

塑料薄切片技术

徐 是 雄

(香港大学植物系)

光学显微镜术观察用的薄切片, 可用各种塑料包埋剂, 如乙二醇甲基丙烯酸酯 (glycol methacrylate) 和环氧树脂类 (epoxy resins) 包埋。这些塑料包埋剂经凝固后, 很容易被切成 1—2 微米的薄切片, 比传统的石蜡切片要薄得多; 而且染色时无需经过脱蜡手续, 便可直接染色, 清晰度也高。其次, 由于塑料包埋剂保存材料的结构性能好, 因此它可以和最好的非凝固性固定剂, 如甲醛、戊二醛、丙烯醛、钨酸等药剂配合起来用。应用优良的固定剂和包埋剂, 细胞的细微结构才能真实地被保存下来。由于这种种优点, 塑料薄切片已逐渐替代传统的石蜡切片。下面介绍乙二醇甲基丙烯酸酯(以下简称为 GMA) 和环氧树脂, 这两种塑料包埋切片技术的具体内容:

1. 乙二醇甲基丙烯酸酯 (GMA) 切片法^[1]

GMA 在出厂时都为单体溶液, 因此易于渗透入生物的各种组织结构和细胞。但如经加热或紫外光照射, GMA 单体便会聚合凝固, 形成一个坚硬的架构, 把细胞内的各种分子包围和支撑起来。这一点 GMA 与环氧树脂不同, 环氧树脂在凝固时是与细胞内的分子形成共价键, 阻止细胞内的分子与各种染料结合。由于 GMA 的渗透性好, 所以在 GMA 切片上可以进行各类组织化学, 抗体荧光示踪等试验。

GMA 在出厂时, 溶液内都含有一些氢醌类防凝固剂, 必须在应用时除去。办法很简单, 只要把 GMA 和活性碳混合, 摇动一些时候, 便可以除去大部份的氢醌^[2], 然后过滤备

用。GMA 溶液内还含有约 3% 的自由态甲基丙烯酸, 它使 GMA 溶液的 pH 偏低, 其切片会被碱性染料染上颜色, 影响材料的清晰度。因此应用 GMA 时首先得测一下溶液的 pH, 方法如下: 取 0.5 毫升 GMA 溶液, 加入 50 毫升的蒸馏水混匀后, 用 pH 量度计测定。假如 GMA 溶液的 pH 偏低, 那可以依照 Frater^[3] 或 Tippet 和 O'Brien^[4] 的方法, 把多余的自由态甲基丙烯酸除去。但根据我们的经验, 如果购买 Harung Associates 的 GMA^[2] pH 一般在 4.5—6.5 之间, 是无需提纯便可以直接使用的。如要做组织化学方面的试验, 则应提纯, 使 GMA 的 pH 稳定在 7 左右。

当 GMA 凝固时, 会释放出大量的热。因此如聚合作用进行得太快, GMA 极容易散发出气体来。假如这些气体聚合在材料内, 会形成气泡而使材料的组织结构遭受损伤。因此, 如用加热的方法来凝固 GMA 的话, 最好温箱的温度保持在 40—60°C 范围内。但如要做酶活性等组织化学方面的测定, 那就必须用紫外光照射法来凝固 GMA, 方法如下:

首先把材料和 GMA 装在一个小的薄铝纸杯内, 然后把它们放在离紫外光灯 10 厘米处照射。照射时把紫外光灯管和 GMA 密封在一个箱内, 箱内不断充以氮气 (目的是排除箱中的氧气, 因为氧气的存在会妨碍 GMA 凝固)。这样约经过一夜的时间, GMA 便会凝固。如要将凝固的时间缩短, 可以在 GMA 里面加入 0.025% 的吡啶黄素 (acriflavine), 提高对紫外光的吸收能力。如怕紫外光在凝固 GMA 时散发出来的热量过高, 那可把整个操作过程放在 0°C 条件下进行, 具体的步骤可参

考 Ashford, Allaway 和 McCully 所提供的方法^[5]。

仅用提纯的 GMA 还不适宜用于凝固和切片, 因为质量不稳定。为提高 GMA 的性能和质量, 还得在纯的溶液内, 加入一定份量的增塑剂和催化剂, 配成混和液, 然后再凝固。混合液的配方如下:

