

电镜中使用的固定剂都有毒性，操作时都要很小心，尽可能在通风橱中完成操作。如果实验室中发生固定剂泄漏，必须立即用大量奶粉覆盖泄漏出来的溶液，待反应充分后收集处理。

固定剂种类

一、四氧化锇（Osmium tetroxide）

四氧化锇是一种很强的氧化剂，呈浅黄色结晶，分子量 254，饱和水溶液的浓度为 7.24%，它的水溶液为中性，有极大毒性。市售有密封的四氧化锇晶体和四氧化锇水溶液两种。四氧化锇晶体溶于水的速度很慢，必要时可以使用超声波设备来加速溶解。市面上也有已经配制好的 2% 四氧化锇水溶液出售，使用相当方便。但要特别注意的是无论是四氧化锇晶体还是水溶液都会挥发出四氧化锇气体，因此应将四氧化锇置于密闭容器（玻璃容器）中保存。四氧化锇气体对呼吸系统有刺激，对眼睛有严重的破坏作用，因此在使用时应特别小心，尽可能在通风橱中进行，并且严格控制用量。废弃的四氧化锇溶液应加入酒精水溶液或硫酸亚铁溶液，使四氧化锇转化为黑色沉淀，以降低毒性方便收集处理。四氧化锇作为固定剂有如下优点：

1. 四氧化锇可以与脂类、糖类和蛋白质反应。其对脂类的固定作用可以补充醛类固定剂对脂类固定不足的缺点。

2. 能增加膜的反差，起到“电子染色”作用。用四氧化锇固定的材料，往往细胞膜结构比较清晰。这是由于被还原的锇沉积在细胞膜结构上，而锇是一种原子序数较高的元素，能加强它们的电子散射（质量密度大），所以四氧化锇作为固定剂的同时，又可作为电子染料，使被固定的样品图像有较好的反差。

3. 四氧化锇会破坏大部分细胞膜的半透膜特性，配制四氧化锇固定液不用考虑渗透压。

四氧化锇虽然具有以上优点，但它也存在不少缺点：

固定剂

四氧化锇渗透力弱，所以组织块要小。否则，将从组织块表面到中间形成一个固定梯度，致使内部自溶过程继续进行引起组织块内部固定不好。

不能保存糖原也不能有效固定核酸，而且对微管固定效果也不理想。

固定的时间不宜太长。时间过长，会使组织变脆，给切片带来困难。此外四氧化锇与蛋白质、不饱和脂肪酸交联形成的复合体都是易溶于水的物质，特别是在长时间的固定后，更易溶解。因此，使用四氧化锇固定样品，时间控制在 12 小时较为适宜。

四氧化锇能与乙醇或醛类起氧化—还原反应，生成沉淀。所以，醛类处理过的样品转入四氧化锇固定之前或四氧化锇固定之后转入乙醇溶液脱水之前都必须用相应的缓冲液充分漂洗干净。

四氧化锇是酶的钝化剂，不能用于细胞化学的研究。

二、多聚甲醛（formaldehyde）

甲醛分子中只有一个碳原子，含有一个醛基，分子式为 SCH_2O ，分子量为 30。市面上虽然有多种形式的甲醛溶液出售，但它们含有少量的甲酸和甲醇，对被固定的样品产生不良影响，适合

电镜固定使用的只有通过由多聚甲醛(paraformaldehyde, , Electron Microscopy Sciences (海德生物总代) , Cat.157-8))新鲜制备的甲醛溶液。甲醛溶液的毒性很大,即使是稀释液也要格外小心操作。甲醛溶液对皮肤有硬化作用,长时接触可能导致皮肤破裂、皮炎或是过敏症状;甲醛极易挥发,它对呼吸道也有影响,长时间暴露在甲醛气体中会使嗅觉敏感度降低;此外甲醛对眼睛也有影响,而且还被认为是致癌物质。因此在操作甲醛粉末或溶液时都必须很小心,带

