

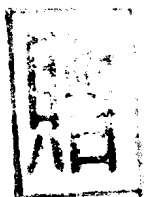
● 陈钟和 杨宝麟 主编

# 神经组织切片技术指导



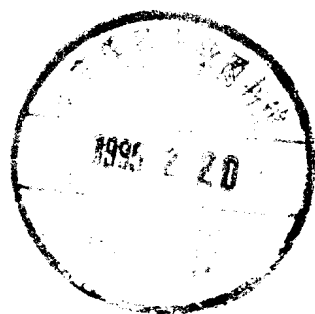
北京医科大学 联合出版社  
中国协和医科大学

R329.4-33  
CZH



# 神经组织切片技术指导

陈钟和 杨宝麟 主编



R329.4-33

CZH

北京医科大学联合出版社  
中国协和医科大学



A1C01101700

**(京) 新登字147号**

**图书在版编目(CIP)数据**

神经组织切片技术指导/陈钟和、杨宝麟主编. —北京:  
北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 10  
ISBN 7-81034-376-9

I. 神… II. ①陈… ②杨… III. 神经组织-切片(生物学)-  
技术 IV. R322.8-33

北京医科大学 联合出版社出版发行  
中国协和医科大学

(100083 北京学院路38号 北京医科大学院内)

北京密云华都印刷厂印刷 新华书店经销

\* \* \*

开本: 787×1092 1/32 印张: 2.875 字数: 65千字

1994年10月第1版 1994年10月北京第1次印刷 印数 1—1000册

定价: 4.80元

## 前 言

我们编纂《神经组织切片技术指导》这本小册子，目的是作为初学神经组织切片的研究生、青年教师和从事本专业的技术人员的启蒙教材。为此，我们将本教研室多年来在教学和科研中曾经使用的若干方法搜集起来，加以筛选，编辑成册。本册所收集的方法虽然不多，但依据编者的切身体验，这些方法对初学者简便易行，容易获得较好结果。有关某些方法的理论问题，为了节省篇幅，在此尽量简略。

本册共分十一章：第一章是切片制作概论；第二～六章属神经解剖学的经典方法；第七～十章分述荧光组化、乙酰胆碱酯酶、辣根过氧化物酶传导和免疫组化方法；第十一章为脑厚片染色法。有关组织化学和放射自显影技术，本校另有专门课程讲授，在此从略。为研究生开设的神经解剖学技术课中，应用此书，另配合有数次讲演，内容偏重于技术的理论和操作要点。

本书编写较为匆促，加以实地经验不够丰富，凡不足之处，乞望读者不吝赐教。在本书编写中，蒙张培林教授审阅，特此致谢。

编者 1993

# 目 录

|                     |        |
|---------------------|--------|
| 第一章 神经组织切片制作概述..... | ( 1 )  |
| 第一节 制片室的基本用具.....   | ( 1 )  |
| 一、基本设备.....         | ( 1 )  |
| 二、制片室的一般规则.....     | ( 2 )  |
| 第二节 玻璃器皿洗涤法.....    | ( 2 )  |
| 第三节 切片机.....        | ( 3 )  |
| 一、石蜡切片机.....        | ( 4 )  |
| 二、火棉胶切片机.....       | ( 4 )  |
| 三、冰冻切片机.....        | ( 4 )  |
| 四、震动切片机.....        | ( 6 )  |
| 五、切片刀的种类.....       | ( 6 )  |
| 第四节 磨刀和磨刀机.....     | ( 8 )  |
| 一、磨刀石的种类.....       | ( 8 )  |
| 二、磨刀.....           | ( 8 )  |
| 三、磨刀机的使用.....       | ( 10 ) |
| 第五节 石蜡切片的基本程序.....  | ( 11 ) |
| 一、取材.....           | ( 11 ) |
| 二、固定.....           | ( 11 ) |
| 三、脱水和透明.....        | ( 16 ) |
| 四、浸蜡与包埋.....        | ( 16 ) |
| 五、切片.....           | ( 17 ) |

