

## 《组织学实验技术》编委会名单

主 编	徐维蓉(上海中医药大学)
副 主 编	刘黎青(山东中医药大学) 周武雄(上海中医药大学) 李中华(广西中医学院)
编 委	(以姓氏笔画为序) 王 旭(辽宁中医药大学) 王 奕(上海中医药大学) 王强利(上海中医药大学) 王 媛(山东中医药大学) 许瑞娜(湖北中医学院) 何才姑(福建中医药大学) 张丽红(复旦大学医学院) 赵英侠(上海中医药大学) 赵爱明(湖南中医药大学) 姚 云(上海中医药大学) 葛刚锋(浙江中医药大学)

# 前 言

本书是为全国中医药院校研究生和7年制学生学习组织学实验技术而编写的专用教材。本教材是由上海中医药大学以及山东、广西、湖北、福建、辽宁等全国9所中医药大学参加编写,参加教材编写的均为上述中医药院校教学和科研第一线的教师,具有丰富的实践经验。

组织学实验技术是医学和生命科学重要的研究手段,伴随着科技进步,新的技术和方法层出不穷。从浩瀚的组织学技术中选出实用的部分,作为中医药院校7年制学生和研究生的教学内容,使学生在有限的学时内能掌握组织学技术的基本方法,为从事科研工作和撰写科研论文打下良好的基础,是编写本教材的目的。

根据中医药院校开设本课程课时相对较少的特点,本教材遵循的编写原则是:理论与实践相结合,简明、实用,并体现先进性和科学性。先进性体现在选入本教材的技术和方法能代表当前本领域内较先进的水平;实用性指选入本教材的技术和方法必须具有很强的可操作性。本书除对每一种技术方法的实验原理进行简要的叙述外,主要指导学生怎样进行实验操作、如何判断实验结果,并指出实验过程中应注意的事项。其中不乏编者多年科研工作中的实践经验。附录中介绍了一些常用试剂和缓冲液的配制、专用名词的中英文对照;彩图部分为各种实验结果的显微镜图像,可供学生在实验操作过程中参考。

希望通过本课程的学习,能提高学生独立操作的实践能力,掌握组织学实验技术的基本原理和操作,并应用于研究课题之中。在实际工作中能灵活运用所学技能,触类旁通,拓宽思路而不至于拘泥不化,以达到提高科研能力和启发创新的目的。

《组织学实验技术》一书的出版发行,得到上海中医药大学教务处和科学出版社有关领导的大力支持和帮助;在教材编写过程中得到同行专家张泽安教授的指导,研究生柯翠英等也为此书付出了辛勤的劳动,在此一并致以深切的谢意。

编写这样一本以实验操作为主要内容的教材,对我们来说是一种新的尝试,限于水平,难免有疏漏和不当之处,恳切希望得到同行以及广大读者的批评和指正。

徐维蓉

2009年8月

# 目 录

## 前言

<b>第 1 章 组织学常规制片基本技术</b> .....	1
第一节 组织学制片方法分类.....	1
第二节 组织切片标本制作程序.....	2
第三节 常用的特殊染色方法 .....	17
<b>第 2 章 组织化学</b> .....	23
第一节 核酸的组织化学 .....	24
第二节 脂类的组织化学 .....	26
第三节 糖类的组织化学 .....	28
第四节 酶的组织化学 .....	31
<b>第 3 章 免疫组织化学</b> .....	47
第一节 抗原和抗体 .....	47
第二节 样品的制备 .....	52
第三节 免疫组织化学基本原理 .....	56
第四节 免疫组织化学染色步骤 .....	60
<b>第 4 章 原位杂交组织化学</b> .....	68
第一节 原位杂交的基本原理 .....	68
第二节 原位杂交组织化学的基本程序 .....	75
第三节 常用原位杂交的操作程序 .....	79
<b>第 5 章 荧光组织化学</b> .....	88
第一节 荧光显微镜 .....	88
第二节 组织和细胞荧光分类 .....	90
第三节 生物胺荧光组织化学 .....	91

第四节	一般荧光组织化学技术 .....	92
第五节	免疫荧光组织化学技术 .....	95
<b>第6章</b>	<b>组织细胞培养</b> .....	106
第一节	组织细胞培养的基础 .....	106
第二节	常用的仪器设备与器材 .....	110
第三节	清洗、包装和灭菌 .....	112
第四节	基本培养技术 .....	115
第五节	细胞冻存和复苏 .....	122
第六节	细胞培养的污染与控制 .....	124
<b>第7章</b>	<b>电子显微镜技术</b> .....	126
第一节	透射电子显微镜技术 .....	126
第二节	扫描电子显微镜技术 .....	132
第三节	免疫电子显微镜技术 .....	136
<b>第8章</b>	<b>激光扫描共聚焦显微镜技术</b> .....	143
第一节	激光扫描共聚焦显微镜概述 .....	143
第二节	激光共聚焦显微镜的基本功能 .....	145
第三节	荧光探针的选择 .....	147
第四节	激光扫描共聚焦显微镜技术在医学研究中的应用 .....	150
<b>第9章</b>	<b>显微图像分析技术</b> .....	158
第一节	显微图像分析系统的基本原理 .....	158
第二节	显微图像分析系统的结构 .....	159
第三节	显微图像分析的基本程序 .....	160
<b>附录1</b>	<b>实验室常用试剂及缓冲液的配制方法</b> .....	165
<b>附录2</b>	<b>英汉名称对照表</b> .....	176
<b>附录3</b>	<b>汉英名称对照表</b> .....	181
<b>参考文献</b>	.....	186