上手套并在通风橱中进行。少量固定剂废弃的醛类试剂(甲醛、戊二醛和丙烯醛等)可以直接在大量流水冲稀的情况下倒进水池内(但要注意有关部门的有关规定),当然少量的醛类试剂与过量的 1M 甘氨酸混合后,再在大量流水冲稀的情况下倒进水池,会更安全。通常 100ml 的甲醛(1%)需要 50ml 的 1M 甘氨酸,100ml 1%戊二醛则需要 35ml,而丙烯醛需要 40ml。大量的醛类试剂必须集中回收处理。

甲醛作为固定剂有如下特点:

由于甲醛的分子量小,它的穿透能力比戊二醛强,反应温和,可用于细胞组织化学研究的前固定。而且它不象戊二醛有两个醛基,引入较少的游离醛基到组织细胞中,因而在一些细胞组织化学研究中更有利。但它的反应是部分可逆的,对细胞基质保存差,脱水后大部分基质丢失,所以不少实验室不单独使用甲醛来固定样品,而将它与戊二醛配制成混合固定液使用。

甲醛对生物样品的作用与戊二醛相似,主要引起蛋白质交联。在水溶液中,单个的甲醛分子以 $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 的形式存在。

与戊二醛不同,甲醛既与 DNA 又与核蛋白反应,但这些反应都是部分可逆的。另外,甲醛固定脂类的能力不强,可以与脂类相连的蛋白质作用。

三、戊二醛 (glutaraldehyde)

戊二醛是一种五碳醛,含有两个醛基。分子式为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, 分子量为 100。电镜固定通常市售的

固定剂 25% (或者 8%, Electron Microscopy Sciences (海德生物总代), Cat.16020) 的戊二醛水溶液稀释成需要的浓度。其 pH 为 $4.0 \sim 5.0$ 。氧气、高温、中性或碱性 pH 均能使戊二醛发生聚合失去醛基,并降低交联效力,所以平时这种原液应保存在低温处。此外戊二醛存放时间过长时, pH 值会降低,颜色变黄,固定效力也大大降低,若戊二醛 pH 值降至 3.5 以下或含有其它杂质时,必须纯化后才能使用。戊二醛对皮肤有硬化作用,但它的挥发性较甲醛弱,最好能在通风橱中操作。

戊二醛作为固定剂有如下特点:

它的反应速度快,是优良的前固定剂。但它的渗透速度较慢,必要时配合甲醛使用效果更佳。

它是蛋白质的强固定剂。它能快速而不可逆地与氨基反应,和甲醛相似,戊二醛的一个醛基与氨基反应,脱水后生成不稳定的 Schiff 键化合物。

由于戊二醛有两个醛基,它可以通过与相邻的另一氨基反应,而产生交联作用。戊二醛的两个醛基也可能与同一氨基作用,形成环状结构

这种环状结构可以进一步与另一戊二醛反应,生成丁间醇醛冷凝物(Aldol condensate)。这种化合物与氧分子共同作用,生成稳定的嘧啶类衍生物(Pyridine derivatives),并在此过程中发生交联。

与甲醛不同，戊二醛的这一步反应是不可逆的，而且需要氧气的参与。由于大块的样品内部氧气供应不足，戊二醛在大块样品的内部无法形成稳定的生成物，会导致样品内部的固定效果不佳。因而在使用戊二醛固定时，小块的样品固定效果较为理想。戊二醛通过交联作用固定蛋白质的过程会伴随氢离子的释放，使样品 pH 值降低。为了维持 pH 值稳定在最佳水平，在戊二醛的固定剂中要加入足量的缓冲液。

戊二醛能通过固定核蛋白来固定组织和细胞中的 DNA 和 RNA，能保存糖原，也可以固定和蛋白质有关联的或含有氨基和亚氨基的脂类。但是只使用戊二醛固定的样品无法阻止后面的脱水、渗透和包埋过程对样品脂类的抽提，因而对细胞膜的固定效果不理想。

