

● 面向 21 世纪课程教材配套实验教程 ●

动物组织胚胎学 实验教程



杨倩 主编



中国农业大学出版社
ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

面向 21 世纪课程教材配套实验教程

动物组织胚胎学 实验教程

杨 倩 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物组织胚胎学实验教程/杨倩主编. —北京:中国农业大学出版社,2006.1

ISBN 7-81066-660-6

I. 动… II. 杨… III. 动物学:组织学(生物):胚胎学-实验-教材 IV. Q954.4-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 135384 号

书 名 动物组织胚胎学实验教程

作 者 杨 倩 主 编

策划编辑 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62731190,2620

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 6.25 印张 149 千字 彩插 1

印 数 1~3 050

定 价 10.00 元

责任编辑 王艳欣

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100094

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

E-mail caup@public.bta.net.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

前 言

动物组织胚胎学是动物医学和动物科学中重要的基础课程之一。本门课程主要以形态学为主,动物体各种器官和组织的微细结构都需要死记硬背。因此,实验课成为学生加深记忆和理解的重要环节,《动物组织胚胎学实验教程》的编写也显得尤为重要。

本《动物组织胚胎学实验教程》是在总结多年教学经验的基础上,由南京农业大学、西南大学、江西农业大学、河北农业大学、湖南农业大学、沈阳农业大学和华南农业大学共同编写的,参编人员有:南京农业大学动物医学院杨倩、黄国庆,河北农业大学动物科技学院胡满,西南大学动物科技学院田茂春、刘建虎,湖南农业大学刘进辉、王水莲,江西农业大学动物科技学院王亚鸣,沈阳农业大学畜牧兽医学院石娇,华南农业大学张媛。具体分工如下:

第一章	刘进辉
第二章	杨倩
第三章、第四章、第五章	石娇
第六章、第七章	胡满
第八章、第九章	杨倩
第十章	王水莲 黄国庆(淡水鱼部分)
第十一章	王水莲
第十二章	王亚鸣 黄国庆(淡水鱼部分)
第十三章	王亚鸣 黄国庆(淡水鱼部分)
第十四章	田茂春 刘建虎(淡水鱼部分)
第十五章	田茂春 刘建虎(淡水鱼部分)
第十六章、第十七章	张媛
第十八章	黄国庆

本书的彩色照片由刘建虎、王水莲、杨倩提供。

全书共分 18 章,每章包括内容简介、实验目的和要求、观察要点及观察方法、示范样本、电镜照片和思考题六个大部分,另附有彩色照片一组。近年来,很多农业院校增加了淡水养殖专业,而淡水鱼的组织学和胚胎学却一直处于空缺状态,因此本教程在收集近年来鱼类组织学研究进展的基础上,首次尝试增加鱼类组织学和胚胎学的内容。本书内容较为全面系统,可供高等农业院校动物医学院和动物科技学院乃至水产学院有关专业学生学习使用。

尽管本教程的编写有一些创新和改进,但由于水平有限,错误之处在所难免,恳请各位同仁和读者不吝指正。

编 者

2005 年 10 月

目 录

第一章	绪论.....	(1)
第二章	细胞学	(13)
第三章	上皮组织	(16)
第四章	结缔组织	(19)
第五章	肌肉组织	(23)
第六章	神经组织	(25)
第七章	神经系统	(29)
第八章	循环系统	(33)
第九章	免疫系统	(36)
第十章	内分泌系统	(42)
第十一章	被皮系统	(46)
第十二章	消化管	(49)
第十三章	消化腺	(56)
第十四章	呼吸系统	(61)
第十五章	泌尿系统	(65)
第十六章	雄性生殖系统	(70)
第十七章	雌性生殖系统	(75)
第十八章	动物早期胚胎发育	(81)
参考文献		(91)

第一章 绪 论

Introduction

一、显微镜的构造和使用方法

(一)显微镜的构造

常用的复式显微镜是一种精密的光学仪器,是研究动植物细胞结构、组织形态特征和器官构造的重要和不可取代的工具。显微镜根据目镜多少的不同可分为单目显微镜和双目显微镜。这两种显微镜虽然繁简不同,但基本构造都包括两大部分,即保证成像的光学系统和用以装置光学系统的机械部分(镜架)。

1. 机械部分 包括镜座、镜柱、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、调焦装置。

镜座是显微镜的底座,支持整个镜体,使显微镜放置稳固。

镜柱是镜座上面直立的短柱,支持镜体上部的各部分。

镜臂弯曲如臂,下连镜柱,上连镜筒,为取放显微镜手握的部位。

镜筒为显微镜上部圆形中空的长筒,其上端放置目镜,下端与物镜转换器相连,并使目镜和物镜的配合保持一定的距离,一般是 160 mm,有的是 170 mm。镜筒的作用是保护成像的光路与亮度。

物镜转换器为接于镜筒下端的圆盘,可自由转动。盘上有 3~4 个螺旋圆孔,为安装物镜的部位。当旋转物镜转换器时,物镜即可固定在使用的位置上,保证物镜与目镜的光线合轴。

载物台(镜台)为放置玻片标本的平台,中央有一圆孔,以通过光线。载物台上安装有标本推进器,用以固定玻片标本和使玻片标本前后左右移动。

为了得到清晰的物像,必须调节物镜与标本之间的距离,使它与物镜的工作距离相等。这种操作叫调焦。在镜柱两侧有调焦装置——粗、细调焦螺旋各一对,旋转时可使载物台上升或下降。大的一对是粗调焦螺旋,调动载物台升降距离较大,旋转一圈可使载物台移动 2 mm 左右。小的一对是细调焦螺旋,调动载物台的升降距离很小,旋转一圈可使载物台移动约 0.1 mm。

