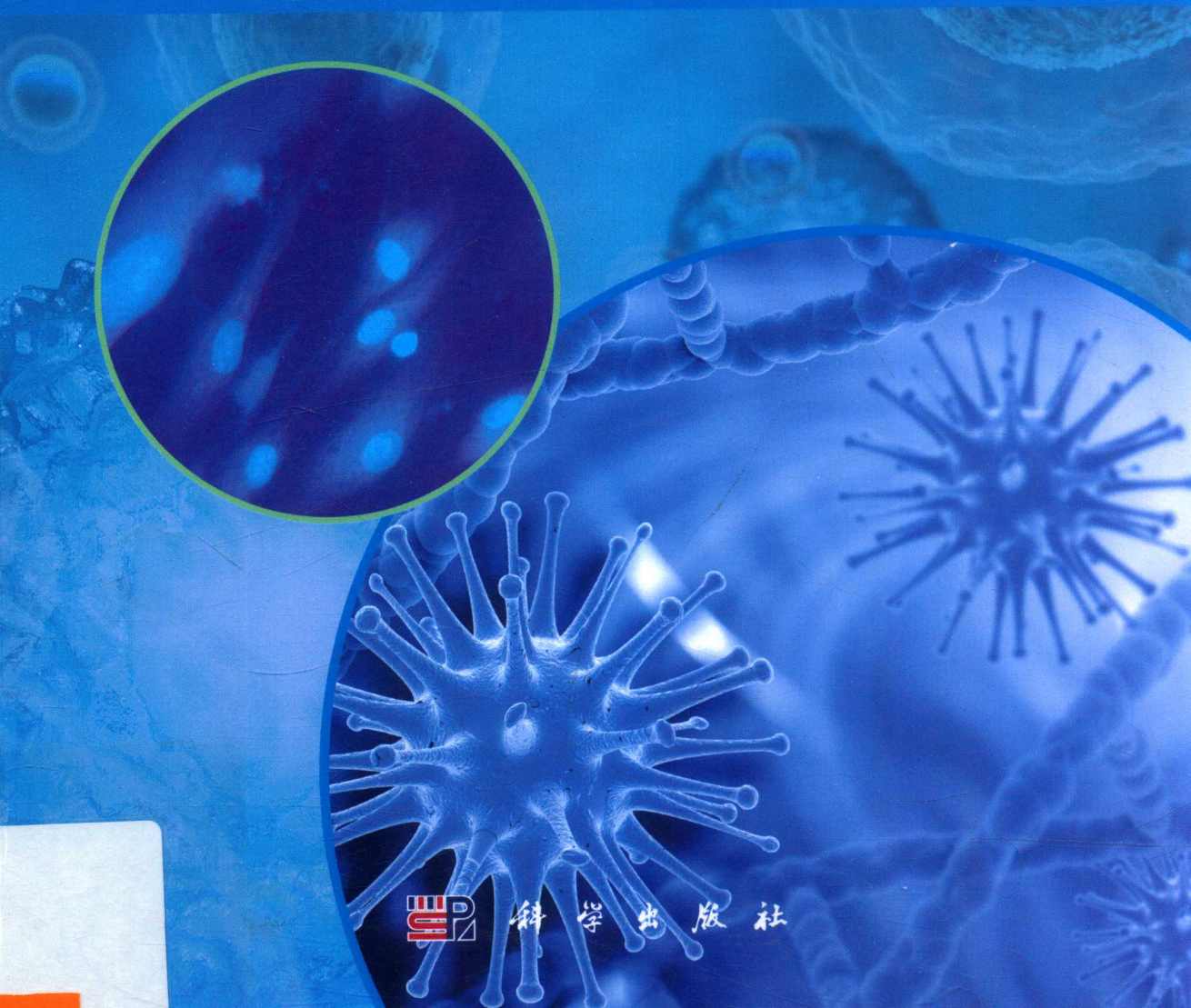


现代组织学技术

蔡 勇 阿依木古丽·阿不都热依木 主编



科学出版社

现代组织学技术

主 编 蔡 勇 阿依木古丽·阿不都热依木

副主编 卢建雄 乔自林 扎西英派

编 者 蔡 勇 阿依木古丽·阿不都热依木

卢建雄 乔自林 扎西英派 杨具田

王家敏 霍生东 杨妍梅 王明明

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书既涵盖了组织形态学中经典的切片技术,又重点介绍了近年来新发展的、具有较高实用价值的一系列新技术。全书共十三章,主要包括组织样本制备技术、石蜡切片制作技术、冰冻切片制作技术、组织染色技术、组织化学技术、免疫组织化学技术、原位杂交组织化学技术、光学显微镜技术、电子显微镜技术、显微图像分析技术、流式细胞术、组织芯片技术和细胞凋亡检测技术,涵盖了生命科学类组织形态学教学和研究中必须掌握的实验技术,并对各种技术的原理、理论意义、应用价值、操作方法及操作中可能遇到的常见问题给予了较为细致的说明。

本书可作为医学和生命科学类专业学生学习的教材,也可作为研究生、科研人员、临床检验医务工作者和实验技术人员进行科学研究的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代组织学技术/蔡勇,阿依木古丽·阿不都热依木主编. —北京:科学出版社, 2018.6

ISBN 978-7-03-057209-7

I. ①现… II. ①蔡… ②阿… III. ①生物组织学 IV. ①Q136

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 077116 号

责任编辑:席 慧 马程迪/责任校对:王晓茜

责任印制:吴兆东/封面设计:铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京九州迅驰传媒文化有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2018年6月第一次印刷 印张:14

字数:340 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

随着医学和生命科学的迅猛发展及各学科间的相互借鉴、相互渗透和相互融合，组织学技术的内涵在不断延伸，技术在不断发展，应用在不断拓展。组织学技术涵盖了组织形态学、细胞生物学、有机化学、生物化学、免疫学、分子生物学等学科知识，可在组织原位对研究对象的形态结构和分子表达情况进行定性、定位和定量分析，并能与研究对象的功能有机结合，可方便、客观和准确地在细胞、组织或器官水平研究生物学作用机理，是生命科学研究中不可缺少的手段和组成部分。为了满足动物医学专业本科学生课外创新和兽医学专业研究生课堂教学需要，编者在原教学讲义的基础上编写了本书。