# 第 1 章

## 组织学常规制片基本技术

组织学是研究机体微细结构及其相关功能的学科,是一门医学基础学科。随着科学技术的发展,组织学的研究方法在不断的改进。组织学的发展与组织学技术的不断革新是分不开的。近年来,从标本的制作方法到显微镜技术都获得了很大的发展。但是,对组织采用固定、切片和染色,应用光学显微镜观察组织结构,仍然是组织学教学和科研中重要的基本方法。

大部分生物学标本或医学标本在活体状态下多为无色透明,光波通过这些被检物时,其波长和振幅不发生改变,所以在一般光学显微镜下看不出其组织结构。而且组织一旦离开机体后很快就会死亡和自溶,其结构就失去正常状态,所以必须对组织采取固定、切片和染色措施。由于组织内部结构的不同,在嗜色性能上有所差异,光波通过染色后的组织时,由于不同颜色在吸收程度上的不同,波长和振幅发生改变,在显微镜下会呈现不同的折光率,从而在显微镜下能清晰地观察其组织结构,这种操作技术称为组织学技术。

制作一张适合在显微镜下观察的切片,对机体组织结构的认识是非常重要的。因此,组织学制片技术是一项非常重要的基本技术,已广泛应用于众多的学科领域,是组织学、病理学、肿瘤学、植物学和法医学等各学科用于研究、观察细胞生理、病理形态变化的主要方法。

### 第一节 组织学制片方法分类

组织学制片方法种类繁多,可分为两大类:切片法和非切片法。

#### 一、切片法

切片法种类较多,包括石蜡切片、冰冻切片、火棉胶切片、电镜技术的超薄切片等,是研究组织学的基本方法。从动物或人体取下的新鲜组织块,要经固定、脱水等处理后,用石蜡、火棉胶、树脂等包埋成一定厚度的包埋块,再经过切片、染色和封片等过程,即可制成组织切片标本。

#### 二、非切片法

即不经过切片等步骤而制成组织切片标本的方法。此类方法操作简单迅速,可根据制片的需要进行选择。常用的方法有:

1. 涂片标本 适用于血液、骨髓、腹水、培养细胞的观察等。
2. 磨片标本 适用于较坚硬的材料。如不经脱钙的骨或牙齿,要用砂轮等将其磨

成薄片。

**3. 铺片标本** 适用于疏松结缔组织和肠系膜等材料,取下后直接放于载玻片上铺开,经固定、染色等步骤后,进行观察。

**4. 活体标本** 适用于观察精子运动、细胞吞噬等活动的材料。

**5. 分离标本** 适用于观察单个完整的细胞。如观察三种肌细胞、神经纤维等。分离时将小块组织浸于化学药品内,溶去细胞间质,经振荡使细胞分离。

**6. 整体封藏标本** 适用于观察无脊椎动物的草履虫、脊椎动物的胚胎材料如鸡胚等。材料经固定、脱水、染色等方法后就可封藏于盖玻片和载玻片内加以观察。

**7. 组织印片** 适用于观察未经固定的新鲜组织小块,如手术后的肝、脾等软组织,将材料压印在载玻片上,经固定后再进行染色、观察。

## 第二节 组织切片标本制作程序

石蜡切片是研究组织学最为广泛应用的基本方法。石蜡切片的制作需经过标本取材、固定、洗涤、脱水、透明、包埋、切片、染色和封固等步骤,整个过程需要数日,做出的标本可以长期保存和使用。

### 一、动物致死和取材

处死动物的方法有很多,如麻醉法、空气栓塞法、断头法、股动脉放血法等。在处死动物时,无论采用哪种方法其主要关键是使动物迅速死亡,尽量避免使动物长时间陷于痛苦和濒于死亡的状态,以免使组织细胞成分、结构发生变化,引起病理假象。动物一旦死亡其组织与细胞就会开始自溶,使组织发生变形和死后变化,所以应立即取材。所取材料愈新鲜愈好,取下的材料必须马上投入固定液固定。

组织取材也是制片过程中一个非常重要的步骤,必须根据教学或科研的具体要求来选取材料的来源和部位,否则难以观察到完整的组织结构。在操作时要求做到:

**1. 材料新鲜** 要在动物致死后立即进行,搁置时间过久会因发生死后变化而使蛋白质分解变性,导致细胞自溶及细菌的滋生,从而失去组织活体时的结构。

**2. 组织块的大小** 既要保证组织的完整,又应力求小而薄,组织块厚度一般为2~3 mm,长度小于8 mm为好,太大的组织块不利于固定液迅速而均匀地渗入组织内部。

**3. 组织块的切面** 切面要平整,此外还应熟悉各器官组织的结构,根据观察目的决定切面(纵切还是横切)。

**4. 保持材料的清洁** 组织块上如有血液、黏液、粪便等污物时,应先用生理盐水冲洗干净,然后再进行取材、固定。

**5. 防止人为因素的影响** 取材用的刀剪器械必须锋利,避免用钝刀前后拉动或用力挤压组织。取材时应用镊子(不要使用有齿镊)夹持组织周围的结缔组织,凡用镊子夹过的或用手压过的地方均不可用,尽量保持组织的原有形态。

## 二、固定和固定液

### (一) 固定的目的和意义

制作标本的关键在于取材后尽可能接近活体的正常状态。机体死亡或组织离开机体后,细胞会逐渐死亡,如果不立即处理,则细胞内的酶(水解酶)会使蛋白质分解为氨基酸渗出细胞,使细胞溶解破坏,结构消失,因此不利于形态学的观察。在无冷藏条件的情况下,更可因其病原微生物的迅速繁殖而腐败。为防止组织成分的自溶、消失,必须使其转变为不溶性的物质以便于保存,因此需要对组织立即进行固定。所谓固定,即借助化学试剂使组织和细胞中的有机和无机成分凝固或沉淀,停止发生死后组织变化,尽量保持其活体状态的过程。用于固定组织的化学试剂称为固定剂,由固定剂配制的溶液称为固定液。

