

ZUZHIXUE YU PEITAI XUE

组织学与胚胎学

实验教程

SHIYAN JIAOCHENG

第四版

主编 邵淑娟

组织学与胚胎学

实 验 教 程

(第四版)

主 编 邵淑娟

大连出版社

© 邵淑娟 2007

图书在版编目(CIP)数据

组织学与胚胎学实验教程/邵淑娟主编. —4版. —大连:大连出版社,2007.1
ISBN 978-7-80612-442-0

I. 组... II. 邵... III. ①人体组织学—实验—医学院校—教材
②人体胚胎学—实验—医学院校—教材 IV. R32-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第010157号

责任编辑:刁铁英

封面设计:曹 艺

责任校对:王恒田

出版发行者:大连出版社

地址:大连市西岗区长白街10号

邮编:116011

电话:(0411)83639794/83620941

传真:(0411)83610391

网址:<http://www.dl-press.com>

电子信箱:cbs@dl.gov.cn

印刷者:大连印刷三厂

经销者:各地新华书店

幅面尺寸:185mm×260mm

印 张:8.5

字 数:210千字

出版时间:1997年8月第1版

印刷时间:2007年2月第4版

2007年3月第5次印刷

印 数:4001—6000册

书 号:ISBN 978-7-80612-442-0

定 价:12.00元

如有印装质量问题,请与我社营销部联系

购书热线电话:(0411)83639794/83620941

版权所有·侵权必究

编委会

主 编 邵淑娟

副主编 胡 军 于丽君 郝立宏 初海鹰

主 审 杨佩满

编 者 (以姓氏笔画为序)

丁艳芳 孔 力 于丽君 马海英 初海鹰

刘 渤 宋 阳 邵淑娟 金 伟 郝立宏

胡 军 宫琳琳 赵瑾瑶

前 言

近年来,随着国家教育规模的不断扩大,普通高等院校人才培养模式逐渐发生改变,这就要求我们基础医学教育内容不断地进行调整,以满足培养目标的要求。《组织学与胚胎学实验教程》第四版,总结了前三版使用过程中的经验和体会,结合目前教学实际情况,进行了教学内容的调整,使教学内容更加凝练。同时,在每章增加了自我检测的内容,使学生更加明确每章的要点,有利于学生复习。

本教材是在大连医科大学组织胚胎学教研室多年使用的内部讲义的基础上,由大连医科大学、大连大学医学院和解放军大连高等医学专科学校三校的组织胚胎学同行共同编写的。大连医科大学的杨佩满教授、许广沅教授从编写的指导思想、编写大纲的审定等方面均给予全面的指导。同时,本书也凝聚了前三版参编人员的智慧和汗水,在此深表谢意。再版过程中,大连医科大学组织胚胎学教研室的全体老师做了大量的工作,在此谨致以最诚挚的谢意。

本教材适合教学实际,内容凝练,重点突出。但由于编者水平所限,会有不少欠缺之处,恳请老师和学生在使用中提出宝贵意见,为今后的修订工作提供参考和依据,使本教材不断提高和完善。

编 者

2006. 12. 25

目 录

第1章	绪论	(1)
第2章	组织学研究的基本方法	(5)
第3章	上皮组织	(17)
第4章	结缔组织—1	(24)
第5章	结缔组织—2:血液	(29)
第6章	肌组织	(31)
第7章	神经组织和神经系统	(35)
第8章	循环系统	(41)
第9章	免疫系统	(46)
第10章	皮肤	(51)
第11章	消化系统——消化管	(54)
第12章	消化系统——消化腺	(61)
第13章	呼吸系统	(66)
第14章	泌尿系统	(70)
第15章	内分泌系统	(74)
第16章	感觉器官	(78)
第17章	男性生殖系统	(82)
第18章	女性生殖系统	(85)
第19章	人体胚胎早期发育	(90)
第20章	循环系统的发生	(96)
第21章	消化系统和呼吸系统的发生及颜面的形成	(101)
第22章	泌尿系统和生殖系统的发生	(107)
第23章	神经系统的发生	(114)
	中英文对照索引	(116)

第1章 绪 论

组织学与胚胎学是一门基础医学必修课程,组织学是研究机体微细结构及其相关功能的科学;胚胎学是研究个体发生、生长及其发育机理的科学。两者都以观察微细结构作为最基本的研究方法,故实验课的学习是不可或缺的重要环节。实验课的内容主要是教师通过多媒体示教,指导学生观察组织切片、电镜照片、模型、观看电视教学片并进行一些必要的技术操作。实验课不仅能使学生通过自己操作和显微镜下观察,认知、验证正常人体细胞、组织、器官的形态结构,加深对所学理论知识的理解、记忆,同时还能训练敏锐的观察能力和准确描述所观察事物的能力,培养尊重客观事实的科学态度。

