## 第2章　植物制片的原理

观察植物细胞和组织的显微结构，必须将其切成或涂成薄片，并经染色等过程，使之能够在显微镜下观察、研究。目前植物制片的方法很多，但其基本原理和步骤则是一致的，即选材→杀死与固定→切成薄片或涂成薄片→洗涤与脱水→透明→渗透与包埋→切片与粘片→染色→封固。上述各步骤是连续的过程，彼此间互相制约和影响。因此，在制片过程中要重视每一步骤的操作。

### 2.1　选　材

#### 2.1.1　材料的选择

实验材料的选取是植物制片的第一步，也是关键的一步。

材料的选择根据制片的目的决定，在取材前必须对材料的特性、研究目的进行掌握。根据目的，按植物的生长特性及生长发育阶段的特性定期取样，如花芽发育、幼穗分化观察需根据实验材料生育特征在不同生育时期定期、连续取样；选择有代表性的材料（除病理取样外，一般要求新鲜、健壮、正常），能代表某一类的植物或器官、组织的结构；取样环境条件一致且具有典型性。如进行染色体观察时，根尖生长至1～2cm时较适宜，幼芽在春夏季嫩芽萌动时取样，花药必须在花芽幼小花蕾形成时期取样。

#### 2.1.2　材料的切取

植物的根、茎、叶、花、果等不同组织器官制片，在不同的切面细胞形状、排列、结构均存在着差异，在制片时，必须准确切取观察部位。在取材时，材料要冲洗干净，并在切割过程中保持湿润（如可用毛笔等蘸水湿润），切割时均匀用力，避免拉切造成组织损伤。

##### 2.1.2.1　根、茎切取

对于根、茎的切取，要根据观察内容确定横切或纵切。在进行根、茎形态结构（初生结构、次生结构）、发育特性观察时，根据观察结构选择适当的切面进行制片，防止制片后观察不到预定结构或观察效果差，而且根、茎材料一般需要切成三个切面进行观察，才能全面地了解到它的立体结构而取得完整的概念。根、茎的横切面直径5mm以内的，可切取5～10mm长小段；横切面直径大于5mm的，可纵向分割成3～5mm长小块；滑走切片机切片可分割成2～4cm长（图2-1）。



图 2-1　植物材料切割（改自李和平，2009）

（1）横切　切面与根或茎轴垂直，形成根、茎的横切（断）面。从材料横切面可观察到材料由外向内的各种组织，这些组织围绕共同的中心点作规则的排列，各种组织的位置、厚度、宽度等都可以从这种切面上辨别出来。在进行根、茎初生结构、次生结构研究时，可采用横切，可区分周皮、皮层、韧皮部、木质部、髓、中柱等结构的细胞大小、排列以及各组织层次厚度等。

（2）纵切　以刀平行根或茎轴直切材料，成纵切面，这种切面又可分为径向切面和切向切面两种。

① 径向切面　也叫半径切面，是以刀通过茎或根的中心点与其半径吻合的切面。这种切面可以观察到各种组织纵向排列的情况。

② 切向切面　切向切面也叫切线切面，是以刀沿茎或根的圆周切线面，与半径成直角的切面。

##### 2.1.2.2　叶片的切取

叶片取材时必须分割成适宜大小（一般2～5mm小块，叶较宽可切成10mm的长条）。叶面分割的部位，以研究者的目的灵活选取。依据叶片的形状、大小不同，其切割的方法也不一样。

（1）窄而长的叶片，如小麦、水稻等禾本科植物以及某些双子叶植物窄长的叶片，叶的宽度5～10mm，可用刀横切成长2～4mm小段。

（2）大而宽的叶片，如棉花、大豆等的叶片，切取前应先选定所要观察的适当部分，根据是否切取中脉或侧脉部分，再进行切取。一般切取5～6mm宽、8～10mm长。

##### 2.1.2.3　植物花切割

花药和雌蕊切割时，于中下部横切成小段；花芽和幼穗剥去外部鳞片及叶鞘和其它部分；花序则需去掉外层苞片；较小的花果可直接取材制片。

##### 2.1.2.4　染色体观察材料切割

① 根尖切取　种子材料萌发根尖生长至1～2cm时取样。例如洋葱鳞茎基部触水、室温下24h即可生根，待根长至1.5～2cm时，切取根尖端约8mm进行处理。

② 幼芽切取　春夏季嫩芽刚萌动时，剥去外部鳞片，切取该外部鳞片上的生长点，用于检查染色体形态特征或做染色体组型分析。

③ 花药取样　花在花芽幼小花蕾形成时期切下，剥去包被组织即可。

### 2.2　杀死、固定与保存

#### 2.2.1　杀死、固定与保存概述

材料从植物体切下后，离开原来环境，其构造和生理状态就会改变，如组织结构发生萎缩、死亡或分解等，制成标本就不能与实际生活状态相一致，所以取得的材料除供新鲜解剖观察外，需要快速杀死、固定，使其最大限度保持生活时的自然状态。

杀死和固定不仅要保存材料原来的生活状态，而且关系到后期处理、制片过程。材料经过固定后，很可能在后续的洗涤、染色、脱水、透明等处理中发生改变，或阻碍后处理的进行而达不到要求。例如苦味酸固定的材料不能用流水冲洗、乙醇或乙酸固定材料妨碍苏丹Ⅲ染色。

杀死，就是用一种或多种化学药品，迅速而永久地终结植物或动物某种组织的生命活动，并使其保持生活时的结构、状态。杀死越快，原先结构变化越少。应尽量选择渗透力强的化学杀死剂（在较短的时间内迅速渗入材料组织的每一个细胞而将其杀死）。

固定，即在杀死的基础上，把某器官的组织或细胞，按其生活状态结构固定下来，使观察的部位尽可能保持其生前的正常状态，在以后制片的任何过程中都不会发生改变。

保存，在材料经杀死、固定处理后，将细胞或组织的结构在较长的时间内保存下来，不致发生溶解或其它变化。常用的固定剂有的能兼作保存剂（液），如乙醇、乙酸及甲醛等固定液。在这些溶液中材料可长期保存，达几年或更长的时间而不会变坏。有的固定剂如铬酸类固定剂，不能兼作保存液，在固定达到一定时间后，必须加以更换，否则会使材料变坏。通常是用70%乙醇作为长期保存液。

#### 2.2.2　固定的基本原理

##### 2.2.2.1　固定的原理

（1）化学作用　即凝结作用，如细胞内的蛋白质，遇到乙醇后即凝结成块而不再溶解变化。

（2）物理作用　即沉淀作用，油类和脂肪等遇到锇酸即产生稳固的黑色沉淀。但必须注意有些沉淀在条件略有改变后又能溶解于水，这就起不到固定作用，因而不能看作固定。

##### 2.2.2.2　固定的目的

根据制片的要求，固定的目的可归纳为下列四点：①迅速杀死原生质，防止细胞和组织离体自溶等变化，保持原先成分和结构，使细胞或组织不易损坏，并显示其原来的细微结构；②增加细胞结构及内含物的折光程度，使各部结构更为清晰，适于显微镜观察；③使组织中某些部分凝固，使材料适当地硬化，便于切片，并保证在以后的冲洗、脱水、透明等过程中不致溶解；④促进植物组织对于某些染色剂的着色，通过固定剂和染色剂的恰当配合，可达到良好的效果。

##### 2.2.2.3　理想的杀死剂、固定剂的特点

① 渗透力强，能迅速地渗透到植物组织或细胞的各个部分，立刻杀死原生质，并固定其细微的结构，使其不发生变化。

② 使组织或细胞不发生收缩或膨胀现象。

③ 能增强染色能力或媒染作用。

④ 固定剂又同时必须是良好的保存剂，材料经过固定后经久不变坏。

⑤ 使组织变硬，并具有一定的坚韧性，适于切片，但又不能使材料过于坚硬，变得松脆而不利于切片。

要达到上述要求的条件，单一的化学试剂处理，显然是难以实现的。有的试剂如95%乙醇渗透力很强，渗透速度可达1mm/h，但它易使原生质收缩，而乙酸的作用则相反，能使原生质膨胀。若两种药剂混合使用，则可取长补短抵消缺点。所以通常采用的固定剂都是由两种或两种以上的化学药品配合而成，叫作混合固定剂，以达到互相制约的目的。