固定可防止细胞发生自溶或组织变化,使细胞内的蛋白质、脂肪、糖、酶等各种成分转变成不溶性物质;固定除了可保持组织和细胞与正常生活时的形态相似,还可使组织中的各种物质沉淀和凝固起来而产生不同的折射率,造成光学上的差异,有利于组织着色和染色后的鉴别与观察;固定过的组织还有利于切片的进行,因为固定液兼有硬化作用,可使组织硬化,增加组织硬度,因此便于组织切片;固定还可防止细胞过度收缩或膨胀而失去其原有的形态结构;有的固定液还具有媒染作用,如重铬酸钾、铬酸等,媒染可使细胞易于着色。及时和适当的固定对于准备用于做免疫组织化学或原位杂交的标本是非常重要的,它可使组织细胞的抗原性、DNA、RNA 等不被破坏。

### (二) 固定的方法

根据需要进行固定的组织的大小、性质等的不同,应选用不同的固定方法,常用的固定方法有:

**1. 浸泡固定法** 将切取的小块材料,直接投入固定液中固定。此种方法取的组织块不宜过大过厚,否则固定液不能迅速渗透,特别是某些致密组织的中央部分,待固定液完全渗透,其中央部分的细胞可能已经变性,影响固定的效果。

**2. 注射、灌注固定法** 某些组织块由于体积过大或固定液极难流入内部或需要对整个脏器或整个动物进行固定,就可采用注射或灌注固定法。固定时将固定液直接注入动物的血管,经血管分支到达整个组织或全身,从而使之得以充分的固定。

**3. 蒸汽固定法** 一些比较细小而薄的标本,可用钒酸或甲醛蒸汽固定。此法主要用于血液或细胞涂片、印片以及某些薄膜组织的固定。

### (三) 固定剂的性质

固定剂的种类很多,有的是还原剂,有的是氧化剂,它们对组织的固定作用各有优缺点,但无论是哪种固定剂,都以具备下列性质者为佳:

(1) 具备较强的渗透力,能较迅速地渗入组织内部,使组织保持与活体时相似的状态。对组织各部分的渗透力相等,使组织内外完全固定,便于保存。

(2) 尽可能避免使组织过度膨胀或收缩而变形,不至于因固定引起人为的改变。

(3) 能迅速使细胞或组织中的成分(糖、蛋白质等)凝固成不溶性的物质而保存下来。

(4) 能使组织达到一定的硬度而适于制片,但又不能使材料太坚硬而变脆;还能增加细胞内含物的折光程度,易于鉴别。

(5) 具有一定的媒染作用,增加组织的染色能力。

#### (四) 固定液的种类

固定液根据其组成可分为两大类:单纯固定液和混合固定液。单纯固定液由一种固定剂组成。单纯使用某一种固定剂往往不能将组织的各种成分保存下来,因而种类较少。混合固定液由两种或两种以上的固定剂混合而成。因为各种固定剂的作用均有选择性,其渗透力也各不相同,对组织的收缩和膨胀作用也不同,将不同的固定剂混合使用,相互弥补不足。配制混合固定液时氧化剂和还原剂一般不联合使用,但也有例外的(如氧化剂和还原剂混合固定液,但要求在临用时配制)。

##### 1. 单纯固定液

(1) 甲醛。甲醛是最常用的一种单纯固定液。它是一种易挥发、有强烈刺激性气味的气体。商品名称为福尔马林,是甲醛的水溶液,最高饱和度为 36%~40%。固定液常用浓度为 4% 甲醛(即 10% 福尔马林)。配制百分浓度时,将甲醛水溶液的饱和量(如 40%)视为 100%,如配 10% 福尔马林溶液,则取 10 ml 甲醛饱和液加水 90 ml 混合即成。甲醛渗透力强,对组织收缩少,固定均匀。甲醛是通过与蛋白质结合而对蛋白质发生固定作用。它除了对蛋白质有固定作用外,还可以保存脂类脂质、神经和髓鞘、高尔基复合体、线粒体等,是一般制片常用的固定液。经甲醛固定的组织,细胞核染色甚佳,但胞质着色较差。甲醛除单独使用外,还常与其他试剂配成混合液,其固定效果更佳。甲醛本身是一种还原剂,易被氧化成甲酸,所以一般不能与铬酸、重铬酸钾、四氧化钼等氧化剂混合。用 10% 甲醛液固定小块组织数小时即可,时间稍长也无关系。但固定时间过长会产生沉淀,所以一般材料不主张长期固定在甲醛溶液中,固定后也需用流水长时间冲洗。

(2) 乙醇。又名酒精,是一种无色的液体,可与水在任何比例下相混合。一般用作固定液的乙醇浓度为 80%~95%。乙醇兼具固定、硬化、脱水等多种功能,在制片过程中用途很大。乙醇渗透力较弱,固定速度较慢。乙醇能沉淀白蛋白、球蛋白和核蛋白,但核蛋白被沉淀后,仍能溶于水,故经乙醇固定的组织,细胞核的着色不好。浓度为 50% 以上的乙醇能溶解脂肪和类脂,又能溶解血色素及损害其他色素,所以要证明细胞内的脂肪、类脂及色素的存在,不能用乙醇做固定液。乙醇本身是一种还原剂,很容易被氧化为乙醛,再变成乙酸,所以不能与重铬酸钾、铬酸、钼酸等氧化剂混合。