GMA	93 克
聚(乙)二醇-400(增塑剂)	7 克
苯酰化过氧(催化剂)	0.6 克

需注意的是, 苯酰化过氧需要经长时间的搅拌, 才会全部溶化。这样的混合液, 最好储存在黄色的有螺丝盖的玻璃瓶内, 溶液不超过瓶的 1/3 容积, 使瓶内留有足够的氧气, 置于 0°C 下储存, 这样可防止 GMA 在储存期间自发凝固。

固定剂

应用 GMA 包埋剂就不能用传统的凝固性固定剂, 如福尔马林-醋酸-酒精液(FAA)、卡诺氏, 纳瓦兴式(CRAF)等固定液, 而必须用非凝固性固定剂固定材料。因为凝固性固定剂对细胞的细微结构损伤很大, 贻像很多, 这些在塑料薄切片中都会表现出来^[6]。下面介绍几种我室常用的非凝固性固定剂的配方, 这些固定剂配方同样可用来固定供电镜观察的材料。

(1) 3% 戊二醛

(a) 商品戊二醛多为 25% 的水溶液, 一般还含有微量的戊二酸。戊二酸会使溶液的 pH 降低, 故不适宜作固定剂, 因此应用时需除去。为此在溶液内放一些碳酸钡(100毫升的戊二醛溶液加 2 克碳酸钡), 摇动 5—10 分钟, 然后过滤备用。

(b) 制备 0.025M 磷酸盐缓冲液(pH7.5), 供稀释戊二醛溶液用。

(c) 固定材料可在室温或 0—4°C 下进行。室温下固定需 1—3 小时, 在 0—4°C 下, 则需要 12—16 小时。

(2) 4% 甲醛

(a) 4 克聚甲醛溶于 100 毫升的 0.025M

磷酸盐缓冲液, 加温至 60°C 使聚甲醛溶化, 冷却至室温, pH 调至 7.5 备用。溶液不耐放, 因此最好在 25 小时内用掉, 不然甲醛会转变为甲酸和甲醇。

(b) 如有需要可以在 100 毫升的固定液中加入 1—5 滴 0.1M 氯化钙, 到刚出现沉淀(即呈现乳白色)时为止。据说 Ca⁺⁺对膜层的固定有好处。

(c) 固定材料的时间比戊二醛长一些为好。

(3) 其它的固定剂

有丙烯醛(acrolein)。但因为丙烯醛毒性很大(是一种强烈的催泪剂), 所以用的人很少。但如有需要可以用 0.025M 磷酸盐缓冲液配成 10% 溶液(pH7.5), 必须在 0°C 下固定 12—16 小时。在高温下固定会使材料的细微结构受损。

锇酸也可用来做固定剂。但我们发觉经锇酸固定影响材料对某些染料的着色, 比较容易导致 GMA 自发凝固。

其它如高锰酸钾等具有强氧化作用的固定剂, 都不适用。

固定时, 用小玻璃瓶盛放固定剂和材料。

洗涤

材料经固定后, 一般用 0.025M 磷酸盐缓冲液洗涤一至两次, 每次放置 1—2 小时。该步可以在室温或 0°C 下进行。

脱水

脱水可以采用以下任何一种方法:

(1) 不同的醇类脱水:

(a) 材料清洗后换入 100% 2-甲氧乙醇(2-methoxy ethanol 又名 methyl cellosolve)。换液两次, 每次静置 1 小时。

(b) 换入 100% 乙醇, 换两次, 每次静置 1 小时。

(c) 换入 100% 丙醇, 换两次, 每次静置 1 小时。

(d) 最后换入 100% 正丁醇, 换两次, 每次静置 1 小时。

脱水一般在室温下进行,也可在 0°C 下进行,但脱水时间要加倍。材料在正丁醇内可以长期保存,但必须储藏在 0°C 。

(2) 不同浓度的乙醇脱水法:

在室温条件下,按下列顺序进行:30%→50%→70%→80%→90%→100%纯乙醇(换两次),在每一浓度中静置半小时,但在纯乙醇中每次则需放1—2小时,并可放置在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下过夜。

渗透

用GMA混合液更换掉乙醇或正丁醇,放在转床上缓慢转动(静置也可以)12—16小时,然后再换一次新鲜的混合液,这样可以放置2—30天。以上步骤应在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下进行。1—2平方毫米大小的材料,渗透2天左右,较大的或比较实心的材料如种子,则需较长的时间。GMA量以装满玻璃小瓶容积的 $1/5$ 左右为宜(盖过材料即可)。

聚合

先将胶囊直立在一个木制的或金属架的孔眼中,然后把材料和新鲜的GMA混合液注入胶囊,盖上胶囊盖。但在加盖之前,必须把盖的顶端压凹,避免空气留在盖的顶端,因为氧气有碍GMA凝固。放置 60°C 恒温箱内,约经12小时,GMA便全部凝固和硬化。

切片

(1) GMA硬化后,用细钢丝锯和刀片将包埋材料的胶囊一端加以修整(无需修得非常光滑),然后用玻璃刀切片。GMA可以在普通的石蜡切片机上进行切片,但需要有一只放玻璃刀的架子(可以自制如图1)。如有超薄切

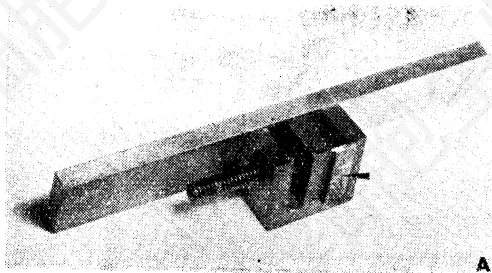
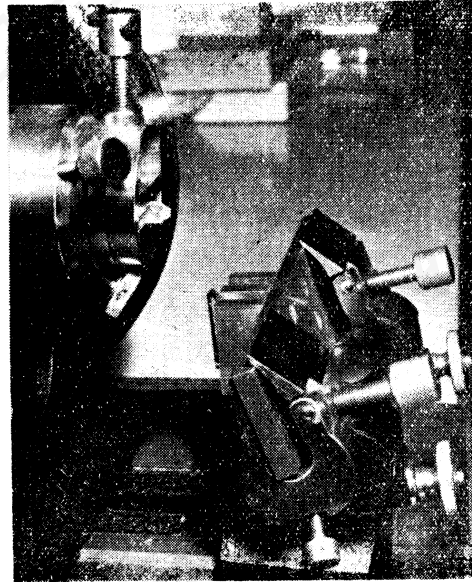


图1 a. 是一幅自制的放玻璃刀的铜架



b. 铜架装在一座Ao Spencer切片机上的情形,箭头所示为玻璃刀

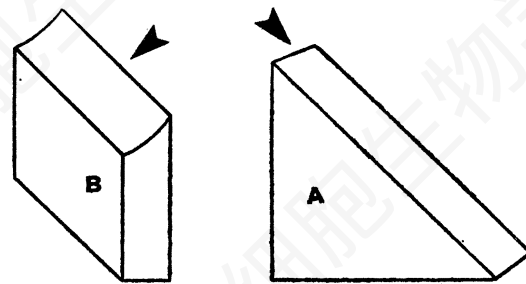


图2 A为三角形玻璃刀
B为Ralph形玻璃刀

片机,也可以用来切1—2微米的GMA薄片。

(2) 玻璃刀

常用的玻璃刀有两种类型:一种比较小型的,刀锋只有6毫米阔,这种玻璃刀大多是用来切超薄切片的。另外一种为较阔的玻璃刀,名叫Ralph玻璃刀^[2,7],刀锋的阔度为4厘米(图2),这种刀除了可以切大块的塑料包埋材料,还可以用来切石蜡。但如切石蜡,则需要刀口上喷涂一层特氟隆(teflon)润滑剂。