目前所用的混合固定剂种类虽然很多，但尚没有一种可以统一适合于各种植物组织的固定剂，因为不同的植物组织，结构及理化特性都不相同，就是同一器官或组织其幼年和老年的结构和特性也不相同。因此，在选择固定剂时，须根据植物的种类、不同的器官、年龄、结构、特性及实验者的经验等决定。

##### 2.2.2.4　固定形象

（1）酸性固定形象　在酸性固定剂中产生的形象，可以使染色体、核仁及纺锤丝保存下来，细胞质固定成索状，核质和线粒体则被溶解。

（2）碱性固定形象　即在碱性固定剂中产生的形象，作用与酸性作用相反，可使分裂间期的染色质和纺锤丝溶解，而保存核质和线粒体，细胞质固定成透明质，而且一般液泡也可以保存下来。

通常使用的固定剂，差不多都能产生酸性固定形象，而只有少数固定剂产生碱性固定形象。固定形象的产生与材料的种类有关。某些材料用酸性固定剂固定后偶尔也会残留线粒体；还与所用的脱水剂及透明剂有连带关系，如使用波茵（Bouin’s）液固定、无水乙醇脱水、二甲苯透明所得结果与用叔丁醇脱水不同。

有的固定剂可以产生两种形象，如重铬酸钾在pH=4.8时，同时可以保存染色质和线粒体。固定剂中若含有两种以上化学药品，固定产生的形象，主要决定于此种混合液中渗透力最强的一种。各试剂的渗透快慢，除与本身性质有关外，也受浓度影响。

在切片制作中，酸性固定剂比碱性固定剂应用更为普遍。常用的多半是酸性固定剂，碱性固定剂仅适用于研究细胞内含物如线粒体等。

#### 2.2.3　常用的固定剂

##### 2.2.3.1　单纯固定剂

（1）乙醇（Ethanol，C2H6O）　最常用的固定剂，依其水分含量可分两种：

① 无水乙醇　标准浓度为100%，是一种重要的杀死固定剂，当材料需要立即杀死与固定时，无水乙醇比较合适，缺点是易使组织收缩变硬，故不常用。应用时固定时间短，一般不超过1h，例如小型的菌类仅需1min，洋葱根尖、百合花药等固定15～30min。用无水乙醇不但可以杀死、固定，而且还有脱水作用。固定后，只需两三次更换无水乙醇，组织即可彻底脱水。

② 95%乙醇　标准浓度为95%～96%的乙醇水溶液，是常用的杀死剂与固定剂，也可兼当短期保存剂。材料经固定后，不必进行洗涤或换液即可进行后续脱水，所以经常使用。缺点是能使原生质收缩，而细胞壁仍能保持原来形状，适用于制作无须保存细胞内含物的切片。使用95%乙醇固定时间以15～30min为宜，较大的材料固定1～2h即可。若时间过长，则材料变脆易折断，难以切片。如要长时间在乙醇中保存，必须加等量的甘油配成乙醇甘油混合液使用。材料经杀死固定后，常用70%乙醇作保存液。

乙醇常与其它药品配合使用，但它本身是一种还原剂，很容易氧化成为乙醛，甚至乙酸，不宜与铬酸、重铬酸钾或锇酸等氧化剂配合，但可与甲醛、冰乙酸或丙酸等配合使用，效果良好。

乙醇可使植物组织中不溶性蛋白质沉淀，使可溶性核酸沉淀。此外乙醇会使脂肪、磷脂等溶解，不宜用于其材料的固定。

（2）甲醛（Formaldehyde，HCHO）　又称蚁醛，纯品是一种气体。常用的是溶于水中的无色溶液，即常说的福尔马林，浓度通常在30%～40%，最高的饱和度一般为40%。制片过程中通常就以化学纯规格40%浓度作为100%的浓度来配制固定液。一般商用的甲醛含有杂质，不宜作为切片用的固定液。

甲醛可单独作为固定剂或杀死剂，对部分材料效果较好，但容易使部分材料收缩，而使另一些材料膨胀或出现空胞等现象，所以最好是与其它药剂混合使用，以获得好的效果。单独使用甲醛作为固定剂，浓度一般为5%～10%。甲醛是很好的硬化剂，但渗透速度较慢；单独使用时，可产生碱性固定形象；它不能沉淀蛋白质；甲醛本身使材料硬化，但可以避免用乙醇造成材料过度坚硬的缺点；甲醛对于脂肪既不保存也不破坏，对于磷脂则有保存的作用。

甲醛是一种强的还原剂，易氧化成甲酸（Formic acid），故不能与铬酸或锇酸等混合使用。

甲醛自溶液挥发能刺激眼睛、鼻腔黏膜，对皮肤有伤害，使用时应注意防护，尽量避免产生危害。

（3）冰乙酸（Glacial acetic acid，CH3COOH）　纯乙酸在低温的时候，能凝结成冰花状结晶，所以叫冰乙酸（或冰醋酸），它是带有强烈刺激性的无色液体，通常以1%～5%的溶液作为固定剂。冰乙酸渗透力很强，而且速度很快，同时能溶解脂肪，产生酸性的固定形象。它可防腐、保存蛋白质等，避免变质，另外它也是染色体很好的保存剂。

冰乙酸能使细胞发生膨胀和防止收缩，可利用它与甲醛、铬酸等容易引起收缩的液体混合使用，起调节平衡的作用。常与其它药剂混合配制成混合液，而作为其中一个主要成分，并不单独使用。

（4）铬酸（Chromic acid，H2CrO4）　铬酸为三氧化铬（CrO3）的水溶液。三氧化铬是一种红棕色结晶体，容易吸潮，盛放的容器必须严格密封，是一种强的氧化剂，遇乙醇很快还原为三氧化二铬而失去其固定作用。因此不能预先与乙醇或甲醛等还原剂配制，在混合配好后必须立即使用，否则失效。

铬酸是一种很好的固定剂和保存剂，可以使蛋白质、核蛋白、核酸等产生良好沉淀，产生的沉淀物不再溶解。对于脂肪及磷脂等不起作用。通过铬酸固定的组织，不能直接暴露在强光下，否则已固定的蛋白质会分解。

铬酸是一种十分优良的杀死剂与固定剂，尤其是研究细胞学必不可少的药剂，也是许多混合杀死剂与固定剂的基本成分。它渗透力强，且能使组织过度硬化，所以常与作用相反的其它药剂混合使用，获得极好效果；缺点是容易使组织收缩。

铬酸的饱和度可达62%，通常配成2%～10%的水溶液作为基液，使用时再进行稀释。一般用0.5%～1%的水溶液作为固定液，铬酸液固定时用量要充足，固定后要用流水彻底洗净。

铬酸固定过度，材料会出现黄棕色，有碍于染色。为此，常将切片浸入1%高锰酸钾水溶液中进行漂白，约1min即可。再用水洗净，然后浸入5%草酸中约1min后再用水洗净，再进行染色。

（5）苦味酸［Picric acid，C6H2（NO2）3OH］　苦味酸即三硝基苯酚，是一种黄色而带光泽的结晶体，有苦味，高毒，高热、震动、撞击、摩擦等可使之爆炸，需要密封保存。难溶于冷水，较易溶于热水，溶于乙醇、乙醚、苯和氯仿。通常用饱和水溶液作为固定剂。



苦味酸的渗透力很强，能使组织发生强烈收缩，使蛋白质、核酸沉淀，并可防止过度硬化，还可增进后续的染色能力（尤其对核着色鲜丽，在细胞学的研究中经常应用）。常与甲醛、冰乙酸以及其它溶液混合使用。使用苦味酸固定的材料必须用50%或70%乙醇而不能用水洗涤，否则沉淀物将会被破坏。固定后再在乙醇中放置一昼夜，然后更换乙醇4～5次，以便充分洗净（组织中存留有黄色，并不妨碍染色；若要洗涤干净，可在乙醇中加少许碳酸锂）。

使用时，一般预先配成饱和水溶液放置备用（饱和度约1.25%，一般在100mL水溶液中加入2～3g，充分搅拌后静置澄清备用）。

（6）锇酸（Osmic acid，OsO4）　锇酸即四氧化锇，一种针状白色结晶体，挥发性极强，具有特殊的臭味。价格昂贵，通常是将0.5g或1g的结晶封装在安瓿瓶内，配制溶液时连同安瓿瓶在容器中击碎。一般是配成2%的母液备用，其饱和度可达6%。配制一般使用超纯水，因即使少许杂质也会使锇酸还原成为黑色而失效。锇酸是强烈的氧化剂，不能和乙醇、甲醛等混合使用。