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| 第六节 火棉胶切片的基本程序.....                             | ( 18 ) |
| 一、取材.....                                       | ( 18 ) |
| 二、脱水.....                                       | ( 19 ) |
| 三、浸胶.....                                       | ( 19 ) |
| 四、包埋.....                                       | ( 19 ) |
| 五、切片.....                                       | ( 20 ) |
| 第二章 苏木精—伊红染色.....                               | ( 22 ) |
| 第三章 神经细胞染色.....                                 | ( 25 ) |
| 第一节 焦油紫染色法.....                                 | ( 25 ) |
| 第二节 桔花青—铬钒染色.....                               | ( 27 ) |
| 第四章 髓鞘染色.....                                   | ( 28 ) |
| 第一节 库尔奇斯基—帕尔—韦格(Kultschitzky-Pal-Weigert)法..... | ( 28 ) |
| 第二节 韦格(Weigert)法.....                           | ( 31 ) |
| 第三节 史披迈尔(Spielmeyer)髓鞘染色法.....                  | ( 31 ) |
| 第四节 魏尔(Weil)髓鞘染色法.....                          | ( 32 ) |
| 第五节 Luxol固蓝法.....                               | ( 33 ) |
| 第五章 还原银法和选择镀染溃变纤维法.....                         | ( 40 ) |
| 第一节 卡哈(Cajal)还原银染法.....                         | ( 40 ) |
| 第二节 阮森(Ranson)吡啶—硝酸银法.....                      | ( 41 ) |
| 第三节 俾尔疏斯基(Bielschowsky)法.....                   | ( 42 ) |
| 第四节 高尔基—坚聂克(Golgi-дешнека)法.....                | ( 44 ) |
| 第五节 Fink-Heimer选择性溃变轴突染色法.....                  | ( 45 ) |
| 第六章 高尔基和考克斯法.....                               | ( 48 ) |
| 第一节 高尔基(Golgi)氏法.....                           | ( 48 ) |

|             |                                                                      |               |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|---------------|
| 第二节         | 快速高尔基(Golgi)法.....                                                   | ( 49 )        |
| 第三节         | Porler和Davenport改良法.....                                             | ( 50 )        |
| 第四节         | 考克斯(Cox) 染色法I.....                                                   | ( 50 )        |
| 第五节         | 考克斯染色法II .....                                                       | ( 51 )        |
| <b>第七章</b>  | <b>荧光组化方法(Fluorcsence histo-<br/>chemical method)和荧光示踪物标记法 .....</b> | <b>( 53 )</b> |
| 第一节         | 甲醛诱发荧光法(Formaldehyde<br>vapar method).....                           | ( 54 )        |
| 第二节         | 蔗糖—磷酸—乙醛酸法(SPG法) .....                                               | ( 55 )        |
| 第三节         | 甲醛—乙醛酸法.....                                                         | ( 56 )        |
| 第四节         | 荧光物质逆行标记法.....                                                       | ( 57 )        |
| <b>第八章</b>  | <b>显示胆硷酯酶的亚铁氰化铜法.....</b>                                            | <b>( 61 )</b> |
| <b>第九章</b>  | <b>辣根过氧化物酶(HRP) 法.....</b>                                           | <b>( 64 )</b> |
| 第一节         | 辣根过氧化物酶(HRP)—DAB棕色<br>方法.....                                        | ( 64 )        |
| 第二节         | 四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetrame-<br>thyl-benzidine TMB)法.....               | ( 65 )        |
| <b>第十章</b>  | <b>神经免疫细胞化学技术.....</b>                                               | <b>( 68 )</b> |
| 第一节         | 光镜.....                                                              | ( 68 )        |
| 第二节         | 免疫电镜.....                                                            | ( 71 )        |
| <b>第十一章</b> | <b>脑厚片染色.....</b>                                                    | <b>( 75 )</b> |
| 第一节         | 马利根(Mulligan)氏法.....                                                 | ( 75 )        |
| 第二节         | 星蓝染脑厚片法.....                                                         | ( 78 )        |
| <b>附录</b>   | <b>缓冲液的配制.....</b>                                                   | <b>( 80 )</b> |
| 一、          | 磷酸缓冲液.....                                                           | ( 80 )        |
| 二、          | 醋酸缓冲液.....                                                           | ( 81 )        |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 三、Tris缓冲液.....  | ( 81 ) |
| 四、二甲胂酸盐缓冲液..... | ( 82 ) |
| 主要参考书.....      | ( 83 ) |