(3) GMA切片因为不是连续性的,所以每一块切片都得小心地用镊子夹住,从刀口移下,然后一片片地放在玻片的水滴上。让它们

干燥,平贴在玻片上。这一步骤操作起来需要耐心和经验。切片时的难易度,除了受材料和GMA的硬度等影响之外,还受室内湿度的影响。

当GMA切片一接触到水时,便马上展开,因此,要小心不让切片因粘附在镊子的头上而丢失。GMA虽然不能作连续切片,但如果技术纯熟,切起来并不比石蜡难度大。

(4) 粘片——载有GMA薄切片的玻璃片需放在80℃的温台上干燥。假如温台的温度过低,粘片不牢固,染色时会脱落;如果温度太高,又会使细胞内的分子受到损伤(尤其使淀粉粒和油脂溶解),因此要注意粘片的温度。

染色

切片干燥后便可以马上染色,而不需把GMA去掉。染色的方法是相当快捷和方便的。如果玻片多,可装在瓶内染,如果只染一两块玻片,只需用滴管加几滴染料在切片上,过几分钟,便可以把染料洗去,然后干燥,封片,在光学显微镜下观察,照相。

一般用来染石蜡切片的染料^[8]都可以用来染GMA薄切片。常用的有以下几种染料:

(1) 甲苯胺蓝-O^[1,9]

溶液:用pH4.4的0.02M苯甲酸纳缓冲液制备0.05%甲苯胺盐溶液。缓冲液的配法,将0.25克苯甲酸和0.29克苯甲酸纳溶在200毫升的蒸馏水中,过滤备用。

染色步骤:甲苯胺蓝-O(1—2分钟)→蒸馏水清洗→室温下干燥(不要用高温烤干,因为这样会使甲苯胺蓝-O的多色反应减弱)→树胶封固。在加树胶前,要在切片上呵一口气,可使甲苯胺蓝-O的多色反应呈现得更好。

结果:甲苯胺蓝-O为一种碱性、多色性(polychromatic)染料。它与不同的植物组织显现多种颜色(metachromatic)反应:染色质——蓝色;细胞质——紫红色;细胞壁内的多糖醛(poly-uronides)——红色;木质素——绿色;多石炭酸——绿色;纤维素和淀粉——

无色。

(2) 酸性品红(Acid Fuchsin)和甲苯胺蓝-O

溶液:(a)酸性品红0.05克用1%醋酸配制,(b)1%醋酸(或1%酸性品红),(c)0.05%甲苯胺蓝用0.02M苯甲酸纳缓冲液(pH4.4)配制。

染色步骤:酸性品红(1—3分钟)→1%醋酸清洗(1分钟)→干燥→甲苯胺蓝-O(30秒—2分钟)→蒸馏水清洗→干燥→树胶封固。

酸性品红为一种酸性染料,它的主要作用是复染。一般细胞质内的蛋白质都会被酸性品红染成红色,这与甲苯胺蓝-O的多种颜色反应成强烈对比,彩色照相尤其鲜艳夺目。

(3) 高碘酸和锡夫氏试剂法(简称PAS)

溶液:1%高碘酸,锡夫氏试剂,漂洗液1N HCl(5毫升)+10%偏亚硫酸钾水溶液(5毫升)+蒸馏水(90毫升);复染可用甲苯胺蓝-O(见上面配方)或0.05克固绿(溶于10%醋酸)。

这一方法是经常用来专一地测定具有连位羟基的多糖类。在用锡夫氏试剂之前,先用高碘酸处理切片,这使多糖的连位羟基被氧化成醛基。醛基和锡夫氏试剂结合形成红颜色产物。假如材料是经醛类固定剂处理过的,那么在使用PSA之前,得选用以下的药剂(任何一种都可以),把固定时残留在材料内的醛基去掉:

(a) 在室温条件下,用1,1-二甲基-3,5-二羰环己烷(dimedone)饱和溶液处理切片12—16小时。

(b) 将二硝基苯肼(2,4-dinitrophenyl hydrazine)溶在15%醋酸溶液内,在室温处理切片30分钟。二硝基苯肼为红色晶体,对染色会有一些影响。