(3) 氯化汞。又名升汞,为白色粉末或针状结晶。作为固定液使用时通常使用其饱和和水溶液,在室温的水中饱和度为 5%~7%。氯化汞渗透力较慢,适用于固定薄块的组织。能沉淀各种蛋白质,使其变性而不溶于水。对脂类和碳水化合物则无固定作用。氯化汞对酸性染料有亲和力。经氯化汞固定的组织,一般在组织中都有汞盐的沉淀,固定后需流水长时间冲洗。最好是用脱汞方法将汞盐沉淀彻底除去。脱汞方法见固定后的处理。氯化汞系剧毒药品,必须严格保管,使用时应注意安全。

(4) 醋酸。醋酸是一种无色透明,有刺激气味的气体,在室温低于 17℃ 以下会结成冰状结晶,故又名冰醋酸。使用时如呈冰状,应连同容器,置于 37℃ 恒温箱中待溶化后再应

用。用作固定液的醋酸常用浓度为5%的溶液。醋酸渗透力强,对一般蛋白质和脂类没有固定作用,也不能保存糖类,但它对核蛋白有明显的沉淀作用,对染色质固定良好,因此所有固定染色体的固定液中几乎都有醋酸。醋酸能使组织特别是胶原纤维膨胀,因此醋酸一般不单独作为固定剂使用。它和乙醇等一起使用可以减弱或抵消固定液对组织的收缩作用。醋酸的酸性还可停止细菌和酶的活动,可避免组织的自溶现象。经单纯醋酸固定的组织,可不经水冲洗,直接进入酒精脱水。

(5) 苦味酸。苦味酸为黄色结晶体,是一种强酸,在空气中能自行燃烧,在密闭条件下会发生爆炸。为使用安全起见,常以饱和水溶液保存。苦味酸能沉淀蛋白质,并溶解黏蛋白使固定的组织较柔软,所以在制作较硬的组织(如皮肤和肌腱等)切片标本时多采用含苦味酸的混合固定液。苦味酸渗透力慢,一般很少单独使用。

其他常用的单纯固定液还有重铬酸钾、铬酸、四氧化钼、丙酮等。

## 2. 混合固定液

(1) Bouin 液。Bouin 液是一种常用的良好固定液,渗透力强,对组织固定均匀,收缩少,对苏木精和伊红都易于着色,染色效果好。其中的苦味酸能使组织适当硬化,并能沉淀一切蛋白质,使之不溶于水,但其对组织有收缩作用,渗透力较弱;而冰醋酸、甲醛穿透力较强,且冰醋酸能固定染色质,可使组织膨大,所以相互配合在一起就成为较好的固定液。一般组织固定12~24 h为宜,较长时间固定也无妨。固定后可加入70%酒精洗去苦味酸的黄色,在脱水时经各级浓度酒精时还可进一步洗去黄色。组织中即使留有少量苦味酸的黄色,对一般染色并无影响。

配制方法:苦味酸饱和水溶液75 ml、甲醛25 ml、冰醋酸5 ml。此液需临时配制。

(2) Zenker 液。Zenker 液中的铬酸、冰醋酸和氯化汞对组织都有固定作用。铬酸是由冰醋酸加入后使重铬酸钾酸化而产生的。铬酸和氯化汞均为蛋白质和染色质的沉淀剂;冰醋酸也是染色质的沉淀剂;铬酸还可防止氯化汞对组织的过度硬化,冰醋酸也可减少组织被铬酸收缩的倾向,并可抵消铬酸渗透慢的缺点。Zenker 液是组织学、细胞学及病理学常用的固定液,多用于固定一般组织,能使细胞核和细胞质染色较清晰。固定时间12~36 h,加热固定可以加快渗透作用,缩短固定时间。固定后流水冲洗12 h,并在以后的脱水过程中需进行脱汞(方法同氯化汞固定的脱汞)。

配制方法:氯化汞5 g、重铬酸钾2.5 g、冰醋酸5 ml、蒸馏水100 ml。配制时将氯化汞、重铬酸钾和蒸馏水混于烧杯中,加热至40~50℃使其溶解,冷却后过滤,贮存于棕色瓶中。临时取贮存液95 ml,加入冰醋酸5 ml,即可配成Zenker液。

(3) Carnoy 液。Carnoy 液中的酒精可固定各种蛋白质、糖原,并有脱水、硬化作用。冰醋酸能使核蛋白沉淀,对染色质固定良好,对组织有膨胀作用,可防止组织的硬化,抵消因酒精引起的组织过度收缩。氯仿可增加渗透力。此液渗透迅速,能较好地固定细胞和染色质,尤其适宜于染色体的显示。一般固定4~6 h,小块组织固定1~2 h即可。固定后可不经水洗,直接进入95%酒精或纯酒精中脱水,从而可缩短切片制作时间。

配制方法:纯酒精60 ml、冰醋酸10 ml、氯仿(三氯乙酸)30 ml。

(4) 中性甲醛液。此固定液是固定人体组织和动物组织的常用固定液,固定效果较单纯甲醛液要好。

配制方法：甲醛(40%)120 ml、蒸馏水 880 ml、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )4 g、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )13 g,其 pH 为 7.0。

其他常用的混合固定液还有甲醛-乙醇固定液、Helly 固定液等。

### (五) 固定后的处理

固定后的组织材料一定要除去留在组织内的固定液及其结晶沉淀,特别是陈旧性标本更应注意流水冲洗,尽可能减少组织中的酸性程度和甲醛色素等。充分的洗涤有利于脱水、切片、染色的进行以及对结果的观察等。对于经不同固定液固定的组织,应正确选用不同的洗涤方法,才能达到充分洗涤的目的。