本书以组织学研究的一般技术程序和技术发展演变历史为主线，系统地介绍了组织形态学研究技术的原理、方法和应用，既涵盖了组织形态学中经典的切片技术，又重点介绍了近年来新发展的具有较高实用价值的一系列新技术；既注重阐述实验技术原理，又突出了研究工作中的实际应用。全书包括四个部分：第一部分是组织样本制备技术；第二部分是切片制作技术，包括石蜡切片制作技术和冰冻切片制作技术；第三部分是大分子物质检测技术，包括组织染色技术、组织化学技术、免疫组织化学技术、原位杂交组织化学技术；第四部分是仪器使用技术，包括光学显微镜技术、电子显微镜技术、显微图像分析技术、流式细胞术、组织芯片技术和细胞凋亡检测技术。

全书共十三章，其中第七章、第九章、第十章、第十一章和第十二章由蔡勇编写；第三章、第四章、第五章和第六章由阿依木古丽·阿不都热依木编写；第一章由霍生东和王明明编写；第二章由扎西英派和杨具田编写；第八章由乔自林和王家敏编写；第十三章由卢建雄和杨妍梅编写。研究生李海健、齐骛穹、廖圆圆、卢美琳和阿尔祖古丽·阿依丁承担了部分内容的文字录入和整理工作。

本书由国家自然科学基金项目（31260589、31660642）、西北民族大学研究生教育教学改革研究项目、西北民族大学本科生教育教学改革研究项目（2016XJJG-38）和规划教材专项资金资助。另外，本书在编写过程中参考了大量的论文和著作，引用了大量的图表和数据，在此对相关作者表示诚挚的谢意！

本书可作为高等院校动物医学、动物科学、生物技术和医学检验等专业的教材，也可供相关专业的学生、教师和科研工作者实验研究时参考。

由于生命科学的迅速发展、新技术的不断涌现和编者水平所限，书中难免存在不足或疏漏之处，敬请读者不吝指正。

蔡 勇 阿依木古丽·阿不都热依木

2018年2月

目 录

前言

第一章 组织样本制备技术 1

第一节 组织样本采集 1

一、实验动物的处死方法 1

二、实验动物的解剖 2

三、取样方法及注意事项 3

四、细胞样本采集 4

第二节 标本的固定 4

一、固定的目的 4

二、固定的对象 5

三、常用的固定剂 5

四、组织固定方法 9

五、培养细胞的固定方法 10

六、固定时应注意的事项 10

七、组织固定后的洗涤 11

第二章 石蜡切片制作技术 12

第一节 组织固定后的处理 12

一、组织块修整 12

二、洗涤 12

三、脱水 13

四、透明 15

五、透蜡（浸蜡）与包埋 16

第二节 石蜡切片 18

一、石蜡切片前的准备 18

二、切片方法 19

三、切片中容易出现的问题、原因

及解决方法 21

第三章 冰冻切片制作技术 22

第一节 冰冻切片的取样及处理 22

一、样品的处理 22

二、组织的速冻 22

第二节 冰冻切片 23

一、恒温冷冻切片机 23

二、切片方法及步骤 24

三、冰冻切片固定液选择 25

四、冰冻切片染色方法 25

五、冰冻切片的优缺点和注意事项 25

第四章 组织染色技术 28

第一节 染色的原理 28

一、染色的发展 28

二、染料 28

三、染色的原理 30

第二节 染色方法 32

一、整体染色法 32

二、组织块染色法 32

三、蜡带染色法 32

四、切片染色法 32

五、涂片染色法 32

六、活体染色法 33

第三节 苏木精-伊红染色法 33

一、苏木精-伊红染色的基本原理 33

二、苏木精-伊红染色的基本方法 33

三、二甲苯在 H-E 染色中的作用 35

四、乙醇在 H-E 染色中的作用 36

五、水洗的作用 36

六、分化和蓝化 37

七、切片制作中出现的问题、原因

及解决方法 37

第四节 特殊染色方法 38

一、瑞特染色法 38

二、巴氏染色法 38

三、迈-格-吉染色方法 39

第五章 组织化学技术 40

第一节 蛋白质和氨基酸的组织化学

技术 40

一、蛋白质的组成及分类 40

二、蛋白质和氨基酸的染色方法	41	一、免疫组织化学技术的基本原理	64
第二节 脂类(脂质)的组织化学技术		二、免疫组织化学技术的分类	65
.....	43	三、免疫组织化学的特点	65
一、钼酸法显示非饱和脂质	43	四、免疫组织化学的发展	66
二、苏丹黑 B 染色法显示脂类	44	第二节 免疫组织化学标本制备	68
三、Fischler 脂肪酸染色法	44	一、取样	69
四、Daddi 酒精性苏丹Ⅲ法	44	二、固定	69
五、高氯酸-萘醌(PAN)法显示胆 固醇	45	三、脱水、浸蜡及包埋	70
六、酸性苏木红法显示磷脂	45	四、切片	70
第三节 酶组织化学技术	46	五、烤片	71
一、酶的分类	46	六、标本防脱落技术	71
二、酶的组织化学反应法	47	七、对照试验	71
三、影响显示酶的因素	47	八、抗原修复	71
四、水解酶的显示	48	九、免疫组织化学结果的判断	73
五、胆碱酯酶的显示	49	第三节 免疫荧光组织化学技术	74
六、氧化酶及过氧化物酶	51	一、直接法	74
七、Sato 显示骨髓、血液涂片的过氧 化物酶法	52	二、间接法	74
八、琥珀酸脱氢酶	52	三、补体法	75
第四节 多糖组织化学技术	52	四、双重标记法	75
一、过碘酸-Schiff 反应	52	五、非特异性荧光染色的抑制或消除	76
二、阿尔辛蓝-PAS 法	53	第四节 免疫酶组织化学技术	77
第五节 核酸组织化学技术	54	一、酶标记抗体法(酶标法)	77
一、Feulgen 反应显示脱氧核糖核酸	54	二、非标记抗体酶法	77
.....	54	三、免疫酶双标记法	80
二、甲基绿-派洛宁显示脱氧核糖核 酸和核糖核酸	54	第五节 亲和免疫组织化学技术	80
三、核酸荧光染色	55	一、亲和免疫组织化学技术的基本 原理	81
第六节 凝集素组织化学技术	59	二、亲和免疫组织化学技术的基本 方法	81
一、凝集素的标记物	59	三、亲和免疫组织化学技术的操作 步骤	82
二、染色步骤	59	第六节 免疫金组织化学技术	83
第七节 生物胺荧光组织化学技术	61	一、免疫胶体金技术	83
一、Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法	61	二、蛋白 A 胶体金技术	84
二、乙醛酸诱发生物单胺荧光法	62	三、免疫金银染色	85
三、邻苯二醛显示组胺荧光法	62	第七节 免疫组织化学增敏方法	86
第六章 免疫组织化学技术	64	一、多聚整合物酶法	86
第一节 免疫组织化学技术的原理、 分类和发展	64	二、催化信号放大系统	87