戊二醛在固定过程中并不完全破坏细胞膜的半透膜特性，因而需要选择合适的固定液渗透压，以免造成固定假象。但合适的固定液渗透压随被固定细胞和缓冲液的种类改变，很难找到一个通用的渗透压。在实际操作中，1.0%-2.5%戊二醛（使用 0.1M 磷酸盐缓冲液或 0.1M 二甲胂酸盐缓冲液）在一般情况下，已经能提供理想的固定效果。除非观察到明显的渗透压造成的假象，一般不对固定液专门进行渗透压调节。

用戊二醛前固定的样品不易变脆，可以进行长时间固定（但最好不要超过一个星期），因而适用于远离实验室或野外现场取材。但戊二醛在稀释溶液中会自行发生一系列反应，因而固定液应尽可能新鲜配制中。

四、其它固定剂

醋酸铀（uranyl acetate）既是一种固定剂又是一种染色剂。它可以与磷酸基团反应，从而固定 DNA 和 RNA，以及含有磷酸基团的磷脂，从而对膜结构的保存有帮助。另外，它可以与蛋白中的酸性基团（如天冬氨酸残基、谷氨酸残基）和碱性基团（如赖氨酸残基）反应，从而起固定蛋白的作用。但醋酸铀不能很好得保存糖原。通常在使用了醛类固定剂和四氧化锇固定剂后，再使用 0.5-1.0%的醋酸铀水溶液，进行第三重固定。操作醋酸铀时要特别注意，尽管市售的醋酸铀放射性不强，但它仍是一种潜在的致癌物。醋酸铀应密封于棕色瓶阴凉处保存。

丙烯醛（acrolein）是一种三碳醛，含有一个醛基和一个双键。它比甲醛和戊二醛活泼，渗透组织的速度也比甲醛和戊二醛快。它可以很好地保存蛋白和磷脂，最好作为甲醛或戊二醛固定液的添加剂使用。通常使用市售密封的 100%丙烯醛液体，固定时使用的浓度小于 1%。它溶于水的速度慢，毒性很大，着火点低，储存和使用它都比上述另外两种醛类危险，非必要不推荐使用。丙烯醛非常活泼且挥发性很强，即使是操作稀释后的溶液也要格外小心，所有与丙烯醛相关的操作绝不能离开通风橱进行，并且最好有经验丰富的操作者在场指导。丙烯醛适合于固定大块的样品，植物组织或有厚细胞壁的微生物样品，以及表面覆盖有几丁质或蜡质的样品。但丙烯醛不适用于整个动物的灌注固定。

丹宁酸（Tannic acid）是一种从植物中提取的物质，泛指五倍子酸（gallic acid）糖苷或多聚糖苷。大分子很难渗透到组织中，因此电镜中使用低分子量的丹宁酸。丹宁酸既是一种强的固定剂，能固定许多蛋白以及糖类衍生物，又是一种媒染剂，能增强对重金属（如铀、铅）的吸收，从而增强样品反差，特别是细胞外膜、弹性纤维、细胞连接、肌肉纤维等。由于丹宁酸渗透速度慢，通常只用作渗透速度快的固定剂的添加剂使用。丹宁酸没有固定的用法，0.5-2.0%丹宁酸和 0.5mg/ml

皂角苷（saponin，增加丹宁酸的渗透速度）与 2.5-4.0%戊二醛一起使用可以得到良好的效果。但固定时间要延长到 3-4 小时以上，并且推荐使用醋酸铀作第三重固定。丹宁酸适用于灌注固定。

重铬酸钾（potassium dichromate）在固定中有两种作用，一是缓冲作用，二是固定作用，帮助保存脂类和糖类。在处理神经组织样品时，因为重铬酸钾能很好地保存髓磷脂，可与四氧化钼配合使用，作为第二重固定剂。但需要注意的是，重铬酸钾是一种致癌物质，应小心操作。