2. 光学部分 由成像系统和照明系统组成。成像系统包括物镜和目镜,照明系统包括反光镜(或电光源)和聚光器。

物镜是决定显微镜质量的最重要的部件,安装在镜筒下端的物镜转换器上,一般有 3~4 个放大倍数不同的物镜,即低倍镜(4×、10×)、高倍镜(40×)和油镜(100×),观察时可根据需要选择使用。物镜上一般都刻有放大倍数和数值孔径($N \cdot A$,即镜口率)。

工作距离是指物镜最下面透镜的表面与盖玻片(其厚度为 0.17~0.18 mm)表面之间的距离。物镜的放大倍数愈高,它的工作距离愈小。一般油镜的工作距离仅为 0.2 mm,所以使用时要倍加注意。

目镜安装在镜筒上端,它的作用是将物镜所成的像进一步放大,使之便于观察。其上刻有放大倍数,如 5×、10×和 16×等,可根据当时的需要选择使用。目镜内可装入一细小的“指针”,在视野中为一细小的黑线,可以用它指示所要观察的部位。

反光镜是个圆形的两面镜,可选择使用。一面是平面镜,能反光;另一面是凹面镜,兼有反光和汇集光线的作用。反光镜具有能转动的关节,可作各种方向的翻转,面向光源,能将光线反射入聚光器上。有的显微镜没有反光镜而是使用电光源,接通电源既可发出光线。

聚光器装在载物台下,由聚光镜(几个凸透镜)和虹彩光圈(可变光栅)等组成,它可将平行的光线汇集成束,集中在一点,以增强被观察物体的照明度。聚光器可以上下调节,如用高倍镜时,视野范围小,则需上升聚光器,用低倍物镜时,视野范围大,可下降聚光器。虹彩光圈装在聚光器内,位于载物台下方,拨动光栅,可使光圈扩大或缩小,借以调节通光量。

(二)显微镜的使用方法

显微镜的使用主要包括两个方面,一是光度的调节,另一是焦距的调节。具体使用方法分述于后。

1. 取镜和放置 按固定编号从镜盒中取出显微镜。取镜时应右手握住镜臂,左手平托镜座,保持镜体直立(禁止用单手提着显微镜行走,防止目镜从镜筒中滑出),放置在桌面上正中稍偏左侧,距桌边 5~6 cm 处,以便于观察和防止掉落。

2. 对光 一般情况下可用由窗口进入室内的散射光(应避免直射阳光),或用日光台灯作光源,电光源显微镜使用自身光源。对光时,先把低倍物镜转到中央,对准载物台上的通光孔,然后在观察的同时,用手调节反光镜,使镜面向着光源,一般用平面镜即可,光线弱时可用凹面镜。当光线从反光镜表面向上反射入镜筒时,通过目镜就可以观察到一个圆形的、明亮的视野。此时再利用聚光器或虹彩光圈调节光的强度,使视野内的光线既均匀、明亮,又不刺眼。在对光的过程中,要体会反光镜、聚光器和虹彩光圈在调节光线中的不同作用。

3. 放置切片 下调载物台,把玻片标本放在载物台上,然后通过标本推进器调节,使组织材料正对通光孔的中心。

4. 调整焦距 双眼从侧面注视物镜,并慢慢按顺时针方向转动粗调焦螺旋,使物镜离玻片 5 mm 左右,接着观察,同时转动细调焦螺旋直到看见清晰的物像为止。如一次调焦看不到物像,应重新检查材料是否放在光轴线上,重新移正材料,再重复上述操作过程,直至物像出现和清晰可见为止。当细调焦螺旋向上或向下转不动时,就是转到了极限,千万不能再硬拧,而应重新调节粗调焦螺旋,把物镜与标本的距离稍稍拉开后,再反拧细调焦螺旋,10 圈左右(因一般可动范围为 20 圈)。有些显微镜则可把微调基线拧到指示微调范围的两根白线之间,然后重新调整焦距,直到物像调节清晰为止。

5. 低倍镜观察 焦距调好后,可根据需要,移动玻片,把要观察的部分移到最有利的位置上。找到物像后,还可根据材料的厚薄、颜色、成像的反差强弱是否合适等再进行调焦。如果视野太亮,可降低聚光器或缩小虹彩光圈,反之则升高聚光器或开大虹彩光圈。观察任何标本,都必须先用低倍镜,因为低倍镜的视野范围大,便于对组织、器官进行整体认识,也容易发现目标和确定要观察的部位。

6. 高倍物镜的使用 在观察较小的物体或细微结构时使用。

选好目标:由于高倍物镜只能把低倍镜视野中心的一小部分加以放大,因此,使用高倍镜前,应先在低倍镜中选好目标,将其移至视野的中央,转动物镜转换器,把低倍物镜移开,小心地换上高倍物镜,并使之合轴,即使其与镜筒成一直线(因高倍镜的工作距离很短,操作时要十分仔细,以防镜头碰击玻片)。

调整焦距:在正常情况下,转换成高倍物镜后,只需调节细调焦螺旋,就可获得最清晰的物

像。初用一台显微镜时,必须注意它的高、低倍物镜是否能如上述情况那样很好的配合。如果高倍物镜离盖玻片较远看不到物像时,则需重新调整焦距。此时眼睛应从侧面注视物镜,并小心地转动粗调焦螺旋使镜筒慢慢地下降到高倍物镜头与组织片相接近时为止(注意切勿使镜头紧压玻片,以免损坏镜头和压碎玻片标本),然后再通过目镜观察,同时缓慢转动粗调焦螺旋,直到看见物像后,再换细调焦螺旋,使物像更加清晰为止。在换用高倍镜观察时,视野变小变暗,所以要重新调节视野的亮度,此时可升高聚光器或放大虹彩光圈。