一、实验课的目的和要求

(一)掌握正确使用光学显微镜观察组织切片的基本方法。学会辨认正常细胞、组织、器官,并能进行比较、分析、综合,进而了解其结构与功能的关系。

(二)通过对具体组织切片标本的观察,验证和巩固所学的理论知识,加深和扩大对所学知识的理解。

(三)通过观察电镜照片掌握某些重要细胞、结构的超微结构特点。

(四)能用简单的线条图或文字描述说明镜下所见的某些重要细胞、组织和器官的结构特点。

(五)通过对胚胎模型的观察、教学片的观看,了解人胚发育的基本过程。

(六)培养严格的科学作风和实事求是的科学态度,培养分析问题、解决问题的能力。

二、实验课的学习方法

(一)认真做好课前预习。阅读实验指导,明确每节课的实验目的和要求,认真复习相关理论知识,以便在课堂上做到主动。

(二)重视多媒体示教。在观察切片前认真听讲、观看教师的多媒体示教,详细了解每次实验课所要观察切片的主要结构特点、辨认依据,明确要求重点观察、辨认的内容。

(三)认真观察。观察切片时,注意力要集中,密切联系课堂所学理论知识,有步骤地进行观察并做好简要记录。

1. 了解组织切片标本的名称、取材及染色方法。同一种结构应用不同的染色方法,所显示的颜色不同。

2. 观察时参照多媒体示教照片、书上插图或图谱,可以更容易地在切片中找准结构。

3. 要全面、系统地观察切片。观察时,先用肉眼观其大体形态,判断是中空性器官还是实质性器官;再用低倍镜由腔面向外(前者)或由表及里(后者)扫视全貌,区分各个部位;最后换用高倍镜进一步观察重点内容;油镜一般只在观察血细胞时才用。要注意养成从整体到局部、从一般到特殊的观察习惯。

4. 观察切片、电镜照片要深入细致,边看边想,不但注意要求看什么,更要关注看到的

是什么、有何结构特点即辨认依据是什么。克服应付了事、不求甚解的不良作风。

5. 对类似的组织、器官要善于运用比较、分析和综合的方法,加深对其结构特点的认识,提高辨认能力。如复层扁平上皮与收缩状态的变移上皮、骨骼肌与心肌、中性粒细胞与嗜酸性粒细胞、淋巴细胞与单核细胞、中动脉与大动脉、小肠与结肠、淋巴结与脾脏、近曲小管与远曲小管、增生期子宫与分泌期子宫等。

6. 观察切片和电镜照片的同时,记住观察目标的相关理论知识(形态结构特点和功能),提高实验课学习效率。

7. 观察切片时注意不要被人工假象误导。在制作切片标本时,要经过复杂的技术过程,常常不可避免地产生一些对组织的损伤——人工假象,如上皮细胞部分脱落、血细胞被推破以及组织间出现裂隙、皱褶、刀痕、染料残渣等,要注意识别。

(四)注意组织结构与功能状态的关系。同一细胞、组织、器官在不同的生理状态下会呈现出不同的形态。如甲状腺滤泡上皮细胞可因功能状态不同而呈现扁平、立方或柱状的不同形态。所以,在观察切片标本时要有一个动态的观点,这是理论与实际相联系的重要环节。

(五)注意平面与立体的关系。由于切片标本极薄,在视野中呈现的是平面结构。观察切片标本时要能将看到的二维图形还原为三维的立体构像。此外,由于切片的部位和方向的不同,同一细胞、组织或器官可呈现不同的切面图像(横切面、纵切面、斜切面、切线切面等)(图2)。

(六)注意胚胎模型中各部分颜色所表示的胚层来源。在胚体体形建立以前的各时期模型中常以黄色表示下胚层或内胚层,红色表示中胚层,蓝色表示上胚层或外胚层;各器官、系统发生的模型除遵循上述原则外可略有变动,如以红、棕红、桔红等分别表示同一胚层分化而来的不同原基(或器官)。

(七)胚胎学实验要有时间概念和动态的观点。不同原基(或器官)发生过程均经过由简单到复杂,由原始到完善的过程,故在不同时间内具有不同的外形、结构和位置的变化。在学习时要在理解内容的基础上,结合模型及教学片,充分发挥自己的想象力,建立起人胚发育过程中时间、空间、结构三者的动态变化立体概念和整体变化观念。