高锰酸钾（potassium permanganate）可以与脂类反应，增强膜结构的反差。可以保存 DNA 和糖原，但有一定的抽提作用，几乎无法固定细胞内的颗粒性或纤维状结构，可能会引入一些假象。穿透性强，适用于有厚细胞壁或蜡质层包被的植物及昆虫样品。使用时可以不加缓冲液，固定时间不宜太长，0.5-1.0%高锰酸钾溶液固定 30 分钟到 2 小时。

常用固定剂的配方

一、凝固型固定剂

1、酒精(ethyl, alcohol)

常用 95%酒精及纯酒精。酒精穿透力强，固定时间常在 1 小时以内。高浓度酒精有使材料收缩的作用。70%的酒精可作保存液。配制低度酒精必须要用普通酒精即 95%的酒精，绝不可用纯酒精。酒精为还原剂，不能与铬酸、钼酸、重铬酸钾等氧化剂配合。酒精可使核酸，蛋白质及肝糖等发生沉淀，但能溶解脂肪及拟脂。

2、铬酸(chromic acid)

铬酸是一种很好的保存剂，可以使蛋白质沉淀，组织硬化，但是容易使组织收缩，同时渗透 亦比较缓慢。一般与其它药剂混合使用，可以成为优良的固定剂。平常与醋酸合并应用，效果良好。特点：易潮解，为强氧化剂。缺点：渗透力弱，易使组织发生收缩。

3、苦味酸(picric acid)

苦味酸对于组织渗透缓慢，且能使组织强烈收缩。但可使蛋白质、核酸等沉淀，并防止过度硬化，对以后增进染色能力很大。一般很少单独使用，常与其他药剂混合使用。固定后需要用 50%或 70%酒精洗涤。特点：渗透力弱，易使组织发生收缩，易爆炸。注意事项：一般用 50%或 70%酒精洗涤。

4、醋酸(acetic acid)

醋酸为无色透明的液体，刺激性极强，冷则凝结成冰，故又叫冰醋酸。醋酸以与水和酒精配成各种比例的溶液，所用浓度为 0.2~5%，也常与其他固定剂配合使用。醋酸穿透性很强，单独使用，有使原生质膨胀的作用，故常与酒精，甲醛等合用，醋酸为固定染色体的优良固定液，因此固定染色体的固定液中，几乎都含有醋酸。特点：渗透力强，可使组织产生膨胀作用。

二、非凝固型固定剂

1、福尔马林(formalin)

浓度在 2~10%的福尔马林，为很好的硬化剂，但是渗透力薄弱，而且对材料会引起强烈收缩。所以最好与其他药剂混合使用，效果会大大增加。注意的是，它亦是一种还原剂，故不宜与氧化剂铬酸、钼酸相混。特点：很好的硬化剂，强还原剂；渗透力弱。

2、重铬酸钾(potassium dichromate)

用作固定剂的浓度 1~3%。其水溶液略具酸性，亦为一种强氧化剂。因此不能与酒精、甲醛液等事先储藏。同时为一种强烈的硬化剂，渗透力薄弱，所以很少单独使用。特点：强氧化剂，强硬化剂；渗透力弱。常与其它固定剂配合使用。

3、钼酸(osmic acid)

此物品十分昂贵，其溶液呈中性反应。是一种强烈的氧化剂，不能与酒精、甲醛液混用。钼酸是目前植物制片中一种最好的固定剂，对细胞里细微的构造能够良好的固定，并为脂肪性物质唯一固定剂。因此在线粒体及其他细胞器的研究中常常使用。经钼酸固定后，又能防止用酒精脱水时所产生的沉淀作用。但此种固定剂渗透十分薄弱，同时不易固定均匀，往往外边过度固定，而里边尚未固定完全。所以用作固定的材料应该愈小愈好。

特点：中性；渗透力极弱。电镜固定常用的固定剂；也是唯一能固定脂类分子的最好的化学固定剂。

4、戊二醛(glutaraldehyde)

