖玻片,稍加压,在盖玻片四周涂上熔溶石蜡,制片即完成,贴上标签。

甘油冻胶配制 优质明胶 5g,蒸馏水 30ml,甘油 35ml,苯酚(溶于 10 滴水中)0.5g(每 100ml 水中加 1g)。先将明胶溶解于 35℃温蒸馏水中,然后将其他药品加入,待完全溶解而溶液尚温暖时,用粗滤纸滤入广口瓶中,冻结后贮藏备用。

(六)石蜡制片法

石蜡制片法,是利用石蜡渗透到材料内部,制成蜡块后再进行切片和染色的方法。一般均制成永久制片。其特点是操作容易,切成的片子薄(2~10 μ m),能切成蜡带,有利于制作连续切片等,但步骤较多,周期较长。切片用具有切片机、烘箱、铜模、染色缸、指管、蜡杯、镊子、单面刀片、酒精灯、载玻片、盖玻片、切片盒、显微镜等。试剂有各级浓度的乙醇、二甲苯、石蜡、番红、固绿、苏木精色素、黏贴剂、加拿大树胶等。

1. 取材石蜡切片法的取材同徒手切片法。一般可切成 3~5mm 的短段,如果直径过大,可切成 1/2 或 1/4,包括中央部位。在切材料时必须注意与中轴成直角,两切面平行,否则制成的切片细胞是斜的,所用的刀片要锋利,快速将材料切开,以免挤压、损坏组织。对于新鲜材料,采集时要注意标本尽可能不受损伤,切成小段并立即杀生与固定,如不能立即固定,应用湿纸把标本暂时包裹起来。

2. 杀生与固定取新鲜的药材制作石蜡切片,必须用固定液杀生固定,使其细胞形态、结构及其内含物和鲜活时相似,且不发生收缩或伸长,并使组织变硬,便于切片,增强内含物的折光度,使细胞易于着色,并能防腐。对于干的药材,则不需固定,可直接放入水中浸泡软

化即可。

杀生与固定的试剂有乙醇、福尔马林、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾、升汞及钨酸等。它们可以单独应用，但更常用的是配制成混合液使用。中药材显微鉴定中，石蜡切片最常用的固定液是福尔马林 - 醋酸 - 乙醇混合液，俗称 FAA 固定液。它适用于药材组织构造观察的固定，不宜做染色体等细胞学研究材料的固定。

FAA 固定液配方：

50% 或 70% 乙醇	90ml
冰醋酸	5 ml 或略少
福尔马林	5 ml 或略多

乙醇透入组织的速度很快。经乙醇固定的组织容易变硬，收缩也很剧烈，可比原组织缩小约 20%。乙醇可凝固蛋白质，但不能沉淀核蛋白。经乙醇固定的标本，细胞核着色不良，不适于染色体的固定。

冰醋酸能和乙醇及水混合，醋酸溶液虽不能凝固细胞质中的蛋白质，但能凝固核蛋白，所以用醋酸固定的标本，染色体的固定与染色都很好。醋酸的穿透速度很快。经醋酸固定的标本，可使细胞膨胀，防止收缩，组织也不会硬化。因此，醋酸常和乙醇、福尔马林配合使用。

用福尔马林固定的标本，组织硬化，但收缩很少。固定后的组织不需水洗，可直接经乙醇脱水。但用福尔马林长期固定的标本，需经水洗 24h，否则会影响染色。

FAA 混合固定液，是取各种试剂之长，补其之短，所以适合于多种材料的固定。具体应用时，应视材料硬软性质，适当增加或减少某种成分的比例。如固定收缩性小的材料，可略减冰醋酸的量，稍增加福尔马林的量，对于易收缩的材料，可增加冰醋酸的用量。FAA 液还可兼作保存液使用。

固定时间最短需 18h，木质小枝至少 1 星期，质地较软的可固定 48h，脱水前用流水或 50% 的乙醇洗涤 24h，其中换 2~3 次，洗净固定剂，以免影响染色。

