

形态学 实用技术

■ 主编 钟睿舫 沈浩贤 张莉 ■

中国医药科技出版社

形态学实用技术

主 编 钟睿翀 沈浩贤 张 莉

中国医药科技出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

形态学实用技术/钟睿翀, 沈浩贤, 张莉主编. —北京:
中国医药科技出版社, 2007.6

ISBN 978-7-5067-3706-7

I. 形… II. ①钟…②沈…③张… III. 人体形态学
IV. R32

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 092660 号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

版式设计 程明

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 责编: 010-62245386 发行: 010-62244206

网址 www.cspyp.cn www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm 1/32

印张 13

字数 287 千字

印数 1—3000

版次 2007 年 6 月第 1 版

印次 2007 年 6 月第 1 次印刷

印刷 三河富华印刷包装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-3706-7

定价 26.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

内 容 提 要

本书综合形态学各学科技术的发展和交叉融合的特点，重点介绍了形态学常规、常用技术及其与临床的联系。全书共十一章，分别介绍了形态学标本制作技术、显微镜及显微摄影技术、细胞培养、组织化学技术、聚合酶链反应、细胞图像测量分析及技术、流式细胞检测技术、组织芯片、电子显微镜与超薄切片技术、形态学常用临床检测技术、常用试剂的配制。涵盖了形态学主要技术，具有实用、全面、先进等特点。书中介绍的方法，不少是作者多年实践经验的总结，颇有参考价值。是形态学、临床检验工作者，临床病理、检验专业学生不可多得的教材和工具书。

编委会名单

主 编 钟睿肿 沈浩贤 张 莉
主 审 黄林邦
副主编 肖 海 刘联斌 王尊哲 赵 炜
编 委 (以姓氏笔画为序)

王 东 (滨州医学院)
王尊哲 (潍坊医学院)
刘菲予 (赣南医学院)
刘联斌 (赣州市肿瘤医院)
吕军华 (赣南医学院)
陈水清 (赣南医学院)
吴洪娟 (潍坊医学院)
肖 海 (赣南医学院)
张 莉 (南昌大学医学院上饶分院)
沈浩贤 (广州医学院)
宋 涛 (赣南医学院)
赵 炜 (青岛医学院)
赵恒梅 (青岛医学院)
钟睿肿 (赣南医学院)
殷彦君 (滨州医学院)
廖 华 (赣南医学院)

前 言

近几十年来,科学技术日新月异,这与实验方法的改进和技术手段的更新密不可分,更关键的是科技工作者运用创造性思维掌握和运用先进的研究技术和方法的结果。

随着现代医学教育的不断深入,国内高等医学院校大多数成立了形态实验室,综合了组织胚胎学、病理学、病原生物学、细胞生物学、遗传学等学科的实验,主要目的是实现资源共享、实验技术人员一专多能。形态学实验教学人员的整体素质决定着实验教学效果的好坏、实验教学改革的成败。多技能、跨学科的新型实技人才亟待培养,这正是本书编写的目的。

本书的编写得到了同仁的广泛关注与支持,有多所院校、医院参编。感谢广州医学院沈浩贤教授,南昌大学医学院上饶分院张莉教授,赣州市肿瘤医院刘联斌医师,青岛医学院赵炜、赵恒梅教授,潍坊医学院吴洪娟、王尊哲教授,滨州医学院殷彦君、王东教授等的关心和帮助。本书在编写过程中得到赣南医学院领导和显微实验室同事们的大力支持,在此一并表示感谢。还要感谢本院苏水莲、林卡莉、马廉兰、杨庆春教授对本书的编写所提的宝贵意见和建议。

由于本书涵盖学科多,编写时间紧,书中难免有谬误和不足之处,欢迎广大读者提出宝贵意见,我们将不胜感谢!

编 者

2007 年 2 月

目 录

第一章 形态学标本制作技术.....	(1)
第一节 形态学玻片标本制作的仪器和设备	(1)
第二节 形态学玻片标本制作的方法	(5)
第三节 几种主要的细胞器、组织和器官的制片法.....	(17)
第四节 病理学切片标本制作技术.....	(34)
第五节 人体寄生虫学玻片标本制作技术	(61)
第六节 微生物染色技术	(83)
第七节 病理大体标本制作技术	(96)
第八节 寄生虫大体标本制作技术.....	(97)
第二章 显微镜及显微摄影技术.....	(104)
第一节 正立式显微镜	(104)
第二节 偏光显微镜	(107)
第三节 倒置显微镜	(109)
第四节 体视显微镜	(109)
第五节 显微摄影技术	(110)
第三章 细胞培养.....	(121)
第一节 实验室设施和主要设备	(121)
第二节 清洗及消毒	(125)
第三节 培养液	(130)
第四节 细胞培养基本技术和要求.....	(142)
第五节 常用组织培养法	(149)
第六节 两种正常细胞的培养	(152)
第七节 培养细胞的观察	(156)
第八节 细胞培养污染的检测和排除	(157)