第八节 双重或多重免疫组织化学染色技术	88	一、原位 PCR 的基本原理	107
一、基本染色形式	89	二、原位 PCR 的技术类型	108
二、阻断法单酶或双重酶免疫组织化学染色	90	三、原位 PCR 的技术特点	109
三、阻断法双重免疫荧光组织化学染色	91	第五节 双重和多重原位杂交技术	110
四、非阻断法单酶或双酶双重免疫组织化学染色	91	一、放射性核素和非放射性标记探针的双重标记原位杂交	110
五、非阻断法双重免疫荧光组织化学染色	92	二、非放射性标记探针的双重标记原位杂交	111
六、其他类型组合的双重免疫染色	92	三、两种放射性核素标记探针的双重标记原位杂交	111
七、三重免疫染色	93	第六节 原位杂交结合免疫组织化学技术	111
第九节 免疫组织化学结果判定及注意事项	93	一、原位杂交在先	112
一、免疫组织化学染色结果判断原则	93	二、免疫组织化学在先	112
二、非特异性染色	94	第八章 光学显微镜技术	114
三、常见问题与处理方法	94	第一节 普通光学显微镜	114
第七章 原位杂交组织化学技术	99	一、普通光学显微镜成像原理	114
第一节 原位杂交组织化学的基本原理	99	二、光学显微镜基本结构	115
一、核酸的分子结构	99	三、光学显微镜技术指标	117
二、核酸的理化性质	100	四、光学显微镜照明技术	119
三、核酸分子杂交的基本原理	101	五、普通光学显微镜的使用与保养	120
四、核酸探针的种类	101	第二节 倒置显微镜	121
五、核酸分子杂交的类型	102	第三节 相差显微镜	121
第二节 原位杂交组织化学技术的基本方法	102	一、相差显微镜成像原理	122
一、杂交前准备	102	二、相差显微镜装置	123
二、杂交	104	第四节 荧光显微镜	123
三、杂交后处理	105	一、荧光的产生	123
四、检测	105	二、荧光显微镜的组成	124
五、对照试验	105	三、荧光素	125
第三节 荧光原位杂交技术	105	四、荧光显微镜主要用途	126
一、荧光原位杂交探针	106	五、荧光显微镜使用的主要注意事项	127
二、荧光原位杂交技术类型	106	第五节 激光扫描共聚焦显微镜	127
三、多色荧光原位杂交技术	107	一、基本原理	128
第四节 原位 PCR 技术	107	二、激光扫描共聚焦显微镜的基本结构	129
		三、激光扫描共聚焦显微镜的主要特点	130

四、共聚焦显微镜图像模式	130	二、图像分析误差的计算	178
五、激光扫描共聚焦显微镜的主要应用	133	三、图像分析的误差控制	179
六、双光子(多光子)激光共聚焦显微镜	134	第六节 国内外图像分析仪	180
第六节 其他光学显微镜技术	135	一、国产图像分析仪的情况简介	180
一、暗视野显微镜	135	二、国外图像分析仪的情况简介	181
二、近场光学显微镜	136	第十一章 流式细胞术	183
三、原子力显微镜	138	第一节 流式细胞仪原理和组成	183
第九章 电子显微镜技术	141	一、流式细胞术分析的基本原理	183
第一节 透射电子显微镜技术	141	二、流式细胞仪的基本结构	184
一、透射电镜术的基本原理	141	第二节 荧光素	186
二、超薄切片技术	143	一、荧光	186
三、观察与记录	149	二、荧光素的特性	186
四、冷冻超薄切片技术	150	三、常用的荧光素	188
五、冷冻断裂技术	151	第三节 流式细胞仪样本制备和标记方法	189
第二节 扫描电子显微镜技术	152	一、实验准备阶段	189
一、扫描电镜术的基本原理	152	二、样本处理	189
二、扫描电镜生物样品制备的基本方法	154	三、荧光染色	190
三、特殊扫描电镜生物样品制备方法	157	四、细胞分选	190
第十章 显微图像分析技术	159	第四节 流式细胞仪的数据处理	190
第一节 显微图像分析系统的基本原理	159	一、数据的显示	190
第二节 生物显微图像分析系统	160	二、数据的分析	191
一、生物显微图像分析系统的组成	160	第五节 流式细胞仪的应用	191
二、生物显微图像分析系统软件组成	162	一、细胞周期检测	191
第三节 显微图像处理	164	二、细胞凋亡检测	192
一、数字图像处理原理	164	三、细胞增殖检测	192
二、图像处理的基本步骤	164	四、细胞膜标记检测——淋巴细胞亚群	192
第四节 生物显微图像分析	170	五、细胞质标记检测——细胞内细胞因子检测	192
一、二维几何参数测量	170	六、流式细胞仪分选技术	192
二、体视学参数测量	172	七、染色体分析	194
三、光度学参数测量	175	第十二章 组织芯片技术	195
第五节 显微图像分析质量控制	177	第一节 生物芯片	195
一、图像分析的误差因素	177	一、生物芯片简介	195
		二、生物芯片的种类	196
		第二节 组织芯片技术	197
		一、组织芯片的制备	197
		二、组织芯片结果分析	199

