

组织切片技术

芮菊生 杜懋琴 陈海明 李次兰 编著

人民教育出版社

内 容 提 要

本书主要供大专院校生物系开设切片技术课或有关科研制片工作者的参考,内容着重于动物组织制片技术。全书共分三大部分,第一部分介绍组织切片的基本操作;第二部分介绍细胞、组织的特殊染色法;第三部分介绍组织化学染色法。

高等学校教学参考书

组 织 切 片 技 术

芮菊生 杜懋琴 陈海明 李次兰 编著

*

人民教育出版社出版

新华书店上海发行所发行

上海中华印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 21 4/8 字数 493,000

1980年1月第1版 1980年11月第1次印刷

印数 1—3,500

书号 13012·0498 定价 1.60 元

前 言

组织切片技术是大专院校生物系、医学院、农学院以及有关科研单位的一项基本技术，在教学和科研领域内广泛应用。

本书是根据我们数次开设的显微技术课以及为上海市及外地医药系统、科研单位培训技术人员所举办的组织切片短训班、组织切片技术讨论班等的讲稿、讲义，吸取外单位的方法经验，重新补充编写而成的。其中大部分方法曾经师生多次实践。内容着重于动物组织制片技术。以常用及易于实际操作的方法为主，第一部分基本操作内容是针对课堂教学和实验的必需要求而设，其余各部分内容可选择应用。本书主要供大专院校生物系开设切片技术课或有关科研制片工作者(包括病理诊断制片)的参考。

全书共分三个部分：第一部分组织切片的基本操作，包括第一到第十一章由芮菊生同志编写，第二部分细胞组织的特殊染色法由陈海明同志编写，第三部分组织化学染色法由杜懋琴同志编写。在第一部分中有关染色的原理(细胞的染色、荧光染色)系聘请我系生物物理教研组张淑辉同志编写，第三部分中放射自显影术系聘请我系生理教研组叶汉章同志编写，技术方法由李次兰同志校验。由于我们水平有限，实践经验不足，遗漏、缺点、错误在所难免，希望读者批评指正，俾再版时修改，以趋完善。

编 者 1978.10.

目 录

第一部分 组织切片的基本操作

第一篇 切片制作的基本原理

第一章 概述	1	1. 石蜡	24
一、引言	1	2. 火棉胶	25
二、制片方法的种类	1	3. 炭蜡	26
1. 非切片法	1	三、包埋方法的种类	26
2. 切片法	1	1. 熔化法	26
三、制片方法的一般步骤概述	1	2. 挥发法	27
1. 切片法	1	3. 双重法	27
2. 非切片法	2	四、透入与包埋的操作	27
第二章 杀死、取材和固定	3	1. 石蜡的透入与包埋法	27
一、动物杀死的方法	3	2. 火棉胶的透入与包埋法	28
二、取材和固定	3	3. 炭蜡的透入与包埋法	28
1. 取材和固定的目的	3	4. 双重包埋法	28
2. 固定的对象	4	5. 明胶包埋法	29
3. 组成固定剂的性质和条件	4	第六章 切片	30
4. 固定剂的作用	5	一、几种切片法的优缺点	30
5. 固定剂的媒染效果	5	二、切片机的种类构造	31
6. 固定剂的穿透率	5	1. 石蜡切片机	31
7. 固定中组织的收缩问题	5	2. 火棉胶切片机	33
8. 取材和固定应注意事项	5	3. 冰冻切片机	33
9. 常用固定剂的性能及其使用	7	三、切片机的保养	34
10. 常用固定剂性质及用法简表	15	四、切片刀的种类, 研磨与保存	35
11. 常用固定剂配制表	19	第七章 染色与染料	38
第三章 洗涤和脱水	19	一、染色的目的	38
一、洗涤的目的和洗涤的原则	19	二、染色的历史	38
二、几种常用固定剂的特殊洗涤法	20	三、染料在动物组织学中的应用	39
三、脱水的目的和方法	20	四、染料的一般性质	40
四、脱水剂的类型	21	1. 发色团	40
五、常用脱水剂及其使用方法	21	2. 助色团	43
第四章 透明	23	3. 酸性染料和碱性染料	46
一、透明的目的	23	五、染料的分类	48
二、常用透明剂	23	六、染色的原理	50
第五章 透入与包埋	24	1. 染色的物理作用	50
一、透入与包埋的目的	24	2. 染色的化学作用	51
二、透入包埋剂的种类	24	3. 细胞的染色	51

4. 荧光染色	55	2. 煤焦染料	72
七、染色的方法	62	十、常用染料的主要用途	77
1. 整体染色法	62	十一、各种染色剂用途的归类	84
2. 组织块染色法	62	十二、常用染料的溶解度	87
3. 蜡带染色法	62	第八章 分化与封藏	88
4. 切片染色法	62	一、分化的目的与方法	88
5. 特殊染色法	63	二、分化剂的种类	89
八、媒染剂及促染剂	65	三、封藏的目的	89
九、常用染料的性能及配制	68	四、常用封藏剂	90
1. 天然染料	68		

第二篇 切片的具体制作

第九章 制片前的准备工作	92	四、肌肉组织浸渍分离制片法	96
一、玻璃器皿的清洗	92	五、间皮硝酸银染色制片法	96
二、一般溶液的配制	93	六、鸡胚胎之整体制片法	97
三、实验室工作注意事项	93	第十一章 切片的制作	98
第十章 非切片法的制作	94	一、石蜡切片的制作	98
一、血液涂片的制作	94	二、冰冻切片的制作	106
二、骨磨片的制作法	95	三、火棉胶切片的制作	108
三、无丝分裂(膀胱印片)法的制片	96		