(八)自我检测。每课实验内容完成后,要按照组织学实验部分每课自检内容检查自己的切片观察、掌握情况;填好胚胎学实验部分每课所附模式图的图注,进行自我检测。

(九)认真完成实验报告。实验报告的书写方式有两种:即文字描述和绘图。

文字描述:是指把显微镜下所观察到的组织结构特点,以文字的形式记录下来。描述时要求层次分明(中空性器官由腔面向外描述,实质性器官由表及里描述),结构描述准确,文字流畅,书写工整。

绘图:是指在认真观察切片并理解的基础上,选取结构典型的部位,以简单的线条图的方式绘制镜下实际所见的形态结构特点。绘图时要注意图面设计、大小比例、颜色深浅、线条粗细要合理;染色特点准确表达,如HE染色的标本上,细胞质着红色,细胞核着蓝色;图中标线应平行,注字应工整,标线、注字用铅笔;图下方注明标本名称、标本号、取材、染色方法、放大倍率(图1)。绘图要体现科学性、真实性、特征性、艺术性,切忌对照书上的附图或图谱抄画,也不要乱画。备好绘图文具:红蓝铅笔、铅笔、尺子、橡皮等。

标本名称:

标本号:

取材:

染色方法:

放大倍数:

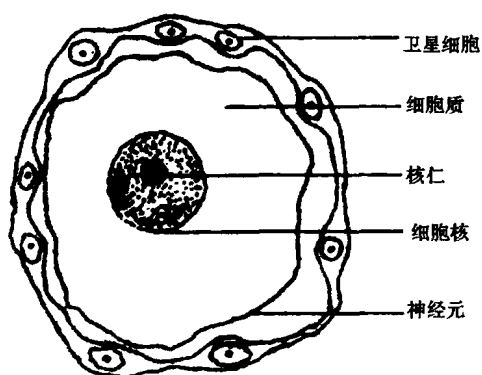


图1 绘图记录格式举例

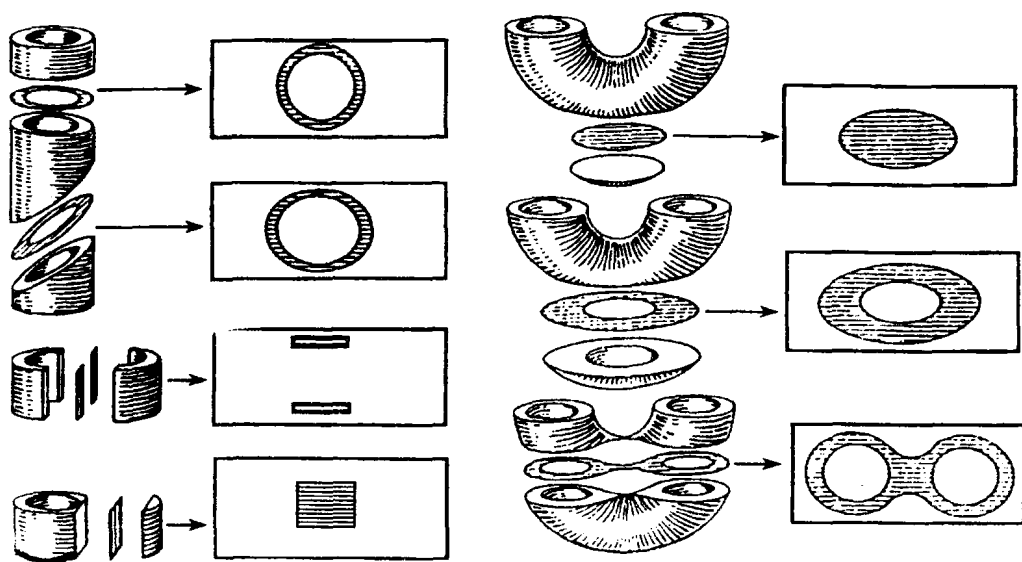


图2 切面与立体的关系

三、实验室规则和注意事项

1. 实验课穿好白大衣,携带教科书、实验指导、图谱、实验报告纸及绘图文具。
2. 按指定位置入座和使用显微镜、切片,不得擅自调换。
3. 实验课提前 10 分钟到,检查显微镜、切片等,如有问题课前即报告老师并做好登记。
4. 显微镜是精密的贵重仪器,要严格遵守操作规程(见下一章)。
5. 按号取、放切片标本。观察切片时一定注意切片的放置方向:盖片在上,载片在下。
6. 严格按照肉眼→低倍镜→高倍镜的顺序进行观察。一般不用油镜。
7. 旋转调节器时,动作要轻;低倍镜换高倍镜后,注意只能轻轻转动细调节器,不要使镜头碰到切片。