锇酸溶解较慢，24h以上才能全部溶解。它的水溶液为淡黄色透明液体，贮藏时必须密封、避光、低温保存。一般可将锇酸溶于1%的铬酸溶液中配成1%的溶液，比较稳定、不易变质，并且对于后一步的混合配制亦较方便。

锇酸是目前植物切片特别是细胞学方面较好的固定剂，可以将细胞中的微小结构完好固定，对脂肪性物质固定效果也很好。因此，在线粒体的研究中常用此液固定。样品经此液固定后，还能防止用乙醇脱水时所产生的沉淀作用。

锇酸的渗透力很弱，且固定不易均匀，容易导致材料外边过度固定、内部固定不完全，所以材料切割得越小越好。固定完全后材料呈现棕黑色。

材料在固定以后、脱水之前，必须在流水中彻底洗涤（一般要一昼夜），染色前可用H2O2漂白（用1份H2O2加10份70%～80%的乙醇）以免影响染色。

（7）重铬酸钾（Potassium dichromate，K2Cr2O7）　重铬酸钾是一种橙色的结晶粉末，它在水中的溶解度大约为9%，用作固定液的浓度为1%～3%。它的水溶液带酸性，是一种强烈的氧化剂，不能与乙醇、甲醛等事先混合。它又是一种强烈的硬化剂，但它的渗透力较弱，被固定的材料以小为宜。

重铬酸钾常与其它药品配合作固定液用，很少单独使用。和其它药剂混合使用时，配制后的酸碱性不同，对于组织的固定可产生两种完全不同的固定效果。当混合液pH<4时，固定性能类似铬酸，可以固定染色体，但不能固定细胞质中的线粒体，细胞质及染色质则沉淀为网状；如果pH>5.2，染色体被溶去、染色质的网状不明显，但细胞质保持均匀一致，尤其对线粒体的固定有很好的效果。

（8）氯化汞（Mercuric chloride，HgCl2）　氯化汞又名升汞，是一种剧毒的无色粉末，常与乙酸等混合使用，杀死力强、渗透迅速，对于蛋白质有强烈沉淀作用；但是容易引起细胞收缩。

氯化汞易结晶留存于组织中，经氯化汞固定的材料必须彻底洗净。一般用氯化汞饱和水溶液作固定剂，也可用70%乙醇配制溶液。使用水溶液，要用水冲洗干净；乙醇溶液则要用同浓度的乙醇冲洗，或加少量碘液以洗净汞盐（最后用0.2%的硫代硫酸钠将碘洗去，并用水或乙醇洗净）。材料固定后，要迅速包埋，防止材料破坏。另外，氯化汞固定液不宜在细胞学的研究中使用。

（9）碘（Iodine，I2）　稀释的碘和碘化钾的饱和水溶液是低等单细胞生物、群体生物以及藻类等的一种良好固定剂。它的渗透力很强，如与冰乙酸或甲醛液配合使用效果更好。固定后，材料需用水冲洗干净，也可在水中加入0.5%的鞣酸水溶液清洗淀粉核等不易洗净的染色物质。

（10）戊二醛（Glutaraldehyde）　Sabattim、Bensch和Barrnett首先采用戊二醛作为固定液，现广泛使用。戊二醛与蛋白质、核酸形成交联，并能保存多种化合物和某些酶的活性，完成固定过程。既可单独使用又可与其它醛类如甲醛、丙烯醛混合使用。

一般商品戊二醛为8%、25%、70%的水溶液，pH4～5。高浓度、高温、中性或碱性等因素均导致戊二醛自行聚合而失去固定能力，因此应存放于棕色瓶内，在低、中等酸度和低温下保存。若戊二醛含有微量戊二酸或其它杂质，使用前可用活性炭提纯，即向100mL商品戊二醛中加入10g活性炭，在4℃下振摇，然后静置1h，过滤，重复上述操作1～2次；或取100mL商品戊二醛，加入2g活性炭，连续振摇5～10min，过滤，收集清液备用。

可以使用0.5%～12%戊二醛作为固定液，一般使用1%～5%。配制时使用除巴比妥-乙酸外的任何缓冲液均可。

配制后固定液pH=6.8，盛于带磨口的细口棕色瓶中，置4℃下保存。使用时如发现沉淀或霉变应重新配制。

固定在室温下进行，以1～3h为好，如在0～4℃进行，可延长固定时间10～24h。

##### 2.2.3.2　混合固定剂

单一固定剂各有优缺点，通常需配成混合液使用，以获得平衡调节效果。在混合使用时，要根据各药剂特性，平衡匹配，如易使细胞质收缩的药剂与能使细胞质膨胀的药剂配用，强氧化剂不能与强还原剂同时并用。

（1）甲醛-乙酸-乙醇（F.A.A.）固定液　通常称为F.A.A.固定液，是植物制片中最常用的一种良好固定液和保存液。一般植物器官和组织均可用此液来固定，而且都可得到较好效果；材料固定后，不需更换保存液即可长期保存，经久不坏，因此又称为“标准固定液”或“万能固定液”。但此液中含有乙醇，对于细胞学的制片和单细胞生物、丝状藻类以及菌类的固定则不如其它专用的固定液，又由于含有易挥发的有毒物质甲醛，使用时应注意。

固定液中冰乙酸及甲醛的比例，可根据样品材料特性而相应改变，如发现原生质有收缩现象则增加乙酸、减少甲醛（冰乙酸可使原生质发生膨胀，抵消由乙醇或甲醛造成的收缩）。一般说来容易引起收缩的材料则宜多加冰乙酸、减少甲醛；固定坚硬的材料则略减少冰乙酸而增加甲醛。

乙醇的浓度，通常应用的原则是，固定柔弱幼嫩的材料用低度乙醇，即以50%为好，固定老龄的或较坚硬材料则以70%乙醇为佳。

材料在此种固定液中，通常固定24h即可进行脱水步骤（幼嫩材料12h，成熟材料24h，木材或高木质化材料5～7d）。同时它又是良好的保存液，材料在此液中长久放置也无妨碍，甚至保存数年仍可制作切片。如果在配方中加入5%的甘油，能防止蒸发及材料变硬，增进保存性能。经此液固定的材料，用50%或70%乙醇换洗两三次即可进行脱水。

在F.A.A.固定液中的冰乙酸，也可用丙酸代替，称F.P.A.。有时固定效果比F.A.A.还好（表2-1）。

（2）乙醇-甲醛固定液　此液可用于一般植物组织的固定，作用很好，配制方法简便，既经济又实用，尤其对于柱头中萌发的花粉管的固定可得良好的结果。固定后的材料可以立即用作观察，通常固定的时间为24h，也可以将材料浸放此液中长久保存（表2-2）。

表 2-1　F.A.A.固定液

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 项　目 | 乙醇 | 甲醛/mL | 冰乙酸/mL |
| 一般材料 | 70%，90mL | 5 | 5 |
| 胚胎材料 | 50%，87mL | 10 | 3 |

表 2-2　乙醇-甲醛固定液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项　目 | 70%乙醇/mL | 甲醛/mL |
| 一般配制 | 100 | 4～10 |
| Lynds Jones | 100 | 2 |
| Chamberlain | 100 | 10 |

（3）乙醇-乙酸固定液　主要成分是乙醇和冰乙酸，但有时还加入氯仿、氯化汞等药剂，常用的配方有Carnoy’s fluid（卡诺固定液）、Gilson’s fluid（吉尔森固定液）等。

卡诺固定液常用于植物组织、细胞的固定。材料在此液中可快速完成固定，如根尖只需15～20min、花药只需1h。固定时间不能太长，一般不超过24h为宜，否则材料受到破坏。固定作用完成后，需用无水乙醇洗涤2～3次至材料不含冰乙酸及氯仿气味，方可进行透明。材料在此液中固定后，如果不能及时进行下一步操作，必须更换保存液进行保存（表2-3）。

表 2-3　乙醇-乙酸固定液

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 无水乙醇/mL | 冰乙酸/mL | 氯仿/mL |
| 配方Ⅰ | 75 | 25 |  |
| 配方Ⅱ | 60 | 10 | 30 |