# 第一章 神经组织切片制作概述

本章首先介绍神经组织切片制作梗概。神经组织制片的基本过程同一般组织学切片的制作基本上是一致的。不过神经组织在形态结构上有别于其它组织，为了显示这些特点，在制作过程中就有许多较为特殊之处。因此，对于初学者只要反复实践，就能达到满意结果。

在介绍具体的神经组织切片染制方法之前，先将制片室的基本设备和制作的基本过程了解一下，可能更便于掌握。

## 第一节 制片室的基本用具

### 一、基本设备

仪器：①普通生物显微镜；②恒温箱( $37^{\circ}\sim 40^{\circ}\text{C}$ )；③熔蜡箱( $60^{\circ}\sim 70^{\circ}\text{C}$ )；④烤片箱( $40^{\circ}\text{C}$ )；⑤普通天秤(感量为 $0.1\text{g}$ )；⑥切片机(旋转式者为石蜡切片机、滑动式者为火棉胶切片机、冰冻切片机适用于非包埋的组织块、震动切片机是为切新鲜组织制备的)；⑦磨刀机。

玻璃器皿：①量杯和烧杯(各种容量)。②合碟( $10\sim 20\text{cm}$ )。③漏斗。④酒精灯。⑤广口瓶和细口瓶(各种容量)。⑥方型和圆型标本缸(各种容量)。⑦双口双盖瓶(火棉胶瓶)。⑧染色缸： $1\times 3\text{寸}$ 、 $2\times 3\text{寸}$ 。⑨载物片： $1\times 3\text{寸}$ 、 $2\times 3\text{寸}$ 。⑩盖玻片： $18\times 18\text{mm}$ 、 $22\times 22\text{mm}$ 、 $24\times 32\text{mm}$ 、 $24\times$

50mm、45×60mm。⑪树胶瓶。

一般手术器械：解剖刀、剪子(尖头、圆头、弯头)、大小镊子(带齿和不带齿)、大小骨钳、眼科剪(直型、弯型)、纹式止血钳、持针器、钢锯、双齿锯和各种大小缝针等。

其它：磨刀石、磨刀皮、钻石笔、三角架、石棉网、大小瓶刷、大小竹镊、石蜡包埋器、组织针、金属片铲、瓶签、丝线等。

## 二、制片室的一般规则

切片室内使用的各种仪器、用具、染液、试剂等都要注意清洁和安全。每日工作完毕要将室内收拾整齐。

所配制的溶液、染料、试剂必须及时贴上瓶签、记录上名称、配制时间和保存温度等。

有些染料和试剂有一定的有效期，配制时注意用量，以免造成浪费。

在配制强酸、强碱时一定要注意安全，在配制玻璃器皿洗液时，必须将硫酸徐徐倒入水中，切勿将水倾倒入硫酸中以免发生危险。

要处理好易燃易爆化学试剂，以防失火，易潮解的试剂，保存在干燥缸内，以防潮解失效。

每日工作完毕，将室内打扫干净，离室前检查室内灯、水、电、煤气和门窗，注意安全。

## 第二节 玻璃器皿洗涤法

无论新旧玻璃器皿，使用前都必须彻底洗净，可先用洗涤剂再用硫酸洗液洗涤，水冲、烘干后备用。

如用于镀银等金属盐类的玻璃器皿，洗涤后的玻璃器皿还要投入硫酸洗液中浸泡2小时以上，然后取出用自来水彻底冲洗，烘干备用。

载物片和盖玻片均应投入硫酸洗液中浸泡，充分水洗后投入95%酒精中，再用白色丝绸擦干备用。

用过的旧载物片，可投入废二甲苯中浸泡，直至盖玻片自行脱落为止，擦去二甲苯再投入稀释的洗衣粉中除去油污和载物片上的组织，用水洗净擦干，用这种方法可以充分利用载物片和盖玻片的使用率。