8. 损坏显微镜、切片、模型等,应立即主动报告老师,酌情赔偿损失。
9. 实验室保持安静和清洁,不准喧哗和乱扔杂物,不准在实验桌、切片盒、登记本等处乱写乱画。
10. 实验完毕,必须整理好切片,做好登记,将显微镜及切片盒放回原处。
11. 值日生认真打扫实验室卫生,关好门、窗、水、电,扔垃圾。

(胡军 孔力)

第2章 组织学研究的基本方法

目的和要求

1. 掌握普通光学显微镜的构造、操作及保养。
2. 了解石蜡切片制作及苏木精——伊红染色法的基本原理及过程。
3. 了解电子显微镜的基本原理及超薄切片标本的制作过程。
4. 了解组织化学方法及免疫组织化学方法。

一、光学显微镜

光学显微镜是组织学实验观察的主要仪器。了解光镜的构造,正确而熟练地使用光镜是组织学实验课重要的基本技能训练项目之一。

(一) 光学显微镜的构造

光学显微镜的基本结构包括两部分:机械部分和光学部分(图3)。

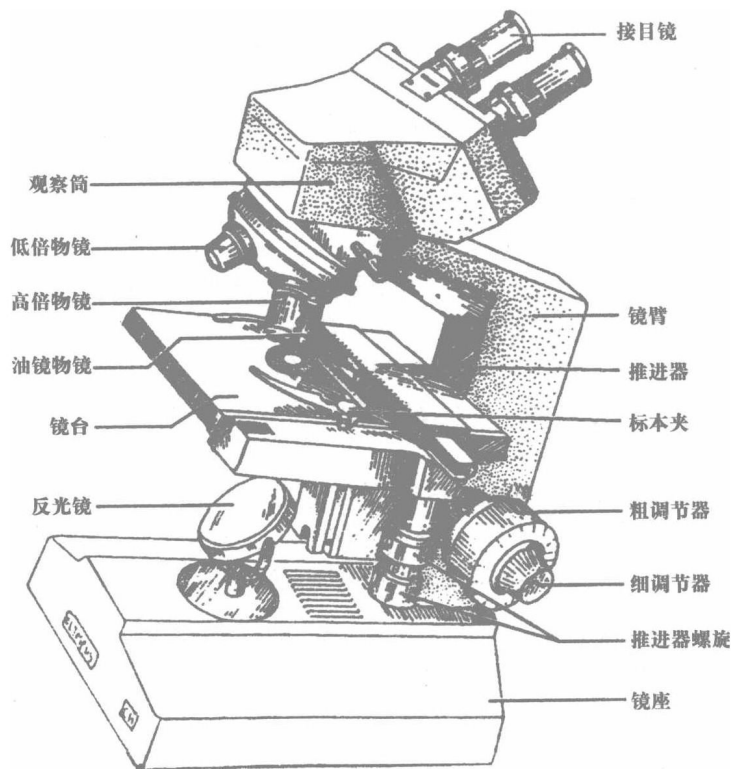


图3 光学显微镜的构造

机械部分主要包括:

1. 镜座:位于最下部,起支持作用。

2. 镜臂:起支持和握取作用。

3. 镜台:又称载物台,是放置切片标本的平台,中央有一圆形通光孔。镜台上装有固定切片和调节观察视野的标本夹、推进器。

4. 镜筒:上端插有目镜,下端连接物镜转换器。

5. 粗调节器:转轮较大,可以升降镜台,主要用于低倍镜聚焦。

6. 细调节器:转轮较小,主要用于高倍镜聚焦。

7. 物镜转换器:可以旋转,用于不同放大倍数物镜的转换。

光学部分主要包括:

8. 目镜:双筒显微镜的双目镜之一,内含指针。

目镜附件(1)目镜筒滑板及瞳孔间距标尺:用于调节目镜间距离,以适合自己的瞳孔间距;

目镜附件(2)视度调节环:如两眼屈光度不等,可调节视度调节环进行补偿,使双眼物像均清晰。

9. 物镜:嵌于物镜转换器上,根据其放大倍数和使用特点可分为低倍镜($4\times$ 、 $10\times$)、高倍镜($40\times$)和油镜($100\times$)。