第二部分 细胞、组织的特殊染色法

第一章 染色体染色法	111	第五章 脂肪染色法	117
一、Ehrlich-Biondi 氏染色法示染色体	111	一、显示中性及酸性脂类的 Nile 蓝法	118
二、大染色体之显示	112	二、Lillie 氏油红O染色法示脂肪	118
三、细胞有丝分裂	112	三、脂肪染色法(苏丹III法)	118
第二章 线粒体染色法	113	四、脂肪酸	119
一、Regaud 氏染色法示线粒体	113	五、胆固醇	119
二、Regaud 氏改良法示线粒体	114	六、类脂质	119
三、Cowdry 氏法之一示线粒体	114	第六章 色素染色法	119
四、Cowdry 氏法之二示线粒体	114	一、Dopa 氧化酶反应	120
第三章 高尔基体染色法	115	二、黑色素染色法(Fortana法)	120
一、Cajal 氏硝酸铀法示高尔基体	115	三、Dopa 黑素反应	120
二、Da Fano 氏改良 Cajal 氏法示高 尔基体	116	四、证明黑色素的 Lillie 氏亚铁吸收法	121
第四章 糖元染色法	116	五、Lillie 氏过蚁酸和过醋酸的 Schiff 氏反应	122
一、显示糖元的过碘酸 Schiff 氏反应 (P.A.S)	116	六、铁氰化铁还原技术(Lillie氏改良法)	123
二、显示糖元的 Best's 卡红染色法	116	第七章 含铁血黄素染色法	124
三、显示糖元及粘蛋白的银法	117	一、柏林蓝反应	124
		二、滕氏蓝反应	125

三、用普鲁士蓝证明铁的 Bunling 氏法	125
第八章 胆红素(胆色素)染色法	126
一、证明胆色素的 Stein 氏法	126
二、证明胆红素的 Hall 氏法	127
第九章 肾上腺嗜铬细胞染色法	127
一、显示肾上腺素红(嗜铬性)的改良 Giemsa 法	128
二、Wiesel 氏嗜铬细胞染色法	128
三、Ogata-Ogata 氏硝酸银嗜铬细胞法	129
第十章 垂体细胞染色法	129
一、Romeis 氏前叶细胞染色法	129
二、证明垂体细胞的 Slidder 氏橘黄 G 复红亮绿法	130
第十一章 嗜银细胞染色法	131
一、Masson 氏银浸法示肠嗜银细胞	131
二、龙桂开嗜银细胞银浸法示肠嗜银细 胞	132
三、Fortana-Masson 嗜银颗粒染色	132
四、显示嗜银细胞颗粒的重氮法	133
第十二章 肥大细胞染色法	133
一、鲍鉴清天青-伊红-美蓝染色法	133
二、证明肥大细胞颗粒的 Maximov 氏 酒精硫堇法	134
三、证明肥大细胞的甲苯胺蓝染色法	134
第十三章 包涵体染色法	134
一、证明包涵体的 Mann 氏甲基蓝- 伊红法	135
二、昆虫体内包涵体染色法	135
第十四章 细菌染色法	137
一、Gram-Weigert 细菌染色	137
二、Ziehl-Neelsen 氏抗酸染色	137
三、Wade-Fite 氏抗酸新染法	138
四、证明结核杆菌的石炭酸-复红-金胺 苯酚法	138
第十五章 真菌染色法	139
一、证明真菌的 Grocott 氏乌洛托品银 法	139
二、证明真菌的 Gridley 氏法	141
第十六章 螺旋体染色法	142
一、证明螺旋体的 Camp bell 和 Rosahn 法	142

二、Levaditi 氏法示梅毒螺旋体	143
第十七章 淀粉样变性染色法	143
一、证明类淀粉物的 Puchtler、Sweet 和 Levine 氏刚果红法	143
二、证明类淀粉物的结晶紫法	144
三、证明类淀粉物 Lieb 氏结晶紫法	145
第十八章 胶元纤维染色法	146
一、Heidenhain 氏 Azan 染色法	146
二、Masson 氏法	147
三、Mallory 氏磷钼酸-苏木素染色法	147
四、Van-Gieson 氏法	148
五、Lillie 氏猩红-苦味酸-苯胺蓝法	148
第十九章 弹性纤维染色法	149
一、Verhoeff 氏弹性纤维染色法	149
二、Orcein 氏弹性纤维染色法	149
第二十章 网状纤维染色法	150
一、Gordon 及 Sweet 氏原法	150
二、Del Rio-Hortega 氏法	151
三、Foot 氏法	151
四、Wilder 氏法	152
第二十一章 骨组织的染色法	153
一、钙质染色法——Kossa 氏法	153
二、Schmorl 氏硫堇-苦味酸法	154
三、Lillie 氏硝酸银沉淀法	154
四、Romeis 氏美蓝染色法	155
第二十二章 肌组织的染色法	155
一、Schäffler 氏肌原纤维、网状纤维及 胶元纤维同时显出法	155
二、Retterer 氏法显示横纹肌	156
三、显示心肌梗死的酸性复红染色法	156
第二十三章 消化系统的染色法	157
一、Alcian 蓝-PAS 染色法——示粘液染 色	157
二、P. Mayer 氏粘液卡红染色法	158
三、K. S. Ludwig 氏胃腺细胞鉴别染 色法	158
四、Kopsch 氏改良 Golgi 氏法示胆毛 细管	159
五、张保真铁苏木素染色法示胆毛细管	159
六、胰腺 Gomori 氏铬铝苏木素法	159
七、去氧核糖核酸、多糖类、蛋白质的三	

色染色法	161
第二十四章 神经系统	162
一、尼氏小体染色——Pischinger 氏缓冲 美蓝法	162
二、染肉眼可见的脑切片的一种方法	162
三、Golgi 氏速法示神经细胞及突起	163
四、Cox 氏法示神经细胞及突起	164
五、R. Spoorri 氏法示神经细胞体及 突起	164
六、V. Apathy 氏氯化金法示神经原 纤维	164
七、Cajal 氏冰冻切片浸渍法示神经 纤维	165