三、组织芯片的优点与问题·····	200	·····	208
第十三章 细胞凋亡检测技术·····	202	第五节 细胞凋亡相关蛋白质和酶的 检测·····	208
第一节 细胞凋亡的形态学检测·····	202	一、Fas 抗原的检测·····	208
一、普通光学显微镜观察法·····	203	二、Bcl-2 蛋白的检测·····	208
二、荧光显微镜检测法·····	203	三、P53 蛋白的检测·····	208
三、电子显微镜观察法·····	204	四、caspase3 活性的检测·····	209
第二节 凋亡的细胞膜结构改变检测 ·····	205	五、PARP 活性的测定·····	209
第三节 凋亡细胞的流式细胞术检测 ·····	206	第六节 细胞凋亡 DNA 裂解的检测···	209
一、PI 染色法·····	206	一、凋亡细胞 DNA 裂解的电泳检测法 ·····	209
二、Hoechst-PI 染色法·····	206	二、细胞凋亡 DNA 裂解的免疫化学 检测法·····	210
三、Annexin 法·····	206	三、细胞凋亡 DNA 裂解的原位末端 标记法·····	210
第四节 细胞凋亡的 TUNEL 法检测 ·····	207	四、彗星分析技术·····	211
一、过氧化物酶标记测定法·····	207	主要参考文献·····	212
二、荧光素标记测定法·····	207		
三、生物素-dUTP/酶标亲和素测定法			

第一章

组织样本制备技术

组织样本的采集和处理是进行组织学研究的基础，对实验结果的正确性和准确性起到决定性作用。样本的采集要选择准确的部位和合适的时间，采用正确的方法程序。动物模型构建好后，标本采集过早或过晚都可能导致假阴性结果，采集过程要尽可能在最短时间内完成，一般情况下应保证 30min 内完成，不适当的处理时间将直接影响和干扰研究结果，应尽快降低所采集组织样本的温度并及时进行采集后处理。肿瘤组织标本的采集和处理应严格遵循生物安全处理规范，同时应根据具体的实验目的和要求，采取相应的方法和技术及时对采集的组织进行相应的处理。

第一节 组织样本采集

动物模型构建成功后，需要处死实验动物并取下所需的组织材料。常用的实验动物有猴、狗、兔、大白鼠、小白鼠、豚鼠等。动物处死的方法很多，常根据动物的大小和观察目的的不同来确定处死方法。无论采用何种处死方法，取样都一定要迅速，应在动物处死后立即进行解剖和切取组织材料，否则会引起细胞发生死后变化（如组织自溶等），进而改变甚至失去原有的结构，如果进行酶组织化学（简称酶组化）染色，将会使大量的酶失活和丢失。

一、实验动物的处死方法

1. 空气栓塞法

实验者取 50~100ml 注射器一只，从腹股沟处（股静脉）（兔子从耳静脉）迅速注入空气，一般兔和猫的致死空气量为 20~40ml，狗、猴的致死空气量为 70~150ml，空气进入心脏和大血管后形成空气栓塞，发生循环障碍而死亡。此方法迅速、方便，但各脏器瘀血明显。

2. 麻醉法

用乙醚和三氯甲烷（氯仿）首先将实验动物麻醉，固定于实验台上进行取样，这样所得材料较为新鲜，一般没有死后反应，但乙醚麻醉致死的动物常有肺部充血和呼吸道分泌物增多的病变，在观察切片时，必须注意分辨这些人为的病变。

（1）吸入麻醉法：此方法较适用于小白鼠、大白鼠、豚鼠、兔等较小的动物。将用 5~20ml 乙醚浸泡过的脱脂棉铺在玻璃容器内（容器大小视动物的大小而定），小白鼠、大白鼠、豚鼠等也装进容器内，将容器加盖，经过 1~2min，动物即可进入麻醉状态。麻醉兔时，将兔装入特制的兔盒，把头留在盒子外面，实验者将兔头按住，把事先准备好的装有麻醉脱脂棉的玻璃容器扣在兔头上，即可将之麻醉。

(2) 注射麻醉法：多用于狗、猴等较大的动物，也可用于小动物。以静脉、腹腔、皮下、肌肉注射的方法，注射致死量一般视动物的大小而定，根据具体情况灵活掌握。

3. 脑、脊髓破坏法

用金属探针经枕骨大孔处进入，然后搅动探针破坏脑和脊髓而使其死亡。此方法常用于蛙类的处死。

4. 断头处死法

用剪刀剪断其颈部，使头断离而死亡。此方法常用于小动物的处死或有些特殊需要的情况。

5. 颈椎脱臼法

此方法主要用于大白鼠和小白鼠。实验者先用右手抓住鼠尾根部从鼠笼中取出小白鼠，置于实验台上，右手不要放松，用左手的拇指和食指抓住小白鼠的两耳及头颈部皮肤并固定实验动物颈部，右手拽住实验动物的尾部，轻轻一拉扯断其颈椎，使其脱位，造成脊髓与脑髓断离，动物立即死亡。处死大白鼠的方法同小白鼠，在扯断颈椎时，抓鼠尾的手稍微靠近鼠身，避免鼠头回转咬伤实验者。此方法处死的动物组织结构保存较好。

6. 急性大失血处死法

在动物麻醉或不麻醉的情况下，进行大量放血而造成其急性死亡。采用此种方法致死的动物比较安静，对脏器损伤不大，是一种比较好的采集病理切片标本的动物处死方法。

(1) 眼球摘除放血：常用于大白鼠和小白鼠。将大白鼠或者小白鼠的双眼全部摘除后，造成大失血使之死亡。

(2) 血管切开放血：猴、狗、兔等较大动物均可采用此方法。先将动物麻醉，在动物麻醉的状态下，横向切开其腹股沟三角区，切断股动脉和股静脉，使血液立即喷出，同时用自来水冲洗出血部位，洗去血凝块，使血管出口畅通。经 3~5min，动物即死亡。