第四章 组织化学技术.....	(160)
第一节 一般组织化学技术	(160)
第二节 酶组织化学方法	(166)
第三节 免疫组织化学方法	(174)
第四节 电镜细胞化学技术	(181)
第五章 聚合酶链反应.....	(194)
第一节 聚合酶链反应的基本原理	(194)
第二节 PCR 反应体系与反应条件	(196)
第三节 PCR 技术中常见问题及其处理	(206)
第四节 PCR 产物的检测	(211)
第五节 PCR 技术的主要类型和应用	(216)
第六章 细胞图像测量分析及技术.....	(226)
第七章 流式细胞检测技术.....	(229)
第一节 流式细胞仪发展历程与工作原理	(229)
第二节 流式细胞仪 (FCM) 的临床应用	(233)
第八章 组织芯片.....	(251)
第一节 组织芯片的研究进展	(252)
第二节 石蜡组织芯片的制备	(256)
第三节 组织微阵列的应用	(262)
第四节 TMA 的优点和存在的问题.....	(268)
第九章 电子显微镜与超薄切片技术.....	(273)
第一节 透射式电子显微镜	(273)
第二节 透射电镜样品制备方法	(278)
第三节 扫描电子显微镜 (SEM)	(326)
第十章 形态学常用临床检测技术.....	(331)
第一节 临床标本的微生物学检查.....	(331)
第二节 常见寄生虫病检验方法	(342)

第三节	人体外周血白细胞培养及染色体制备	(373)
第四节	羊水细胞培养与染色体标本的制备	(376)
第十一章	常用试剂的配制.....	(380)
第一节	试剂配制注意事项	(380)
第二节	常用溶液的配制	(381)
第三节	化学试剂的分级	(398)
主要参考文献		(400)

第一章 形态学标本制作技术

第一节 形态学玻片标本制作的仪器和设备

一、常用的主要仪器和设备

(一) 显微镜

显微镜是制片时最常用的仪器。制片室不需要高档显微镜，但应配备下列显微镜：

一台较旧但镜头尚好的显微镜，用于检查切片刀和切片染色情况；一台普通显微镜，用于观察切片的显微结构；一台实体显微镜，用于取材，主要是观察所取材料的好坏和取材部位的精确，以及检查玻片标本的半成品。

(二) 石蜡包埋仪器

1. 恒温箱 市售的各式电热恒温箱均可，用于浸蜡、烤片及染液加温等，温度范围在 37~60℃。

2. 包埋铜框 两块“L”形铜式铝块，可根据组织块大小调节成长方形或正方形，用于组织包埋。

(三) 切片设备

1. 切片机 切片机是制作各种组织切片必不可少的精密仪器。下

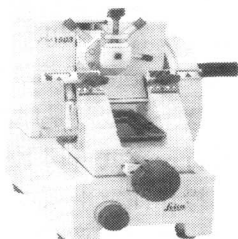


图 1-1 旋转式切片机

面介绍几种常用切片机：

(1) 旋转式切片机 (图 1-1) 用于石蜡切片，又称石蜡切片机，主要有徕卡 LEICA、美国 AO 型，中国上海医疗器械四厂、上海仪表厂生产的各种型号切片机都很好。

这种切片机的刀架固定不动，夹物器可作上、下垂直和前后运动，借夹物器后面的微动装置控制切片的厚度。机轮旋转一次，夹物器就随着上下运动一次，并按所调节的切片厚度向前推进一次。当蜡块与刀口接触时，就切出一片蜡片，连续旋转就切出连续的蜡带。

操作注意事项：旋转式切片机一般不宜切大块组织（不超过 1.8cm），切片时用力要均匀，太快或太慢均不易切成蜡带。每个转动重轮都设有一个卡锁，切片操作前必需先打开卡锁，切片工作结束后应先卡紧卡锁，切片技术人员必须养成这样的良好习惯。这样就可完全避免切片刀伤人或砸坏组织块及切片刀的事故。每次切片工作结束后，必须清理干净切片机，使用一段时间后，应给切片机加润滑油。

(2) 滑走切片机 滑走切片机，适用于切火棉胶包埋的较大组织块，故又称火棉胶切片机，也可切制未经包埋的木材、木质茎和草质茎等材料。

该切片机刀架可以滑动，而夹物器是固定的。夹物器的下面连接着控制切片厚度的微动装置。当刀架在滑行道上滑行一次时，通过微动装置就可使夹物器向上升高一定的高度，这个高度就是厚度计所调节的切片厚度。因此，切片刀每滑行一次就可切下一片一定厚度的切片。