**1. 用水配制的固定液** 固定后用流水冲洗,可使组织中的固定液随时溢出和随时洗去。冲洗时间基本根据固定时间长短而定。新鲜标本固定时间短,需及时脱水者,冲洗时间短;对固定时间较长的组织就必须长时间冲洗。冲洗方法是將组织块放入广口瓶中,瓶口用纱布罩住并用绳系牢。将广口瓶置于自来水龙头下,龙头上可接一段橡皮管,并将另一端插入瓶底,使水从瓶底缓缓流出而更新。冲洗时应注意水不能过急,防止冲坏组织的完整性。对小动物组织以及脑组织等,应以浸泡为主,这样既能达到冲洗的目的,又不至于损害组织。浸泡时间根据不同情况而定。

**2. 含乙醇的固定液** 用乙醇或乙醇混合液固定的组织,一般不需要冲洗,如需冲洗则必须采用与固定液中的乙醇浓度相近的乙醇冲洗,不可用水冲洗,也不可浓度相差很大的乙醇冲洗。

**3. 特殊固定液** 对于用特殊固定液固定的标本,可选用特殊的洗涤法进行洗涤。

(1) 苦味酸。用苦味酸固定的组织需用 50%或 70%乙醇浸泡。苦味酸所留的黄色,在 70%乙醇中可自行脱去。不能完全脱去的,在以后制片脱水中经各级乙醇也会逐渐消失,即使留有少许黄色在组织中也无妨,对一般染色并无影响。

(2) 氯化汞。用氯化汞固定的组织内常有一种沉淀生成,必须除去,否则会使组织发脆或染色不良。方法是用 0.5%碘酒溶液(70%乙醇配制)逐渐反复加入 70%乙醇中,直至乙醇因加入碘的黄色不褪去为止,此时表示组织内氯化汞已完全洗去。最后用硫代硫酸钠洗去碘或用 70%乙醇洗去碘。

### (六) 注意事项

(1) 固定要及时。材料取下后应立即固定,尽量保持与活体时的结构相似。这是制作一张结构清晰、染色效果良好的切片的基础。新鲜组织固定后,或多或少会产生收缩现象,有时甚至会变形。对于一些容易收缩变形的组织,如神经、肌肉、皮肤组织等,可将其两端用线扎在木片上,将组织展平,进行固定。含气而浮于液体表面的组织如肺等,可缚以重物或吸出肺内气体,使其下沉于固定液内。

(2) 组织块的大小要合适,太小可能会使组织的结构不完整,太大的组织块不利于固定液迅速而均匀地渗透到组织内部。

(3) 应有足够的固定液,一般与组织块的比例为 20 : 1,容器勿过小,组织勿过多。避免组织内水分在固定时渗出,影响固定液的浓度,勿使组织粘于瓶底或瓶壁,以免影响固定液的渗入。

(4) 固定时间要合适。因固定液的性质及渗透力的强弱、组织块的大小而不同,固定时间一般不能超过所规定时间,以免组织过度硬化或收缩,不但切片困难,还会影响染色。如 Carnoy 液硬化作用强,固定只需数小时;Bouin 液硬化作用较弱,固定时间较长亦无妨。

(5) 要进行促使固定。在固定期间轻轻地搅动组织或摇动盛器使组织移动有利于固定液的渗透,适当提高固定液的温度也可缩短固定时间。

(6) 选择合适的固定液。如选用不恰当的固定液会引起细胞内成分不同程度的损失,因此,根据教学或研究的目的选择不同的固有液是非常关键的。

(7) 一次取材数量较多时,对取材的部位和顺序进行编号是非常必需的,并及时做好记录。

### 三、脱水

#### (一) 目的

经固定和洗涤后的组织内会含有大量的水分,如不除去水分就无法进行透明和浸蜡包埋。因为用作透明剂的二甲苯和水是不相溶的,用作包埋剂的石蜡也是非水溶性物质。水分不脱尽,透明剂和石蜡等就无法渗入组织,所以组织在透明前必须经过脱水这一环节。脱水就是用某些溶剂逐步将组织块内的水分置换出来的过程,使用的试剂称为脱水剂。

脱水剂有非石蜡溶剂的脱水剂(如乙醇、丙酮等)和脱水兼石蜡溶剂的脱水剂(如正丁醇等)之分。无论何种脱水剂都能与水以任意比例溶合,可根据不同的需要选择使用。只有脱水剂把组织中的水分彻底脱去,才能得到较好的制片效果。目前在病理诊断和实验性动物研究中,较多采用乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡浸透组织的制片方法。

#### (二) 脱水剂的使用方法

**1. 乙醇** 是最为常用的脱水剂。乙醇脱水能力强,既能与水相混合,又能与透明剂相混,并且可使组织硬化,便于切片。但其缺点是穿透组织的速度快,且容易使组织收缩、变脆。为克服这一缺点,在一般脱水过程中,应采用循序渐进的方法,逐步升级,经一系列的不同浓度的乙醇,使组织中的水分逐渐被乙醇所代替。脱水一般可从 50%乙醇开始,依次经过 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇和 100%乙醇。为使组织脱水彻底,应将 95%乙醇分为两节,无水乙醇分为三节进行。对于容易变脆的组织 and 胚胎组织等,可从更低浓度的 35%乙醇开始,避免引起组织的过度收缩。

商品乙醇中有 95%和 100%两种浓度,100%乙醇是从 95%乙醇蒸馏而来,比较贵,所以往往都采用 95%乙醇来配其他各级浓度的乙醇。

简便的乙醇稀释法:无论任何浓度的乙醇稀释时,需稀释到多大浓度就取多少毫升乙醇,然后用蒸馏水加至该乙醇原有浓度即可。例如,将 95%乙醇稀释为 70%浓度时,取 95%乙醇 70 ml 倒入量筒内,然后加入蒸馏水定容至 95 ml 即可。