二、实验动物的解剖

实验动物被麻醉或处死后，首先要进行尸体解剖。小白鼠和大白鼠的解剖较为简单，直接将固定在动物解剖台上的实验动物从下颌下缘至耻骨联合上缘处做一条正中连线，切开皮肤及皮下组织、剪开胸肋骨，即可切取内脏组织。兔、狗、猴等较大动物的解剖方法如下。

(1) 用纱布或脱脂棉蘸少量生理盐水或蒸馏水将固定在动物解剖台上的实验动物胸、腹部的被毛打湿。

(2) 从下颌下缘至耻骨联合上缘处做一条正中连线，切开皮肤及皮下组织并进行分离。分离的方法：将胸壁的皮肤、皮下组织及胸部肌肉一起从胸部中线开始往后剥离至腋前处。剥离时，右手持解剖刀，左手抓紧皮肤和肌肉往后拉，为防止滑脱，可以在皮肤和肌肉外面包裹一层纱布或者一条毛巾。解剖刀的刀刃向下紧贴胸肋骨骨面，但注意不要刺穿肋间肌，以免损伤胸腔内脏器。剥离胸壁的同时切开或者剪开腹腔、盆腔。此时操作要小心仔细，用力不要过猛，更不能撕拉，注意不要损伤腹腔、盆腔内脏器。

(3) 打开胸腔：用解剖刀沿肋弓至第二肋骨双侧对称切断肋软骨，用力要适中。力量过小，肋软骨难以切断；用力过猛，刀尖会将肺组织刺破。切断双侧肋骨后，将肋骨轻轻提起，用解剖刀或者剪刀沿肋骨和胸骨后壁分离纵膈和横膈，再用咬骨剪自下而上剪断左、右第一肋骨和胸锁关节，然后小心地切断周围与其相连的软组织。注意要尽量避开血管，以免切断

血管后血液流入胸腔污染胸腔内脏器或者误认为胸腔积血。

(4) 取下切断的胸肋骨, 暴露胸腔, 初步检查胸腔内脏器有无异位、畸形和病变。

三、取样方法及注意事项

1. 取出内脏器官

解剖完实验动物后, 必须立即取出内脏器官进行病理检查及研究。常用的方法有以下两种。

1) 整体取出脏器法 原位检查完胸、腹腔的脏器后, 将胸、腹和盆腔脏器同时取出进行固定后再取小标本材料。此种方法特别适合于小白鼠、大白鼠、豚鼠等小动物, 大的实验动物解剖有时也使用此方法。具体操作方法如下。

(1) 用双刃尖刀从颈部切口处插入下颌骨正中的内侧缘, 沿下颌骨内侧缘分别向两侧割断并剥离与口腔底部相连的软组织, 从下面拉出舌头, 以暴露软、硬腭, 并在软、硬腭的交界处切断软腭及咽后壁。

(2) 然后一手抓住舌头及气管、心、肺等胸腔脏器往下拉, 另一手用解剖刀分离与其相连的软组织, 直达横膈为止。用线分别结扎主动脉、下腔静脉及食管, 再在结扎处的胸腔段剪断, 即可将胸腔段的脏器一并取出。或者剪断横膈后, 连同腹腔脏器一起取出。

2) 单个脏器取出法 根据实验目的和要求, 重点检查和研究哪些组织, 就先分别取出该组织。这也是病理解剖技术中最常用的一种传统方法, 操作起来也比较简单。

2. 切取组织块

脏器取出来之后, 或者先整个器官固定后再取小组织块, 或者直接切取成小组织块固定。当整体固定肝、脑、脾、肺、肾等组织时, 先用长的脏器刀沿长径方向将其切开, 再做数个平行切面, 每个切面间大约间隔 1cm, 这样有利于固定液的渗透。因脑组织比较柔软, 最好用纱布将其包裹后再固定; 肺组织内含较多空气, 往往在固定时浮在固定液表面而影响固定, 可以用一条毛巾压在肺组织的上面后再进行固定, 这样效果较好。

3. 取样注意事项

(1) 取样的先后: 应根据动物死后组织结构改变速度的快慢而定。首先打开腹腔, 取出消化管腔, 因为消化管在血液循环停止后, 黏膜很快发生自溶现象; 其次为肝、脾等多血器官及神经组织; 最后才是其他脏器。

(2) 取样的大小: 切取的组织块应小而薄, 大小一般以 $2\text{cm} \times 1.5\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 为好, 但有些特殊要求的可视情况而定。

(3) 取样时严禁机械损伤, 不要用镊子、剪刀等去夹、剪任意部位, 也不要用手去拽、拉扯组织, 应先用镊子轻轻夹住所需组织周围的结缔组织, 然后用锋利的手术剪和手术刀剪切下该组织。不可来回切割组织, 以免损伤组织, 使组织器官变形或内部细胞脱落, 影响制片后的观察。

(4) 管状及囊状组织(如消化管的取样)都不应斜切。先将一段肠管或食管剪下, 从中剪开管腔, 使之呈一片状, 然后将其铺在硬纸板上, 黏膜面朝上, 被膜面朝下(贴纸面), 用大头针或细线将四边固定, 用生理盐水轻轻将黏膜表面的食物及黏液漂洗掉, 然后固定。胃及胃的移行部位(贲门、幽门)的处理同样。