八、Weigert-Pal 氏法示髓鞘	165
九、证明髓鞘内脂肪变性的 Marchi 氏 法	166
十、证明髓磷质的 Page 氏法	166
十一、证明神经胶质纤维的 Holzer 氏 法	167
十二、证明神经胶质纤维和细胞的 Mallory 氏苯胺蓝橘黄 G 法	168
十三、Cajal 氏金升汞法示神经胶质(星形 细胞)	168
十四、Hortega 氏少突胶质细胞碳酸银 法	169
十五、Hortega 氏小胶质细胞碳酸银法	170

第三部分 组织化学染色法

第一章 常用组织化学固定剂

及试剂 171

一、固定剂	171
二、常用酸溶液简便配制法	174
三、常用碱溶液简便配制法	175
四、常用盐溶液简便配制法	176
五、缓冲液	176

第二章 蛋白质的组织化学法 179

一、显示蛋白质的汞-溴酚蓝(HgBpB) 法	179
二、显示蛋白质结合性-NH ₂ 基法	180
1. 茚三酮-Schiff 法	180
2. 羟基萘甲醛法	180
3. 氯胺-T 法	181
4. 乙酰苯反应	182
三、显示含色氨酸、组氨酸和酪氨酸的蛋 白质偶联四唑反应	183
四、显示含酪氨酸、SH 及NH ₂ 基蛋白质 的二硝基氟苯(DNFB)法	184
五、显示碱性蛋白质法	186
1. 酸性铬络花青法	186
2. 显示核中碱性蛋白质的萘酚-黄S 法	186
3. 显示核中碱性蛋白质的碱性坚牢绿法	187
六、显示巯基及二硫键的方法	188
1. 显新偶联四唑反应	188
2. 显示 SH 基和 SS 基的 DDD 反应	189

3. 显示 SH 基和 SS 基铁氰化铁法	191
4. 硝蓝四唑法	192
5. 显示 SH 基的萘基马来酰亚胺(HNI) 反应	193
6. 显示 SH 基的汞橙(RSR)法	194
七、显示 SS 基法	196
1. 巯基醋酸-铁氰化铁法	196
2. 显示 SS 基的过甲酸-Schiff 法(PFAS)	196
3. 过甲酸-Alcian 蓝法	197
八、显示酪氨酸法	198
1. Morel-Sisley 重氮化法	198
2. Millon 反应	198
九、显示色氨酸法	200
1. 萘基乙二胺反应(NED)法	200
2. 二甲氨基苯甲醛 DMAB-亚硝酸盐法	201
3. 吲哚类的蔷薇吲哚(Rosindoesé)反应	201
4. 显示吲哚类的后偶联苯叉反应	202
5. 显示吲哚类的咕吨氢醇反应	203
6. 胃蛋白酶提取法	204
十、显示精氨酸法	205
1. 坂口 Sakaguchi 氏反应 I 法	205
2. 坂口 8-羟基喹啉反应 II 法	205
3. 显示含精氨酸及赖氨酸蛋白质的胰蛋 白酶提取法	206
十一、显示弹性蛋白法	207
1. 醛品红染色法	207
2. Moore 法	207

3. 显示弹力组织的甲苯二酚-新品红法	208
4. 显示弹力组织的万-魏氏染色法	209
十二、显示神经分泌物法	209
1. 醌品红染色法	209
2. Bargmann 氏铬苏木素法	211
十三、显示垂体细胞的类粘蛋白颗粒	211
1. Wilson-Ezrin 法	211
2. Halmi 法	212
3. PFAAB. PAS 橙 G 法	212
第三章 核酸的组织化学法	213
一、显示 DNA 法	213
1. Feulgen 染色法	213
2. Feulgen-羧甲酰胺肼反应	215
二、显示 DNA 及 RNA 的甲基绿-焦宁法	217
三、显示核酸的酶提取法	220
1. 显示 RNA 的核糖核酸酶提取法	220
2. 显示 DNA 的脱氧核糖核酸酶的提取法	221
四、显示核酸的荧光酮的改良 Turchini 法	222
五、显示核酸的吖啶橙荧光染色法	223
六、显示核酸的倍花青法	223
1. Einarson 的倍花青-铬明矾法	223
2. 改良倍花青法	225
第四章 碳水化合物的组织化学法	225
一、显示多糖、粘多糖及粘蛋白等的 Schiff 反应	225
1. McManus 法	227
2. 血细胞内糖元定位法	228
3. 血细胞内糖元定位简法	229
4. 培养细胞内糖元定位	229
5. Hotchkiss 氏法	229
6. Shimizu 和 Kumanoto 四醋酸铅-Schiff 法	230
7. Lhotka 氏铋酸钠-Schiff 法	231
二、显示糖元及粘蛋白的银染法	231
三、显示抗坏血酸银法	232
1. 酸性硝酸银法	233
2. Bacchus 法	233
3. Jensen 及 Karaljian 法	234
4. Bourne, Barnett 及 Bourne 法	234
四、显示酸性粘多糖法	234

1. 选择性荧光染色法	234
2. 显示酸性粘多糖的渗析铁法	235
3. 显示酸性粘多糖类的渗析铁与 PAS 染色结合法	235
五、显示透明质酸类物质的透明质酸酶提取法	236
六、显示结缔组织基质粘多糖的 Evan 氏蓝法	237
七、显示乙酰化多糖类的高铁氧胍酸法	237
八、显示葡萄糖的 Okamoto 法	238
九、显示戊糖的改良 Roe-Rice 法	239
第五章 类脂及其衍生物的组织化学法	239
一、显示类脂的方法	240
1. 显示神经组织中的酸性多糖类和中性脂肪的改良 Hale 氏法	240
2. 显示中性脂肪及酸性类脂的 Cain 氏 Nile 蓝法	240
3. 显示类脂的丙二醇苏丹法	241
4. 显示类脂的磷化氢 3R 续发性荧光法	241
5. 显示类脂的控制铬化作用法	242
6. 显示酸性脂类的 Feyrter 氏“封片染色”法	242
二、显示隐脂类的苏丹黑 B 法	243
1. Ackerman 血涂片法	243
2. Berenbaum 法	243
三、显示糖脂的方法	244
1. Diezel 改良的 Molisch 反应法	244
2. Diezel 改良的 Brückner 反应法	244
四、显示磷脂类的方法	244
1. 酞花青铜法	244
2. 酸性氧化苏木素法	245
3. Nile 蓝法	248
4. 显示磷脂、脑苷脂的 Okamoto 氏汞-二苯卡巴腴法	248
五、显示变性髓磷脂的 Marchi 法	249
1. Swank 及 Davenport 法	250
2. Wolman 法	250
六、显示脂肪酸的方法	252
1. Fischler 铜法	252
2. Okamoto 等氏改良 Fischler 法	252
七、显示含不饱和键脂类的方法	253
1. 过甲酸-Schiff 氏法	253
2. 显示不饱和脂类的紫外线 Schiff 法	254