10. 聚光器:嵌于镜台下方,可上下移动以调节光线强弱。内装孔径光阑,可开大或缩小,以调节进光量。

11. 光源:分为内光源和外光源两种。内光源位于镜座中央,内装有小灯泡;外光源通过反光镜(平面、凹面两面)采集光线。

(二)光学显微镜的使用方法

低倍镜的使用:

1. 对光:将双筒显微镜放在正前方,转动粗调节器,降低镜台;旋转物镜转换器,使10倍物镜头对准通光孔;然后升高聚光器,打开孔径光阑,将反光镜的凹面对准光源,直至视野(即在目镜中所能看到的圆形区域)均匀、明亮为止。

2. 放置切片:将要观察的切片放在镜台上,用标本夹固定好,并将要观察的部位移至中央。

3. 调焦距:旋转粗调节器,升高镜台,至物镜距玻片约0.5cm时,再缓慢降低镜台,直到看清图像为止。

4. 调节两瞳孔间的距离:一边用双眼自目镜中观察,一边用双手握住两个目镜管,左右移动,直到双眼看到一共同视野为止。

5. 为使右眼图像更清晰,可轻轻转动细调节器;欲使左眼图像清晰,需旋转镜管视度调节环。

高倍镜的使用:

用低倍镜看清图像后,将要进一步放大的结构移至视野中央,一边从侧面观察,一边旋转物镜转换器,将高倍镜头对准通光孔;升高聚光器,开大孔径光阑,将光线调节到最亮的程度;然后稍微转动细调节器,即可观察到清晰的图像。

油镜的使用:

观察血涂片时,在高倍镜观察的基础上,将需要进一步放大观察的部分移至高倍镜视野中央,再移开高倍物镜,在标本所要观察的部位滴一滴镜油,旋转物镜转换器,将油镜头对准通光孔,使油镜头下端与镜油接触,然后,轻轻转动细调节器,即可看清物像。使用油镜时,光线应调节到最亮的程度。用完油镜后,必须用擦镜纸蘸二甲苯,将镜头和玻片擦净。

(三) 光学显微镜的保养及使用规则

光学显微镜是医学科学中常用的贵重精密仪器之一,使用时必须仔细小心,养成正规操作的习惯,严格遵守使用规则。

1. 自箱中取、放显微镜时,应右手握镜臂,左手托镜座,平贴胸前,以防撞碰。切勿用一只手斜提,前后摇摆,防止目镜或反光镜脱落损坏。

2. 每次使用显微镜前后均要检查显微镜的主要部件有无缺损,如有损坏要及时报告并登记,以便处理与修复。使用时,要严格按操作程序,正确而缓慢地移动有关机械部分。

3. 禁止拆卸或自行修理显微镜的各个部件,更不允许与其他显微镜对换,以免安装不当影响观察效果。

4. 如镜头表面不干净,应该用擦镜纸蘸少量二甲苯轻擦。使用油镜观察完毕后,用擦镜纸擦去油镜头及切片上的油,另换擦镜纸滴上适量二甲苯,再朝一个方向将镜头擦拭干净。切勿转圈擦,以免磨损镜头。同时用该纸将切片上的油擦净。切忌用口吹、手指抹,或用其他纸、纱布擦。纱布只能用来擦拭显微镜的机械部分。

5. 观察完毕后,将切片标本取下按编号放回标本盒内,叉开物镜镜头,反光镜置于垂直位置。若使用电光源显微镜,则先将光源关至最小,然后关掉电源开关,拔掉插头。检查显微镜无损坏后盖好防尘罩,放回原处。

(四) 显微镜操作注意的三个参数

在使用显微镜观察组织结构时,有三个因素是很重要的,即显微镜的分辨本领、景深与焦深、反差。

1. 分辨本领(resolution):指能清楚分辨相邻两质点间最短距离的能力,也称为分辨能力或分辨率。其距离越短,分辨本领越高。人眼在 25cm 明视距离中的分辨本领为 0.2mm,光镜分辨本领为 0.2 μ m。

(1) 分辨本领受照明光源波长制约

$$d = \frac{0.61\lambda}{n\sin\alpha}$$

d: 为分辨本领

λ : 为照明光源的波长

n: 为介质的折射率

α : 为物镜的半孔径角

以光镜油浸物镜为例, $n\sin\alpha$ 最大可以是 1.5, 可见光的 λ 为 0.5 μ m, 因此, 光镜极限分辨本领大约是 0.2 μ m, 小于 0.2 μ m 的微细结构在光镜下是不能辨认的。高倍物镜及低倍物镜的分辨本领更低。