(5) 较小且软的管状脏器如输尿管、输精管、输卵管、中等动(静)脉、神经、脊髓等

应取1~1.5cm长,分段固定。最好平摊在吸水纸上后固定,以防因固定剂的作用而变形。

(6) 有些较小的组织如淋巴结、松果体、脑垂体、神经节等应整个固定。

(7) 神经组织最好同时取一纵切面和横断面,以便于观察。

(8) 取样要尽量保证脏器的完整性,如要保证消化管的黏膜层、肌层及外膜的完整,注意不要破坏肝、肾和脾的被膜等,还要注意组织的切面。应根据所要观察的部位进行选择,管状器官一般横切;小肠因有环行皱襞,所以纵切较好;肾纵切;脑一般与其表面构成直角的方向做垂直切面;肝、脾、腺体,纵切、横切均可;病理材料,除切取病变部位外,还要切取病变和正常组织交界部分的区域,以利于进行正常组织与病理组织的对比观察分析。

(9) 所取的组织块较多时放在同一容器内容易混淆,应加标签予以区别。

(10) 取样时要注明取样时间、组织名称、固定液名称、组织块数量,以备查。

四、细胞标本采集

细胞标本包括体外培养细胞,血液、脑脊液、腹水、胸腔积液、心包积液等体液中的细胞,气管、消化管、泌尿生殖道中的脱落细胞。细胞标本取样方法主要有涂片法、爬片法和印片法。

1. 涂片法

悬浮生长的体外培养细胞和各种体液中的细胞,可用涂片法制备标本。其中培养细胞、血细胞数量较多,可直接涂片,即吸一滴于载玻片上,轻涂,干燥后固定;细胞数量少时,应先将液体自然沉淀,然后吸取离心管底部沉淀离心,弃上清后将沉淀涂片。细胞涂片也可用离心涂片机获得,即将细胞悬液加入离心涂片机内,按1000r/min离心2min,细胞即可均匀分布于载玻片上。为防止细胞脱落,在涂片前,可在载玻片上涂抹黏附剂。

2. 爬片法

对贴壁生长的体外培养细胞,可将洁净的盖玻片放入培养器皿中,细胞接种后便自然爬行至盖玻片表面并贴附伸展。取样时,把盖玻片用预热的缓冲液轻轻冲洗、沥干后固定,即可获得理想的细胞标本。

3. 印片法

主要用于活组织标本、尸检标本及部分子宫颈外口等脱落细胞取样。将涂有黏附剂的载玻片轻轻压于新鲜标本的剖面或器官表面,让脱落细胞黏附在玻片上,风干后立即浸入固定液固定。其优点是取样简便、迅速,细胞内化学成分、酶活性或抗原性保存较好;缺点是细胞分布不均匀,载玻片上细胞可能因重叠而影响观察效果。

第二节 标本的固定

一、固定的目的

将新鲜组织浸泡在某种或者某几种化学试剂中,使细胞内的物质保存下来并尽量接近其生活状态时的形态结构和位置的这一过程称为固定,而这些化学试剂则称为固定剂。当机体死亡后,血液循环即停止,由于缺氧,代谢发生障碍,细胞也逐渐死亡,如不立即处理,则细胞内的组织蛋白酶(水解酶)会使蛋白质分解为氨基酸渗出细胞,使细胞被溶解破坏出现自溶现象。组织结构被破坏,有些形态也发生改变;同时微生物及细菌的繁殖会导致组织腐

败。因此,需要采取有效的措施,防止组织自溶、腐败,采取这一系列措施的过程就是固定。若用于免疫组织化学染色,固定的重要意义还在于保存组织与细胞的抗原性,使抗原物质不发生弥散和丢失。若用于酶组织化学染色,则要使各种酶尽量不丢失。所以,固定的作用有以下几种。

(1) 防止细胞、组织溶解及腐败,以保持细胞与活细胞时的形态相似。

(2) 保存细胞内特殊的成分,使其沉淀或凝固,并定位在细胞内的原有部位,如使蛋白质、脂肪、糖、酶等结构与活细胞时相仿,尽量保持其自然完整状态。

(3) 组织细胞内的不同物质经固定后可以产生不同的折光率,对染料也产生不同的亲和力,造成光学上的差异,使得在活细胞时看不清楚的结构变得清晰起来,并使得细胞各部分容易着色,有利于区别不同的组织成分。

(4) 固定剂具有硬化作用,可以使组织细胞由正常的胶体状(半液体状)转变为凝胶状(半固体状),增加组织的硬度,使组织不易变形,有利于固定以后的处理(如包埋、切片等)。

二、固定的对象

固定的主要对象是蛋白质,因为构成细胞的主要物质是分散在其中的蛋白质。固定就是用化学药品使蛋白质沉淀或凝固下来,至于细胞内的其他成分(如脂肪、糖类、酶等),在一般的制片中是不考虑的,除非要专门观察研究这些物质,才用特殊的方法固定相应的成分。固定剂必须具备的性质和条件如下。

(1) 必须具有相当的渗透力,并对组织各部分的渗透力相等,可使组织内、外完全固定,而且在迅速渗入组织杀死原生质这一短期过程中,细胞形态不发生变化。

(2) 固定液不能因为其固定作用而引起细胞发生人为的改变。

(3) 尽可能避免固定剂使组织膨胀或收缩(不改变原生质原来的体积)。

(4) 能较快地使细胞内的成分(蛋白质等)凝固或沉淀。

(5) 能增加细胞内含物的折光程度,易于鉴别;增加媒染作用和染色能力。

(6) 固定剂要既能使组织变硬适于切片,又不至于使材料脆硬,被固定后的组织要软硬适中。

(7) 固定剂必须对被固定的组织有保存的作用。

三、常用的固定剂

较好的固定剂应具有强渗透力,能迅速渗入组织内部;不会使组织发生过度收缩变形,并能使组织内拟观察的成分得以凝固为不溶性物质;还要使组织达到一定的硬度,有较好的折光率。固定剂分为单一固定剂和混合固定剂两类。

(一) 单一固定剂

单一固定剂由一种化学试剂组成,其种类繁多,特点各异。根据固定原理,单一固定剂可分为交联固定剂、凝固沉淀固定剂和其他固定剂三类。

1. 交联固定剂

交联固定剂主要有甲醛(formaldehyde)、多聚甲醛(paraformaldehyde)、戊二醛(glutaraldehyde)等醛类固定剂。醛类固定剂通过使蛋白质分子相互交联而起固定作用,将抗原保存在原位,具有组织穿透性强、收缩性小等优点。但由于广泛的交联作用,标本中的抗