一般情况下，可用修改后的卡诺固定液，即按照95%乙醇∶冰乙酸=3∶1的比例配制，可用于植物组织及细胞的固定，通常需要2～24h，固定的时间长短以材料的大小而定。固定后即用95%乙醇脱水，如用作细胞学上的涂片，则换至70%乙醇后进行后续操作。

吉尔森固定液常用于菌类，尤其柔软具多胶质菌类，固定时间为18～20h，固定后用50%或70%乙醇冲洗至无乙酸的气味即可。配制如下：60%乙醇50mL+冰乙酸2mL+蒸馏水40mL+80%硝酸7.5mL+氯化汞10g。

（4）铬酸-乙酸固定液　在植物组织与细胞研究显微技术中应用甚为广泛，除特殊要求都可获得较好效果（表2-4）。铬酸与乙酸的配比，要根据材料、经验进行调整。此液固定时要有足够的量，以不少于材料体积的25倍为宜，固定时间24～48h，材料在此液中可放置几天，但不能当作保存液长久放置；脱水前铬酸必须彻底洗除，否则染色困难颜色模糊。

表 2-4　铬酸-乙酸固定液

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 10%铬酸溶液/mL | 10%乙酸/mL | H2O/mL |
| 弱型 | 2.5 | 5 | 92.5 |
| 强型 | 10 | 10 | 80 |

铬酸易潮解，常配成不同浓度水溶液作为基液而随时应用。弱型铬酸-乙酸液常用于容易渗透的材料，如藻类、菌类以及苔藓、蕨类的原叶体、孢子囊等；强型铬酸-乙酸液对木质材料、坚韧的叶子等都较为适用，应用时加入2%的麦芽糖或5%皂素，以助于溶液的渗透。

（5）铬酸-乙酸-甲醛固定液（拉瓦兴固定液，Navaschin’s fluid）　此液对植物细胞学和胚胎学最适用，也是良好的固定液，尤其对于涂抹小孢子的材料，如花药以及根尖都很适合。固定液固定材料时，也可先用卡诺固定液固定5～10min，然后再换用此液，可对其它的水溶液不易渗透的外部密被绒毛的材料（如植物的幼芽、小麦的子房等）进行固定。本固定液1912年首创后不断改进，最常用的有冷多夫（Randoph）改良液与贝林（Balling）改良液（表2-5）。

表 2-5　铬酸-乙酸-甲醛固定液

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项　目 | 铬酸/g | 冰乙酸/mL | 甲醛/mL | H2O/mL | 皂素/g |
| 冷多夫改良液 | 甲液 | 1.5 | 10 |  | 90 |  |
| 乙液 |  |  | 40 | 60 |  |
| 贝林改良液 | 甲液 | 5 | 50 |  | 320 |  |
| 乙液 |  |  | 200 | 175 | 3 |

冷多夫改良液对于根尖、花药、子房等都有较好固定效果，尤其能将细胞有丝分裂时的染色体、纺锤丝等显示出来。甲、乙两液中的铬酸为强氧化剂，甲醛则为还原剂，不能预先混合配制，在用时才将甲、乙两液等量混合。材料在此液中固定12～48h，当固定液呈现绿色时，固定失去功能而仅有保存作用。固定后可用水或70%乙醇冲洗，然后进行脱水。

贝林改良液如果作固定细胞分裂的中期及后期的涂片，则应将乙液中的甲醛改为100mL，蒸馏水改为275mL，固定3h即足够。固定后，可将涂片移入0.5%铬酸水溶液中几分钟，除去甲醛，再进行染色。茎尖及根尖等材料，可长久保存于此液中，但固定两三天后铬酸被还原由棕色变为绿色，脱水前可用水冲洗干净。

（6）铬酸-乙酸-锇酸固定液　此液在植物制片中也常应用，由弗莱明（Fleming）首创，而称为弗莱明液，对一般材料固定都适合，能得到满意的效果，特别在细胞学的研究方面甚为重要。锇酸极易氧化，配制时要特别小心（表2-6）。

表 2-6　铬酸-乙酸-锇酸固定液单位：mL

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项　目 | 1%铬酸 | 1%乙酸 | 1%锇酸 | 2%锇酸 | H2O |
| 弱型 | 甲液 | 25 | 10 |  |  | 55 |
| 乙液 |  |  | 10 |  |  |
| 强型 | 甲液 | 45 | 3 |  |  | 40 |
| 乙液 |  |  |  | 12 |  |

此液目前有多种配法，普通常用的配合有如下两种方式：

① 应用锇酸的水溶液，在固定时以适当比例的铬酸及乙酸配合。

② 将2%锇酸溶液溶于2%的铬酸中，当需用时与乙酸配成适当比例应用。

两种溶液在用时才能混合，锇酸应装于棕色瓶内或用黑色纸包裹密封暗处存放。适用于细胞分裂与染色质、染色体及中心体等的固定，固定时间为24～48h，固定后用水冲洗。材料如变黑色，应在染色前用3%过氧化氢漂白2～4h或用1%铬酸漂白3h。

泰勒（Tayler）改变弗莱明液原配方，列出强、中、弱三种配合比例，适于固定植物各种组织（表2-7）。

强型适合于固定坚硬材料，弱型适于固定柔软细小材料。此液在应用时临时混合，不可事先配制，否则发生氧化还原而失去效能，固定时间为24～48h，此液不能作为保存液，制片前必须在流水中冲洗干净。

表 2-7　泰勒固定液单位：mL

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 10%铬酸 | 10%乙酸 | 2%锇酸的2%铬酸溶液 | H2O |
| 强 | 3.1 | 30 | 12 | 11 |
| 中 | 0.33 | 3 | 0.62 | 6.27 |
| 弱 | 1.5 | 1 | 5 | 96.5 |

（7）苦味酸混合固定液　此液最早由波茵（Bouin）配成，故通称波茵液，在动物制片中应用甚广，在植物制片中因易使材料变硬，造成切片困难。但对于植物胚囊及裸子植物雌雄配子体的自由核时期的固定效果很好。因此，在植物胚胎学研究中经常应用，目前植物制片技术上所采用的都是改良波茵液。1951年沙司（Sass）将爱伦-波茵式固定液综合成表2-8。

表 2-8　爱伦-波茵式固定液单位：mL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 药 剂 成 分 | 波茵式 | 爱伦-波茵式 |
| Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ |
| 1%铬酸 |  | 50 | 50 | 25 |
| 10%乙酸 |  | 20 |  | 40 |
| 冰乙酸 | 5 |  | 5 |  |
| 甲醛 | 25 | 10 | 10 | 10 |
| 饱和苦味酸（水溶液） | 75 | 20 | 35 | 25 |

此液含有氧化剂与还原剂，故不能事先配制贮存。通常是把乙酸和铬酸配成甲液，甲醛和饱和苦味酸配成乙液，用时混合。上述三式中以Ⅰ配方最为常用，适合固定幼嫩的组织，如根尖、胚胎等材料。固定时间为12～48h，固定后可用70%乙醇洗涤数次，然后脱水。

（8）重铬酸钾混合固定液　虽然配法种类很多，但在植物制片中应用较少，植物制片中最常用为里根（Regaud）液，即80mL的8%重铬酸钾+2mL甲醛，适于固定高等植物生长点，也多作为固定叶绿体的固定液。此液是氧化-还原性很强的药剂，应在固定时临时配制。固定12～24h，固定过程更换一次固定液，固定后须在流水中冲洗干净。

（9）氯化汞混合固定液　多用于藻类的固定，常用的配法为氯化汞4g+冰乙酸6mL+甲醛5mL+50%乙醇或水100mL。对于固定微小的藻类固定效果很好，如用甘油、甘油胶封藏，则用水溶液固定液；如做石蜡切片则用乙醇固定液。经过该固定液固定的小型藻类可显示出纤毛；也可以用于固定团藻属的材料。

（10）齐-欧氏液　重铬酸钾1.25g+重铬酸铵1.25g+硫酸铜1g+蒸馏水2L。用于固定线粒体，固定时间至少24h，固定后须用水冲洗干净。

（11）齐氏还原铬酸液　向没有还原作用的铬化物固定液中加入甲醛可使铬化物起到还原作用，而使药剂失去效用，所以常用一种已经还原的铬盐进行配制。配法为硫酸铬5g+氧化铜（稍过量）+甲醛10～15mL+蒸馏水50～90mL，使溶液总量应为100mL。