八、显示固醇类的方法	254	九、显示葡萄糖-6-磷酸酶法	276
1. 改良的 Schultz 法	254	1. Chiquoine	276
2. 显示胆碱脂类的磷酸酶法	255	2. Wachstein 及 Meisel	277
3. 显示胆固醇的三氯化铋法	255	十、显示酸性磷酸酶的铅法	277
4. 显示胆固醇及其酯的鉴别法	256	1. Gomori 1950	277
5. 显示胆固醇及胆固醇酯的 Okamoto 法	256	2. MeDendel 改良法	278
6. 显示类固醇 Schultz 变法	256	3. Rozenszajn 氏改良法	279
第六章 醛基反应	257	4. Ruyter 石蜡切片法 1964	280
一、显示缩醛磷脂的浆醛反应	257	5. Takeuchi 及 Tanoue 法	280
1. Cain 1949 法	257	十一、显示酸性磷酸酶的偶氮偶联法	281
2. Hayes 1949 法	258	1. Pearse 1960 法	281
二、显示醛基的方法	258	2. 显示酸性磷酸酶的萘酚 AS-BI 磷酸酯法	281
1. 苯肼-甲脒反应	258	3. 显示酸性磷酸酶的后偶联法	282
2. 苯甲酸酰肼反应	259	十二、显示磷酸酰胺酶法	283
3. Gomori 氏银氨反应	260	1. Gomori 铅法	283
三、显示类皮质激素的 α -乙酮醇基法	261	2. Meyer 与 Weinmann 改良铅法	283
第七章 显示酶的组织化学方法	261	3. Burstone 的偶联偶氮染料法	284
一、显示碱性磷酸酶的钙-钴法	261	十三、显示酯酶的方法	284
1. Gomori 原法	261	1. Gomori 醋酸 α -萘酯法	284
2. Danielli 改良法	263	2. Gomori 的萘酚 AS-醋酸酯法	285
3. Fredriesson 1956 改良法	264	3. Burstone 的萘酚 AS-LC 醋酸酯法	286
4. Butchnet 及 Chuyen 法	265	4. Holt 及 Withers 的吲哚酚醋酸酯法	287
5. 显示血涂片中碱性磷酸酶的钙-钴法	265	5. Gomori 的 Tween 法	288
二、显示碱性磷酸酶的偶氮偶联染料法	266	6. 显示脂肪酶——酯酶的改良 Tween 法	289
1. Pearse 1960 法	266	十四、显示胆碱酯酶的方法	289
2. 显示血细胞的碱性磷酸酶的偶氮偶联法	267	1. Gomori 十四酰胆碱法	289
3. Kaplaw, Monio 及 Hayhoe 偶氮偶联法	268	2. Gomori 的乙酰硫胆碱法	290
4. 显示碱性磷酸酶的萘酚 AS-磷酸酯偶氮染料法	268	3. Karnovsky 改良法	291
三、显示 5-核苷酸酶法	270	4. 显示胆碱酯酶的乙酰一及丁酰硫胆碱法	292
1. Wachstein 及 Meisel 铅法	270	5. 改良 Koelle 硫胆碱及抑制剂法	294
2. Pearse 及 Rise 钙法	270	6. 硫赶醋酸法	296
四、显示缩醛酶的钙-钴法	271	十五、显示 β -葡萄糖醛酸苷酶的方法	296
五、显示 ATP 酶的方法	272	1. Fishman 及 Baker 的正铁羟基喹啉法	296
1. Wachstein 及 Meisel 铅法	272	2. Burton 及 Pearse 的 8-羟基喹啉偶联偶氮法	297
2. Padykula 及 Herman 钙法	272	3. Seligman, Tsón, Rutenburg 及 Cohen 的后偶联法	298
3. Maengwyn, Davies 钙法	273	十六、显示 β -半乳糖苷酶的后偶联法 (Rutenburg 等 1958b)	298
4. Hiles 改良 Herman 法	274	十七、显示 α -葡萄糖苷酶的后偶联法	299
六、显示硫酸素焦磷酸酶的方法	274	十八、显示 N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶的方法	300
七、显示无机焦磷酸酶的方法	275	十九、显示葡聚糖磷酸化酶及转糖基酶	
八、显示无机多偏磷酸酶的方法	275		

的方法	300
二十、显示细胞色素氧化酶的方法	301
1. Moog 的 G-Nadi 反应	301
2. Nachlas 等的 ADN 法	302
3. Burstone 的 N-苯基-对-苯二胺法	303
二十一、显示过氧化物酶法	304
1. De Robertis 及 Grasso 的联苯胺反 应法	304
2. Van Duijn 1955 法	305
3. 血涂片法	305
4. Ritter 及 Oleson 的稳定性嗜苏丹细 胞的 α -萘酚反应	306
5. 无色专利蓝法	307
二十二、显示过氧化氢酶的乙基过氧化 氢化法	307
二十三、显示“氢过氧化物酶”的乙基过 氧化氢法	308
二十四、显示 Dopa-氧化酶(酪氨酸 酶)法	309
二十五、显示单胺氧化酶法	310
1. 萘酰肼法	310
2. 四唑盐法	311
二十六、显示琥珀酸脱氢酶(SDH)的 四唑盐法	312
1. Nachlas 法	312
2. Gobel's 氏改良 Rutenberg Waoman Seligman 的方法	314
3. Pearson 氏法	315
4. 培养细胞 Nitro-BT 法	316