**2. 丙酮** 脱水作用比乙醇强,但对组织块的收缩作用较大,价格也较高,一般少用。主要在快速脱水或固定兼脱水时多用。

**3. 正丁醇** 脱水能力较弱,但能与水、乙醇及石蜡相混合,所以经正丁醇脱水的组

组织块可直接浸蜡包埋。这种脱水剂兼透明剂的最大优点是很少引起组织块的收缩与变脆。正丁醇在使用时易挥发,吸入后会引起头痛,所以使用时应注意安全。

### (三) 脱水时间

脱水时间应根据组织块的大小、性质和类型而定。组织在 100%乙醇中脱水时间不能过长,否则容易使组织过度硬化变脆,切片困难。特别是肝、脾、肾、膀胱及肌肉等组织脱水时间不能超过 2~4 h。此外,脱水的时间还与固定液的种类有关,含苦味酸固定的组织在乙醇中时间过久也无妨,但经铬化的组织在乙醇中脱水的时间应尽量减少,否则组织会变脆变硬。

### (四) 注意事项

(1) 脱水的方法很多,无论何种方法最重要的是不能骤然进行,也不能操之过急,否则可引起组织强烈收缩,或使组织发生变形,从而得不到满意的切片。

(2) 脱水必须彻底,组织块只有脱水充分才能在透明剂中有良好的透明,也利于以后的染色。应注意的是脱水必须在有盖子的瓶子中进行,尤其是高浓度乙醇很容易吸收空气中的水分,阴雨天、空气湿度较大时更应注意。

(3) 脱水剂的用量不能太少,应为组织块总体积的 5~10 倍以上,并应及时更换。

## 四、透明

### (一) 目的

在切片的制作过程中先后有两次透明,第一次是脱水以后组织块的透明,第二次是染色以后切片的透明。组织块透明在制片过程中是很重要的环节,其目的是便于浸蜡包埋的操作,所以应尽可能使组织块达到透明状态;切片透明的目的是有利于光线的透过,便于显微镜的观察。

组织块进行脱水的根本目的是为了让石蜡渗透入组织内部而为包埋做必要的准备,但实际上组织块经脱水后还不能直接用石蜡包埋。因为脱水后的组织块内含有酒精等脱水剂,而大多数脱水剂不能与石蜡相溶,还需要用能与脱水剂和包埋剂都相溶的媒浸液。这些媒浸液能逐渐渗入组织最终将脱水剂完全排出。媒浸液渗入之后,组织块会变得透亮,呈透明状,这一过程称为透明,所用的媒浸液称为透明剂。常用的透明剂种类很多,如二甲苯、甲苯、苯、香柏油、氯仿等。二甲苯透明能力强,是最常用的透明剂。石蜡切片染色前的脱蜡剂和染色后的透明剂也常用二甲苯,因为经二甲苯透明的切片不容易褪色。

### (二) 透明剂的使用方法

二甲苯是一种无色透明的液体,容易挥发。其透明能力强,但易使组织收缩、变脆,所以组织块在二甲苯中不宜久留,特别对小动物组织材料透明的时间必须严格控制好。

组织块的透明时间应视其大小而定。小块组织一般透明 30 min 左右,如组织块较大,透明时间可延长至 1 h。为使组织块透明彻底,应将二甲苯分为两节,每节 15~30 min。具体时间可根据透明时间和肉眼判断透明程度相结合来决定。

### (三) 注意事项

(1) 透明剂的用量不能太少,应为组织块总体积的 5~10 倍以上。

(2) 透明过程中使用的器材(如镊子等)必须干燥,不得将水滴带入二甲苯中。水会使二甲苯变浑,并会被组织吸收而影响透明程度,潮湿天气更应引起注意。

(3) 若组织块进入二甲苯时出现浑浊或组织块局部不能透明,呈白色浑浊状,表示脱水不彻底,应从多方面查找原因,如组织太厚、透明时间不够,以及与某些组织本身性质有关等,遇到这种情况则必须退回,用脱水剂彻底脱水后再进行透明。

(4) 有的组织如肌肉、肌腱、软骨、皮肤、头发及眼球等,不宜用二甲苯透明,因二甲苯会使组织变得过硬而不易切片。

(5) 二甲苯是一种易挥发的有毒气体,长期接触对呼吸道黏膜等有刺激作用,所以在使用时应在盛二甲苯的容器上加盖盖子。

## 五、浸蜡和包埋

### (一) 目的

组织透明后,在溶化的石蜡中浸渍的过程称为浸蜡。浸蜡是为包埋做准备,因为透明剂具有与石蜡相溶的性质,所以将已透明的组织块投入溶化的石蜡中,石蜡便会浸入组织,从而达到除去组织中的透明剂而代之以石蜡的目的。石蜡渗入组织后,可起到充分的支持作用,并可使组织内部硬度均匀,便于切出完整的切片。

组织块经过浸蜡后,将组织块埋入石蜡等包埋剂中的过程称为包埋。包埋块可使组织达到一定的硬度和韧度,有利于切片。

### (二) 方法

经二甲苯透明的组织块,用冷风稍干后应立即投入到液体石蜡中。为了使石蜡充分渗入到组织块内,在浸蜡时必须经过数次纯石蜡(石蜡Ⅰ、Ⅱ)。为使浸蜡更充分,还可以先入1/2石蜡(1/2石蜡+1/2二甲苯)后,再浸入纯石蜡。浸蜡应彻底,使石蜡中存有的剩余透明剂完全除尽,以免影响切片的质量。

浸蜡要掌握适宜的温度,应在恒温箱中进行。浸蜡时间可根据不同组织类型及其大小而定,基本上与组织固定时间成正比。

石蜡是组织制片技术中应用最为广泛的包埋剂。石蜡有高熔点和低熔点之分,一般应用熔点为56~58℃的石蜡。恒温箱的温度要控制在比石蜡的熔点高2~4℃左右。恒温箱温度过低,石蜡会凝集,则达不到浸蜡的目的;温度过高,则会使组织块出现收缩。在某些情况下,如对酶等进行染色时,则需采用熔点在52~56℃的低熔点石蜡包埋,从而可以保存组织内酶或抗原的活性。