7. 油镜的使用 在油浸物镜使用前,也必须先从低倍镜中找到目标部分,再换高倍物镜调整焦距,将目标部分移到视野中心,然后再换用油镜头。

在使用油镜头前,一定要在盖玻片上滴加一滴香柏油(镜油),然后才能使用。当聚光器镜口率在 1.0 mm 以上时,还要在聚光器上面滴加一滴香柏油(油滴位于载玻片与聚光器之间),以便使油镜发挥最佳作用。

在用油镜观察组织玻片时,绝对不许使用粗调焦螺旋,只能用细调焦螺旋调节焦距。如盖玻片过厚或组织片放反时,则不能聚焦,应注意调换,否则就会压碎玻片或损坏镜头。

油镜使用完毕,需立即擦净。擦拭方法是用棉棒或擦镜纸蘸少许清洁剂(乙醚和无水酒精的混合液,最好不用二甲苯,以免二甲苯浸入镜头),将镜头上残留的油迹擦去。否则香柏油干燥后,不易擦净,且易损坏镜头。

8. 显微镜使用后的整理 观察结束,应先将载物台下降,再取下组织玻片,取下时要注意勿使玻片触及镜头。玻片取下后,再转动物镜转换器,使物镜镜头与通光孔错开,使两个物镜位于载物台上通光孔的两侧,并将反光镜还原成与桌面垂直,擦净镜体,罩上防尘的塑料罩或置于显微镜盒内。

(三)显微镜使用注意事项

显微镜是精密仪器,使用时一定要严格地按规程进行操作。

(1)随时保持显微镜的清洁,不用时用塑料罩罩好或及时收回盒内。机械部分如有灰尘污垢,可用小毛巾擦拭。光学部分如有灰尘污垢,必须先用镜头毛刷拂去,或用吹风球吹去,再用擦镜纸轻擦,或用脱脂棉棒蘸少许酒精和乙醚的混合液,由透镜的中心向外进行轻拭,切忌用手指及纱布等擦抹。

(2)使用显微镜观察时,必须睁开双眼。应反复训练,使自己养成用左眼观察,右眼作图的习惯。

(3)标本最好加盖盖玻片,制作带液体的玻片标本时,液体样本不宜过多,以免水液流出,腐蚀和污染显微镜。

(4)如遇显微镜机件失灵,使用困难时,千万不可用力转动,更不要任意拆修,应立即报告指导教师,要求协助排除故障,以免造成损坏。

(5)显微镜应注意防潮,在观察时,显微镜上凝结的水珠要及时擦干,用完后应放干燥处保存。显微镜盒内应放一袋蓝绿色的硅胶干燥剂,当其吸水潮解后,变为浅粉红色时,应将其取出烘干,待变为蓝绿色时重新使用。

二、组织学标本的制作过程

制作组织学标本是用来研究细胞学、组织学、胚胎学、生物学和病理学等学科的一种基本方法,即将所要观察的材料制成极薄的组织片,根据需要用染料加以染色,在显微镜下观察其

形态和化学成分含量的变化。根据研究目的和制作方法的不同,组织学标本分为两大类,即非切片类标本和切片类标本,前者包括涂片、铺片、压片和磨片等,后者又分为石蜡切片、冰冻切片和火棉胶切片等。

(一)石蜡组织切片制造程序

1. 取材和固定 在生物组织器官中,取出我们所需要研究的那部分材料,但材料不宜过大,一般要求在 $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 左右。取材时应先取变化(腐败)快的内脏器官,特别是消化器官和泌尿器官,后取变化慢的肌肉、皮肤和骨骼等。所取的组织材料应具有很强的代表性,能较好地代表整个器官,如取肾组织时,既要取到肾的皮质部,也要取到肾的髓质部和被膜。将取得的材料先用生理盐水轻轻冲洗后迅速投入固定液中固定,固定的目的是使组织中蛋白质迅速凝固,保持其活体时的形态结构,若新鲜材料不固定或固定不及时很快就会腐败,组织结构发生变化。固定液为化学药剂,有单一固定液和混合固定液之分。

常用的单一固定液有乙醇、醋酸、苦味酸、福尔马林、升汞和重铬酸钾等,各种单一固定液都具有一定的优缺点,因此,常用混合固定液取长补短。最常用的混合固定液有波恩氏液(Bouin)、陈克氏液、苗勒氏液、卡尔诺爱氏液等。根据材料、染色方法等要求的不同选择不同的固定液,如一般组织器官以波恩氏液固定为好,而神经组织以陈克氏液固定为好。固定液的用量一般为组织材料体积的 10~15 倍,固定时间一般为 12~24 h,可根据气温高低和组织材料大小确定具体固定时间,固定好了的组织材料可在 85% 酒精中保存。

2. 脱水和透明 将固定好的组织材料放在自来水下轻轻冲洗,除去材料上的杂质,但由于组织材料中的水分会妨碍石蜡渗透进入组织内,所以必须脱去组织材料中的水分。常用的脱水剂为酒精,采用 50%、70%、85%、90%、95% 和无水酒精等不同浓度的酒精,由低浓度到高浓度依次渐进进行脱水,每级酒精浓度脱水时间为 1~2 h,低浓度的酒精(50%、70% 和 85%)可适当延长至 4~12 h。为了增加组织材料的透明性而便于进行显微观察,需用透明剂对组织材料进行透明,常用的透明剂有二甲苯和哥罗仿等。二甲苯等药剂渗入到组织材料内后,组织材料呈现透明状态,故称为透明剂。透明时间一般为 1~2 h。

