薄切法

日本關西醫科大學
微生物研究所
黃秀吉（醫二屆）

前曾述及電子顯微鏡的歷史與研究方向，但超薄切片法是電子顯微鏡的基礎，沒有超薄的切片，則電子顯微鏡就無用武之地了，因此「超薄切片法」對有心研究電子顯微鏡的人是占重要的地位的。

A超薄切片法的發達經過

超薄切片法是Von, Andenne (1939) 才開始以光學顯微鏡用的切片法爲基礎，用 Formalin 作固定劑，Alcohol 爲脫水劑，M.P.60°C 的硬Paraffin來包埋，而後楔狀切片而製成，此種方法不能切得太薄，以致到 1946 年 Fullam (1946) 把Paraffin 包埋後的Block，利用高的Microtome 來試切，但成功還是很少。

現在的超薄切片法，大部份是利用 Pease & Baker (1948)，Newman，Borysko & Swerdlow (1949) 改良而成。Pease & Baker (1948) 的包埋劑爲 Cello idine，Paraffin 的二重包埋法，Microtome 是普通的 Spencer No 820 及 Spencer No 821 漸漸改良而成。在1949年 Newan，Borys ko & Swerdlow提倡試料製成用熱膨張法，使得包埋劑 N-Butyl Methacrylate被利用一時期。到1950年Latta & Hartman 發明了玻璃刀。1952年 Palade用 O_sO_4爲固定劑，因此 1949～1952 年超薄切片法爲固定劑用O_sO_4，脫水劑利用Alcohol包埋劑用N-Butyl Methacrylate，Microtome用的Glassknife，此可說是第一期的方法。

接著固定法除了O_sO_4外，1956年Luft用高錳酸鉀，到1959年Luft又用Acrolein 做固定劑。1963年Sabatini，Bensch & Barnett以Glutaraldehyde爲固定劑，用水溶性樹脂爲脫水劑。1960年Wichterle，Bartl & Rosenberg 等用 Glycol-Methacrylate爲脫水劑而 Stäuble (1960) 則用 Durcupan，另一方面包埋法，Methacrylate 樹脂有許多缺點，因此在1956年 Glauert，Roger S & Glauert R H等三人及 Maale & Birch-A nd rerson 等開始使用 Epon樹脂，而 Kellenberger Schwab & Ryter(1956 則用 Polyester 樹脂。接着1958年 Watson 有了電子染色法後，超 Microtome 才開始販賣。因此1956年～1962年間，除了O_sO_4爲固定劑外，他用 K M_nO_4與Glutaralodehyde 而脫水劑爲水溶性樹脂，包埋劑爲 Epok 樹脂與Polyester 樹脂，致於電子染色法一直到現在還在使用，而今後的超薄片法等種種都有良好的改良，到現在還在發展中，

表1超薄切片法的發達經過 UI TRATHIN SECTIONING

	Fixation	Dehydration	Embedding	sectioning	Mounting	staining
1939	(Formalin)	(Alcohol)	paraffin			
1941					collodion and For-mvar membranes	
1948			(celloidin-paraffin)	spencer 821		
1949		alcohol	methacrylate resins			
1950				Glass knife		
1952	O_sO_4			ultramicrotome		
1953				Diamond knife		
1956	KM_nO_4		Epoxy and polyester resin		carbon film	
1957		Gelatin				
1958			Araldite (EP) Vestopal (PE)			Electron uranyl leadsaets
1959	Acrolein	Aqon Epon	Epon(EP)			
1960		Glycol, methacrylate Durcupan	styrene resins Rigolac (PE)			
1962	Glutaraldehyde		Maraglas (EP)			
1963		carbowax 200	Epok (EP)			
1964			D.E.R.(EP)		chloroprene rubber	
1965		Hydroxypropyl			coating grid	
1966		methacrylate Ethy lene glycol				

表 2 超 薄 切 片 法

	超薄切片法第一期法 (1949～1952)	超薄切片法第二期法 (1956～1962)
固　　定	O_sO_4	O_sO_4, KM_nO_4, Glutaraldehyde
脫　水　劑	Alcohol	Alcohol, Acetone,水溶性樹脂,
包　埋　劑	Methacrylate 樹　脂	Epok 樹脂, polyester 樹脂
薄　　切	Glass knife 超 microtome	Glass knife, Diamond knife, microtome
電 子 染 色		電 子 染 色

B超薄切片法和光學顯微鏡用切片法

組織切片，爲了能在電子顯微鏡下清楚地觀察爲目的，因此切片的厚度必須在 0.1u 以下，才能清楚地觀察到細胞的各微細器官，所以0.1U以下的切片製造方法，我們稱它爲超薄切片法(Ultrathin sectioning)，超薄切片法大部份依據光學顯微鏡用的切片法之原理，在不破壞組織下而製成其相異諸點提供於下。

表3超薄切片法和光學顯微鏡用切超法之相差異點

試　　料	組織片很小
固　　定	O_sO_4（單獨使用）以外KM_nO_4, Glutaraldehyde，各種的緩衝劑
脫　　水	各種水溶性合成樹脂
包　　埋	各種合成樹脂
薄　　切	特別設計的超 microtome, Glass knife, Diamond knife 切片法厚須在0.1U之下
載　　物	切片必須載在金屬 mesh 上
染　　色	電子染色，不必脫包埋劑