(2)分辨本领决定有效放大率

$$M_{\text{有效}} = \frac{\text{裸眼 } d}{\text{物镜 } d} \quad M_{\text{有效}}: \text{有效放大率}$$

超过有效放大率的放大称为空放大,结果像虽然增大,但却是模糊不清的。用油镜观察时,有效放大倍率 $M_{\text{有效}} = \frac{0.2\text{mm}}{0.2\mu\text{m}} = 1000\times$, 因此光镜总放大倍率一般为 $1000\times$, 为观察舒适些,最高也不超过 $2000\times$ 。而低于有效放大率时则是没有充分发挥仪器的性能,如油镜分辨率为 $0.2\mu\text{m}$, M 为 $100\times$, 若用 $5\times$ 目镜,则总放大倍率为 $500\times$, 低于有效放大倍率($1000\times$), 仪器的实际分辨本领 $d_{\text{仪}} = \frac{0.2\text{mm}}{500\times} = 0.4\mu\text{m}$ 。也就是说,在低于 $500\times$ 的光镜照片上,不可能看到 $<0.4\mu\text{m}$ 的结构细节。

2. 景深(depth of field)与焦深(depth of focus): 景深指沿光轴方向样品能清晰成像的厚度。假如将物体置于透镜前方,于透镜后方置一屏幕,物体聚焦在屏幕上呈清晰的像。如果能把物体在光轴方向前后移动一定距离而屏幕的像依然清楚的话,这段距离就是景深。反过来,物体不动,在光轴方向前后移动屏幕以一定距离,而像始终清楚,这段可移动的距离称之为焦深。光镜的景深、焦深甚短,放大倍率 100 倍时,景深约 $0.2\mu\text{m}$ 左右,比光镜样品厚度($7\mu\text{m}$)小得多,因此在聚焦成像时既不会出现结构重叠,同时通过不同平面的聚焦可得到样品中更多的信息,有可能重建某些微细结构的三维立体形态。电镜的景深和焦深比光镜长得多。

3. 反差(contrast): 又称对比度,指图像中各部分细节的亮度与它们的背景亮度的差别。如果反差太弱,即使仪器分辨本领很高,也不能辨认样品的细节。反差主要有光强度反差和色反差。另外还有相位反差(波长的相位差异),主要用于相差显微镜。

在显微镜观察和拍照时,取得适宜的反差是非常重要的。反差要适度,过弱则图像模糊;过强则图像生硬,且不能提供细节和层次。反差可通过以下方式调节:(1)样品染色增加反差;(2)调节视野辉度即物像亮暗程度达到理想反差。辉度可通过改变聚光器高度、聚光器孔径光阑大小及反光镜角度来调节。

二、石蜡切片标本制作方法

组织学标本一般可分为两大类:非切片标本和切片标本。

非切片标本:指不用切片机而制作的标本,主要包括:

(1)涂片标本:将液态组织(血液、骨髓、培养细胞等)直接涂抹在载玻片上,经固定、染色、封固等步骤制成标本;

(2)铺片标本:将膜状组织结构(如肠系膜)伸展后平铺于载玻片上,经固定、染色、封固等步骤制成标本;

(3)磨片标本:把坚硬的骨组织等不经脱钙而直接磨成薄片,经过染色或不染色,然后封固制成标本。

切片标本:即将人体或动物某种脏器的一小部分切下来,经过一定的技术处理制成切片标本,进行镜下观察。我们在实验教学中所观察的大多都是这类标本,最常用的是石蜡切片标本。制作石蜡切片必须达到以下几点要求:尽量保持生前构造;组织要薄;组织内

的构造能够分辨;组织透明便于在显微镜下观察;标本尽可能长期保存。

为达到上述要求,制作石蜡切片时需经过下列复杂的步骤:

(一)取材

组织学是研究正常有机体细胞、组织和器官微细结构的科学,因此所取的材料要新鲜和正常。一般在动物死后2小时以内取下需要的组织和器官,用利刀切成小块,一般不超过 1cm^3 。

(二)固定

将取下的新鲜组织块迅速投入固定液中进行固定,使细胞内的蛋白质及其他成分迅速变性凝固,以避免由组织内酶作用引起的细胞自溶或由细菌作用引起的组织细胞分解,从而保持其原有的形态。固定液的种类很多,必须是渗透力强,又不使组织过度收缩或膨胀的试剂,常用的有10%甲醛、90%酒精、醋酸、丙酮、苦味酸、重铬酸钾、锇酸、Zenkens液、Bouins液等。固定液的量一般以组织块大小的20倍为宜,固定时间的长短随固定液的要求不同而定,也与气温、组织块的大小有关。