3. 冲洗冲洗的目的是除去固定液，避免影响染色。一般固定液经流水冲洗一定时间即可除去，FAA 固定液除用流水冲洗外，亦可直接在 50% 或 70% 乙醇中洗涤。

(1) 流水冲洗 将材料自固定液中取出，移入广口瓶中，用纱布扎住瓶口，留一小孔，塞入橡皮管至底部，橡皮管另一端接自来水，流水冲洗 12h 后即可。

(2) 乙醇洗涤：将材料自固定液中取出，移入具有相应浓度的乙醇小瓶中，洗涤时间根据材料大小、软硬的长短而定，其中更换乙醇数次。

4. 脱水材料洗涤后需要脱水，脱水的目的是使组织中的水分完全除去，并使组织变硬，有利于其他药剂进入材料内；常用的脱水剂是不同浓度的乙醇。脱水是逐渐进行的，不可太快，也不要太缓，防止材料收缩以及周期太长。脱水要彻底，否则使以后的二甲苯不能进入，因而石蜡也不能浸入，影响切片。

脱水时间按乙醇浓度而异，低浓度乙醇和高浓度乙醇中，每级停留的时间不宜太长，一般 2~4h，否则易使组织变软和收缩变脆影响切片，如需过夜，应停留在 70% 乙醇中。

常用的脱水剂是乙醇。脱水步骤：将材料移至带塞的试管中，用水冲洗的材料，从 35% 乙醇开始，经过 45%、60%、70%、85%、95%，最后到无水乙醇。用 50% 乙醇洗涤的材料，从 50% 乙醇开始，经过 60%、70%、85%、95%，最后到无水乙醇。脱水到无水乙醇时，需要换 2 次，每次 1~2h，保证水分被充分除尽。

除乙醇外,脱水剂尚有丙酮、甘油、二氧六环、正丁醇、叔丁醇等。后三者为石蜡溶剂,脱水后不须经过透明步骤,直接透蜡。

5. 透明脱水完成后,要将材料中的乙醇用透明剂去除,其目的在于使石蜡能很顺利地进入材料组织中,增强组织的折光系数,并能和封藏剂混合,进行封藏。最常用的透明剂为二甲苯。二甲苯能溶于乙醇,也能溶解石蜡,透明力强,但时间过长时容易使材料收缩、变脆、变硬。

与脱水过程相同,逐渐用二甲苯代替乙醇,步骤如下:

无水乙醇 - 二甲苯(1:3)→无水乙醇 - 二甲苯(2:2)→无水乙醇 - 二甲苯(3:1)→纯二甲苯。

在每个级度中停留的时间,一般在1~2h之间,在纯二甲苯中应更换2次,至半透明即可。

其他透明剂还有苯、甲苯、氯仿、香柏油、丁香油等。

6. 透蜡即将包埋剂石蜡透入组织的过程。

市售生物切片的石蜡有52~54℃和58~60℃两种熔点。可根据当时气温而选用,气温高的宜选用58~60℃的石蜡,气温低的宜选用52~54℃的石蜡。

材料透明后,留有刚好盖没材料的二甲苯,加入石蜡小片,35℃左右保温,石蜡小片溶解后,继续加入,直到不再溶解并成为固体为止。这一过程大约需12h。打开指管木塞,放入温箱内,箱温略高于熔点,待石蜡熔化后,将材料移入纯蜡杯中,约经12h,其中换纯蜡3次,使石蜡渐渐代替了二甲苯,而材料中充满了石蜡。

7. 包埋是将被石蜡所浸透的材料连同熔化的石蜡一起倒入一定形状的纸盒内,并立即投入冷水中,使它立即凝固成蜡块的过程。包埋前,准备好纸盒(涂上液体石蜡)、镊子、酒精灯,从温箱中取出蜡杯,连同材料一起倒入纸盒内,迅速将镊子在酒精灯上加温,拨正材料,加上标签纸。待到石蜡表面凝固,即可将纸盒向一侧倾斜,使冷水从一边浸入纸盒,并立即使它沉入水中,30min后,取纸盒拿出蜡块,即可贮藏备用(图1-5)。