5. MTT 法	317
二十七、显示 DPN 及 TPN 黄素蛋白酶 的方法	317
1. MTT 法	317
2. 显示 DPN-黄素蛋白酶的 Nitro-BT 法	318
3. 显示 TPN-黄素蛋白酶的 Nitro-BT 法	319
二十八、显示要求 DPN 及 TPN 的脱 氢酶的四唑盐法	319
二十九、显示亮氨酸氨基酞酶的方法	321
三十、显示组织蛋白酶 C 的吲哚醋酸酯法	322
三十一、显示芳基硫酸酯酶的后偶联法	323
三十二、显示碳酸酐酶的方法	323
第 八 章 其他组织化学法	324
一、显示肠嗜银细胞颗粒法	324
1. 重氮法	324
2. Gibb 氏法	325
二、显示脂褐质的方法	326
1. Schmorl 法	326
2. 铬明矾苏木素法	326
3. 显示抗酸性脂褐质的 Ziehl-Neelsen 长法	326
三、鉴别脂褐质和黑色素的 Nile 蓝法	327
1. Hueck 法	327
2. Lillie	327
四、显示脂肪过氧化物的方法	328
1. Glavind 等法	328
2. 二氨基苄法	328
[附] 放射自显影术	329

第一部分 组织切片的基本操作

第一篇 切片制作的基本原理

第一章 概 述

一、引 言

组织切片技术是组织学、胚胎学、生理学、动物学等生物科学及病理解剖学等医学科学,研究观察细胞、组织的生理、病理形态变化的一种主要方法,用以补充生活观察的不足。因生活观察不仅不易看清细胞、组织的微细结构,且操作复杂,但在经过固定、脱水、包埋等手续后就可把材料切成极薄的片子,再用不同的染色方法以显示不同细胞和组织的形态,以及细胞和组织中某些化学成分含量的变化。切片也便于保存,所以是教学和科研中常用的方法。

由于近代物理学、化学及生物学等学科的发展,为组织切片方法提供了丰富的知识和条件。例如:现代染料化学的成就为组织学家提供了不少宝贵的试剂,近代物理学的发展为组织切片技术提供了新的技术及设备,使组织切片的方法不断的更新。在学习制片过程中,不仅需要具有理化知识,还须耐心细致;不仅要学习前人的方法,更要融会贯通,还要不断总结经验,不断巩固和提高理论水平,才能有所发现,有所发明,有所前进。

二、制片方法的种类

生物组织切片的制作方法很多,但总的来说可以归纳为两大类:即非切片法和切片法。

1. 非切片法

这是不用切片机、不经切片手续而制成切片的方法。方法有多种,包括:整体封藏法、涂片法、压碎法、浸渍分离法等等,此类方法操作简单而快,组织各个组成部分均不被切断,能保持原有状态,但在压碎标本时,使组织受压迫,因而某些组成部分的正常关系位置有所变动,这是它的缺点。

2. 切片法

这是必须依靠切片机将组织切成薄片的方法。在切成薄片以前必须设法使组织内渗入某些支持物质,使组织保持一定的硬度,然后使用切片机进行切片的。根据所用支持剂的种类不同,可分石蜡切片法、火棉胶切片法、冰冻切片法等类型。所以切片法手续比较复杂,不是几个小时就可以做成切片的。

三、制片方法的一般步骤概述

1. 切片法

从动物体取下材料开始,到制成切片标本为止,其间必须经过以下各个步骤:

(1) 杀死、取材与固定: 这是制作切片的第一步,首先必须把动物体的组织杀死,并设法把它原来的结构保存下来,以便观察研究。一般用化学药品把它固定,这种化学药品称为固定剂,它有杀死兼固定和硬化细胞组织的作用。

(2) 洗涤: 组织经过固定剂作用以后,内部渗入很多固定剂,经过一定的固定时间以后,一定要及时地把渗入里面的固定剂洗去,否则固定剂作用过久会产生一些不良后果,如影响染色、产生结晶等,所以在固定以后必须用水冲洗干净。

(3) 脱水: 组织在水洗后含有大量水分,必须用一些有机溶剂,称为脱水剂的以驱除里面的水分,以利组织的保存和下一步的透明、透蜡诸步骤的进行。因为透明剂与水是不能混合的,所以必须先脱去水分,方能透入。

(4) 透明: 组织在脱水以后方能进行透明,它的目的是便于透蜡包埋。因为透蜡的熔剂(如石蜡)一般多不能与脱水剂混合,只能与透明剂混合,所以在脱水后组织里的水分已为透明剂所代替,这样才有便于透蜡熔剂的渗入。

(5) 透入: 组织块在完全透明后,支持剂如石蜡、火棉胶等就容易透入,它的目的方面使组织变硬有利于切片,另外也使组织块间的相互位置保持一定,基本上保持生活时的状况。石蜡切片法的透入一定要保持在一定的温度下才能进行。

(6) 包埋: 把透足石蜡或火棉胶的组织包埋在石蜡或火棉胶里,成为一定的形状以便切片。

(7) 切片: 把包埋好的组织块用切片机进行切片,根据观察的要求可以切取所需要的厚度。

(8) 贴片: 用粘贴剂使切出的切片平铺粘贴在载玻片上以利于染色的进行。一般用甘油蛋白贴剂较多。

(9) 染色: 切片贴好烘干后就要进行染色,其目的是使细胞或组织的一部分染上与其他部分不同的颜色,产生不同的折射率以显示它不同的构造。染色方法有多种可以根据要求不同而选择。