3. 浸蜡与包埋 浸蜡前先准备好装石蜡的小瓷杯,使石蜡在杯内熔解,熔好的石蜡放入温箱中并使温箱温度保持 60°C 左右。然后把已透明好的组织材料放入二甲苯+石蜡的混合液内(比例为 3:1)浸蜡 30 min 到 1 h,然后过渡到软蜡(熔点 $48\sim 52^{\circ}\text{C}$)中浸蜡 30 min,再到两个硬蜡杯中各浸蜡 30 min,最后将浸过蜡的组织材料切面朝下放入盛有石蜡的包埋盒中,待石蜡冷却后,组织材料就包在其中。

4. 切片与贴片 切片前先对包埋好石蜡的组织材料进行修整,将组织材料以外多余的石蜡切去,保持组织材料外面有 2~3 mm 的石蜡。取来小木块,用热熔蜡将蜡块粘在木块上,冷却后便可进行切片。切片时将切片刀固定在刀架上,保持刀面呈一定倾斜角度,一般为 $4^{\circ}\sim 6^{\circ}$,调整好切片厚薄刻度,右手握转轮柄均匀地上下转动,使石蜡组织在刀刃上下移动,切成薄薄的蜡片带,左手拿一支毛笔,托着薄蜡片带。若脱水、浸蜡和包埋不当,切成的蜡片会卷起来,很难把蜡片切成蜡带。

在清洁载玻片上滴上一小滴蛋白甘油液(贴附剂),将蛋白甘油液抹均匀,加上几滴蒸馏水,再夹上 1~2 片石蜡组织切片放在蒸馏水上,稍加热载玻片,将石蜡组织切片慢慢展平,然后把贴好的组织切片放入烘箱中烘干或自然干燥,最后进入染色。

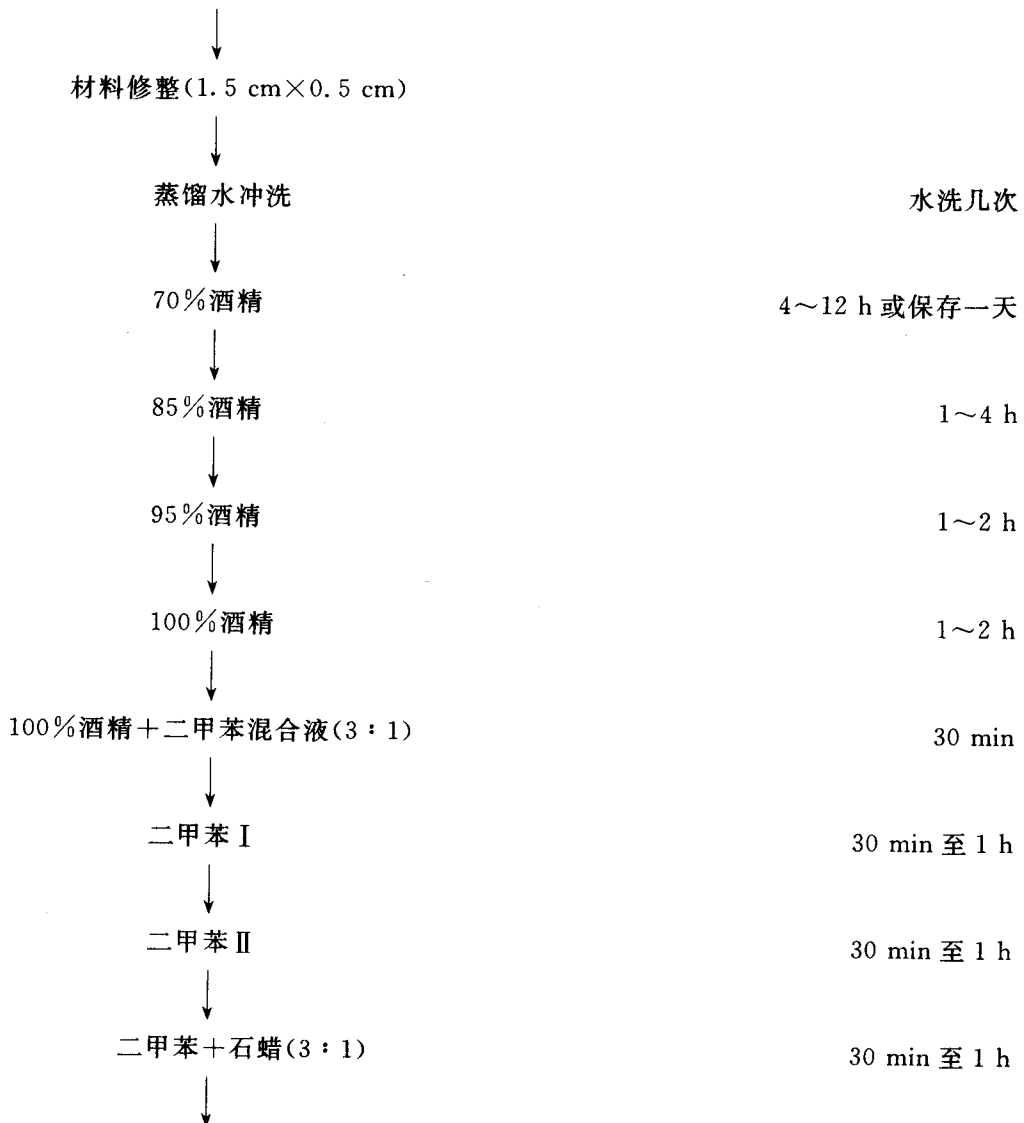
5. 染色 染色是用不同颜色的染料如苏木精(hematoxylin)和伊红(eosin)处理烘干后的