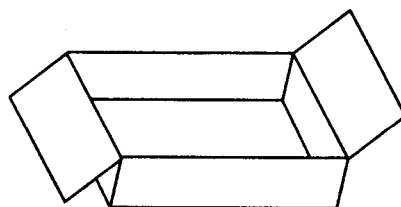


图1-5 包埋纸盒

如用铜模包埋,下面应垫玻璃板,包埋后不须将蜡块浸入水中,待冷却后扳开即可。

8. 切片切片是将已包埋好的蜡块置于切片机上,切出薄片的过程。

(1) 切片机:切片机是用于各种组织切片的一种精密机械,由基座、旋转轮、厚度调节钮、刀夹、物夹等组成。

刀夹在切片机的前面,刀口向上固定不动,角度可自由调节。物夹可上下移动向前推进,其后面连接着控制切片厚度的微动装置,当旋转轮用手转动1次,物夹则上下来回移动1次,并按调节好的厚度向前移动1格,向下移动经过刀口,即切下一组织薄片,如此旋转轮不断转动,就能不断地切下切片,并在刀刃处连接成连续的蜡带。

(2) 切片刀:石蜡切片用刀为刀刃两面平直的刀,适用于滑走切片机和旋转切片机,使用前一般须磨刀。美国AO公司生产的切片机附有一次性使用的切片刀,不须磨刀。

(3) 磨刀方法:先准备好磨刀石和润滑剂。磨刀石有粗细之分,种类有黄石、青石以及现在生产的各种带金刚石粉的磨刀石,要求平滑无疵。润滑剂一般用水,最好用石蜡油。磨前先在磨石上涂上润滑剂,切片刀上装上刀背和刀柄,磨时刀口向前,由右下方向左前方推

动,到左前方后,将刀平移到右前方,同时刀口向上翻过来,再从右前方向左下方推动,再将刀平移到右下方,同时刀口向上翻过来,如此重复。磨好后在荡刀皮上荡刀几次,使刀刃更锋利,注意荡刀时刀口向后,否则会将荡刀皮割破。最后进行检验,在低倍显微镜下,刀刃应呈现一条白色光带,或用头发放在刀刃上拉过,锋利的刀刃应能拉住头发不滑动。另现在有自动磨刀机生产,磨刀比较省力。

(4) 蜡块处理 将石蜡块切成小方块,固着在台木(约 $2\text{cm} \times 1.5\text{cm} \times 2\text{cm}$)的一端上。方法是先把浸过蜡的台木的一头和有材料的石蜡的一头都在酒精灯上烤熔,把熔化的两头粘在一起,然后放在凉水中冷却即可。材料注意必须修得平整,特别是蜡块的上下面必须平行,否则蜡带弯曲影响切片。用铜模包埋的蜡块不须处理,可直接装机切片。

(5) 切片操作:将蜡块置于切片机物台上,安装好刀片,调整刀口角度,检查材料的位置是否与刀口垂直,调节切片厚度 $8 \sim 12\mu\text{m}$,然后摇动切片机,便切出了一条蜡带,然后用毛笔将蜡带挑下,移到黑纸上。蜡片不能用手去拿,因手有热度,薄片会融化粘在手上。

9. 贴片是把切片机切下的蜡带,按盖玻片的大小,分割成小段,粘贴于载玻片上的一个步骤。

取干净载玻片,涂上1小滴黏贴剂,用手指抹匀,加蒸馏水1滴,把黑纸上的蜡片用刀片割断,镊取一片蜡片轻放在载玻片的蒸馏水上(光面向下),材料放的位置稍偏右边以空出左边贴标签。将载玻片移至烘片台上,温度不超过 43°C ,使蜡片平展,然后略倾斜载玻片使多余的水分流出,蜡片便粘在上面了,待蜡片干透,即可进行染色。