(10) 封藏: 切片染好以后用一种胶类物质称封藏剂的封好,以利于长期保存。

以上为切片制作的一般步骤概述,其详细过程、原理将在以后各章节中叙述。

2. 非切片法

非切片法的种类较多,根据观察目的不同有所选择,具体方法将在后面讲述。

(1) 整体封藏法: 用这种方法制片,一般是身体很小或自身为一薄片的低等动物,如无脊椎动物的水螅、草履虫等。或脊椎动物的胚胎材料: 如鸡胚、蛙胚、猪胚等。也可取下某一动物体的某部分器官制成封片的,如昆虫的翅、鸟的羽毛、鱼的鳞片等等。这些材料取下后经固定、脱水、染色等手续就可以封藏于玻片内而不需用切片机来切片。

(2) 涂片法: 主要是液体或半流动性的材料,不能切成薄片则可涂在玻片上,再经固定与染色等手续制成标本。如: 血液、精液、尿、痰、粪便等,还有细胞学的检查,微生物及原生动物的等也可用涂片法制片。

(3) 磨片法: 主要用于含有钙盐等矿物质成分坚硬的材料, 如脊椎动物的牙齿、坚骨, 软体动物的介壳、珊瑚虫的骨骼等可不经切片制成磨片标本。

(4) 分离法: 为了要观察研究在组织或器官里的单个细胞或纤维的形状, 必须设法使细胞与细胞间的间质消除, 细胞便各自分离开来, 再经染色后制成切片的方法叫分离法。一般有二种方法:

① 浸渍分离法: 是利用药品使细胞间质溶解, 细胞便能自动分离, 取出单个细胞经过染色、脱水、透明等处理封成片子。

② 撕碎法: 材料经固定或浸渍到一定的程度后用解剖针在解剖镜下撕开的方法, 如观察单个的神经纤维即可用此种方法制片。

(5) 压碎法: 一些柔软的材料可夹在玻片或盖片间进行压碎或压开经染色后进行观察。

第二章 杀死、取材和固定

一、动物杀死的方法

制作切片的第一步首先要把动物杀死, 取下需做切片的材料(包括外科病理手术或活检切除下来的材料)。动物杀死的方法很多, 常根据动物大小、种别及观察目的而定。例如青蛙、小鼠等类较小的动物, 可用断头法杀死, 即用大号剪刀剪断颈部, 迅速将动物倒提放血, 如反射尚未消失可用金属探针插入脊髓管, 破坏其脑脊髓。一些较大的动物例如天竺鼠、兔子、猫等可用空气栓塞法, 用 50 毫升的注射器从耳静脉注射入空气, 使动物心脏发生急性空气栓塞, 循环障碍, 痉挛而死。注入空气的量, 视动物大小而不同, 一般情况下兔、猫约注入 20—40 毫升, 狗需注入 80—150 毫升。此法迅速方便, 但各脏器淤血明显, 脑和心可发生人为性病变(心内膜下淤血和脑部变质)。也可用扑杀法, 即用木槌从头后部给予猛击, 使其颈椎脱位, 延髓急性损伤而死。或用麻醉或用窒息法, 使动物闷在盛有乙醚或氯仿的密闭容器内, 使麻醉致死, 或在容器中通入煤气, 使其发生急性煤气中毒而死亡。其中用乙醚麻醉致死的动物常有肺部充血、呼吸道分泌物增多的病变。煤气中毒致死的动物因一氧化碳可使血红蛋白转变为碳氧血红蛋白, 使动物内脏呈樱桃红色, 影响对血液和骨髓的涂片染色(必须在组织固定后, 用稀的过氧化氢液处理后再进行)。这些人为病变, 在观察时必须注意分辨。

总之在杀死动物时, 无论采用哪种方法, 都要尽力避免使动物长时间陷于痛苦和濒于死亡状态, 以免使动物的组织细胞成分结构发生变化, 或引起病理假象。

另外在生物学制片中, 一些较小的低等动物, 如原生动物(草履虫)、腔肠动物(水螅)等的杀死方法, 可用加热法或用冷的或热的固定剂直接杀死的方法, 和以上所述较高等动物的杀死法有所不同。

二、取材和固定

1. 取材和固定的目的

动物杀死后应该立即取材和固定,否则组织会因失水变形和发生死后变化。

所谓“固定”,就是将我们要观察的新鲜组织,从动物体取下后立即投入固定剂内,借助化学药品的作用使细胞组织的形态结构保存起来不使其改变形态和变质的一种手续,因为动物死后血液循环停止,细胞逐渐死亡,如不立即处理,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,组织变形,发生组织自溶现象,更可由于微生物的繁殖而腐败,组织结构破坏,失去原来的结构,也就失去了制片的意义,所以固定的作用和目的有四:(一)可以防止组织溶解及腐败。(二)使细胞内的蛋白质、脂肪、糖、酶等各种成分沉淀保存下来,保持它原有的结构与生活时相仿。(三)因沉淀及凝固的关系使细胞内成分产生不同的折射率,造成光学上的差异,使得在生活情况下原来看不清楚的结构变得清晰起来了,并使得细胞各部分容易染色。(四)固定剂兼有硬化作用,使组织硬化,增加组织硬度,使组织不易变形,有利于固定以后的处理,因此,固定是制片过程中的一个重要手续。

一种良好的固定剂能使材料中的内部结构的化学成分变化很小,被保存下来的细胞形态也就比较完整真实。但据实验证明,材料经固定后的情况与生活时的情况总有些差别,因为材料在固定过程中,必然要受到一定的影响而发生变化,产生“人为产物”。所以从显微镜标本中所见到的某些结构,究竟能否完全代表它生活时的状况,还必须对照其他方法来证明。至于固定成败的关键,与固定剂及标本本身的性质有密切的关系,要根据材料的具体要求去选择合适的固定剂,材料要新鲜,取材技术的熟练程度也是一个主要的因素。

