

贝类标本的制作

金志良

(四川省乐山市第三中学)

软体动物是动物界中的一个大的门。大多数软体动物具有贝壳，故称贝类。进行贝类学的研究，必需根据课题的要求采集和制作标本。本文仅介绍贝类标本的制作。

一、整体标本

供分类鉴定的标本，贝壳及内脏团应保存完整。标本需用5%的福马林液固定10小时后移入70%的乙醇中长期保存，或直接以70%的乙醇固定保存。不能在福马林或福马林与乙醇混合液中长期保存，否则贝壳会被侵蚀破碎，失去研究价值。若要用两者的混合液或纯福马林保存，最好将内脏团与贝壳分别保存。易破碎的贝壳，如椎实螺、扁卷螺、蜗牛等，应保存于放有棉花的标本瓶内，以防压碎。并注意贝壳上有分类价值的色带及小棘。应在采得新鲜标本后立即记录(笔记、草图、彩图、彩色摄影等)贝壳上附着的有碍观察形态特征的异物，如藻类、水生动物及其他水生植物等，应仔细地用刷子或其他工具清除。

二、形态解剖标本

由于贝类动物体内各系统的形态构造各具特点，因此需经不同的处理和制作后才能进行解剖观察。

(一)循环、神经系统的解剖标本：需经麻醉使动物展直，以便进行观察。

1. 麻醉处理：有以下几种方法。

(1) 升温麻醉：如双壳类的河蚌，腹足类的田螺，肺螺类的椎实螺、蜗牛，均可将活标本放入清水内慢慢地加温至42℃以上，使它们的头、足伸出壳外逐渐麻醉，再用沸水或热的波恩氏液急速处死固定。若麻醉程度不够，可用镊子夹住其足部、头部，拉直螺体再急速处死。

(2) 绝氧麻醉(窒息法)：淡水、陆生和海产的贝类均可将活标本放入广口瓶内，盛满清水，排出空气，紧闭瓶口(瓶口需涂上凡士林)，在22—23℃时，经24—26小时可麻醉；在16—22℃时，需经48小时以上才能麻醉。待软体部份伸出壳外后，用探针试试，若已麻醉，可急速处死。一只瓶内可装多只标本，增加其密度，加速耗氧量，促

进麻醉速度。

(3) 药品麻醉：水面上施放薄荷脑结晶体，让其慢慢溶化扩散至水中，经14—26小时可麻醉小型贝类、胚胎及幼虫；或用1—5%古柯硷溶液、0.2—0.6%水化氯醛溶液、10—50%乙醇、1%的氨基甲酸乙脂溶液及1—4%铬酸溶液均可。麻醉头足类可用1%氢氧化氨水溶液、10%硫酸镁海水溶液及1%氯化镁海水溶液。上述药物麻醉剂，可肌肉注射，亦可浸泡，大型的标本一般肌肉注射。

(4) 复式麻醉：上述三种方法均为单一因子的麻醉，也可使用两种或两种以上的因子同时进行复式麻醉。如使用弗氯卡因和薄荷脑同时麻醉无齿蚌的钩介幼虫，效果好，用升温、减压、绝氧或再加上40毫克/100毫升的普鲁卡因麻醉椎实螺，瘤短勾蜷效果快而好。

2. 着色处理

经麻醉的动物展直、杀死、固定后，标本可直接用于解剖。但观察较小型标本或较精细的形态构造，还需着色处理。如田螺、椎实螺神经系统的标本应浸入3%的詹氏绿或2%卡红的70%乙醇液中染成淡绿或淡红色后，再进行解剖。循环系统中的动脉干或静脉干，亦可在解剖神经系统时同时进行。但应注意血管与神经的区别，神经鞘膜上具有分散的色素细胞，而血管外壁上没有这种特异标记；血管是空心的，神经是实心的，可用解剖针、毛细玻璃针或镊子探测。

3. 注射处理：软体动物循环系统的研究，一般采用心脏注射方法。宜使用新鲜或固定时间短的标本，以防血管硬化，或其中蛋白质凝集成块影响注射效果。

注射工具，应视动物个体的大小而选用。如做大型种类——蚌类、乌贼、红螺等用一般注射器；做小型种类——田螺、椎实螺、蜗牛、扁卷螺、短沟蜷，则用毛细注射针1)插入心耳、心室或动、静脉干中进行注射。

采用集成红500克、蒸馏水100毫升、甘油40毫升和福马林40毫升配成注射液，作河蚌心室注射，显示动脉系统。用普鲁士兰105克、淀粉210克、蒸馏水700毫升、甘油40毫升和福马林40毫升配成兰色注射液注射心耳，显示河蚌的静脉系统。也可用精制的中国墨汁作注射液，用脱脂胎发2)或细线在椎实螺的心耳与心室间作结扎，然后分别在两只螺体的心耳和心室进行注射，亦能显示椎实螺的动脉和静脉系统。海产的红螺、乌贼也可用上述两种不同颜色的注射液做动、静脉系统的标本。乌贼从鳃心注入红色注射液，显示动脉，从鳃静脉注入兰色注射液，显示静脉系统。