梅氏蛋白黏贴剂(Mayer's albumen)配制法 将鸡蛋一个打入碗中,去蛋黄,用筷子打成雪花状泡沫,用双层纱布过滤到量筒中,经数小时或一夜即可滤出透明蛋白液,再加等量甘油,振荡,使两者混合,最后加入麝香草酚(1:100)防腐,可保存几个月到1年。

10. 染色是根据植物细胞中不同的化学性质用染料分别进行染色,便于观察细胞的形态、构造、内含物等。在制片过程中,如需要也可以不进行染色,以便观察细胞的自然色彩。

(1) 染料:中药制片中染料可分为天然染料和人工染料两大类。常用的天然染料有苏木精、洋红、地衣红等。人工染料根据其主要有色部分是阳离子或阴离子。为阳离子即是碱性染料,如番红、结晶紫等为阴离子即是酸性染料,如固绿、曙红等。若阳离子、阴离子都有,即是中性染料。

常用染料配法:①1%的番红 50%乙醇溶液 将1g番红溶解于50%乙醇溶液100ml中,可将木质化的细胞壁及细胞核染成红色。②0.1%的固绿 95%乙醇溶液 将0.1g的固绿溶解于95%乙醇溶液100ml中,可将非木质化的细胞壁及细胞质染成绿色。③德拉菲(De-lafield's)苏木精(hematoxylin)配方:

甲液 苏木精 1g 无水乙醇 6ml

乙液 硫酸铝按饱和水溶液(约1:11) 100ml

丙液 甘油 25ml 甲醇 25ml

配法:将甲液一滴一滴地加入乙液中,并随时用玻棒搅动。然后将溶液暴露于阳光和空气中,约7~10d后加入丙液。将混合液静止1~2个月至颜色变深时过滤即得。染色剂配制后置于阴冷处,紧塞瓶口,可长期保存使用。使用时将染色剂1份用3~5份蒸馏水稀释,染色后分化更明显。

此染色剂染后需水洗1~5min,然后在0.2%~1%盐酸乙醇溶液退色。

(2) 染色方法：在染色过程中，有累进染色法和退回染色法两种。累进染色法是将材料浸在略稀释的染色剂中，慢慢地使组织或细胞染到适当的深度为止，所需时间较短。退回染色法是将材料长时间地浸在染色剂中，使组织染色过度，然后用酸性乙醇进行退色，直到组织分化清晰为上。退回染色法所需时间较长，但组织分化明显，一般中药显微制片都采用此法。

番红 - 固绿对染法：适用于植物药的组织染色，结果木栓化和木质化的细胞壁呈鲜红色，纤维素细胞壁呈绿色，淀粉粒呈红色。其染色步骤为：

切片在二甲苯中脱蜡→无水乙醇→95%乙醇→85%乙醇→70%乙醇→50%乙醇→1%番红 50%乙醇溶液→70%乙醇→85%乙醇→0.1%固绿 95%乙醇溶液→95%乙醇→无水乙醇→无水乙醇→二甲苯混合液(1:1)→二甲苯→二甲苯→封藏。

其中,脱蜡 20 ~ 30min ,番红乙醇溶液 1 ~ 12h,固绿乙醇溶液 30s,其他步骤 3 ~ 5min。

番红 - 苏木精双重染色：适用于植物药的组织染色，结果木质化、栓质化细胞壁鲜红色，纤维素细胞壁紫色，淀粉粒红色。其染色步骤为：

切片在二甲苯中脱蜡→复水到蒸馏水→0.5%苏木精溶液→水洗→30%乙醇→50%乙醇→1%番红 50%乙醇溶液→70%乙醇→85%乙醇→95%乙醇→无水乙醇→无水乙醇→无水乙醇 - 二甲苯混合液(1:1)→二甲苯→二甲苯→封藏。