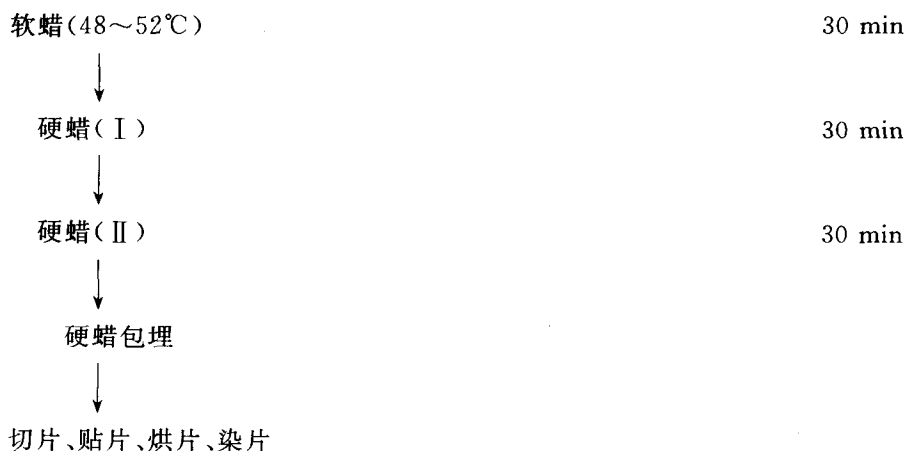
组织切片,使组织切片中不同结构显示不同的颜色,以达到区分材料不同结构的目的。根据化学性质不同,染料可区分为酸性、碱性和中性染料。有些组织或结构易被酸性染料着色,称为嗜酸性(acidophilia);有些组织或结构易被碱性染料着色,称为嗜碱性(basophilia);有些组织或结构既不被酸性染料着色,也不易被碱性染料着色,称为嗜中性(neutrophilia)。实验室常用苏木精-伊红染色,称为 HE 染色。苏木精是碱性染料,将细胞核染成紫色或蓝紫色,伊红是酸性染料,将细胞质染成红色,所以在染色反应上,细胞核属于嗜碱性,细胞质属于嗜酸性。

6. 封藏 组织切片染色后,为了便于长久保存,可用低浓度酒精依次脱水,再用二甲苯处理透明,然后用树胶将盖玻片贴附在组织材料上,树胶干后贴上标签。至此,石蜡组织切片基本制成。

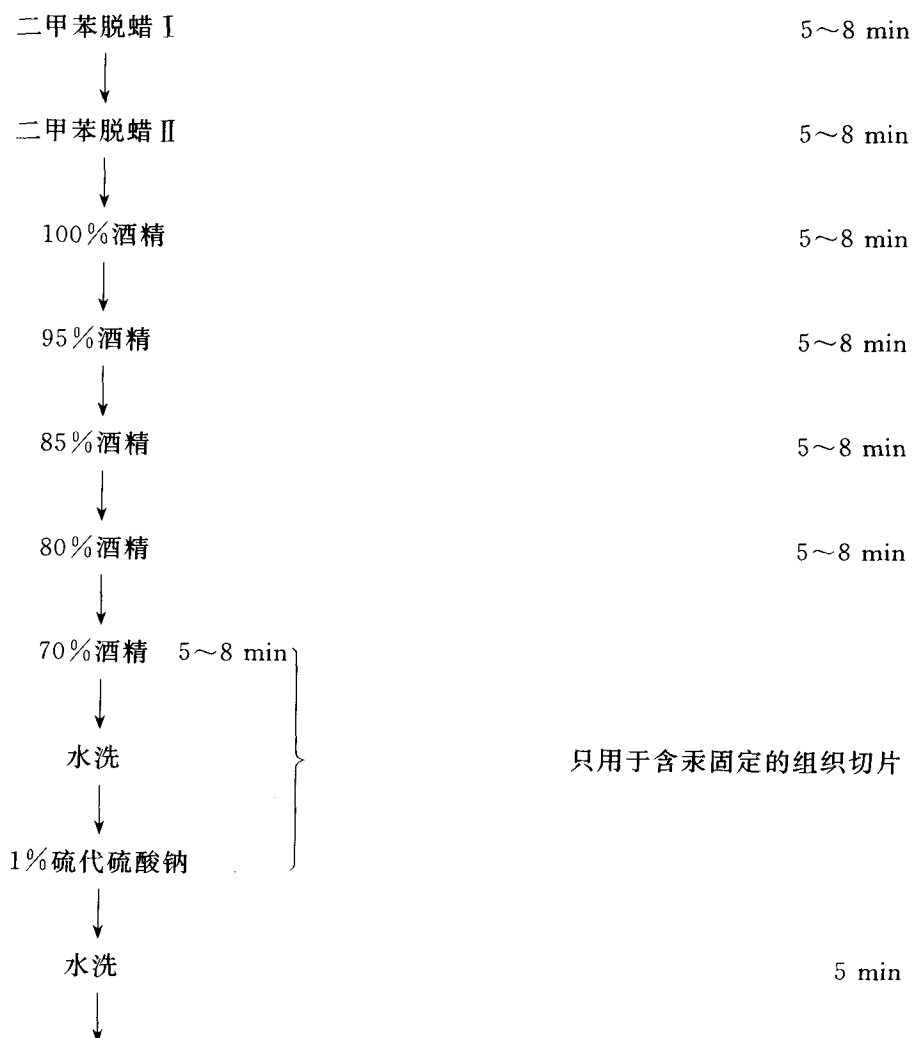
具体操作程序如下:

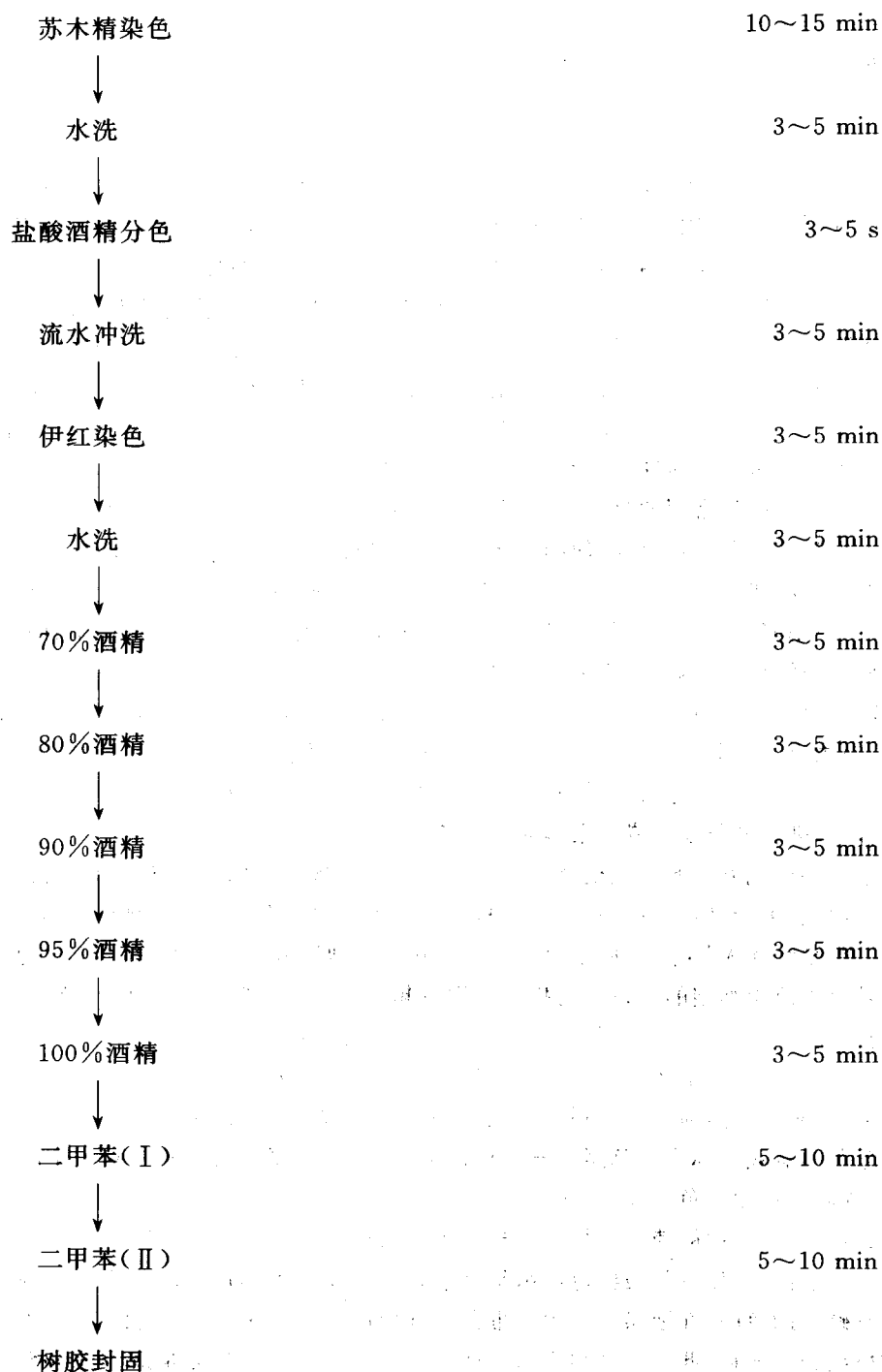
取材投入适当的固定液中固定 24 h 左右





其中,切片染色可按以下程序进行。





以上各阶段自始至终是互相联系的,每个阶段所用时间是一个大概范围,不同的组织材料用不同的固定液,不同染色所用的时间也不一样,在操作过程中,每个步骤都可直接影响组织切片的制作效果,在实践中需不断积累总结经验。

(二) 染色原理

染色(stain)是用染料使组织切片着色,便于镜下观察。天然和人工合成的染料甚多,它们都是含发色团的有机化合物,当染料具有助色团成为盐类物质,即可溶解于水并具电荷,与组织有亲和力,使组织着色。含氨基($-\text{NH}_2$)、二甲氨基 $[-\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ 等碱性助色团的染料,称碱性染料(basic dye),它的盐溶液具阳电荷;含羧基($-\text{COOH}$)、羟基($-\text{OH}$)或磺基($-\text{SO}_3\text{H}$)等酸性助色团的染料,称酸性染料(acid dye),它的溶液具阴电荷。组织的染色原理一般认为基于化学结合或物理吸附作用。细胞和组织的酸性物质或结构与碱性染料亲和力强者,称嗜碱性;而碱性物质或结构与酸性染料亲和力强者,称嗜酸性;若与两种染料的亲和力均不强者,称嗜中性。组织的基本成分是蛋白质,构成蛋白质的氨基酸常是既有含氨基的,也有含羧基的,是两性电解质。各种蛋白质的等电点因氨基酸成分的不同而异,其电荷性质又与溶液的 pH 值相关,根据研究目的选用合适的染色方法,调整好染液的 pH 值,即可取得良好染色效果。常用的酸性染料有伊红、坚牢绿、橙黄 G 等,碱性染料有苏木精、亚甲蓝、碱性品红等。组织学中最常用的是苏木精-伊红染色法,简称 HE 染色法。苏木精使细胞核和胞质内的嗜碱性物质着蓝紫色,伊红使细胞质基质和间质内的胶原纤维等着红色。