硫酸洗液的配制法：

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 重铬酸钾(potassium dichromate, 工业品) | 40g   |
| 硫酸(sulphuric acid, 工业品)         | 200ml |
| 自来水                             | 200ml |

先将重铬酸钾加入自来水中加热溶解，然后冷却。待冷却后，徐徐加入硫酸，随加随搅拌。加入硫酸时，溶液迅速变热，注意不要使溶液过热，降低添加速度，防止出现沉淀。此时可在容器外用冰块降温，直到将硫酸液全部加完为止。这时硫酸洗液呈深橙红色。在配制时不能操之过急，液体过热易产生沉淀，效力降低。尤其要注意切勿将重铬酸钾液倾倒入硫酸中，会引起爆炸伤人。

### 第三节 切片机

切片机的种类很多，常用的切片机可分为四种，即石蜡切片机、火棉胶切片机、冰冻切片机、震动切片机。每种使用方法各有不同，现简要介绍如下：

## 一、石蜡切片机

多为轮转式，为组织切片室中主要的工具之一。组织切片的厚薄准确与否和切片的完整程度与切片机的质量有密切的关系。一台好的切片机，关键在于齿轮盘及丝杆的准确转动，准确的转动就能得出准确的切片厚度。一般切片机都刻有指示度盘，每度以微米( $\mu\text{m}$ )为单位(即 $1/1000\text{mm}$ )。切片机上装有持物台、持刀台、刀台移动制、手摇柄和机座等。

切片时，首先将蜡块置于持物台上，然后将切片刀放在持刀台上，调好方位，定好厚度，即可切片。

## 二、火棉胶切片机

此切片机是推拉式的，切片时将组织块放在持物台上，切片刀平置于机上的持刀台上，与组织块作一定角度。切片时切片刀由前向后滑动，每推拉一次得切片一张。

## 三、冰冻切片机

冰冻切片机与石蜡切片机相仿，冰冻切片方法是利用制冷剂作用在组织块上，使组织在短暂的时间内冻结，将生活状态下的组织结构与化学成分固定下来，并能更好地保存酶的活性。冰冻切片法是神经解剖学研究中的常用方法。

### (一) 制冷方法：

1. 氯乙烷法：将氯乙烷直接喷洒在组织块上，氯乙烷很快挥发，同时吸收热量而使组织块冻结。
2. 二氧化碳法：由液态 $\text{CO}_2$ 放出后气化，致使组织块冻结。
3. 半导体冰冻切片：将半导体制冷装置分别安装在组织台和切片刀上使其制冷，用普通推拉切片机即可切片。

(二) 恒冷箱切片：恒冷箱切片是近年来发展起来的切

片方法，是将切片机置于恒冷箱中，使切片机周围保持在恒定的低温状态。适用于固定组织和未经固定的新鲜组织、均能切出完整的切片。恒冷箱切片优于以上各种冰冻切片。

1. 步骤：将金属标本托放在恒冷箱内预冷，在标本托上放少量蒸馏水，同时放上一小块滤纸，如组织块太小，可在组织托上放一块脑组织做底托。

2. 骤冷(Quenching)：是使组织块迅速骤然冷却，以防止组织内水分子积聚而产生冰晶，破坏组织结构，同时可保存化学成分和酶的活性。要求组织块要小，骤冷时间要短。

准备降温杯一个(市场上小的保温瓶即可)，将无水乙醇约150ml放入降温杯内。用竹镊取少许干冰投入杯内，此时出现冒泡现象，边加干冰边搅拌，直到饱和，这时干冰酒精混合液变得粘稠，加入干冰时不再冒泡，温度达到 $-70^{\circ}\sim -75^{\circ}\text{C}$ 。