操作注意事项：切片时应调好刀的角度，一是调整刀刃与组织块表面平行，另一是尽量在切片过程中，让刀刃全部切过组织块；切片时还应注意随时保持组织块上及切片刀凹

面上充满 70% 酒精，慢慢体会切片时用力的大小、速度的快慢。

(3) 冰冻切片机 冰冻切片机夹物器固定，是来回移动刀架而切片的。刀架下面连接有调节切片厚度的微动装置，切片刀每来回移动一次，材料块就按厚度计所调节的厚度升高一次，从而获得一定厚度的一片切片，冰冻切片机需配冷冻装置，一般为二氧化碳钢瓶、半导体致冷器或自动冷冻机等。

冰冻切片机不易切出较薄的切片，且不宜作连续切片，优点是新鲜组织或已固定的组织，经致冷后即可切片，适用于临床病理组织快速检查及组织化学研究。

2. 切片刀 切片刀有以下四型：

A 型 为双凹面型，用于石蜡等包埋的组织块切片。

B 型 为单凹面型，其凹面有较大、较小两种，分别用于火棉胶包埋切片和石蜡包埋或新鲜组织切片。

C 型 为楔形的切片刀，用途最广，可用于各种包埋或未包埋的冰冻组织的切片。

D 型 为凿状切片刀，用于较硬组织和包埋块的切片。

近年来，一次性刀片的出现，省去了过去磨刀之苦，很受切片技术人员的欢迎。在切片机上装一个刀架，固定之，然后在刀架上装刀片，刀片可左右移动，直到刀口都不利就丢，刀片有宽、窄两种，宽刀片适用于较大块组织，因宽刀片更易固定，更受切片技术人员欢迎。

二、染色工具

(一) 染色缸

有三种类型：立式染色缸，可直插载玻片 5 片；卧式染

色缸，可横插载玻片 10 片；盖玻片染色缸，可插 22mm × 22mm，或 24mm × 24mm 盖玻片 5 片。

（二）染色皿

制作小形动、植物整体装片用。如无染色皿，可用小培养皿代替。

（三）染色架

是铜制镀镍的可盛放载玻片的小篮，一般为 26 片装，也有 28、30、50 片的。

（四）载玻片和盖玻片

1. 载玻片 普通规格 76mm × 26mm，厚度为 1 ~ 1.2mm，以无霉点、无条痕、边缘光滑、无色为好，磨砂载玻片多用于组化染色。

2. 盖玻片 常用的有 18mm × 18mm，20mm × 20mm，22mm × 22mm，24mm × 24mm，有的厂家可根据用户需要制作特种规格。

为制作高质量的玻片标本，载玻片、盖玻片的清洁度很重要。清洗方法主要有三种：用 95% 酒精浸泡数小时至 1 天，擦干备用；用 1% 盐酸浸泡 24h，流水冲 24h，擦干备用；用清洁剂浸泡 24h，流水冲 24h，然后浸 95% 酒精数小时至 1 天，擦干备用。