(三)脱水、浸透

组织要切成薄片必须具备一定的硬度,常用的方法是将固定后的组织浸埋于石蜡中。但由于甲醛等固定液为水溶剂,水不能和石蜡混溶,而固定后的组织中因充满水分会妨碍石蜡的浸入,所以必须用脱水剂去掉水分。

常用的脱水剂是酒精,脱水时由浓度较低的酒精开始,逐渐转入高浓度的酒精。如由50%开始,经70%、80%、90%、95%至无水酒精,每一步骤各约5~12小时至1天,视材料的大小而定。需注意,组织块不能骤然放入高浓度的酒精,因为这样会使组织和细胞收缩过度,形态变化过大。此外,95%酒精及无水酒精有脆化组织的作用,时间不宜过长,一般3~6小时即可。

脱水后组织中含有酒精,仍不能与石蜡混溶,需用能够和酒精及加热熔化的石蜡混溶的中间液取代组织中的酒精,并使石蜡易于浸入组织。常用的中间液有二甲苯、氯仿、甲苯、香柏油等。用中间液充分浸透组织时,组织块呈透明状,故这些中间液又称透明剂。

(四)浸蜡与包埋

把脱水、浸透透明剂后的组织块投入温箱($56^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$)内已熔化的石蜡中,经2~3小时使石蜡充分渗透至组织内部,把透明剂从组织块中置换出来,这叫浸蜡。当组织块浸蜡完毕后,即将其放入盛有熔化石蜡的包埋器中,待石蜡凝固后,组织块便被包埋在里面,成为蜡块,这一过程称为包埋。浸蜡与包埋的目的是使组织块饱和,最后恢复成固体,有一定的硬度,利于切片。

(五)切片及贴片

将含组织块的蜡块经修整后固定好,在切片机上切成薄片,厚度按需要而定,一般组织切片是 $5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 。切片可用蛋白甘油混合液贴附于干净的载玻片上,也可直接贴于载玻片上,置于 50°C 左右的温箱内烤干备用。

(六)染色

贴好的切片,经过脱蜡、梯度酒精、水洗等过程后,即可进行染色。染色的目的是利用组织中各种结构与化学染料作用所呈现的不同颜色,来分辨标本的微细结构。所染的颜

色随染料、固定液以及细胞、组织的结构和生理状态不同而异,常用的染色方法是苏木精—伊红染色法(Hematoxylin Eosin stain),简称 HE 染色法。

苏木精是一种天然的碱性染料,可使组织细胞中的酸性物质(又称嗜碱性物质)染成紫蓝色,如细胞核中的染色质等;伊红是一种酸性染料,可使组织细胞中的碱性物质(又称嗜酸性物质)染成红色,如多数细胞的细胞质、核仁等在 HE 染色的切片中均呈红色,很易与细胞核区别。详细过程后叙。

(七)封固

染色后,经酒精脱水、二甲苯透明,即可封固。封固时,在切片标本上滴一滴树胶,盖上盖玻片,干后即成为既可以在镜下观察又能够长期保存的标本。

三、常规 HE 染色技术

(一)染液配制

1. 苏木精染液:

苏木精 2 克溶于 100 毫升蒸馏水中,溶解后加蒸馏水及纯甘油各 100 毫升,钾矾 3 克及冰醋酸 10 毫升。混合后用纱布封闭瓶盖,两周后颜色由红色变为暗紫色,即可以使用。

2. 伊红酒精溶液:

0.5 ~ 1 克伊红与 100 毫升 95% 酒精充分搅拌混合,溶解后即可使用。在使用时如发现现有沉淀产生,应更换新液。

(二)HE 染色的步骤和方法

1. 切片脱蜡:HE 染色所用的苏木精染料系水溶液,所以切片要用二甲苯脱蜡 5 ~ 10 分钟,将石蜡去除才能进行染色。

2. 切片从二甲苯中取出,浸入无水酒精约 1 ~ 3 分钟,用以洗去载片上溶解石蜡的二甲苯,此时切片应全部清晰。

3. 切片浸入 95% 酒精 1 ~ 3 分钟,其作用与无水酒精相同,此时,组织切片呈白色。

4. 自 90% → 80% → 70% → 50% → 30% → 10% 各 1 ~ 2 分钟,之后入水。使切片不致于因从高浓度酒精骤然入水而骤缩、脱落。

5. 水洗切片入苏木精液染色 10 ~ 15 分钟,此步染细胞核。若室温低或用的是新配苏木精,染色时间应适当延长,也可加温染色。苏木精使用过久或因与其他物质起作用发生沉淀,染液变为蓝黑色,则苏木精失效。