其中,脱蜡 20 ~ 30min ,苏木精溶液 15 ~ 30min ,番红乙醇溶液 1 ~ 12h,其他步骤 3 ~ 5min。

11. 封藏为制片最后一步手续，其目的是使已染色的材料保存在适当的封藏剂中，并使其能在显微镜下很清晰地显示出来，最常用的封藏剂是加拿大树胶（折光率 1.52）。

操作方法是在桌上放一张洁净的滤纸，将已染好色的切片从二甲苯中取出，放于纸上，擦干周围的二甲苯，在切片的中央滴上 1 滴树胶，然后用镊子夹住盖玻片，先一边与树胶接触，然后慢慢放下，注意不形成气泡，待完全干燥后，在载玻片的左边贴上标签，注明材料名称，制片日期等内容。至此，整个石蜡制片全部完成。

四、绘图技术

药用植物和中药材形态及其显微构造，除可用文字描述外，一般均需附图说明。绘图是药用植物学和中药鉴定学工作中的一项基本技能。绘图的精确与好坏，明显地影响药用植物学和中药鉴定学研究的结果与质量。常用绘图方法有徒手绘图法和显微描绘法两种。若按绘图工具则可分为铅笔绘图法、墨线绘图法和彩色绘图法等。绘制显微组织简图，要用国际通用的代表符号来表示。

(一) 绘图的基础知识

药用植物和中药材及其显微构造图是实物的形象记录，要求比例正确，形态逼真，结构清楚。对药用植物和中药材的形态图还要求富有立体感，不能随意夸张和任意涂影。要正确绘出实物的立体结构图，必须有一定的透视知识，如前大、后小，近明、远暗，透视方向一致，各透视线最终消失到一点等基础知识。

绘图常有以下规定：①一切结构均用线条来表示。线条要求粗细均匀，光滑清晰，明暗一致，接头处无分叉，切忌重复描绘。②所有结构线条不能用尺或其他圆规或曲线板等工具

代画，必须徒手作图，以表示生物的自然形态。③显示立体结构可用透视线条来表示。对球体、圆柱体或圆锥体的立体结构可以用圆点衬托明暗光线的方式，而不可用任何涂影来表示。点要小而圆，由密到稀逐步过渡。④各部位应先画了引线再注文字。引线用直尺画实线来表示，要求细直、均匀、不交叉，以免误指。注字时要尽可能详细些。所注文字最好在图右边的一侧，排列整齐。图内的结构名称，可直接用文字写明，也可用数码代注，再在图下集中注明。注字书写要求清楚、端正。图下需注明标本的名称、部位和放大倍数。⑤实验题目写在绘图纸的上方，图题和所用材料的名称和部位写在图的下方。

$$\text{放大倍数} = \frac{\text{用直尺量出画在纸上图象的长度或大小}}{\text{用显微目尺量出被测观察物在同一方向上的实际长度或大小}}$$

(二) 徒手绘图法的步骤

- (1) 选择最典型的标本或结构。
- (2) 仔细观察各部位的形状和结构及其间的比例关系和较明显的立体结构。
- (3) 用较淡的铅笔(2H 或 4H)，按照实物或显微图像的比例关系和立体投影画出轮廓草图，并留出书写图题和注字的地方。
- (4) 经反复对照修改后，再用较浓的铅笔(B 或 2B)绘出修改图。
- (5) 画引线，注字。

(三) 墨线绘图法

墨线绘图法系用特制的绘图小蘸笔，蘸墨汁在透明硫酸纸上画墨线图的一种方法。由于书籍或论文上的附图需制版，不能用铅笔图，必须用墨线图，故墨线图实际上就是将铅笔图用墨线描绘，增加线条的反差度，有利于印刷清楚。画墨线图的要求，基本上与铅笔图相同，但对画线条和打点的要求更高。若有个别线条画错，可先用锐利刀片轻轻刮净线条，再用橡皮将纸面擦至光滑或用指甲磨光后重画。