物理吸附作用的染色方法是使染料直接进入细胞组织内进行显色,如用苏丹染料显示脂肪组织,用硝酸银、氯化金等重金属盐显示组织中某些结构等。在银染法中有些组织结构还可直接使硝酸银还原而显色,称为亲银性(argentaffin);有些结构无直接还原作用,需加入还原剂方能显色,则称为嗜银性(argyrophilia)。还有些组织成分如结缔组织和软骨基质中的糖氨多糖,当用甲苯胺蓝(toluidine blue)等碱性染料染色后呈紫红色,这种现象称为异染性(metachromasia),其原理可能是该染料在溶液中呈单体状态时显蓝色,当它与多阴离子的高分子物质耦合后,染料分子聚合成多聚体而显红色。

还有些染色方法的原理至今还不清楚。组织细胞染色原理至今尚无满意的解释,可能是物理作用,也可能是化学作用,或者是两者综合作用的结果。染色的物理作用是利用毛细管现象,渗透、吸收和吸附作用,使染料的色素颗粒牢固地进入组织细胞,并使其显色。染色的化学作用是渗入组织细胞的染料与其相应的物质起化学反应,产生有色的化合物。各染料都具有这两种性质,这两种性质主要是由发色团和助色团产生。

发色团:苯的衍生物具有可见光区吸收带。这些衍生物显示的吸收带与其价键的不稳定性有关,如对苯二酚为无色,当其氧化后失去两个氢原子,它的分子则变为有黄色的对醌,这种产生颜色的醌式环称为发色团。若一种化合物含有几个环,只要其中有一个醌式环就可产生颜色,称此发色团为色原(chromogen)。

助色团:是一种能使化合物产生电离作用的辅助原子团(酸碱性基团)。它能使染色的色泽进一步加深,并使其与被染色组织具有亲和力。助色团的性质决定染料的酸碱性。碱性染料具有碱性助色团,在溶媒中产生的带色部分为带正电荷的阳离子,易与组织细胞内带负电荷的物质结合而显色,此性质被称为嗜碱性。如细胞核内的主要化学成分脱氧核糖核酸易被苏木精染成紫蓝色。酸性染料具有酸性助色团,在溶媒中产生的带色部分为阴离子,易与组织细胞内带正电荷的部分结合而显色,此性质被称为嗜酸性,如细胞质内成分大多为蛋白质,易与伊红或橘黄结合呈红色或橘黄色。

(三) 几种常见的染色方法

1. 苦味酸-酸性品红染色法

(1) 试剂配制。

► Weigert 氏铁苏木精液：甲、乙两液需分瓶盛放，甲液配制后数天即可使用，~~不宜配制过多~~，如保存时间过长则染色不良，平时应密封保存，乙液配制后立即可用。临用前将甲、乙两液等量混合。

甲液：苏木精	1 g
无水酒精 (absolute alcohol)	100 mL
乙液：30%三氯化铁液 (ferric chloride)	4 mL
蒸馏水	100 mL
纯盐酸 (hydrochloric acid)	1 mL

► Van Gieson 氏染液：甲、乙两液分瓶盛放。临用前取甲液 1 份，乙液 9 份混合后使用。

甲液：1%酸性品红 (acid fuchsin) 水溶液

乙液：苦味酸 (picric acid) 饱和水溶液 (约 1.2%)

► 1%盐酸酒精液：70%酒精	99 mL
纯盐酸	1 mL

(2) 操作方法。组织固定于 10% 甲醛液，常规脱水包埋，切片脱蜡至水，用 Weigert 氏铁苏木精液染 5~10 min，流水稍洗，1% 盐酸酒精迅速分化，流水冲洗数分钟，用 Van Gieson 氏液染 1~2 min，倾去染液，直接用 95% 酒精分化和脱水，无水酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。

2. 地衣红法

(1) 试剂配制。

地衣红酒精液：地衣红 (orcein)	1 g
70% 酒精	100 mL
浓盐酸	1 mL

将地衣红溶于 70% 酒精，然后加入浓盐酸，放置 1~2 天后即可使用。

(2) 操作方法。组织固定于 10% 甲醛液，按常规脱水包埋，切片脱蜡至 70% 酒精，入地衣红酒精液染 3 h，70% 酒精浸洗两次，每次约 30 s，至染液不脱出为止，95% 酒精、无水酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。

3. 磷钨酸苏木精法

(1) 试剂配制。

► 磷钨酸苏木精液：苏木精	0.1 g
蒸馏水	100 mL
磷钨酸 (phosphotungstic acid)	2 g

取一烧杯盛蒸馏水 30 mL，加入苏木精，稍加温使苏木精完全溶解，再取另一烧杯盛余下的蒸馏水 70 mL，加入磷钨酸使其完全溶解。待苏木精液冷后与磷钨酸液混合，置于光亮处数周至数月待成熟后才可使用。

► 酸化高锰酸钾液：甲、乙两液分瓶盛装，临用前等份混合后滴在切片上。

甲液：0.5% 高锰酸钾水溶液

高锰酸钾(potassium permanganate)	0.5 g
蒸馏水加至	100 mL
乙液:0.5%硫酸水溶液	
硫酸(sulfuric acid)	0.5 mL
蒸馏水	99.5 mL
▶2%草酸水溶液:草酸(oxalic acid)	2 g
蒸馏水加至	100 mL
▶0.5%碘酒精液:碘片(iodine)	0.5 g
70%酒精加至	100 mL
▶5%硫代硫酸钠液:硫代硫酸钠(sodium thiosulfate)	5 g
蒸馏水加至	100 mL