原表位常被醛基封闭,细胞膜通透性较差,不利于抗体渗透到细胞内部,因此在进行免疫组织化学染色时,常需要进行抗原修复,并用细胞膜通透剂如 TritonX-100 等对细胞膜进行通透处理。使用交联固定剂应注意:①固定时间不宜过长,以免交联过度;②固定液体积至少为组织体积的 20 倍,每次更换时应用新鲜的固定剂;③组织块不宜过厚;④固定后组织块要充分用水或缓冲液冲洗,以减少非特异性染色。

(1) 甲醛:甲醛是一种气体,其饱和水溶液(37%~40%)称为福尔马林(formalin)。常用按 1 份甲醛加 9 份水的比例配成的 10%甲醛溶液作为固定液,用于一般组织学标本的固定。若固定组织化学与细胞化学标本,则用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB, pH 7.2~7.4)代替水配制成 10%的中性甲醛固定液。因福尔马林除含有甲醛外,还含有甲醇、甲酸、乙醛和酮等较多杂质,所以常会影响免疫组织化学标本的固定效果。

(2) 多聚甲醛:甲醛能以固体的聚合物形式存在,即白色粉末状的多聚甲醛。将多聚甲醛溶于 PB,加热至 60℃(加热可使多聚甲醛解聚为单体,必要时可滴加少量 1mol/L NaOH 促进其解聚),边搅拌边加温至液体透明为止。常用的多聚甲醛浓度为 4%。该固定液较温和,广泛用于免疫组织化学研究。

(3) 戊二醛:戊二醛分子含有两个醛基,具有比甲醛更强的交联作用,因此对细胞的超微结构尤其是内质网等膜性系统的固定效果较甲醛或多聚甲醛好,常用 PB 或 0.1mol/L 的二甲砷酸盐缓冲液(pH 7.2~7.4)配成 2.5%的戊二醛,用于电子显微镜(简称“电镜”)标本的固定。其不足之处是对组织的渗透较慢,因此用戊二醛固定的标本,其大小不宜超过 1mm³。若与多聚甲醛混合使用,如 2.5%戊二醛-2%多聚甲醛磷酸盐缓冲液,可克服戊二醛渗透慢的缺点。由于戊二醛的强交联作用可抑制抗原活性和降低细胞膜通透性,因此在固定免疫电镜标本时应降低戊二醛浓度。例如,在 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中加入少量戊二醛,配制成含 0.25%~1%戊二醛的 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液,用其固定免疫电镜标本,既能较好地保护超微结构,又能较好地保护抗原活性,也不使细胞膜通透性明显降低。

2. 凝固沉淀固定剂

其固定组织细胞的原理主要是使组织细胞中的蛋白质、糖等物质凝固,而在原位形成沉淀物。用此类固定剂固定的组织细胞穿透力强,抗原活性保存较好,但对小分子蛋白质、多肽、类脂等物质的保存效果较差,常与其他固定剂联合使用。此类固定剂可破坏细胞内成分的分子结构,如通过破坏疏水键使蛋白质丧失原有的三维结构,使生物膜上的脂类分解为微胶粒等;在固定期间和后续处理组织细胞时,细胞内分子会流失到细胞外,不能保持生活状态的细胞结构。尽管这些固定剂已使用多年,但是如果细胞形态结构对实验结果至关重要,则不选用此类固定剂。

(1) 丙酮:丙酮(acetone)为无色极易挥发和易燃液体,渗透力很强,具有较强的脱水作用,能使蛋白质沉淀凝固,但不影响蛋白质的功能基团而保存酶的活性,用于固定磷酸酶和氧化酶效果较好。常用于冷冻切片和细胞涂片标本的固定,抗原性保存效果好。丙酮置 4℃备用,临用时将冷冻切片或细胞涂片置于 4℃丙酮内 10~20min,取出后自然干燥。缺点是固定快,易使组织细胞收缩,结构保存欠佳。

(2) 甲醇/乙醇:其性能与丙酮基本相同,兼有固定和脱水双重作用,能沉淀蛋白质,对高分子蛋白质的固定效果好,渗透性强,但组织块硬化、收缩明显,易使组织变脆。用冷甲醇(methanol)或乙醇(alcohol)能较好地保存酶活性和抗原活性,但对小分子蛋白质、多

肽保存效果较差。

(3) 苦味酸：苦味酸 (picric acid) 能沉淀蛋白质，其乙醇饱和液可固定糖类物质，对脂肪、类脂质无固定作用，经其固定的核酸在随后的 70% 乙醇中易被水溶解，因此不适于 DNA 或 RNA 的固定。苦味酸很少单独使用，通常将其配制成饱和水溶液保存，作为混合固定剂的成分之一。用苦味酸固定的标本常有黄色，可在低浓度乙醇中脱去。

(4) 乙酸：乙酸 (acetic acid) 能沉淀细胞核内蛋白质，并较好地保存染色体结构，但不能凝固细胞质内蛋白质，也不保存糖类、脂肪及类脂质，因此在固定高尔基体、线粒体等细胞器时不能用高浓度的乙酸，以 0.3% 以下为宜。乙酸的最大特点是对组织有膨胀作用及防硬化作用，同时穿透力较强，因此与乙醇、甲醛、铬酸等易引起组织硬化与收缩的液体混合使用，具有相互平衡的作用。乙酸作为单独固定剂使用时，常用浓度为 5%。

(5) 三氯乙酸：三氯乙酸 (trichloroacetic acid) 的作用与乙酸相似，能使蛋白质凝固沉淀，常在混合固定液中对组织起膨化作用。除作为固定剂外，还可作为一种良好的脱钙剂。

(6) 氯化汞：氯化汞 (mercury dichloride) 也称为升汞，常用其饱和水溶液 (5%~7%) 作为固定剂，能使蛋白质凝固和沉淀，使组织迅速硬化，但对碳水化合物和类脂无固定作用。由于升汞具有较强的组织收缩作用，因此常与其他固定剂联合使用，如与乙酸联合使用，一则乙酸对组织的膨化作用可平衡升汞的收缩作用，二则乙酸固定核蛋白而升汞固定细胞质蛋白，二者相得益彰。