6. 用水洗净剩余染液,进入 10% → 30% → 50% → 70% 酒精各 1 ~ 2 分钟。

7. 分色:此步是苏木精染色的关键。分色分三步进行,70% 酸性酒精(70% 酒精内滴加少量盐酸)分色 30 秒,70% 中性酒精 1 分钟,70% 碱性酒精(酒精内加入少量氢氧化钠)返蓝 1 ~ 2 分钟。分色时间根据组织不同而有所改变,可视组织颜色的深浅而定。分色标准以核为深蓝色,胞质无色或淡灰白色为好。

8. 分色后切片入 80% 酒精 1 ~ 2 分钟,90% 酒精 1 ~ 2 分钟。

9. 入伊红酒精液染色 3 ~ 5 分钟,亦可视组织的性质与伊红的浓度增减染色时间。伊红染色不宜过深,淡红即可。此步染细胞质。

10. 去色:95% 酒精洗二次,各 2 ~ 3 分钟,以除净多余伊红,使胞质着色清晰。

11. 脱水:无水酒精洗二次,各 1 ~ 3 分钟,以保证切片完全脱水,但不可久置,久置组

织会过度褪色。

12. 透明:切片从纯酒精中取出后,用吸水纸略为吸干,立即放入二甲苯中透明,透明三次,各约5分钟,透明时需检查切片,此时切片完全清晰透亮;若切片上出现云雾状或白色,说明组织切片脱水不够或在空气中吸水,应将切片返回无水酒精,复入二甲苯中直至透明为止。

13. 封固:切片经二甲苯透明后,取适量中性加拿大树胶滴于载玻片的组织上,取盖玻片从一端慢慢往下盖,避免发生气泡。树胶要求中性,否则容易褪色。切片封固后,置于37℃~40℃温箱中烤干,放阴凉处保存

14. 镜检:HE染色结果,嗜碱性结构呈深蓝色,嗜酸性结构为红色。

苏木精——伊红(HE)染色程序简图

石蜡切片 → 二甲苯 3~5min → 二甲苯 3~5min → 无水酒精 1~3min → 无水酒精 1~3min → 95%酒精 1~3min → 90%~10%酒精 各1~2min → 水洗 → 苏木精染色 10~15min → 水洗 → 10%~70%酒精 各1~2min → 70%酸性酒精(分色) 30s → 中性酒精 1min → 碱性酒精(返蓝) 1~2min → 80%、90%酒精 各1~2min → 伊红酒精染色 3~5min → 95%酒精 2~3min × 2 → 100%酒精 1~3min × 2 → 二甲苯 5min × 3 → 封固

四、电子显微镜基本构造及超薄切片的制作过程

电子显微镜(简称电镜)是研究细胞和细胞间质超微结构的基本工具。电镜样品不易保存,所以在电镜下拍摄的照片是我们用于研究的主要依据。电镜可分为透射电子显微镜和扫描电子显微镜。

(一)透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM),简称透射电镜

透射电镜装置庞大,其结构与普通光学显微镜有相似之处,但有以下几点主要区别:

1. 透射电镜用高真空、高电压条件下取得的电子束代替光镜所用的可见光源。
2. 以电子透镜代替光镜的玻璃透镜(物镜和目镜)。
3. 光镜调整放大倍率是通过更换不同物镜实现的,而物镜本身放大倍率一般是不改变的;电镜则是通过调整中间镜的放大倍率而改变整机的放大倍率。
4. 光镜的聚焦是通过调整物镜与样品间的距离完成的,而电镜的物镜与样品间的距离是不可调的,其聚焦要通过调整物镜电流来完成。
5. 不像光镜能用肉眼直接看见标本的成像,透射电镜必须将其投射到荧光屏上才能观察。光镜常是观察研究后,摄片做为记录,而电镜则多重视于摄片后的研究,因为在荧光屏上长时间仔细观察会使样品在电子束作用下发生变化或样品受到污染,并且荧光屏乳胶颗粒粗,不如照片提供的细节多,故比较重视及时摄片,以便仔细研究。
6. 透射电镜的电子束穿透力低,必须制备500Å左右厚的超薄切片,用重金属盐进行电子染色后观察。
7. 当电镜加速电压很高(数十千伏或更高)时,电子束照射在金属表面上会激发出X射线,因此电镜也是一个危险的X射线源,操作人员要注意防护和定期做健康检查。