(2)操作方法。组织固定于 Zenker 氏液,流水冲洗一夜后,常规脱水包埋,切片脱蜡至水。若已用 10%甲醛液固定,应再把切片置于 Zenker 氏液于 37℃温箱处理 3 h,或于室温处理一夜。流水稍冲洗,并进行除汞处理(切片置于 0.5%碘酒精作用 10 min,稍水洗,5%硫代硫酸钠脱碘 5 min,流水冲洗 10 min)。酸化高锰酸钾液作用 5 min,稍水洗,2%草酸液漂白 1~3 min,流水冲洗 5 min,蒸馏水洗一次,入磷钨酸苏木精液染 24~48 h。取出后直接用 95%酒精迅速洗去多余的染液,无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

4. 结晶紫-中性红法

(1)试剂配制。

▶结晶紫染液:结晶紫(crystal violet)	0.5 g
25%酒精	100 mL
▶Weigert 氏碘液:碘片	1 g
碘化钾(potassium iodide)	2 g
蒸馏水	100 mL
▶醋酸酒精液:冰醋酸(glacial acetic acid)	2 mL
无水酒精	98 mL
▶0.2%中性红酒精液:中性红(neutral red)	200 mg
无水酒精加至	100 mL
▶0.2%固绿酒精液:固绿 FCF(fast green FCF)	200 mg
无水酒精加至	100 mL
▶Twort 氏复染液:0.2%中性红酒精液	9 mL
0.2%固绿酒精液	1 mL
蒸馏水	30 mL

此液需于临用前混合。

(2)操作方法。组织固定于 10%甲醛液,按常规脱水包埋,切片脱蜡至水。结晶紫液滴染 3~5 min。流水冲洗。Weigert 氏碘液处理 3 min。流水冲洗,用吸水纸吸干。用醋酸酒精液(于 56℃温箱内预热短时)脱色,直至切片没有颜色脱出,约 10 min。流水稍洗。Twort 氏复染液染 5 min。流水稍洗。用醋酸酒精液分化,至切片没有红色脱出为止,约数秒钟。无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

5. 高碘酸-无色品红法

(1) 试剂配制。

► 0.5% 高碘酸水溶液: 高碘酸(periodic acid) 0.5 g
蒸馏水加至 100 mL

溶解后用小口砂塞瓶盛装, 置于冰箱内保存。用前取出恢复至室温。

► 0.5% 偏重亚硫酸钠液: 偏重亚硫酸钠(sodium metabisulfite) 0.5 g
蒸馏水加至 100 mL

溶解后用小口砂塞瓶盛装, 置于冰箱内保存。用前取出恢复至室温。

► 无色品红液(Schiff 氏试剂): 碱性品红(basic fuchsin) 1 g
蒸馏水 200 mL
1 mol/L 盐酸 20 mL
偏重亚硫酸钠 1~1.5 g
活性炭(activated charcoal) 1~1.5 g

取一只 500 mL 的洁净三角烧瓶盛蒸馏水 200 mL, 煮沸后加入碱性品红, 并摇动数分钟使碱性品红完全溶解, 此时溶液为深红色。待冷却至 50℃ 时, 过滤至另一只洁净三角烧瓶内。加入 1 mol/L 盐酸 20 mL。再待溶液冷却至 25℃ 左右时, 加入偏重亚硫酸钠, 即用胶塞塞紧瓶口, 并轻轻摇动使其溶解, 此时碱性品红液的颜色明显变淡。置于室温、暗处 24 h, 此时溶液应呈淡的稻草黄色或淡红色。加入活性炭粉, 搅均匀后塞紧瓶口轻摇 1~2 min。静置 1~2 h, 用双层滤纸过滤到小口砂塞瓶内, 此时溶液应完全无色, 即为无色品红, 又称 Schiff 氏试剂。置于冰箱内保存。

► 亮绿水溶液: 亮绿(light green SF) 0.2 g
蒸馏水 100 mL
冰醋酸 0.2 mL

(2) 操作方法。组织固定于 10% 甲醛溶液, 按常规脱水包埋, 切片脱蜡至水。0.5% 高碘酸氧化 5~8 min。流水冲洗 2 min, 再用蒸馏水洗。入无色品红液于暗处并加盖作用 10~20 min。0.5% 偏重亚硫酸钠液滴洗 2 次, 每次约 1 min。流水冲洗 5 min。亮绿水溶液复染数秒钟。稍水洗, 常规脱水透明, 中性树胶封固。

6. 姬姆萨(Giemsa)法

(1) 试剂配制。

► Regaud 氏固定液: 3% 重铬酸钾(potassium dichromate) 80 mL
浓甲醛液(formaldehyde) 20 mL

临用前将两液混合, 混合 24 h 后开始失效。

► Giemsa 氏液: Giemsa 染料 0.75 g
甲醇(methyl alcohol) 50 mL
甘油(glycerin) 50 mL

先将 Giemsa 染料溶于甘油, 在 50℃ 水浴中使其充分溶解, 用玻棒搅动, 持续 30 min, 冷却后再加入甲醇, 摇匀, 放置一夜才可使用。

► 缓冲 Giemsa 氏稀释液: Giemsa 氏原液 1.5 mL
0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 6.8) 30 mL

此稀释液需于每次临用前配制。

(2)操作方法。新鲜组织立即置入 Regaud 氏液固定 2~4 天,每天换一次新液,再用 3% 重铬酸钾水溶液固定一天。流水冲洗 24 h,按常规脱水包埋。切片脱蜡至水,再用蒸馏水洗 2~3 次,约 30 min。入缓冲 Giemsa 氏稀释液染色 18~24 h。蒸馏水稍洗后用滤纸吸干。用正丁醇分化约数秒钟,用滤纸吸干。正丁醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

湖南农业大学 刘进辉