2. 固定的对象

构成细胞的主要物质是蛋白质,它分散在细胞内,所以固定的主要对象是蛋白质。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、碳水化合物在一般制片中是不考虑的,除非要研究观察这些物质,可用特殊的方法单独把这个成分固定下来。

3. 组成固定剂的性质和条件

用作固定剂的药物必须具有凝固或沉淀蛋白质、脂肪等成分的作用,渗入组织的能力要强,渗透力低弱的需与渗透力强的混合使用,可以取长补短成为较完善的固定剂。使组织收缩或膨胀过大的药物也不适宜,因会改变组织原来的结构形态。例如,冰醋酸对组织有较大的膨胀作用,故很少单独使用。固定剂对组织会产生一定的硬度,但使组织过硬的药物也不适宜。固定剂对染色有一定的影响也要加以选择。

所以固定剂要适合固定的目的,必须具有下列各种性质:

- (1) 迅速渗入组织杀死原生质,在杀死的短时期中,细胞形态不至有所变化。
- (2) 必须具有相当的渗透力,对组织各部分的渗透力相等,可使组织内外完全固定。
- (3) 使细胞中不至于因固定引起人为的改变。
- (4) 在凝固原生质以后,增加细胞对于各种穿透的抵抗力,不至于因以后的处理,而使固定了的原生质变形。
- (5) 尽可能避免使组织膨胀或收缩(不会改变原生质原来的体积)。
- (6) 要使细胞内的成分(蛋白质等)凝固或沉淀。
- (7) 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。

(8) 使组织变硬,适于切片,但又不致使材料太坚硬而松脆。

(9) 固定以后,又能有保存作用。

4. 固定剂的作用

固定剂固定的对象主要是蛋白质,所以固定剂有无作用主要视其对蛋白质有无沉淀作用而定。固定剂对蛋白质的固定作用有以下几种方式:

(1) 固定剂与蛋白质间起了化学上的结合,大大改变了分子的结构产生沉淀。

(2) 固定剂对蛋白质的变性作用。蛋白质变性后最明显的变化就是失去了可溶性,本身成为沉淀状态。蛋白质的变性作用是不可逆的。例如以酒精固定即是变性作用,酒精不与蛋白质成化合物,而是从其中提取水分,造成不可逆的变性改变。

(3) 使蛋白质冻胶化。固定液与蛋白质间起了化学上的结合,改变了分子的结构,但并不产生沉淀,而使蛋白质凝胶化,并不溶于水。

5. 固定剂的媒染效果

生活细胞大多不易染色,但经固定后便易染色,这是由于固定剂对组织常有一定的媒染效果,就是它一方面可与蛋白质相结合,同时也能与染料相结合。例如经氯化汞固定的组织易于染色。但各种固定剂对各种染料的媒染效果也有很大的差别,例如四氧化锇与染料作用冲突,用四氧化锇固定后便不易染色。

6. 固定剂的穿透率

固定剂在组织中的穿透率在固定作用中是很重要的。穿透力要强而迅速,才能在短时间内使组织内外都得到固定。例如冰醋酸和甲醛是渗透较强的固定剂。苦味酸、铬酸、酒精、锇酸渗透力很弱。

E. Wustenfeld 用各种固定液对肝、脾、肌肉、肾进行固定,其渗透速度,平均以甲醛比酒精快 2.06 倍,比 Zenker 氏液快 4.46 倍,比 Carnoy 氏液快 6.31 倍,比 Susa 氏液快 6.84 倍。

Dempster (1960)用各种动物组织(肝、心、肌肉、肾、脑等)研究了九种标准固定剂对它的穿透速度,在不同时间内测出它的穿透深度(见下页附表)。他指出在用 Zenker 氏液固定后 8 小时,兔肝为重铬酸盐穿透深达 0.85 毫米,被升汞穿达 2.6 毫米,被醋酸穿达 5.8 毫米。

7. 固定中组织的收缩问题

据 Bahr, Bloom 及 Friberg (1957)的研究用甲醛或四氧化锇固定的组织,在固定剂内发生膨胀,如在福尔马林内固定 30 分钟膨胀达 9%,固定 12 小时膨胀达 18%,以四氧化锇固定的组织固定 15 分钟膨胀 15%,固定 24 小时达 30%,但经酒精脱水使组织收缩,甲醛固定的材料收缩 33%,四氧化锇固定的材料收缩达 23%,经透入作用组织进一步收缩,如用异丁烯酸(methacrylate)渗入,收缩达 20%,用石蜡渗入收缩达 30%。从这些数据的表示可知福尔马林固定的材料经石蜡透入的最后结果使组织总收缩达 30—40%。

使组织体积收缩的机制并不完全清楚,可能有很多因素如膜透性的改变,呼吸的抑制和钠运输活性的改变等。

8. 取材和固定应注意事项

(1) 固定的组织必须新鲜。从动物体取下组织后,应立即投入固定剂,否则时间相隔过

	穿 透 深 度 (毫米)			穿 透 因 素	
	4 小时	8 小时	12小时	k	e
1. 10%醋酸	3.8	5	5	0.25	2.11
2. 5%三氯醋酸(c)*	2.7	4	5	0.67	1.78
3. 10%福尔马林	2.7	4.7	5	1.14	1.25
4. 95%乙醇	1.7	3.5	5	2.0	3
5. 7.5%升汞(c)	2.0	3.0	3.5	0.79	2.09
6. 苦味酸饱和水溶液	1.0	1.5	1.75	3.9	2.03
7. 2.5%重铬酸钾	1.0	1.5	1.75	3.94	2.12
8. 0.7%铬酸	0.6	1.0	1.2	8.4	1.99
9. 4%四氧化钼	0.3	0.5	0.7	23.9	1.94

$t = k \cdot d^e$ t = 时间 d = 穿透深度

k 为常数, 系穿透组织 1mm 所需时间数

e 为扩散速率的指数

例: $20 \times 10 \times 6$ mm 组织块, 固定于甲醛($k=1.14$, $e=1.25$)则需时间为 $t = 1.14 \times 3^{1.25} = 4.275$ 小时。