(二) 消化、生殖系统的解剖标本：因其管道和构造较简单，一般不需特殊处理。但是，齿舌的观察研究，需经5%的KOH或10%的NH₃(OH)煮沸或浸泡后流水冲洗、去掉肌肉和结缔组织，铺平展直，才易观察准确。

(三) 肌肉系统的解剖标本：要求充分麻醉展直，用70%乙醇固定保存为宜；若用甲醛液，浓度以2—3%为好，并且固定保存时间不能太久，否则肌肉变碎不利解剖。对肌层厚而坚韧的贝类标本，可在充分麻醉后，迅速以沸水杀死，再投入70%酒精固定

1) 用喷灯拉玻管，制成毛细注射针，通过直径为3毫米的橡皮管与50毫升的医用注射器相连接，将注射器固定于铁三角架上，即成自制微型注射器，

2) 婴儿头发以纯乙醇浸泡后，晾干即成。

保存。这样制作后的肌肉标本易于解剖。

三、组织学切片标本的制作

(一)标本的固定

用于切片的组织、器官，最好采用新鲜标本。根据课题的需要选择适当的固定液固定。固定液恰当与否与切片、染色有密切的关系。软体动物石蜡切片标本常用的固定液，有下面五种：

1. Bouin固定液(1897)

饱和的三硝基甲酚	15毫升
福马林	5毫升
冰乙酸	1毫升

用于组织、胚胎及细胞的固定，也可作保存液使用。一般组织器官的固定需14小时以上，胚胎标本需4小时以上。固定标本经70%乙醇冲洗至洁白，若乙醇中加入5%的碳酸锂，则可缩短冲洗脱色时间。亦可在切片后进入70%乙醇液中加碳酸锂脱色。

2. Zenker固定液(1894)

重铬酸钾	2.5克
升汞	4—7克
硫酸钠(可省去)	1克
蒸馏水	100毫升

使用时在50毫升原液中加入2.5毫升冰乙酸或2.5毫升甲醛液，pH值调至2.5为宜。标本固定14—24小时，水洗24小时。经等级乙醇过渡至70%的乙醇液中保存备用。切片脱蜡后下行至70%的乙醇液时加1%的碘脱去组织中汞化物的沉淀，经1%硫代硫酸钠水溶液脱去碘色，充分流水冲洗后，H.E.或Mallory氏三色法染色。此固定液适用于软体动物器官、组织标本。

3. Flemming固定液(1884)

铬酸1%水溶液	30毫升
锇酸2%水溶液	8毫升
冰乙酸	1—0.5毫升

本液适用于染色体、高尔基体和粒线体的固定。固定标本22—30小时，自来水流水冲洗一夜。做粒线体标本时，在冲洗前浸于重铬酸钾饱和液中进行镀铬处理，温度保持于38—40℃。

4. Mayer固定液

三硝基甲酚的饱和液	200毫升
25%硝酸	1毫升

使用时临时配制，固定4—18小时后，以70%乙醇冲洗二、三次后逐级脱水，石蜡包埋。适宜于软体动物一般器官和组织制片。

5. Carnoy固定液

100%的乙醇	60毫升
氯仿	30毫升
冰乙酸	10毫升

我们曾用此液固定中国圆田螺的生殖系统，进行组织化学的切片观察。用Hothkiss的PAS反应显示粘多糖和基础膜，Brachet的甲基绿一派郎宁法显示DNA和RNA。此液适用于组织化学制片。鉴于其渗透力很强，故针对软体动物组织柔软、多水的特点，乙醇和氯仿的比例可改为1:1，固定时间2—4小时即可。换入90%乙醇中洗6—8小时，换洗数次，移入80%乙醇中保存。苯或二甲苯透明，石蜡包埋。

(二) 标本的包埋

贝类的组织、胚胎切片标本，一般以石蜡包埋。包埋前的脱水透明，应注意软体动物的组织胚胎较柔嫩、多水的特点，因此，乙醇、二甲苯的梯度应小一点，时间也要视标本的大小、种类、室温及固定液的不同而异，一般3—30分钟均可。脱水标准以进入二甲苯和乙醇混合液中不变白为度。若标本变白或二甲苯—乙醇混合液中出现白色絮状物，应重新返回到90%至100%二级乙醇中再脱水。否则标本透蜡不好，出现空泡，影响切片质量。