此液可用于固定线粒体和液泡，固定时间为48h，固定后须用水冲洗干净。

溶液中加入的氧化铜使混合液的pH值达到4.6；加入甲醛的量，主要决定于固定的材料种类与制片经验，一般甲醛的浓度过高致使质壁分离和液泡膨胀，太低则可导致混合液被材料组织液冲淡而难以得到正确的固定形象（表2-9）。

表 2-9　固定液对组织渗透速度参考表

|  |  |
| --- | --- |
| 固 定 液 | 单位时间内渗入距离/mm |
| 1h | 4h | 12h | 26h |
| F.A.A.液 | 2 | 3 | 6 | 8 |
| 弗莱明液 | 1 | 2 | 4.5 | 5 |
| 1%苦味酸 | 0.5 | 1 | 1.5 | 1.5 |
| 0.5%锇酸 | 0.25 | 0.72 | 1.0 | 1.0 |
| 1%铬酸 | 0.5 | 1.5 | 2.5 | 4.0 |
| 10%甲醛 | 0.5 | 2.0 | 2.5 | 5.0 |
| 70%乙醇 | 0.5 | 1.25 | 2.5 | 8.0 |
| 95%乙醇 | 1 | 1.75 | 3.5 | 8.0 |
| 5%乙酸 | 1 | 2.5 | 4.0 | 8.0 |

上述的固定液中，前九种混合固定液产生酸性形象，后两种产生碱性形象。

#### 2.2.4　固定操作注意事项

在了解上述有关杀死、固定以及固定剂的理论和应用范围后，为了在固定操作中使材料尽量维持原状，必须注意下列事项。

（1）取材要新鲜　固定材料的选择必须是具有代表性的新鲜样本，除病理取样外，选取无损伤、生长健壮的材料取样。若材料上有非观察对象如绒毛、鳞片时，须在固定前剥去。

（2）固定要迅速　材料迅速割取后，要立即投入固定液进行固定，尽可能保持原来的生活状态。

（3）大小要适宜　材料越小，固定液就越快渗透到组织内部各个部分，较快完成固定作用，材料的大小根据制片的目的与材料的性质，以取材1～5mm为宜，一般不超过10mm。

（4）固定要合理　不同组织和细胞的结构、成分，对于化学药剂反应不同，固定液的渗透力也因其性质、浓度和温度的变化而不同。因此，要根据研究对象和观察目的选用适宜的固定液。如观察幼嫩的组织（花粉粒、花药、子房、胚囊、根尖、茎尖等）一般以冷多夫改良拉瓦兴液为宜；若观察根、茎的一般组织结构时，可用F.A.A.固定液；而观察叶的结构则一般用铬酸-乙酸-甲醛固定液效果较好。

（5）时间要适宜　对不同材料，固定液完成固定的时间不同。固定时间过短不能起到固定作用，过长则会对材料造成破坏、影响染色等，固定时应加以注意。

（6）温度要合适　一般可在室温下固定，特殊材料需要在2～4℃冷固定以降低细胞的自溶作用和水分损失。温度也会影响固定时间，温度高，固定时间短；反之，固定时间则长。

（7）用量要充足　新鲜材料中一般都含有大量的水分，会稀释固定液。一般固定液用量应为所固定材料体积的20～50倍，用量过少会影响固定的效果。

（8）固定时抽气　植物材料常有绒毛、气体存在，使材料上浮而不能沉入固定液中，妨碍固定液的渗入。因此，固定时一般要预先抽气，排除材料组织、细胞间隙中的气体，保证固定液快速渗入组织和细胞。抽气时可适当振荡，促使气体排出，直到材料下沉为止。

① 注射器抽气　将材料连同固定液倒入20mL或50mL取下针头的注射器内，然后插入注射器手柄，轻轻推进，将管内空气排出。用左手的食指按住注射器前端小孔，右手徐徐拉出注射器手柄，这时可以看到，材料四周有气体冒出，如此重复推拉数次，材料开始下沉，表示空气已经排尽，完成抽气。此法最大优点是简便易行，无需其它设备。用力的大小，应根据材料的性质（含空气的多少）和大小酌情掌握，但用力不可过猛，否则材料会发生收缩现象。当使用具橡皮塞小瓶（如青霉素小瓶）固定时，可将注射器针头插入瓶内液体上方，缓慢外拉注射器手柄，将空气抽入注射器，此时，材料中气体不断被抽出，在固定液中形成连续小气泡。待小气泡逐渐减少、材料下沉后，将注射器拔出即可。若注射器较小或材料气体较多，可重复几次。

② 自来水抽气　在自来水龙头下方装一金属抽气管，用橡皮管及T形玻璃管连在一安全瓶的橡皮塞孔中，此橡皮塞的另一孔，也插入一支T形玻璃管，并用橡皮管与另一广口瓶橡皮塞上的T形玻璃管相连即成。抽气时将盛有固定液及材料的平底管放入广口瓶内，盖紧瓶塞，打开自来水龙头，此时材料中的气体即可排出。此法亦可根据材料的性质，利用自来水的流速控制抽气快慢，以避免材料的收缩（图2-2）。



图 2-2　抽气装置



图 2-3　电动抽气泵的抽气装置

1—材料放置处；2—水银柱；3—水银瓶；4—进气管；

5—氧化钙瓶；6—安全瓶；7—电动抽气泵

③ 电动抽气　将材料投入盛有固定液的平底管中，放入真空器内抽气。视材料的大小、性质决定抽气的时间，一般开动真空泵2～5min。如时间太久，会引起材料的收缩。抽气后取出平底管，盖紧瓶塞，保存材料（图2-3）。

### 2.3　洗　涤

#### 2.3.1　洗涤的作用

材料经固定后，在进行后续操作或保存以前，一般都要洗涤干净。所谓洗涤，即让洗涤剂渗透到材料组织中去，将固定液洗掉，以便进行切片染色或保存。

常用的洗涤剂是水或乙醇，根据配制固定液溶液的性质选择用哪一种，一般对水溶液的固定液用水洗；乙醇溶液固定液则用同浓度的乙醇洗。

① 用F.A.A.固定液固定的材料，用同浓度的乙醇更换两三次即可进行脱水，在脱水过程中还起逐渐洗涤的作用，不必经过特别冲洗。

② 拉瓦兴或其它弱酸类的固定液，固定后的材料应用水洗，换水漂洗或流水冲洗。

③ 用苦味酸或苦味酸类的混合液（苦味酸-甲醛液除外），在固定作用完成后，必须用高浓度乙醇（70%）冲洗，不可用水冲洗，因水能消除这种固定剂所起的作用。用苦味酸液固定的材料，不宜多洗，因组织易浸渍分散而影响效果。

④ 使用弗莱明或锇酸类的固定液，材料固定后，要用流水冲洗。

⑤ 使用氯化汞混合固定液固定后的材料，用水或低浓度乙醇洗涤均可。洗涤时，可略加碘液，以鉴别氯化汞是否清洗净，如已全部洗净，加入碘后在短时间内不会变色。

关于冲洗的时间，要根据固定液及材料的性质和大小而定，一般1～6h即可。

#### 2.3.2　洗涤的方法



 图 2-4　冲洗

洗涤时，又分漂洗与冲洗。

漂洗即将材料置于洗涤液中较长时间浸泡，其间每隔1～2h更换新的洗涤液。冲洗即用流动洗涤液慢速冲洗，一般用水洗。若需用流水冲洗，可将材料倒入广口瓶，用细纱布扎好，通入橡胶管，管一端接水龙头上，调节适当流水速度，徐徐地进行，水龙头切勿开得太猛，以免损坏材料；也可把材料置于一个两头相通的玻璃管内，两端管口用纱布扎好，然后放入烧杯或其它容器中，再用橡胶管（或玻璃漏斗）接上水龙头，使水徐徐流入烧杯内冲洗，此种方法不会损坏材料，比较稳妥（图2-4）。