特点：能与蛋白质分子的氨基和肽键连接形成交连；是最常用的非凝固型固定剂。可以部分保持酶和蛋白质的活性。固定能力比甲醛强。常用于电镜制片的固定；用缓冲液配制。

混合型固定液

混合原则：a、优缺点互补；b、膨胀与收缩相互平衡；c、强氧化剂与还原剂应分别配置。

1、酒精-福尔马林液

70% 酒精 100 ml

福尔马林 2-10 ml

固定植物一般组织，尤其用在柱头中的萌发花粉管的固定。固定后的材料，立即用作观察。通常固定 24 小时，可长久保存。

特点：不易收缩，常用于固定花粉管。

2、甲醛-醋酸-酒精液(FAA)

50% 或 70% 酒精 90 ml

冰醋酸 5 ml

福尔马林 5 ml

这个固定液在植物研究上，应用最多，为植物组织最常用的固定液。固定时间，不受限制，短为 24 小时，长可延至数月或数年。野外工作，非常便利。并且固定的材料，不妨碍染色。可用以固定植物的一般组织，但用作细胞学上的固定，不如其他一些专用的固定剂。经此液固定后的材料，可不必洗涤，直接用 70%酒精脱水。

特点：过去称“标准固定液”或“万能固定液”；是组织形态中常用的固定液；同时可兼做保存液。

3、酒精-冰醋酸液

其中常用为卡诺液(Carnoy)

纯酒精 15 ml

冰醋酸 5 ml

可用作植物组织及细胞的固定，通常固定 2—24 小时，视材料的大小而定。固定以后即用 95% 的酒精脱水；如用作细胞学上的涂片，固定后可直接回到 70% 酒精，然后进行操作。

特点：具强渗透力，作用迅速；常用于染色体压片法的固定。

4、铬酸-醋酸-福尔马林液

又名纳瓦兴液(Nawashin)。1912 年首创。常用为冷多夫(Randoph)改良液。

分为甲乙两部分，用前等量混合。

此液在植物制片上应用甚广，是细胞学及组织学上一种优良的固定液。此液原来的配方已很少应用，现所用的都是改良液，且种类很多，如材料较柔嫩，含水量较多，可用配方 I、II；材料较坚硬，含水量较少，可用 IV、V 配方，其中配方 II 对植物胚胎学制片特别适用。为了使用方便，常分别配成甲、乙两种基液，用时临时等量配合。固定时间为 12-24 小时，固定后用 70% 酒精洗涤数次。

特点：渗透慢，不能长期保存；主要用于显示分裂相。

5、精-醋酸-氯仿固定液 (Carnoy fixative)

酒精 30 毫升

氯仿 5 毫升

冰醋酸 1 毫升

可用作植物组织及细胞的固定，固定根尖和花药只需 30—60 分钟。不可在此液中放置太久（以不超过一天为宜）。

6、福尔马林-丙酸-酒精液(Johansen fluid)

福尔马林 5 毫升

丙酸 5 毫升

50%酒精 90 毫升

此液可用作固定一般植物组织。固定根尖细胞，用作染色体观察。通常固定 24 小时，也可长期保存。

7、铬酸-醋酸固定液

三氧化铬 1 克

冰醋酸 1 毫升

蒸馏水 100 毫升

用于容易渗透的材料，如丝状藻类、菌类、蕨类的原叶体等。固定 12—24 小时。此液不作保存液。

8、铬酸-醋酸-福尔马林液 (Licent fluid)

1%铬酸 80 毫升

醋酸 5 毫升

福尔马林 15 毫升

固定液中包含氧化剂与还原剂，因此，此液用时需要临时配制。通常固定 12—24 小时。

9、氯化汞-碘酸固定液 (Bensley fixative)

2.5%氯化汞水溶液 4 份

2%钨酸 1 份

此液一般可用以固定线粒体，固定 12—24 小时，水洗。

10、 铬酸钾—福尔马林固定液(Regaud fixative)

3%重铬酸钾 80 毫升

福尔马林 20 毫升

固定高等植物生长点，用以观察细胞的结构，效果良好。在植物细胞学中多采用为叶绿体的固定液。此液氧化性很强，应用时，最好临时配制。固定 2—12 小时。