画墨线图的具体步骤 ①用铅笔在白纸上画好草图。 ②在玻璃板上(或下有白灯光的毛玻璃台上)将草图压在硫酸纸下，用蘸笔复绘草图。③打点衬托立体感，一定要去掉下面草

图后，在玻璃板上直接打点。打点要求细小、均匀，不要重叠。 ④画引线，注字。

(四) 显微组织简图的画法和有关代表符号

显微组织简图是将显微构造的各种组织位置和比例关系，用国际通用的代表符号，画成较简明的组织构造图，使能清晰地了解该器官组织构造的全貌。画法同墨线图和铅笔图。常用的各组织和细胞内含物的代表符号见图 1-6。

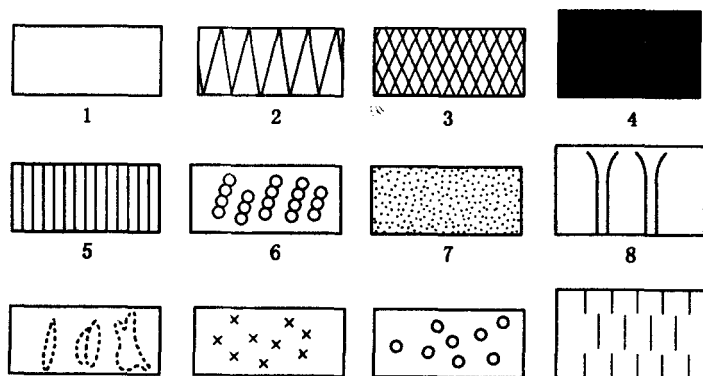


图 1-6 植物组织简图常用符号

- | | | | |
|---------------|------------|-------------|--------------|
| 1. 薄壁组织 | 2. 木栓组织 | 3. 厚壁组织或纤维束 | 4. 厚壁组织 |
| 5. 木质部或叶的栅栏组织 | 6. 导管或木质部束 | 7. 韧皮部 | 8. 射线 |
| 9. 裂隙 | 10. 草酸钙簇晶 | 11. 草酸钙方晶 | 12. 绿色组织厚角组织 |

五、测微尺和描绘仪的使用

(一) 测微尺的使用

1. 镜台测微尺是一种特制的玻片，中央有一个刻度的标尺，全长为 1mm,共分 100 小格,每小格长 0.01mm,即 $10\mu\text{m}$ 。

2. 目镜测微尺是放在目镜内的一种标尺，为一块圆形的玻璃片，直径 20~21mm,上部刻有不同形式的标尺。有直线式和网格式两种，测量长度一般用直线式，共长 10mm,分成 10 大格，每大格又分成 10 小格，共 100 小格。网格式测微尺用于计算数目和测量面积。

3. 细胞及细胞内含物等的测量先将目镜测微尺装入目镜内的铁圈内，用镜台测微尺标化。标化时转动目镜，移动镜台测微尺使两种量尺的刻度平行，并使它们的一端重合，再找出另一端的重合刻度，分别记录目镜测微尺和镜台测微尺每小格在该物镜条件下所相当的大小 (μm)，如用 $5\times$ 目镜和 $40\times$ 物镜，测得目镜测微尺的 100 格，等于镜台测微尺的 50 小格，即目镜测微尺在这一组合中每格实际长度为 $5\mu\text{m}$ 测量时，以目镜测微尺测量被检物的小格数，乘以每小格的大小即得。如果用不同倍数的目镜，必须重新标化和计算。

(二) 阿培式描绘器的构造和使用

1. 构造阿培式描绘器由接座部件与描绘器主体两大部分组成。接座部件由接座主体、滚花高头螺钉、锁紧螺钉等组成。描绘器主体由直角棱镜部件、转动杆、偏振组件、接管部件、支承柱、球形罩部件、锁紧小头螺钉、分光棱镜部件、检偏镜座等组成。

2. 使用方法

(1) 在显微镜上调节出所需绘图的标本图像。

(2) 将目镜从镜筒上取出，并将描绘器接座部件安在目镜筒上，插上取出的目镜，将描绘器主体与接座部件连结，用锁紧螺钉锁紧，然后调节接座部件位置，一般使目镜端面与直角棱镜部件内的直角棱镜面靠近为好，最后用螺钉拧紧。