将20或30ml的烧杯内盛放20ml正己烷(Hexane)，放入降温杯内，用一金属托嵌在烧杯口上，不使烧杯倾倒，盖好杯盖，经过10分钟左右，测量正己烷降到 $-65^{\circ}\sim -67^{\circ}\text{C}$ 。将取下的组织块，迅速投入正己烷内。注意不要使组织块与杯壁接触避免粘上。在正己烷中骤冷的时间不宜过长，一般在10秒钟左右。

用预冷的镊子将组织块取出，用滴管滴一滴蒸馏水，将组织块粘在恒冷箱内预冷的组织托上，使组织固定牢固。约20分钟后，组织块温度与恒冷箱内温度一致后，开始切片。

切片时恒冷箱温度维持在 $-15^{\circ}\sim -20^{\circ}\text{C}$ 。切片时利用防捲板，使切片顺利展平。也可以用载玻片直接在切片刀上贴片，切下的切片在室温下干燥。

#### 四、震动切片机

震动切片机是近年来出现的一种新型切片机，原本是为切新鲜未固定的组织制备的。此机利用刀片的振动切割组织，振幅和频率可根据需要来调节。震动切片机可切固定过的组织，也可切未经固定的新鲜组织。目前在作免疫组化电镜研究中，在免疫反应前多用震动切片机切片，避免冰冻切片，以利结构的保存。

切片时将缓冲液置于标本槽中，将组织块固定在组织托上浸入液体中，开始切片，切下的组织片，漂浮在液体中，用毛笔取出。切片厚度 $20\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 。在神经解剖学研究中不宜做连续切片。

#### 五、切片刀的种类

切片刀是切片机的主要部件之一，切片刀有两面皆凹的，有一面平而另一面凹的，也有两面均为平的。凹度大的适于火棉胶切片，凹度小的适于石蜡切片，两面均平者用于冰冻切片。

有许多书上介绍在切片刀的背部有a、b、c、d的符号，这是代表刀的种类。a型为火棉胶切片刀，其特点为刀身的一侧倾斜度略大于石蜡切片刀，这种切片刀，在切片时酒精可以滞留在刀刃上，可以起到滑润作用。b型为石蜡切片刀，特点为刀身一侧为平直的，另一侧仅微凹。切片时将刀的平直面对组织蜡块，即蜡块的接触面。c型为冰冻切片刀，特点为刀身两侧均平直，一侧刀刃部为刨型者，用于切冰冻后的组织。d型为切硬组织或未脱灰骨的组织，其特点在刀刃上有较宽的刨刃，形象刨子，d刀又可根据组织的硬度的情况分 $d_1$ 、 $d_2$ 、 $d_3$ 、 $d_4$ 等(图1-1)。

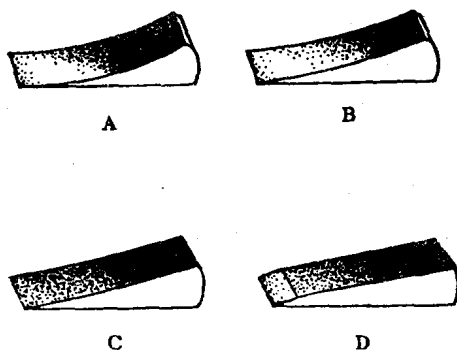


图1-1 切片刀的种类

- A: 一侧倾斜度较深(火棉胶切片刀)
- B: 一侧为平直的, 另一侧较浅(石蜡切片刀)
- C: 两侧均平直, 另一侧仅微凹(冰冻切片刀, 亦可用于石蜡切片)
- D: 刀刃上有较宽的刨刃(切硬组织或未脱钙的组织)