(c) 用0.2M亚氢酸钠溶液(1M醋酸溶液配制),在室温下处理切片10—24小时,每次用前新配制。

PSA染色步骤:把残余的醛基去掉→清洗1小时→1%高碘酸(10—30分钟)→清洗5

分钟→锡夫氏试剂(15—30分钟)→新鲜漂洗液清洗(0.5% Na₂S₂O₅)(1—2分钟)→水洗(2分钟)→固绿或甲苯胺蓝-O对染(3—5分钟)→水清洗(5分钟)→干燥(室温)→封固(树脂)。

结果: PAS使淀粉和半纤维素染成深红色。但纤维素则不呈现正反应(原因不明)。木化的壁经常也会呈现正反应,但这是由于非专一性染色导致的(原因也不太清楚)。胼胝质也不呈现正反应,因为缺少连位羟基。

封片

临时封片可以用油封片。永久片最好用树脂或其它中性的封固剂封固。

照相

由于GMA切片薄,所以染色不深,因此拍黑白照相时,反差效果有时不够好。补救的方法是采用稍厚的切片,用PAS+甲苯胺蓝-O染色,染得深一点。用这样的切片照相,效果很好。

II, 环氧树脂类包埋剂制片法

目前常用来包埋材料,供电子显微镜观察的环氧树脂有好几种,如Araldite、Epikote(Epon)、ERL-4206(又名Spurr's medium)等。这些环氧树脂如切成1—2微米厚薄的切片,又可供光学显微镜观察。在众多的环氧树脂中,包埋植物材料最方便的一种为Spurr氏包埋剂,因为它具有粘度低、渗透力强、切片稳定等优点。Spurr氏包埋剂的配方如下:

ERL-4206(环氧树脂) (Vinyl cyclohexene dioxide)	10克
D.E.R. 736(柔软剂) (diglycidyl ether of polypropylene glycol)	6克
NSA(硬化剂) (Noenyl succinic anhydride)	26克
S-1(催化剂) (dimethyl lamino-ethanol)	0.4克
	42.4克

固定

先将材料切成1—2平方毫米,用3—6%戊二醛(用pH7.5 0.025M磷酸盐缓冲液配制)在室温下固定2—4小时。固定后用0.025M磷酸盐缓冲液洗涤2—4小时,也可以过夜。然后用含1%锇酸的0.025M磷酸盐缓冲液(也可以不用缓冲液),再固定1—2小时。在用锇酸再固定之前,一定要把残余的戊二醛洗净,不然锇酸会变黑而影响结果。

脱水

用清水把固定液洗净,然后用下列的顺序和浓度的乙醇脱水:30%→50%→70%→80%→90%→纯乙醇(两次),各级静置10—30分钟。

浸透

用少量的酒精盖过材料,然后每隔10—20分钟,用滴管加10—20滴Spurr氏包埋剂进去,混匀(Spurr氏包埋剂的粘度低,因此用力摇几下,便可以乙醇完全混合)。这步重复多次,直至乙醇和包埋剂的比例为1:9。然后把混和液抽干,换入纯的包埋剂,静置1—2小时(最好放在转床上缓慢转动)。再换一次纯的包埋剂,在室温和转床上过夜。第2天再换一次新配的包埋剂,过夜。第3天便可以把材料取出加以包埋和聚合。比较大的材料,则可以天天换一次,至1—2星期止。每次都新配的新鲜配的Spurr包埋剂。

包埋和聚合

将胶囊直立在木制或金属的架子的孔眼中,加入材料和新鲜制备的包埋剂。也可以用一种平放的模子来埋材料(flat embedding)。在66°C—80°C温箱内进行聚合8—24小时。

切片

在埋藏材料的尖端,用细钢丝锯和刀片修整平滑。用三角形或Ralph形玻璃刀切1—2微米的薄片。切片时需要在玻璃刀口上用胶布做一个小水槽。飘浮在小水槽内的切片,可以用一个小的白金或合金圆环或针把切片捞起,移放在玻片的水滴上。在每滴水中放4—5

块切片, 在 80°C 温台上烤干备用。

染色

环氧树脂切片的染色, 没有 GMA 方便, 因为一般的染料不易透进去。故环氧树脂不能像 GMA 那样做组织化学方面的测定。但如仅观察组织结构, 那么环氧树脂薄片, 经下列几种染料加热染色, 清晰度是相当高的, 而且颜色鲜艳。但要注意那些被染成的颜色, 都是非专一性和没有意义的反应。