包埋前,所用的石蜡必须已在恒温箱中溶化。包埋前还必须制作好包埋器。包埋器有用光亮且较厚的纸折叠成的小长形盒或金属包埋框等。包埋时,先在包埋器内倒入溶化的石蜡,然后用加温的镊子将浸过蜡的组织块置于其内;待石蜡的表层凝固时即可将包埋器迅速放入冷水中冷却,以加速石蜡的凝固;等石蜡完全凝固变硬后,便可将蜡块从包埋器中取出。

### (三) 注意事项

(1) 浸蜡用的石蜡不能太少,应为组织块总体积的5~10倍以上。

(2) 组织块在更换蜡杯时要有一定的时间间隔,尽量不要将组织内含有的二甲苯带入最后的纯石蜡中,从而影响浸蜡的程度。

(3) 包埋时,在放入组织块时应注意组织的切面朝下并放平整,皮肤、囊壁、血管壁等应垂直于包埋器的底面包埋。包埋的组织块较多时,各组织块放入包埋器的同时应进行编号,以防错乱。

(4) 包埋用的石蜡温度不宜过高,以免损伤组织;过低则使组织和石蜡不适宜而影响切片。包埋用的石蜡还必须干净,避免因杂质而影响切片的质量,并且可能损伤切片刀。用新蜡和旧蜡混合溶化沉淀后得到的干净蜡包埋是较为理想的做法。

(5) 包埋时应点亮酒精灯,夹取组织块的镊子应随时烤热,以免石蜡凝结后黏附在镊子上,造成蜡块凝固而影响包埋质量。

(6) 包埋操作要迅速。组织块从浸蜡杯中取出置于包埋器中的时间间隔应尽量缩短,避免在空中停留过久,使组织表面的石蜡凝固。若包埋器中的石蜡不能溶化组织表面的凝固层,则可形成与包埋蜡分离状态,切片将无法进行。另外也应避免先前已溶化的石蜡在组织块尚未埋妥前已凝固。

(7) 包埋后的蜡块应呈均质半透明状。若包埋后发现浸蜡不够,或包埋效果不佳,可将蜡块溶化,重新浸蜡和包埋。

## 六、组织块脱水、透明、浸蜡的时间安排

**1. 脱水** 经水洗的组织从 50%乙醇开始(也可从 70%乙醇开始),依次经过 70%、80%、95% I、95% II、无水乙醇 I、无水乙醇 II。每一级乙醇脱水时间约为 30 min。具体可根据组织块大小适当缩短或延长。

**2. 透明** 二甲苯 I、II 各 15~30 min。

**3. 浸蜡** 最好先入 1/2 石蜡(含 1/2 二甲苯),然后再入石蜡 I、II,这样可将组织内剩余的二甲苯尽量除去,浸蜡总时间以不超过 1 h 为宜。

## 七、组织切片

组织块包埋后,用切片机将蜡块切成薄片的过程称为组织切片。石蜡切片的一般厚度为 5~10  $\mu\text{m}$ 。

### (一) 切片机

切片机是制作组织切片标本必备的精密仪器。从 18 世纪组织切片机问世起,至今已有了很大的发展。切片机可分为三类,石蜡切片机、火棉胶切片机和冰冻恒冷箱切片机。其中的石蜡切片机和冰冻恒冷箱切片机在教学、科研和病理诊断中较常用。

**1. 石蜡切片机** 能将经石蜡包埋的组织块切成薄片的切片机称为石蜡切片机。石蜡切片机通常是指轮转式切片机,具有使用方便、快速的特点。其主要有刀座和刀架、组织块夹持器、切片厚度调节旋钮、持刀架前后移动调节轮、标本推进手轮、手轮锁定装置、切片机底座等部件组成。

石蜡切片机能够切出以微米为单位的薄片。轮转式石蜡切片机是靠旋转一个重轮,

带动齿轮,齿轮上每一齿牙代表 $1\mu\text{m}$ 。齿轮既受重轮带动又受切片厚度微动装置的控制。如需切 $5\mu\text{m}$ 厚的切片,就将带刻度的切片厚度调节器上的数字调节到5字处(一般每一数字代表 $1\mu\text{m}$ )。切片时,转动标本推进手轮,每转动一周,标本固定台就向切片刀侧移动 $5\mu\text{m}$ 厚度的距离,同时还垂直下降上升往返一次,于是就可得到一张 $5\mu\text{m}$ 厚度的组织切片。由于装置蜡块的机头同时做上下垂直运动与水平前行运动,蜡块与切片刀每接触一次,就可得到一张切片,机轮连续转动,就可获得一条连续的蜡带。

**2. 冰冻恒冷箱切片机** 冰冻恒冷箱切片机是形态学教学和科研必备的设备之一。此类切片机主要用于组织不经过石蜡、火棉胶等包埋而直接进行切片的组织。由于冰冻切片制片时,组织不需要经过脱水、包埋等处理,制片时间短。常规的石蜡包埋能改变组织内的化学反应,甚至使细胞内的酶或其他可溶性物质如脂类等完全消失,而冰冻切片对组织样本中的脂类成分和某些酶类物质等保存较好,所以在酶组织化学、免疫组织化学、原位杂交、原位 RT-PCR 等的生物组织样品的制片以及临床活检中被广泛应用。