螺类的嗅检器、眼球、心脏、胚胎等小型标本，应置双筒解剖镜下定向包埋，以便确定其切片的方向。包埋前可在脱水过程中用曙红单染，以便观察及连续切片时的排列和贴片。

(三) 标本的切片

软体动物切片、贴片的程序和操作方法与一般组织胚胎学的石蜡切片相同。切片厚度5—8 μ ，用于显微摄影的切片，厚度以8—12 μ 为宜。

(四) 切片标本的染色

消化道、腺体及鳃的切片，宜用Heidenhain染色法。肾脏的切片用常规的H.E.即可。性腺切片的染色用H.E.或Heidenhain法。神经、神经节的切片用甲醛液固定后，以Cajal氏染色。淡水螺类的眼球用一般固定液固定，切片脱蜡降至水中后用双氧水或过氯酸水或5%的盐酸乙醇脱去细胞色素，用镀银法染其神经纤维，用H.E.复染，或用Heidenhain法单染。淡水软体动物，如螺类的田螺、椎实螺，蚌类的无齿蚌的早期发生标本，用Heidenhain法单染，或单染后以醋酸洋红复染，追踪其细胞谱系。田螺的两型精子用Heidenhain单染，或单染后以曙红复染，亦可用Brachet的甲基绿一派郎宁法着色，头部呈绿色，尾部呈红色。胚胎发生的连续切片，可用Heidenhain、曙红、亮绿三色法着色以示胚层的分化。

四、非切片玻片标本制作

非切片玻片标本，包括涂片、压片、磨片、分离的组织、器官装片及卵、胚的整装片和连续整装片。这类玻片标本，按其保存时间，分临时性和永久性的两类。

(一) 临时性的玻片标本制作

对软体动物的部份器官、组织和分泌物如血液、精液、卵巢压碎组织，蛋白腺、唾

液腺、食道分泌物等进行临时的观察研究，可采用涂片、压片、分离等方法进行观察。活体组织、器官和卵、胚的临时玻片标本，可用0.45%的生理盐水制作。因活体标本透明，不易观察，可用0.5%的甲基绿、1%的美兰或中性红染色后观察。对直径小的受精卵及早期胚胎标本应在盖片与载片之间加粗细适度的两根玻丝，以便置显微镜下后轻轻地移动盖片，使标本在盖片与载片间滚动，观察细胞谱系和形态。如中国圆田螺的受精卵，卵径仅41—42 μ (欧洲的田螺卵径18 μ)，观察其卵裂过程和早期幼虫，即可用此法。亦可用凹玻片观察。

(二)永久性非切片玻片标本制作

1. 丙三醇制片法：将固定后的小型软体动物的器官、卵、胚胎、幼虫经1—2小时水洗后移入盛有5—10%的丙三醇液的小培养皿中，用双层纱布盖好，置于45—50的恒温箱中1—2日，使丙三醇浓缩后封片。于盖片四周用浓的加拿大树脂、石蜡、火漆或乳胶封固。也可用甘油明胶、甘油桃胶等封片剂代替丙三醇，但不经浓缩，直接用于封片。

2. 加拿大树胶制片法：经固定后的着色或不着色的卵、胚、部份组织或单个器官标本，以温热的2.5—5%的琼脂，按所需标本的方位固着于载片上，然后经等级乙醇或正丁醇逐级脱水，二甲苯透明后加拿大树胶封固成永久性制片。如田螺的卵、早期胚胎，椎实螺的卵裂标本、幼虫，河蚌及其他双壳类的钩介幼虫等可用此法制作。幼虫在固定前必须麻醉；在盖片与载片间应加适当粗细的玻璃丝，以防琼脂和加拿大树胶收缩时盖片压碎标本。

3. 贝壳磨片标本制作法：研究软体动物的贝壳必需先制成薄片，以便观察。大型贝壳的磨片，可用小钢锯按一定的方向和角度锯开后用油石或细砂轮磨至所需的厚度。小型的易碎贝壳，则需按一定角度切割成小片，用松脂贴附于毛玻璃片上，再用油石磨成薄片。用乙醇或二甲苯溶去松脂，洗净，以香柏油或加拿大树胶封片。在制片过程中必须注意贝壳的切割方向和角度，否则所显示的构造差异极大。

(上接37页)

本实验证明，麝香对青蛙离体心脏既有兴奋作用，也有抑制作用。这种不同性质的反应与自然气温或季节性温度有着十分密切的关系。Kunos等(1976)用不同温度灌流液对离体蛙心实验，产生不同的反应，进一步提供了气温对离体蛙心在夏天和冬天产生不同反应的可能性。另外，木村正康(1968)进行麝香加强儿茶酚胺效应的实验后提出，麝香作用的特征在于对 α 受体效应的选择性。而在我们的研究中，却看到了在16—20 条件下，麝香兴奋M受体，而在20—27 时，兴奋 α 受体。说明麝香对 α 或M受体的选择性作用，依赖于气温的变化。虽然这些结果还不能否定在人工控制不同温度灌流液条件下 α 受体相互转变的假设，但我们的实验结果表明，成都地区4至6月正是春夏交替的季节，在这种气温条件下，麝香对两栖无尾类冷血动物的心脏产生不同性质的反应，似乎同这些动物在冬天蛰伏，夏天活跃这种年周期性的生物学特征有一定的关系。