久, 夏天超过 4 小时, 冬天超过 24 小时, 体积就要收缩变形。或发生自溶现象, 一般以神经、造血组织的自溶速度较快, 胰腺、胃肠道的粘膜亦较易发生。

(2) 切取组织材料应根据需要观察的部位进行选择, 预先要考虑好切面方向。所取组织应包括各脏器的重要结构或全层。如取肾脏, 应包括皮质、髓质和肾盂。有浆膜的器官如肝、肺、脾等应包括包膜在内。心脏、胃肠道等应包括它管壁的全层结构。大动物的器官不易全部制片, 可切取能代表该器官的部分材料, 如肾脏可切取包括皮质、髓质和肾盂一部分的材料。

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, 以利观察分析。

组织器官的切面方向, 在管状器官一般横切, 也可纵切如小肠因有环行皱壁故以纵切较好。肾脏纵切, 脑一般取与其表面和脑沟成直角的方向作垂直切面, 肝、脾、腺体纵横切均可。

(3) 切取组织材料, 刀要锐利, 动作必须仔细, 不可来回切割, 如用钝刀切割则切口处会形成卷曲不平使组织损伤, 也不要挤压或牵拉组织以免损伤组织, 使组织器官变形或内部细胞脱落, 影响制片后的检查。所以使用镊子宜轻轻夹起, 被镊伤的部位宜弃去不用。

(4) 切取的组织块必须小而薄。由于固定剂渗入组织的能力有很大的差异, 任何固定剂数小时内渗入组织的深度只达 2—3 毫米, 所以切取的组织不能过厚, 否则组织中间部分由于药液渗透不足, 固定不够, 不能达到制片的要求。尤其细胞学的制片组织块不能超过 2 毫米, 故切取组织块的大小一般以 $0.5 \times 0.5 \times 0.2$ 厘米或 $1 \times 1 \times 0.3$ 厘米, $1.5 \times 1.5 \times 0.5$ 厘米, 最厚勿超过 0.5 厘米。柔软组织不易切小, 可先取稍大组织块固定数小时, 等待组织稍硬后, 再行修切成薄的小块继续固定。过于细小的材料为预防在固定后的失落, 可连同其周围的组织

一起固定。固定好后再把它取出。对被膜厚而坚实的器官(如睾丸),须切开被膜,并在其上开2个以上的小口,以利固定液的渗入。对大型标本最好用注射固定法,将固定剂注入血管内可以固定得更好。

(5) 切取组织块时对于不需要的其他周围组织,如附着的脂肪组织将会妨碍固定剂的渗入,可以切去不要,这样也可减少组织的体积有利于制片。有些材料如肠管经固定剂的作用后往往会使粘膜外翻,不利于包埋,可在固定数小时后修除外翻部分,继续固定。

(6) 在固定时要防止材料因固定剂的作用而发生变形。一些柔嫩或薄的材料如神经、肌腱、肠系膜等应先平摊于吸水纸上,再投入固定剂中,可防止因蛋白质凝固而引起的扭转变形。对有空气的组织如肺等浮于液体表面可用线缚住用重物使其下沉,或用真空浸蜡装置,吸出肺内气体,使其下沉于固定剂内。

(7) 取消化管时应保持清洁,防止混入其中的砂粒损伤刀片,可用生理盐水或固定剂轻轻洗去所含的粘液、食物残渣等,再投入新的固定剂中。

(8) 组织块附加标记的方法:组织块取得较多在同一容器内很易相互混淆,应加标签以区别之,一般用卡片纸裁成小的纸条,用深色铅笔或黑墨汁预先写好标本的号码和标本的名称待组织取下后,即粘贴上去一般不会脱落,万一脱落可用甘油蛋白代替浆糊将其粘贴。或用昆虫钉将号码标签刺入组织内,此法使组织上留下一小孔,不适于作连续切片,也不可用含升汞的固定液以防钉子生锈。最好是分材料分瓶盛着在盛不同固定剂的瓶子上最好贴上标签,注明固定液、材料、日期等。

(9) 固定剂的用量:固定组织时,应有足够的固定剂,一般为组织块体积的10—15倍,容器勿过小,材料勿太多,避免组织内水分在固定时渗出,影响固定剂的浓度,勿使组织贴于瓶底或瓶壁,以免影响固定剂的渗入,在固定较精细的材料或用纯酒精为固定剂的标本瓶底要垫以棉花,使固定剂能均匀的渗入。对弱的和作用较慢的固定剂如苦味酸,固定剂的量要多(约100倍材料体积的量),而强的固定剂如Flemming氏液则量可少些。

(10) 固定的时间,视材料的种类、性质、大小、固定剂种类、性质、渗透力的强弱而定,可从1—2小时到十几小时或二十几小时,也有长至几天的。一些小的材料,仅须几十分钟,某些固定剂(如Carnoy)对组织的硬化作用较强,固定时间不宜过长,但有些固定剂(如Bouin)固定时间较长也无关系,一般固定24小时左右即可。

此外,固定时间的长短与温度有密切关系,一般在室温中进行。增加温度虽可缩短固定时间,但对组织变化较大,尤其是组织化学染色更不相宜,除应用于手术扎出物急待诊断的材料,作急速包埋及冰冻切片外,一般并不采用。

(11) 固定剂要避免接触阳光,以免引起化学变化,失去固定作用。

9. 常用固定剂的性能及其使用

固定剂有简单固定剂和混合固定剂的区别,所谓简单固定剂(单一固定剂)即是用一种药品作为固定剂的:如乙醇、甲醛、冰醋酸、升汞等等。用无水乙醇固定肝脏可显示肝糖,升汞对蛋白质固定很好,冰醋酸可以固定核蛋白等等,它只是对细胞的某种成分固定得较好,而不能将所有成分都保存下来,如无水乙醇虽可固定肝糖,但不能固定脂肪,因脂肪易溶于乙醇,所以