冰冻恒冷箱切片机实际上是装有切片机的低温冰箱,切片机的操作控制柄在恒冷箱的外面,主要有制冷系统和切片系统两部分构成。制冷系统包括恒冷箱和样品冷却系统;切片系统与石蜡切片机基本相同。一般恒冷箱冷却系统的温度范围为 $-35\sim 0^{\circ}\text{C}$ 。样品冷却系统的温度范围为 $-50\sim -10^{\circ}\text{C}$ 。切片厚度在 $0\sim 60\mu\text{m}$ 范围内调整,能适应对各种组织冰冻切片的需要。除标本的冰冻、固定在切片机内操作外,大部分操作都可在切片机外进行,所以使用起来也很方便。

## (二) 石蜡切片方法

组织切片是整个制片过程中非常关键的一步。制作高质量的切片,不仅要有精良的仪器等设备,更重要的是应具备熟练的操作技术。

石蜡切片法为常用的切片方法,切片厚度一般为 $5\sim 10\mu\text{m}$ 。在进行切片操作前,应准备好切片需使用的工具。工具包括磨好的切片刀、毛笔、盛蜡片的托盘、镊子等。

### 1. 切片方法

(1) 切片前将蜡块从包埋器中取出并进行修整。包埋好的蜡块,用刀片根据组织的大小,切去边缘的余蜡,但应在组织的外围保留 $0.2\text{cm}$ 左右的蜡边,以便连续切片。

(2) 将修整好的蜡块安装到持蜡器上。安装时,可在蜡铲上加一些碎的石蜡,将蜡铲在酒精灯上加热,待石蜡溶化后,先倒一部分溶化的石蜡于持蜡器上。将烧热的蜡铲放于蜡块和持蜡器之间,当蜡块底部略溶化后立即抽掉蜡铲,蜡块便滑落到持蜡器上。冷却后,蜡块就可牢固地黏附在持蜡器上。也可不用持蜡器,将修整好的蜡块,直接安装在切片机的组织块夹持器中进行切片。当然,如果蜡块太小,还须用持蜡器。

(3) 将已焊上蜡块的持蜡器安装到切片机的组织块夹持器上并用夹板夹紧。不用持蜡器而直接安装的蜡块,则不能夹得过紧,否则蜡块容易压碎。

(4) 将切片刀装到切片机的夹刀座上,调整好切片刀与蜡块之间的角度和距离,调整好后将各部位的螺旋旋紧。

(5) 调整切片厚度调节器至所需的厚度,一般切片厚度为 $5\sim 10\mu\text{m}$ 。

(6) 待上述步骤都准备好后,便可开始切片。切片时用右手转动标本推进手轮的手

柄进行切片。每转动一圈便切下一片,连续转动旋转轮,切片借石蜡的黏性可一片接着一片地形成一条连续的蜡带,即连续切片。同时用左手拿着毛笔将蜡带轻轻托起,牵引着蜡带向前拉,至一定长度后用镊子和毛笔轻轻地将蜡带取下,平放于托盘中。

**2. 常见问题及解决办法** 在石蜡切片过程中有时会遇到各种问题,应及时找出原因并予以解决。常见的问题及解决办法有:

(1) 切片不能形成蜡带。这可能是因为室温过低或石蜡过硬,蜡块四周留的蜡边过少或不平所致。前者可通过提高室温,或更换熔点较低的石蜡重新包埋来解决。后者可将组织块重新包埋、修整。

(2) 蜡带弯曲。这可能是蜡块上下两边或左右两边不平行;切片刀不锋利或蜡块与切片刀口不平行等所致。可将蜡块四边重新修整;调节蜡块夹持器与切片刀平行;换锋利的切片刀等方法来解决。

(3) 蜡片上卷。这可能因切片刀刀口太钝或不清洁,刀的角度过大或石蜡过硬等所致。

(4) 蜡片易黏在切片刀上或蜡片皱褶。这可能是室温过高或石蜡太软所致。可用冷水或冰块冰一下蜡块即可。切片刀的角度过小,也会出现这种情况。

(5) 蜡片厚薄不一。这可能是切片刀或蜡块没有固定好,切片机磨损或发生故障等所致。

(6) 蜡片中组织出现裂隙或碎裂。这可能是由组织浸蜡不足或浸蜡温度过高,或在透明剂中时间过长,组织已发脆所致。

(7) 蜡片上出现纵行裂口。这可能是切片刀有缺口或不洁,石蜡内有硬物质等所致。

### 3. 注意事项

(1) 蜡块四周必须修切整齐,并且四边的留蜡距离要均等,不能一边多,一边少;四边要尽量平行,尤其是上下边缘要尽量平行,否则切出的蜡片弯曲不成直带,蜡片不易连续成带。

(2) 切片刀要经常研磨,保持锋利且无缺损。切片刀上有小缺口,或刀口不平整,切出的蜡片上会有裂缝甚至破碎,影响后面的染色效果以及对实验结果的观察。切片刀不锋利也不利于连续切片的形成。切片结束后应将切片刀取下,并用二甲苯等擦拭干净。

(3) 组织切片机是一种精密的仪器,要注意日常保养,使用时必须按操作规定去做。调节切片厚度时,刻度盘上的数字必须对准,不然厚度不准确,也容易损伤齿牙。每次使用前应对各个可动部分的零件作检查,看是否能滑动自如。为保证其准确度不受损伤,不可随意乱拆零件。同时要注意保持其清洁,每次使用后都要进行充分的擦拭,并涂以优质机油,防止生锈、发霉。

(4) 切片时,转动手柄的力要均匀,速度也要均匀,否则容易引起切片的厚度不均匀。

(5) 取下的蜡带在放入托盘时应注意将光滑的那一面朝下放,以便后面的黏片。

(6) 蜡块切过后可用溶化的石蜡封住切面,可使蜡块长期保存。

### (三) 冰冻切片法

**1. 切片方法** 冰冻切片法的基本方法与石蜡切片法相同。冰冻切片法的种类多