### 2.4　脱水剂与脱水

#### 2.4.1　脱水

凡是制作永久切片，都必须用中性树胶等封固剂封存，大部分封固剂都不溶于水，而植物组织和固定液均含很多水分，所以在制片时都要进行材料脱水；在石蜡法制片或塑料包埋制片中，都要把材料包埋在石蜡或树脂塑料中，若材料含有水分，则无法完成渗透。所以在浸蜡或其它试剂渗透之前，也必须先把材料中的水分除尽。

脱水，就是用一种药剂把材料中的水分全部取代。脱水的作用有两点：一是使材料硬化，形状更加稳定；二是使材料中的水分除尽，保证包埋剂和封固剂能够渗透到组织中去。用作脱水剂的药剂，应具备两个特性：一是必须是亲水的，能与水以任何比例混合，以便代替细胞中的所有水分；二是必须能和其它有机溶剂互相混合、取代。

#### 2.4.2　常用的脱水剂

（1）乙醇（Ethyl alcohol）　乙醇是目前制片技术中最常用的一种脱水剂，但它并不是最理想的脱水剂，因为它容易引起组织、细胞收缩或使材料变硬不利于切片；石蜡制片在脱水后还必须再用其它有机溶剂除尽乙醇。但乙醇沿用已久，且操作方便，容易掌握，目前仍然普遍应用。

脱水的过程应从低浓度开始，逐渐增高浓度，开始时不能操之过急将材料置于高浓度乙醇中，否则会使细胞收缩或损坏材料。通常配成不同浓度的乙醇梯度，一般从30%乙醇开始经过50%乙醇→70%乙醇→80%乙醇→95%乙醇→无水乙醇，依次递增。材料在各级乙醇中所停留的时间，按性质及大小而定，一般体积在2～5mm3大小，各级停留1～2h。大的或较坚硬的材料，停留时间要延长些，否则不能渗到材料中央部分，影响脱水效果。操作时，低浓度乙醇可稍快些，到高浓度乙醇时则不能过快，无水乙醇要更换两次，才能脱尽水分。对已切成薄片的材料，则只需3～5min即可。细胞学研究用的材料，可从10%乙醇开始脱水。从95%乙醇转入无水乙醇后，放置的时间不能过长（否则材料会变硬脆，增加以后切片困难）。无水乙醇脱水后再逐步过渡到二甲苯进行后续透明。在二甲苯中如果出现乳白色混浊现象时，表示水分未彻底脱净，应再回到无水乙醇中，重新脱水。

另外，当材料脱水至95%乙醇时，在乙醇中可加入少许番红或曙红，将材料染上红色，使包埋在石蜡或其它包埋剂中的材料容易观察认识。

各级浓度乙醇应事先配好，以便随时取用，用过的高浓度乙醇（70%以上）可回收经蒸馏重新应用或用于酒精灯。

（2）氧化二乙烯（Dioxane）　可以与水、乙醇及油类混合。具有脱水和透明的双重作用，而且不会使组织发生硬化及收缩。脱水时只要经过30%→70%→90%→100%各级处理，即可进行浸蜡。但其密度较溶解的石蜡还高，所以在包埋前，必须用二甲苯或氯仿将药液除掉才能浸蜡。另外，此剂容易燃烧，用时要特别注意，而且其气体有毒，故不常用。

（3）正丁醇（*n*-butanol）　分子式为C4H10O，微溶于水，溶于乙醇、醚等多数有机溶剂。此剂可与石蜡互溶，但在一般应用上还未能完全代替乙醇。平常都是与乙醇配成一定的比例，作脱水之用，最后才经过纯正丁醇。经此液处理的材料可不必经过透明即可浸蜡。

（4）叔丁醇（Tert-butanol）　分子式为C4H10O，常温下为无色透明液体或固体（25℃下），具有樟脑香味，易溶于水、乙醇和乙醚，可单独或与乙醇混合使用，是目前应用较广的一种脱水剂。不会使组织收缩或变硬，也不必经过透明，并且比熔融的石蜡轻，包埋时很容易在组织中除去，可以简化脱水、透明等步骤，在一些制片过程中逐渐代替乙醇。在电子显微镜技术中常用此剂作为中间脱水剂。

（5）丙酮（Acetone）　也称作二甲基酮，饱和脂肪酮系列中最简单的酮。丙酮可以代替乙醇，脱水作用较快，不能直接溶解石蜡，仍需二甲苯或其它透明剂透明后才能进行浸蜡和包埋；但在电子显微镜技术上使用的包埋剂，一般溶于丙酮，就可用丙酮脱水、透明。

（6）甘油（Glycerol）　甘油也是一种良好的脱水剂，尤其对于细小柔软的材料，多用于藻类、菌类、苔类的原丝体、蕨类的原叶体等的脱水。用甘油脱水可以避免原生质收缩现象，但在使用前必须将材料中的固定液完全洗净，否则在包埋、染色时会发生困难。甘油脱水，可以从5%浓度开始，逐渐过渡到纯甘油。

（7）环己酮（Cyclohexanone）　密度与水相似，无毒，可与苯、二甲苯、氯仿等有机溶剂混合，也为石蜡溶剂。可代替无水乙醇脱水后直接入石蜡，组织不会变硬，不需再经二甲苯透明。

（8）松脂醇　为无色溶液或低熔点透明结晶，有花香，几乎不溶于水，但溶于醇和醚。材料经过固定、洗涤后经各级乙醇脱水至95%乙醇，然后浸入等份95%乙醇和松脂醇的混合液中，等组织块下沉后进行下列处理：95%乙醇1份加松脂醇2份的混合液中浸泡1h→95%乙醇1份加松脂醇3份的混合液中浸泡1h→松脂醇Ⅰ、Ⅱ中各浸泡1h→松脂醇5份加石蜡1份中浸泡1h，然后浸蜡包埋。经松脂醇处理的组织块收缩较少，发生硬化的现象也少。多用于乙醇及卡诺固定液固定的组织。

### 2.5　透明剂与透明

#### 2.5.1　透明的作用

材料经各级脱水剂脱水后，组织内部已没有水分，如果脱水剂（乙醇）不能与包埋剂（石蜡）相溶，则包埋剂不能进入细胞或组织，还要经过一种既能与脱水剂又能与包埋剂（石蜡）相混合的溶剂来处理，以便于包埋剂的渗入。由于这种溶剂能使材料清净透明，因此，这个步骤称为“透明”。在制片技术中，除了应用一些既能使材料脱水及清净透明，又能与包埋剂或封固剂相混合的脱水剂外（例如氧化二乙烯、正丁醇），一般应用乙醇脱水的制片，都要经过透明步骤。

透明的目的就是要使组织中的脱水剂（乙醇）等被透明剂所替代，以便渗透剂进入植物组织；使材料透明，能增强组织的折光系数；能与封藏剂混合，便于封藏。

#### 2.5.2　常用的透明剂

（1）二甲苯（Xylene）　无色透明有芳香味的液体，是苯环上两个氢被甲基取代的产物，沸点为137～140℃。二甲苯是目前应用最广的一种透明剂，作用迅速，能溶解石蜡、树胶（加拿大树胶、中性树胶等）。缺点是易使材料收缩变脆，使用时材料必须彻底脱尽水分，否则发生白色乳状浑浊。

为了避免材料发生收缩，采取了逐级过渡的办法，即逐步从无水乙醇过渡到二甲苯中。一般是从2/3无水乙醇+1/3二甲苯→1/2无水乙醇+1/2二甲苯→1/3无水乙醇+2/3二甲苯→二甲苯Ⅰ→二甲苯Ⅱ（注：二甲苯Ⅰ，指第1次用纯二甲苯；二甲苯Ⅱ，指第2次用纯二甲苯。全书的二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ都是指纯二甲苯，Ⅰ和Ⅱ表示用两次纯二甲苯。全书同）

纯二甲苯应更换两次，以除尽乙醇。在二甲苯中放置时间不宜过长，否则会使材料收缩或变硬脆，时间长短视材料的大小而定，一般1～3h（染色后的切片，只要2～5min）。

（2）氯仿（Chloroform，三氯甲烷）　过去火棉胶制片都采用氯仿作为透明剂，石蜡法也可应用。氯仿的挥发性能比二甲苯强，渗透力较弱，对材料的收缩作用也较小，因此，浸渍时间应延长。但氯仿能破坏染色效果，所以对于已经染色的切片禁用。