近年来市场上可购到切片刀片, 这种刀片安置在石蜡切片机的特殊刀架上, 使用颇为方便, 可切很薄的切片, 并解除了磨刀的麻烦, 当刀刃不快时, 换新刀片即可。

切片刀在购买回来后, 必须配制刀柄和刀裤。在配制时必须注意刀裤的大小要适宜, 否则会使刀刃磨得过宽或过窄。每个刀裤只能和一把切片配合使用, 不能与别的切片刀混合使用(图1-2)。

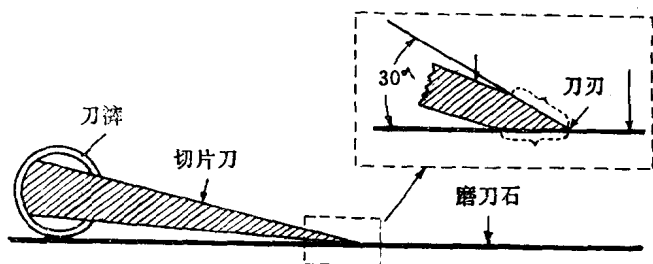


图1-2 刀刃、刀锋与磨刀石的关系

## 第四节 磨刀和磨刀机

### 一、磨刀石的种类

磨刀石有人造石和天然石之分，一般均采用天然石。天然石一般有青色和黑色两种，青板石质地坚硬，不易出浆，常用黑色的，又名黑老虎，石质软硬适中，磨刀较好用。磨石的大小一般为 $10 \times 30\text{cm}$ 。

如何选择磨刀石：看一块磨刀石的好坏，首先要看石头的质量。一般在石厂购买时最好先用水在石头表面擦一下，基本上就能看出有无杂质（有杂质的不能用）。然后挑选石质软硬适中，不要过硬也不要过软，以出少量浆者为好。

### 二、磨刀

刚买来的磨刀石，表面非常粗糙，此时先将磨刀石的使用面用毛玻璃磨平。将已磨平的石面用水洗净。

磨刀时先将磨刀石放置平稳，切勿倾斜。右手紧握刀柄，左手紧按刀的最前端，使刀口与磨刀石后部紧密接触，此时将刀向左前斜方向使刀慢慢推进，至磨刀石前端。

然后翻转刀面，使刀裤不要离开磨石，并将刀柄向右推移，推刀向左后斜方向。

依照上述方法反复操作，不要过急，直到手势熟练。

将切片刀磨好后，在低倍显微镜下观察，视刀刃处是否还有缺口，如缺口较大还须进行磨刀，直到无缺口为止。

将已磨好的切片刀用水洗净擦干，还要用璧刀皮反复璧刀。璧刀时恰恰与磨刀的方向相反，刀裤向前推进，要注意刀口与璧刀皮贴紧，否则达不到璧刀的效果。璧刀的目的，就是将刀刃更加锐利，可以用一根头发在刀口上检验，能否截断，能截断又没有缺口，此切片刀即可切片(图1-3)。为了

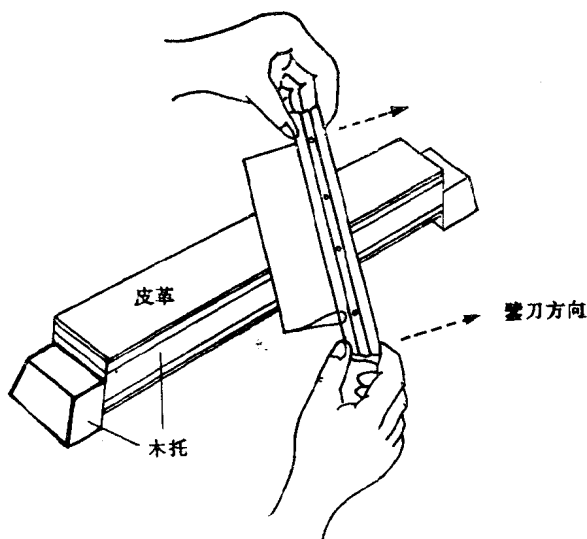


图1-3 切片刀与璧刀皮的关系