(3) 在球形罩观察窗处观察所需描绘的图像，当在视场内能同时看到图像和画笔时即可进行描绘工作。如果图像处的光能量小于画笔处的光能量，会产生只看到画笔，看不清图像和现象。此时可旋转检偏镜座，使其两路光来的光能量大致相等，能同时看到图像和画笔。相反则将偏振光部件插入接管部件，并旋转转动杆，以达到能同时看清图像和画笔的目的。

六、细胞壁及后含物的显微化学鉴别法

细胞壁和细胞内含物的性质不完全一致，可用化学试液进行检定，以利中药的鉴别。

(一) 细胞壁性质的检定

1. 木栓化或角质化细胞壁多存在于植物体的体表，如木栓层、表皮或表皮内方的数列细胞,加苏丹 III 试液,稍置或微热,显橘红色至红色。

2. 木质化细胞壁多为厚壁组织如石细胞或纤维，木质部的输导组织如导管或管胞，

有的射线细胞或输导组织以外的细胞也木化。加间苯三酚试液 1~2 滴,稍置再滴加盐酸 1 滴,因木化程度不同,显红色或紫红色。有时需稍加热,颜色才能显现。

3. 纤维素细胞壁为薄壁细胞或韧皮部输导组织的细胞壁。加氯化锌碘试液,或先加碘试液湿润后,稍放置,再加硫酸溶液(33→50)显蓝色或紫色。

4. 黏液化细胞壁多存在于表皮组织内。加钌红试液,显红色。

5. 硅质化细胞壁多存在于表皮组织内。加硫酸无变化。

(二) 细胞后含物性质的检定

1. 淀粉粒属碳水化合物。加碘试液显蓝色或紫色。如用甘油醋酸试液装片置偏光显微镜下观察,未糊化的淀粉粒显偏光现象,已糊化的淀粉粒无偏光现象。

2. 糊粉粒为贮藏蛋白质。加碘试液,显棕色或黄棕色。加硝酸汞试液,显砖红色。材料中如含有多量脂肪油,宜先用乙醚或石油醚脱脂后进行试验。

3. 脂肪油、挥发油或树脂加苏丹Ⅲ试液显橘红色、红色或紫红色。加 90% 乙醇,脂肪油不溶解(蓖麻油和巴豆油例外),挥发油则溶解。

4. 菊糖多溶于水,观察时宜用 70% 乙醇或水合氯醛试液冷处理材料后,方可析出菊糖结晶。加 10% α -萘酚乙醇溶液,再加硫酸,显紫红色并很快溶解。

5. 液加钌红试液,显红色。

6. 草酸钙结晶 加稀醋酸不溶解,加稀 HCl 溶解而无气泡发生。加硫酸溶液(1→2),逐渐溶解,片刻后,析出针状硫酸钙结晶。

7. 碳酸钙结晶(钟乳体)加稀盐酸溶解,同时有气泡发生。

8. 硅质加硫酸不溶解,加氢氟酸则溶解,使用氢氟酸时,应注意保护物镜。

七、显微摄影技术

利用显微照相装置拍摄显微镜视野中可观察到的显微特征,作为资料记录,必要时可放大成照片或制成幻灯片用作分析研究和科技交流,这种技术称为显微摄影技术(microphotography),也称为显微照相技术。在中药鉴定工作中或科研工作中,常以拍摄照片图像来阐明中药的形态、组织学特征或粉末特征,这是中药专业学生必须了解的一项基本知识。

(一) 显微摄影的原理

显微摄影的原理和普通照相术相同,通过透镜将标本的影像投影在感光材料上,再用适当的方法使影像固定下来。

(二) 显微摄影的过程

显微摄影包括镜检、拍摄(运用镜箱或照相机将显微镜中的标本像摄在感光材料上)、显影(将潜影转变成可见显像,即负片操作),印放(将负片上的影像印在感光材料上,即正片操作)。本节主要介绍拍摄部分的内容。