（3）甲苯（Toluene）　又称甲基苯、苯基甲烷，无色、带特殊芳香味、易挥发液体。甲苯属芳香族碳氢化合物，很多性质与苯很相像，具有类似苯的芳香气味，在现今实际应用中常常替代有毒性的苯作为有机溶剂使用，它的沸点（常压）为110.63℃，熔点为-94.99℃，凝固点为-95℃。性能与二甲苯相同，可作二甲苯的替代品。

（4）苯（Benzene）　无色至淡黄色的易挥发、非极性液体。具有高折射性和强烈芳香味，易燃，有毒，凝固点5.53℃，沸点80.1℃。苯的性能与二甲苯相似，亦可作为透明剂。

（5）丁香油（Clove oil）　丁香油为切片经染色后、树胶封固以前较好的透明剂。还可利用丁香油具有溶解某些染料的能力，将其配成各种染色剂进行染色，例如固绿、橘红G等可在丁香油中溶成饱和液，待染色脱水到最后一步时，可代替衬染、分色、透明三步，使效果更好。经丁香油透明后的制片，尚需经二甲苯将组织中的残油除净，否则染色的色彩不鲜明。另外丁香油蒸发慢，如不经二甲苯，即使制片放置很长时间，也不易干固。丁香油的价格甚贵，应用时往往采用滴染。滴染后余油可回收再用。

（6）香柏油（Cedar oil）　香柏油多用于油镜上，普通产品常混有杂质。此油可作透明剂，并且不易使材料收缩变硬，但作用很慢，很小的组织也需要12h以上，且不易为石蜡所代替。应用时应在无水乙醇后一级使用。它不易挥发，最后仍需经过一次二甲苯，以便除净香柏油，加速石蜡的渗透。

（7）冬青油（Wintergreen oil）　冬青油可作整体制片的透明剂，尤其对于显示植物维管系统效果很好，但此剂的渗透很慢，并有毒性，平时较少应用，而常用其它试剂代替。

（8）苯胺油（Aniline oil）　无色油状液体，暴露在空气或光下变成棕色，溶于醇及醚，微溶于水。有毒，使用时应小心，切勿接触皮肤。具有脱水、透明作用，在乙醇中容易变硬变脆的材料如纤维细胞多的植物组织，都可用苯胺油来透明。70%乙醇1份+苯胺油1份→85%乙醇1份+苯胺油2份→95%乙醇1份+苯胺油2份→纯苯胺油。每级处理时间为2～4h，在纯苯胺油中直到材料全部透明为止。在浸蜡之前，还需经过氯仿或甲苯换洗两次，时间比在纯苯胺油中透明的时间长30min。

### 2.6　制　片

详细介绍参见本书第2篇。

### 2.7　染色剂与染色

#### 2.7.1　染色的发现与染色原理

染色在显微技术上的应用，最早是列文虎克（Leeuwenhoek）发明的，他在1714年用显微镜观察母牛肌肉时，把透明度很大的切片经含有番红花的酒浸泡后再进行观察，结果很好，发现了染色在显微技术上的价值，而后染色技术逐渐被推广应用。

植物的组织或细胞含有大量的水分，活细胞一般含水量在70%～90%，如果不进行染色，细胞对光线的吸收和反射与所含水溶液差不多，折射率相近，透明度大，在显微镜下影像不清晰，难以分辨清楚。虽然在一定范围内，可因植物组织或细胞各部分折光不同而可在显微镜下观察，但局限性很大，一般只限于新鲜的材料或活体观察。倘若要做成永久切片，必须用封固剂，如用树胶封固；但树胶折射率与植物组织、细胞很接近，更难观察。为了使植物的组织或细胞各部分显像清楚，必须通过染色。运用不同的染色方法和选用不同的染色剂，使组织或细胞某一部分染上颜色，另一部分不染上颜色成为背景；或将不同部分染成不同颜色，可使组织或细胞在光学显微镜下显像清晰，便于观察研究。因此，植物制片的染色在植物学的教学与研究中占有十分重要的地位。但染色本身也有缺点，一般组织或细胞经染色后多是死的，在染色过程中细胞的形态与结构还会发生不同程度的变化，不能完全代表其生活细胞的真实状况。如果操作不当还会造成一些假象。

植物制片上的染色原理，大致与常规纺织品等的染色原理差不多，只是制片过程中所应用的范围较小，而且更加精密细致。

关于染色的原理，一般可以用物理或化学作用来解释，有时甚至需要应用两种作用原理说明。随着对染色技术的深入了解，生物组织染色过程的复杂性也越来越突出，很难用单纯的理论圆满解释这些复杂现象。目前比较统一地认为生物的细胞之所以能够染成各种颜色，是由物理与化学的综合作用所造成的。

（1）物理作用的解释　通常认为细胞的染色主要可以由于毛细现象、吸附作用和吸收作用三种物理作用，使细胞染上颜色。

① 毛细现象　即组织及细胞对染料的毛细现象，被染色的物质，一般都存在孔隙，染料可以通过毛细现象或渗透作用渗入组织的内部。

② 吸附作用　一种物质从它周围把另一种物质的分子、原子或离子集中在界面上的过程叫吸附作用（adsorption）。或者说，吸附是指物质在相界面上浓度自动发生变化的过程。由于吸附作用，各种组织具有特有的显色作用，不同组织只能选择吸附特定的染料而显示不同色泽。

③ 吸收作用　染料渗入细胞后，由于吸收作用而存留在细胞内形成一种“固溶体”。

染料一般是通过渗透进入组织里，所以用吸收作用来解释比较容易理解，如组织中被染的颜色，往往也就是染料溶液的原来颜色。吸附作用是一种分子较小的物质附着在另一种物质表面的过程。被吸附的物质，一般可以以分子形式存在于溶液里，随着分子结构的不同，各种物质之间吸附的差别很大，而且与体系的酸碱性（pH值）、温度及其它离子的存在有密切关系。

上述三种解释，虽可以说明染色上的一些问题，如组织或细胞中“分化染色”现象、媒染剂作用、染色溶液的浓度对染色速度的影响、酸碱度对酸性或碱性染料的影响等，但仅仅用物理作用解释，仍不全面，一些染料均匀地渗入细胞之后，有些部分很容易再离析出来，但是另一部分则不太容易，此种现象有时可以用化学吸附来解释。

（2）化学作用的解释　通过细胞学的研究知道组织或细胞中某些部分能进行酸性反应，而另一部分则能进行碱性反应。这样，酸性部分能够与所接触的溶液中的阳离子相结合，而碱性部分能够与阴离子结合。染料中之所以显现各种颜色，是由带有阳离子（碱性染料）或阴离子（酸性材料）等的不同染料所造成。这样组织或细胞中不同部分呈现的不同颜色，就可以通过与染料所起的不同的化学反应来解释。

化学作用的解释虽然说明染色上的一些问题，如媒染作用、分化染色等，但仍不很完善。组织染色究竟是化学作用还是物理作用，由于过程的复杂性，很难单独、圆满解释。实际上化学结合与吸附是可以同时发生、并不矛盾的。

物理吸附是由范德华力引起的，作用力弱、吸附为多分子层，无选择性，吸附热小，吸附速度快；化学吸附是由于形成化学键的结果，作用力强，单分子层吸附，有选择性，吸附热大，吸附速度慢。

#### 2.7.2　染色剂的概念与性质

##### 2.7.2.1　染色剂的概念

染色剂以及其与纺织所用染料的区别在于，染色剂也是染料，但其使用目的不同。染料在制造中通常分成两类：一类是供一般使用；另一类供生物方面使用。生物方面使用的染料，在制造过程中要求特别严格、精密与细致。再严格地说，生物学染色剂是指一些可供镜检（即显微镜下检查）用的染料，使实物在染色后清晰可见，习惯上仍通称染料。

##### 2.7.2.2　染色剂一般性质

植物学上用的染色剂一般都是含有苯环的有机化合物，由三部分组成：一是苯环，再就是连接在苯环上的发色团（使有机分子产生颜色的含有不饱和键的基团，又称色基团、色基）和助色团（或称作用基团）。苯环上若只连接有发色团时，这种化合物虽然能呈现颜色，但不能称为染料，因为它不能电离，因而不能成为盐类，水溶性很小，它与细胞的亲和力也很差，不能与细胞牢固地结合，覆盖在细胞上后，用机械的方法即可除去。苯环上若再连接助色团（能够使染料分子颜色加深，极性加大，并与被染物质分子间形成亲和力的基团）后，便具有了能够电离的性质，这样能与适当的物质结合成盐类，电离后带有正或负电荷的染料离子与细胞的结合，便更加牢固而呈现颜色。所以苯环必须同时连接有两个类型基团，才能有染料的作用。