三、常用仪器和工具

脱水机：对动物标本按程序浸于各种溶剂如脱水、透明、浸蜡的精密仪器，可根据需要购置不同功能的脱水机。

切片漂烘温控仪：采用微电脑实现湿度的无触点控制和数字化显示，因而读数稳定可靠。

冰箱：用于冷藏标本、蜡块、切片蜡带、药品、试剂

等用。

蒸馏水器：最好是玻璃双蒸水器。

离心机：普通电动离心机。

天平：普通药物天平 1 台，分析天平 1 台。

电炉：万用电炉

解剖器械：解剖器械 1 套。

其他用具：温度计、定时钟、烤片盒、铁三角架、漏斗架、试管架、石棉网、研钵、胶管、玻管、玻棒、药匙、瓶刷、滤纸、毛笔、毛刷、纱布、脱脂棉等各若干。

四、常用的玻璃器皿

大口瓶：30、60、125、250、500、1000ml 各若干

小口瓶：50、125、250、500、1000、5000、10000ml 各若干。

量筒或量杯：各种规格（10～1000ml）。

烧杯和烧瓶：各种规格（50～1000ml）。

其他：培养皿、注射器、漏斗、酒精灯、吸管、滴管、试管、有盖标本瓶等若干。

第二节 形态学玻片标本 制作的方法

一、制片法概述

制片方法很多，归纳起来有两大类：切片法和非切片法。

（一）切片法

通过器械把组织切成薄片的方法。

1. 徒手切片 手拿刀片或剃刀将标本切成薄片，可经固定或不固定制成标本观察。

2. 石蜡切片法 以石蜡为支持物，使石蜡浸到组织中，经过包埋，用旋转切片机切片，此法是切片法中最常用的方法。

3. 火棉胶切片法 以火棉作为支持物，使火棉透入组织中，经过包埋，用滑走切片机切片。

4. 冰冻切片法 利用致冷的药剂、气体、冷冻装置，使组织内及周围的水分结冰，然后用冰冻切片机切片。

(二) 非切片法

1. 整体装片法 小的动、植物或大的动、植物的某一部分，能在显微镜下观察清楚，可直接制成装片。如昆虫的口器、水螅、小型寄生虫、藻类等。

2. 涂片法 直接将标本涂在载玻片上方法。如血液、骨髓、精液、细菌等可用此法。

3. 压片法 将标本置于载玻片与盖玻片之间，借用外力，使标本展开成玻片标本，如运动终板的制作。

4. 铺片法 一些膜状的结构，如皮下结缔组织，肠系膜的间皮，可用解剖针扒开平铺于载玻片上，制成玻片标本。

5. 分离法 利用一些化学药物，使细胞分离，而后制成标本，如脊髓神经原、肌纤维可用此法。

6. 磨片法 动物的贝壳、动物或人体的骨骼和齿，可磨成薄片，再制成标本。

不论用何种方法制成玻片标本，一般需经过取材、固定、染色、封固等四个主要步骤。

二、取材

开始工作前应对制片各步骤的原理和操作予以充分研究，制订制片计划（包括标本的采取、方法、药品和日程安排等），减少不必要的损失。

1. 材料新鲜 所取组织越新鲜越好，以保证原有的形态结构。

2. 组织块的大小 以 $1.8\text{cm} \times 1.0\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ 为宜，病理外检、科研 $0.1 \sim 0.2\text{cm}$ 即可，教学切片可 $0.3 \sim 0.5\text{cm}$ 。

3. 取材部位 取材部位要准确、规范，如胰腺一般取胰尾；病理标本根据病变部位、性质的不同，规范化取材。

4. 选好组织的切面 如观察骨骼肌纤维的横纹，需取纵切面，若观察肌原纤维的排列就需取其横切面。长管状器官，以横切为好。

5. 保持原有形态 取材时切勿挤压组织，有些材料如神经、肌肉可两端用线扎在木片或硬纸片上固定保持原有形态。

6. 动物的选择及处死的途径 制作玻片教学标本，动物的选择很重要，如肥大细胞标本的制作，以大鼠皮下结缔组织或肠系膜为佳；内耳、胰岛细胞标本，以豚鼠最好。动物的处死方法直接影响取材的效果。如昆虫等小动物可直接投入氯仿或乙醚蒸气的大口瓶中，令其麻醉。若要杀生，直接投入含氰化钾的毒瓶中；有些动物（如水螅、蚯蚓）直接投入固定液中，会引起强烈收缩而影响标本制作，必须先麻醉而后固定；海洋内大部分无脊动物及有些寄生虫（如肝吸虫、绦虫）可用普通清水浸泡，使其松弛，然后再杀死。

7. 取材时要有详细记录 如采集日期、地点、标本名

称、年龄、性别、取材部位、断面、固定液等。

三、固定

1. 固定的目的和作用 ①防止组织自溶和腐败；②使细胞内的蛋白质、糖、脂肪等各种成分沉淀保存下来，维持原有形态；③因沉淀及凝固的关系，使细胞内成分产生不同的折光率，使显微结构更加清晰；④固定剂还兼硬化作用，易于操作。

2. 常用的固定方法

①小块组织固定法：从人体或动物体取下小块组织，立即置入液态固定剂中固定，标本：固定液为（1:4~20）。取材超过0.5cm，可放冰箱内固定，并适当延长时间。

②注射、灌注固定法：如需固定整个脏器或整个动物体，或固定液极难渗入内部的材料，可将固定液注入血管，经血管达到所需部位。

③蒸汽固定法：小而厚的标本，如血液涂片，可采用醋酸或甲醛蒸汽固定法。

3. 常用固定液 可分为单纯固定液和混合固定液两大类。

4. 单纯固定液

①乙醇（ethylalcohol）分子式 C_2H_5OH ，又称酒精，常用95%乙醇为固定液。95%乙醇穿透组织速度快，能沉淀白蛋白，球蛋白和核蛋白，核蛋白沉淀物溶于水，对核染色不良，不适于染色体的固定。50%以上浓度的酒精可溶解脂肪、类脂体及色素，故不能作为脂肪、类脂体及色素的固定剂。

②甲醛（formaldehyde）分子式为 $HCHO$ 。市售为