C現在的超薄切片法

能够獲得良好的電子顯微鏡像，必須具有超薄切片法的技術，例如固定、脫水、包埋、薄切、電子染色，其中有一部差錯就不能得到良好的像，也就是說不能得到良好的研究，爲了達到研究的目的，現在的超薄切片法有許多良好的改進表 4，5 是現在所使用的方法。

表 4 現在常使用的超薄切片法

方　法	條　　件	方　法	條　　件
試　料	Sample的大小約在1mm³以下	薄　切	超 microtome Glass knife Diamond knife 切片的厚必須在0.1u以下
固　定	O_sO_4, KM_nO_4 Glutaraldehyde } 緩衝液		
水　洗	緩　衝　液	載　物	支持膜於金屬 mesh上然後，直接與切厚的試料片接着。
脫　水	alcohol		
包　埋	Epok樹脂：Epon 812	染　色	Uranye ace tate lead salts } =二重染色

表 5 現在所使用的對一般的實質性器官的細胞之超薄切片法

方　法	條　　件	
試　料	約1mm³之組織片	
固　定	1～2%O_sO_4一磷酸緩衝液 (PH.7.2～7.6)	1～2 小時(2～4°C)
	2～3% KM_nO_4 過錳酸鉀	1～2 小時(2～4°C)
	2～5%Glutaraldehyde—磷酸緩衝液 (PH 7.2～7.6)	1～小時(2～4°C)
水　洗	磷酸緩衝液	3 回，5 分 (室溫)

脫　水	alcohol 150%,70%,90%,100%之 Alcohol	1小時（室溫）
包　埋	Epok樹脂(Epon 812)	
薄　切	超microtome, Glass knife（角度45～50）厚0.1u以下	
載　物	支持膜於金屬 mesh 上然後直接與厚切試料片接着	
染　色	Uranyl acetate與lead salts二重染色 2～5%uranyl acetate lead的 citric acid 塩類	 10～20分室溫 5～10分（室溫）

在醫學生物學的分野，一般細胞的實質器官（如：肝，腎、肺等）以表5做參考。我現在的方法大部分與表5大同小異。而在理工學的分野例如：木材植物、纖維、塑膠、皮革、食料品等利用表4又如無機的粉體、金屬等試料不必固定，alcohol 脫水，直接直空加熱脫水後，參照表4方法而不必電子染色。

—參考文獻—

1) Von Andenrne M: Electron Ulermikroskopie, J.gpringer. Berlin 1940

2) Schaefer, V.J. & Harker, D: Surface replicas for use in the electron microscope, J, appl. phys, 13:427～433, 1942 3) Williams, R, C, & Wyckoff, R, W, G,: The thickness of electron micr oscopic objects J. appl. phys 15:712～716, 1945

4) Brandley, D,E,:Evaporated carbon films for use in electron microscopy, Brit J. appl. phys, 5:65 1954

5) Von Ardenne, M: Die Keilschnittmethod, ein Wagzur Herstellung von Mikrotomschnitten mit weniger als 10^{-3}mm Stärke für electronenmikroskopische Zwecke, Z, wiss, Mikr. 26:8～23 1939

6) Fullam, E.F. & Gessler, A.E.: A. high speed microtomy for the electron microoscope. Rev. Sci. Instr. 17:23, 1946

7) Pease,D.C. & Baker, R.F. : Sectioning techniques for light and eletron microscopy using a. conuentional microtome, P. roc, Soc, exp. Biol, N.Y.67 470～471, 1948

8) Newman, S.B. Borysko, E, & Swerdlow, M:New sectioning techniques for light and electron microscopy, Sciencellono 66～68 1949.

9) Latta, H, & Hartmann, J.F.: Use of a glass edge in thin sectioning for electrcn microscopy. Proc. Soc. exp. Biol, NY. 47 436～438 1950

10) Palade, G.E.: Astudy of fixation for electron microscopy, Jexp. Med. 95 285～298 1952

11) Luft, J.H.: A new fixation for elctron microscopy, J. Biophy Ø Biochem. Cytol 2, 799～802 1956

12) Luft, J.H.: The use of acrolein as a fixatine for light and electron microsc opy, Anat Rec 133:305, 1959

13) Sabatini, D,D, Bensch. K & Barnett, R.J.: Cytochemistry and elctron microscopy, The preser vation of celluar ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, J. Cell, Biol 17:19～58 1963

14) Wichterle, O, Bartl, P &R osenberg M; Water-soluble methacrylate as embedding media for preparation of ultra-thin section, Nature 186: 494～495 1960

15) Stäubli W: nouvelle matiere dinclusion hydrosoluble pour la cytologia electronique, Compt, rend, Acad. Sc, 250:1137～1141, 1960

16) Glauert, A,M, Rogers, G.E. & Glavert, R.H.: A new embedding medium for electron micros-copy, Nature 178:803～804 1956

17) Maale O & Birch-Andersen A:6th Symposium of the Society for General Microbiology, Bacterial Anatomy, Cambiidge The University Press 261～276 1956

18) Kellenberger E, Schwab, W & Ryter A: Lutilisation din copolymere groupe des poiyesters comme materiel dinclusicn en ultrastructure Experientia 12: 421～422 1956

19) Watson ML:staining of tissue sections for electron microscopy with heavy mtals J. Biophys and Biochem, Cytol. 4:475～478 1958