用升汞固定的组织往往有许多汞盐沉积，其切片在染色前需要进行脱汞处理，可将切片用 1% 碘酒处理 10min，再用 5% 硫代硫酸钠水溶液去碘。

3. 其他固定剂

除了上述交联固定剂和凝固沉淀固定剂外，还有一类固定剂可用于组织标本固定，其固定原理不完全清楚。这类固定剂多为强氧化剂，不能用于免疫组织化学标本的固定。

(1) 铬酸：铬酸 (chromic acid) 即三氧化铬 (chromium trioxide)，为强氧化剂，能沉淀蛋白质，但对脂肪及类脂无明显作用，能固定高尔基体、线粒体及糖原。铬酸对组织的穿透力较弱，固定时间较长，一般需 12~24h；对组织有一定硬化作用，且收缩作用较强。由于铬酸具有较强烈的沉淀作用，因此不宜单独使用。经含铬酸固定液固定的组织需经流水彻底冲洗 (不少于 24h)，否则会影响后续切片染色。

(2) 重铬酸钾：重铬酸钾 (potassium dichromate) 对组织的固定作用随固定液的 pH 不同而异。未酸化的重铬酸钾 (pH 5.2 以上) 虽不能沉淀蛋白质，但可使蛋白质具有不溶性，使细胞质得到较好的固定，同时还能固定类脂，使其不溶于脂溶性试剂，因此可保存高尔基体和线粒体。而一旦加入乙酸使固定液酸化后 (pH 4.2 以下)，能产生铬酸，便对染色体也有固定作用，并使细胞质和染色体的蛋白质沉淀呈网状，但线粒体被破坏。重铬酸钾作为固定剂的常用浓度为 1%~3%。

重铬酸钾也是一种强氧化剂，因此不能与还原剂混用，与甲醛混合后不能长久稳定保存。

(3) 四氧化锇：四氧化锇 (osmium tetroxide) 俗称锇酸 (osmic acid)，是一种非电解质强氧化剂，与氮原子有较强的亲和力，能与各种氨基酸、肽及蛋白质发生反应，在蛋白质分子间形成交联，稳定蛋白质的各种结构成分且不产生沉淀，因此能较好地保存细胞的微细结构。锇酸对脂类也有良好的保护作用，是固定脂类的唯一固定剂，特别是对磷脂蛋白膜性结构有良好的固定作用。此外，锇酸对组织细胞的收缩和膨胀影响极微，使组织软硬适度，利

于超薄切片，是电镜技术中广泛使用的固定剂。其缺点是分子大，渗透缓慢，固定不均匀，对糖原、核酸的固定效果不佳。配制时，先用蒸馏水配成 2% 的浓度，使用前用 PB 或二甲砷酸盐缓冲液稀释成 1%。

（二）混合固定剂

单一固定剂有时很难达到理想的固定效果，为了弥补彼此之间的缺点，通常可将几种固定剂混合使用。

1. Bouin 固定液

Bouin 固定液由甲醛、冰醋酸和饱和苦味酸按一定比例组成，是一种最常用的混合固定剂，具有穿透速度快、收缩作用小、固定均匀等特性。冰醋酸的渗透力很强，能很好地沉淀核蛋白，细胞核染色效果好；苦味酸能使组织保持适当的硬度；甲醛能平衡另外两种试剂对组织的膨胀作用，防止冰醋酸对细胞核内染色体及苦味酸对细胞质强烈作用所产生的粗大颗粒。与单甲醛固定液比较，更适合免疫组织化学标本固定，加入少量戊二醛，也可用于免疫电镜标本的固定。但因该固定液偏酸性（pH 3.0~3.5），对抗原性有一定损害，在常规免疫组织化学技术中使用较 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液有局限，也不适于组织标本的长期保存。

2. Carnoy 固定液

Carnoy 固定液由冰醋酸、氯仿和无水乙醇（1:3:6）组成，能固定细胞质和细胞核，尤其适于染色体、DNA 和 RNA 的固定，也适于糖原和尼氏体的固定；可防止乙醇对组织的硬化及收缩作用，渗透能力强，特别适合外膜致密不易透入的组织固定，常用于组织化学标本固定。固定后的组织块可直接放入 95% 乙醇脱水。

3. Zamboni 固定液

Zamboni 固定液由多聚甲醛、饱和苦味酸和 Karasson-Schwlt 磷酸盐缓冲液组成，作用原理和特点类似于 Bouin 固定液。该固定液对超微结构的保存优于 Bouin 固定液，既可用于光镜免疫组织化学标本的固定，也能用于免疫电镜标本的固定。

4. PLP 固定液

PLP 固定液是由过碘酸、赖氨酸和多聚甲醛混合组成的过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛（periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP）磷酸盐缓冲液。该固定液适合于固定富含糖类的组织，对超微结构及许多抗原的保存均较好。其作用机制是过碘酸能使组织中的糖基氧化成为醛基，赖氨酸的双价氨基与醛基结合，从而与糖形成交联。由于组织抗原大多由蛋白质和糖类构成，抗原表位位于蛋白质部分，因此该固定剂可选择性地使糖类固定，这样既稳定了抗原，又不影响其在组织中的位置关系。

5. Karnovsky 固定液

Karnovsky 固定液由多聚甲醛、戊二醛、氯化钙和磷酸盐缓冲液或二甲砷酸盐缓冲液组成，pH 为 7.3。该固定液中的戊二醛能较好地保存细胞内的膜性结构，因此常用于免疫电镜标本的固定。

6. PFG 固定液

PFG 固定液即对苯醌-甲醛-戊二醛（parabenzquinone-formaldehyde-glutaraldehyde, PFG）的二甲砷酸盐缓冲液，适于多种肽类抗原的固定，尤其适于免疫电镜标本的固定。