例如，三硝基苯是一个黄色的化合物，但它不能电离，不能与酸碱化合，也不溶于水，虽然具有黄色，但不能使其它物质染上黄色。但如果苯环上连接一个羟基（—OH），成为三硝基苯酚，即苦味酸，也是黄色但能够电离，就能与其它物质结合并有一定的水溶性，而成为一种黄色的染料。与苯环相连的硝基（—NO2）是助色团，它使苦味酸具有能使其它物质染色的性质。羟基电离出H+来，染料成了负离子，能与碱类化合成为溶于水的盐类。如苦味酸铵便是一个染色剂，苦味酸铵溶于水后，电离成N$H\_{4}^{+}$和带负电的苦味酸根离子，后者便能与带正离子的细胞物质相结合，使其染色。在苦味酸铵中，硝基是呈色基团，使染料呈现黄色，羟基是助色团，它使染料能够电离，并构成盐类，而对细胞质进行染色。

综上所述，染料是一种有机化合物，连接在苯环上的原子团具有发色的特性，颜色是由发色团产生的，而染色性能是由带有能电离成盐的助色团的作用造成的。

#### 2.7.3　染色剂的种类

随着科学的发展，目前在生物制片中，所用的染料种类越来越多。可根据它们的来源、化学性质、结构和对生物组织结构着色情况进行分类。

##### 2.7.3.1　根据染料来源分类

分为两大类，天然染料与人工染料。

（1）天然染料　天然染料是从生物体（动物或植物）中提取出来的，在植物切片中，常用的天然染料种类并不多，但很重要，且经常应用，其成分结构都比较复杂，有些尚不很清楚，目前还不能用人工方法合成。如胭脂虫红、苏木精、地衣素红、石蕊等。

（2）人工染料（煤焦染料）　人工染料是与天然染料相对而言的，也叫人造染料，多是从煤焦油中提取出来的，所以也叫煤焦染料。

目前在制片技术中主要采用人工染料。由于最早的人工染料是由苯胺制成的，往往也叫作“苯胺染料”。但这一名称并不妥当，因为目前应用的很多染料和苯胺没有关系，也不是苯胺的衍生物，只能说多半是芳香系有机化合物，是烃类化合物中苯的衍生物。常用的有番红、固绿、苯胺蓝、结晶紫、橘红G、中性红、苏丹Ⅲ、酸性品红、碱性品红、刚果红、俾斯麦棕等。

##### 2.7.3.2　根据化学性质分类

根据染料的化学结构性质和其电离后染料离子本身所带的电荷，通常分为三类，即酸性染料、碱性染料与中性染料。

（1）酸性染料　含有酸性基团的一类阴离子染料，在酸性、弱酸性、中性染液中能够对蛋白质、聚酰胺等直接作用。染料分子结构比较简单，多数为单偶氮类染料，少数为双偶氮类染料。电离后，染料本身成为带负电的离子，与钠、钾等金属离子结合。金属阳离子与有色的有机酸根结合成为染料，能溶于水及乙醇等。如亮绿、曙红等。

（2）碱性染料　电离后，染料离子带正电，它本身是一种有色的有机碱基，与无色的乙酸根、氯离子或硫酸根等结合成为染料，一般都能溶于水或乙醇，如番红、苏木精等。

（3）中性染料（复合染料）　由酸性及碱性的染料混合而成，也叫复合染料。主要是由酸性染料（色酸的盐）和碱性染料（色碱的盐）配制而成。在这种染料中，阳离子和阴离子都含有发色团，能溶于乙醇或水，如中性红（实际是微碱性）。

##### 2.7.3.3　根据着色结构分类

根据对植物组织结构着色情况而分：

（1）组织染料　指能够使植物体的组织染色的染料。

（2）细胞染料　又可分两类：细胞质染料，与细胞质亲和力较大的染料；细胞核染料，与细胞核亲和力较大的染料。

### 2.8　封固与封固剂

植物制片不管选用何种方法，其最后一步都是封片（封固、封藏）。封固的作用有两方面：一是将已制成的片子，永久保存下来，以便观察研究；二是应用具有合适折射率的封固剂，可以使材料清楚地显现出来。因此，封固剂要求折射率高且干燥后就凝固。

#### 2.8.1　水溶性封固剂

有的材料不需完全脱水，或脱水后会引起收缩变形，如很多藻类、真菌类及高等植物的胚囊等，就要采用水溶性的封固剂。

（1）甘油封固剂　适于封固藻类或其它不能进行脱水的柔软组织材料。其配制方法为甘油50mL+蒸馏水50mL+苯酚少许。

（2）甘油-乙醇封固剂　配制方法：甘油50mL+95%乙醇50mL+蒸馏水100mL。

（3）甘油胶封固剂　配制方法：先将明胶溶解于水中（36～40℃）待全部溶解后，再加入甘油与苯酚。充分搅拌完全均匀混合后，经过滤贮存于瓶中备用。

Kisser氏明胶液：明胶（动物胶）10g+蒸馏水35mL+甘油30mL。

Kaiser氏明胶液：明胶（动物胶）10g+蒸馏水60mL+甘油70mL+苯酚1g。

Fischor氏液：硼砂5g+蒸馏水240mL+甘油25mL+明胶（动物胶）40g。

甘油-明胶液：明胶（动物胶）10g+甘油70mL+蒸馏水100mL+苯酚1～1.5g。

凡是甘油或甘油胶封固的制片，如要长期保存都要用油漆进行封边。否则时间长了，容易吸水或干燥，使材料变坏。必须加以注意。

#### 2.8.2　糖浆封固剂

对于不能用乙醇及二甲苯处理的材料，如制作显示乳汁管的橡胶制片，若经乙醇及二甲苯的步骤会溶解橡胶，用糖浆封固剂则可避免。配制方法：糊精30g+麦芽糖2.5g+蒸馏水30mL+少量苯酚。

#### 2.8.3　树脂性封固剂

（1）加拿大树胶（Canada Balsam）　加拿大树胶是植物制片上最常用的一种封固剂。它是从一种冷杉树（*Abies* *balsamea*）中提取制成的。这种树原产于北美洲，以加拿大出产最多，故而得名。有固体与液体两种，液体是用二甲苯或苯配制成的。固体树胶可用二甲苯或苯溶解稀释后使用。稀释时要注意两点：一是应配稀些，如果太稠厚，封片时容易产生气泡；二是配制时不能加热，因高温会使树胶变质发黑，不能使用。同时还要避免日光照射，应装入深色瓶中，放置于阴凉避光的地方。

（2）中性树胶　浅黄色透明油状液体，是一种天然树脂，溶解于二甲苯中成60%溶液。呈中性反应，不溶于水，折射率1.578。干燥后凝结成透明无色固体，无收缩、变黄、纹裂等现象。与玻璃黏着力很强，封片后盖玻片与载玻片黏合紧密。使用与加拿大树胶相同。

（3）合成树胶　随着科学的发展，合成树胶的种类也越来越多。合成的树胶，一般都具有较高的折射率，溶液的色泽也比较浅或无色透明，这是其特点。但切片材料封固其中，能否长时间保存颜色不褪还有待进一步研究和鉴定。

#### 2.8.4　其它封固剂

（1）达马树脂蜂蜡　达马树脂和蜂蜡等量配合而成。配制时将蜂蜡在玻璃或瓷器中水浴加热熔化，达马树脂则在铁器中直接加热熔化（注意避免加热过度），然后将熔化的蜂蜡倒入达马树脂中掺和而成，配成后放在铁容器中保存。

（2）DPX封固剂　二甲苯40mL+磷酸甲苯（或磷酸三甲酚）7.5mL+迪士春80 10mL。上述三种成分混合保存。

（3）Apathy氏封固剂　折射率为1.52，无荧光性，适用于荧光观察。阿拉伯胶50g+蔗糖50g+蒸馏水50mL+麝香草酚0.05g。将上述四种成分加入瓶中密封稍加热使其溶解，密封保存。