(三) 显微摄影装置

显微摄影设备常分为无测光装置和有测光装置两类。无测光装置的显微摄影,曝光速度全凭经验掌握,操作者常需要以不同的光强与曝光时间的搭配进行试拍来选择最佳曝光条件,也可以按照每张底片拍一种时间,然后进行冲洗底片,选择其中最适曝光时间为标准。

摄影的方法与普通照相基本相同。有测光装置的显微摄影，又分为全自动和半自动测光两种。显微摄影装置由下面两个部分构成。

1. 显微镜摄影用显微镜应是比较好的显微镜，其物镜最好是复消色差物镜（由几组透镜构成的物镜，既能消除色像差，又能消除球面像差的，称为复消色差物镜）。显微摄影的景深（当用物镜在被摄物体某一平面上对焦时，在这一位置以上和以下的范围以内有一定的宽容度在这一特定范围内的所有邻近平面的焦点都清楚，这些平面所包括的深度就代表调速装置的景深）与物镜的像距有关。对于数值孔径相同的物镜来说，景深随像距的平方减小。显微镜的照明也很重要，最好用自带光源的显微镜，光源稳定而强烈，光谱连续。为了增加影像的反差，提高清晰度，显微摄影中还利用各种颜色的滤光片（见附注）。

2. 镜箱或照相机 一般镜箱的主要组成部分为：①照相机的箱身，是一个不透光的盒子，内装感光胶片。②镜头构成光学影像的装置，由一组透镜组成。③快门是控制曝光时间的装置。④调整像清晰度的机件。⑤取景器，为描准被摄物像的装置。

（四）显微摄影装置的使用步骤

1. 无测光装置的显微摄影（135 照相显微摄影）步骤

（1）选用质量较好的并自带光源的显微镜，放置到稳固的实验台上，防止震动。

（2）接通电源，并调整光源照明，使各部分光在视野内明亮，均匀一致。

（3）将显微镜上弯筒目镜筒取下，换装上直筒摄影接筒，并装上摄影目镜。

（4）取下 135DF 相机镜头，将照相机身装在摄影接筒上。

（5）在照相机快门按钮处装上快门线（或不安装快门线），再将摄影接筒上的快门线推进钮锁紧（用末端螺丝旋紧），这时摄影接筒的快门全开启让光线通过，从照相机上速度盘进行曝光控制。

（6）将欲摄影的切片置载物台上夹好，找好要拍摄的显微特征，从摄影目镜中观察，并调节显微镜粗细螺旋，将欲拍摄的显微特征调节至清晰。注意，先由低倍物镜后高倍物镜的顺序，使物象位于视野中心的十字线范围。

（7）升降聚光器，进一步调节光源，以获得最佳照明条件及较高的分解率和反差。一般利用低倍镜时可稍下些，使用高倍镜时，聚光器要上升，距载物台约 0.5cm 或更短些均可。如果光源是外来光源，反光镜要用平面镜。

（8）根据标本染色情况和要突出的部位选择合适的滤色片。滤色片置光源与聚光器之间的滤片环上。在使用 4× 物镜拍摄时，除加毛玻璃外，还需揭去聚光器上盖，以便光源均匀分布。

（9）将反光镜拉出。

（10）选定调速盘，决定曝光时间。照相机上的刻度有“T”，为使用 1min 以上的长时间者，开后不会自闭，到时须把它关上。“B”为使用 1min 以下者，开了以后到时将手一放，快门自闭。其他还有 2s, 1s, 1/2s, 1/3s，这些开了到时即会自动关闭。拍摄时，可通过对标本进行试拍，以确定合适的曝光时间。

（11）旋转卷片扳手到位（切不可扳一部分下来）。

（12）按下快门，依所需时间曝光，注意避免整个装置有任何振动。

（13）每拍摄一张，要同时记录所拍标本内容及所用条件。