(a) 甲苯胺蓝-O

溶液: 1% 甲苯胺蓝-O 溶液 [用 1% 硼酸钠 (pH9) 配制]。

染色步骤: 把一大滴过滤的甲苯胺蓝-O 滴在切片上, 在 80°C 温台上加热至染料四周刚开始干, 马上用水清洗, 温台烤干, 这时便可观察。用油或环氧树脂封片。

(b) 碱性品红和亚甲蓝^[11]

溶液: Na₂PO₄ 0.5 克 + 碱性品红 0.25 克 + 亚甲蓝 0.2 克 + 0.5% 硼酸 15 毫升 + 蒸馏水 70 毫升 + 0.72% NaOH (pH6.8) 10 毫升。

染色步骤: 将一大滴过滤的染料, 放在玻片的切片上, 平放在 50—60°C 温台上烤 30 秒至 1 分钟 → 用蒸馏水清洗 → 烤干 → 用油或环氧树脂封片。

(c) 亚甲蓝、天青和番红 O。

溶液:

(1) 亚甲蓝 0.13 克 + 天青 A 0.02 克 + 甘油 10 毫升 + 甲醇 10 毫升 + 0.1M 磷酸缓冲液 (pH6.9) 30 毫升 + 蒸馏水 50 毫升。

(2) 番红 0.01 克 + 0.2M Tris 缓冲液 (pH9) 100 毫升。

染色: Warmke 和 Lee 的方法^[12]需要的染色时间较长, 而且还要经透明等步骤。我们发现如用以下改良的快速染色法, 效果也很好。

放几大滴过滤的 (1) 溶液在切片上, 把玻片放在 60—80°C 的温台上烤 1—2 分钟 (最好染得深一些) → 清洗干净 → 再放几大滴过滤的 (2) 溶液在切片上, 在 60°C 温台上烤 30 秒—

1 分钟 (小心不要染得太深) → 清洗 → 烤干 → 用油作临时封片, 或环氧树脂作永久封片。

结束语

GMA 和环氧树脂薄片, 两者都是常用的方法。从以上的叙述, 可以看到, GMA 薄片可以用来做各种组织化学测定, 荧光, 荧光抗体等试验, 但它的缺点是不能用来进行电子显微镜观察。在文献中虽然已有人把 GMA 加以改良, 来作电子显微镜观察^[13], 但效果还不够理想, 没有环氧树脂稳定性好。

环氧树脂薄切片的优点是能够作连续的超薄切片, 但不能用来作任何的组织化学方面的测定。所以现在有把这两种方法结合起来用的趋势。由于采用了这些新的技术, 不但对植物解剖学, 其它如植物生理学, 细胞学等学科的研究也有好的作用。

最后我想指出一点, 塑料包埋剂很快会在我国普及起来。经常接触这些塑料时, 要注意不要让塑料溶液沾在手上, 因为这些塑料溶液会使一些人生皮肤敏感病。但硬化了的塑料则不会有影响。

参考文献

- [1] Feder, N. and T. P. O'Brien (1968) *Amer. J. Bot.* 55:123—142.
- [2] Bennett, H. S., A. D. Wyrick, S. W. Lee, and J. H. McNeil (1976) *Stain Technology* 51:71—97.
- [3] Frater, R. (1979) *Stain Technology* 54: 241—243.
- [4] Tippet, J. T. and T. P. O'Brien (1975) *Lab. Practice* 26:239—240.
- [5] Ashford, A. E., W. G. Allaway, M. E. McCully (1972) *J. Histochem. Cytochem.* 20:986—990.
- [6] O'Brien, T. P., J. Kuo, M. E. McCully and S. - Y. ZEE (徐是雄) (1973) *Aust. J. Biol. Sci.* 26:1231—50.
- [7] Semba, R. (1979) *Stain Technology* 54: 251—255.
- [8] Jensen, W. A. (1962) *Botanical Histochemistry*. Freeman and Co.
- [9] O'Brien, T. P., N. Feder, and M. E.