

生物科学综合实验指导

赵立青 张金红 主编



科学出版社

生物科学综合实验指导

赵立青 张金红 主编



科学出版社

北 京

内 容 简 介

生命科学是一门实验性科学,为顺应时代发展,培养具有较强综合分析问题、解决问题能力的高素质生命科学研究人才,南开大学为本科生开设了“生物科学综合实验”课程,实验内容主要选自任课教师的科学研究或教改成果、大学生创新科研项目成果、相关领域的最新技术及传统特色学科成果等。在几轮教学实践的基础上,作者总结、编写了本书。本书内容丰富,涵盖生物化学、分子生物学、细胞生物学、遗传学、植物学、动物学、微生物学、基因工程等多学科理论及技术。实验项目编排以科研成果为基础,紧密结合科研实际,将基础技能的综合运用与解决实际问题相结合,同时兼顾生命科学领域研究技术的新进展。使用者可根据专业性质和教学条件选择适当的内容安排。

本书可供高等院校生命科学类相关专业学生使用,也可供其他专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物科学综合实验指导/赵立青,张金红主编. —北京:科学出版社,2016
ISBN 978-7-03-050554-5

I. ①生… II. ①赵…②张… III. 生物学-实验 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 268049 号

责任编辑:刘 畅 / 责任校对:李 影
责任印制:张 伟 / 封面设计:迷底书装

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>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2017 年 1 月第二次印刷 印张:8 3/4

字数:167 000

定价:29.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

综合性实验课程是高等学校顺应新世纪社会 and 科技发展对人才培养要求的产物,各级各类学校均以不同形式开设了此类课程。“生物科学综合实验”是南开大学生物科学专业本科生必修的综合性实验课程。课程起始于 2009 年,经过几年的教学实践与改革,已建立三十余项涵盖生物化学、分子生物学、细胞生物学、遗传学、植物学、动物学、微生物学、基因工程等多学科理论及技术的实验项目库,在此基础上,我们编撰出《生物科学综合实验指导》一书。

本着培养学生探究精神、科学思维及综合实践能力的主旨,本书在实验内容的选择上体现三个特色:第一,突出基础技能与解决实际问题相结合,引导学生有效地综合运用多种实验技术方法,解决科学研究中的问题;第二,紧密结合科研实际,注重科研成果转化,将适宜本科实验操作的教师研究成果或部分科研内容纳入教材;第三,体现生命科学研究的新技术,引领学生进入生物技术前沿,增长见识,开阔视野。

本书涵盖 30 个独立实验项目,由南开大学生物实验教学中心各学科多位教师共同编写。其中,实验一由赵忠芳老师编写,实验二、实验十七由赵强老师编写,实验三由卜文俊、石雪芹老师编写,实验四由于昕老师编写,实验五、实验六由刘燕强、刘巍老师编写,实验七由江莎、沈广爽老师编写,实验八由陈磊老师编写,实验九、实验十一由赵念席老师编写,实验十由朱晔荣老师编写,实验十二由白艳玲老师编写,实验十三、实验十四由门淑珍老师编写,实验十五由吴卫辉老师编写,实验十六由吴震州老师编写,实验十八由宋文芹、王宏刚老师编写,实验十九由陈成彬老师编写,实验二十、实验二十一由王宏刚、宋文芹、陈成彬老师编写,实验二十二由李登文老师编写,实验二十三、实验二十四由王春国老师编写,实验二十五由赵立青老师编写,实验二十六由赵立青、陈容容老师编写,实验二十七由周浩老师编写,实验二十八由朱正茂老师编写,实验二十九由张金红、邓飞、赵玉红老师编写,实验三十由安军老师编写。

本书的出版得到南开大学实验教学中心和南开大学教务处的经费资助,在此表示衷心的感谢。

本书编写力求严谨、准确,但鉴于我们的水平有限,难免会有不当之处,恳请同行和读者批评指正。

编 者

2016 年 10 月于南开园

目 录

前言

实验一	小鼠的形态与结构	1
实验二	小鼠重要脏器石蜡切片和苏木精-伊红染色与观察	6
实验三	昆虫标本的采集、制作与分类鉴定	12
实验四	应用蜻蜓成虫对天津市区水环境进行生物监测与评价	18
实验五	小鼠学习记忆能力及其影响因素的观测	20
实验六	膜片钳实验四种记录模式的建立和神经细胞通道电流的记录	24
实验七	植物石蜡切片的制作	28
实验八	植物群落的物种多样性分析	32
实验九	干旱胁迫对羊草生理生化性状的影响研究	35
实验十	不同光周期处理对浮萍淀粉积累的影响	42
实验十一	植物硝酸还原酶活性的测定	45
实验十二	叶绿体分离与体外转化	50
实验十三	拟南芥突变体表型分析及基因型鉴定	55
实验十四	在烟草叶片中瞬时表达研究蛋白质的亚细胞定位	61
实验十五	病原菌毒力因子的调控及细胞毒性测试	65
实验十六	乳酸链球菌产乳链菌素 Nisin 的定量检测	70
实验十七	人、小鼠、鸡和两栖类动物外周血细胞形态与结构的比较性研究	75
实验十八	细胞凋亡检测	77
实验十九	不同药物处理后对肿瘤细胞生长活力的影响	81
实验二十	电击诱导动物细胞融合技术	85
实验二十一	间接免疫荧光技术观察细胞中的内质网	88
实验二十二	利用免疫荧光标记技术研究细胞有丝分裂	91
实验二十三	理化诱变处理对哺乳动物细胞微管骨架的影响	96
实验二十四	肿瘤细胞染色体组蛋白(H3K4)双甲基化修饰的免疫荧光检测	98
实验二十五	小鼠肺组织切片 <i>Galectin-1</i> 基因表达的免疫组织化学检测	102
实验二十六	二维电泳检测热休克处理对细菌蛋白表达谱的影响	106
实验二十七	用 AKTA prime plus 蛋白质层析系统纯化绿色荧光蛋白(GFP)	113

实验二十八 竞争性等位基因特异性 PCR 检测单核苷酸多态性	120
实验二十九 高压液相色谱法在食品安全、农药残留等分析中的应用	126
实验三十 静电纺丝纤维膜的制备及其细胞亲和性评价.....	130

实验一 小鼠的形态与结构

一、实验目的与要求

1. 学习对小鼠的抓取与保定方法。
2. 学习小鼠的外部形态与内部结构。

二、实验原理与技术应用

小鼠属于脊索动物门脊椎动物亚门哺乳纲啮齿目鼠科。由于小鼠体形小、饲养管理方便、易于控制、生产繁殖快、有规范的质量控制标准,已拥有大量的近交系、突变系和封闭群,在各种实验研究中,用量最大、用途最多。小鼠是生物科学和医学基础研究常用的实验动物,对小鼠的形态与结构的认识是相关科学研究的基础。小鼠的品系很多,科研研究目的不同,所选的小鼠品系不一样。

三、主要仪器设备

鼠笼、解剖器械、大头针、解剖盘、烧杯、棉花、棉线手套、乳胶手套。

四、实验动物与试剂

实验动物:小鼠

试剂:碘酒、75%乙醇

五、实验方法与操作步骤

(一) 小鼠的外部形态

外部形态观察:分为头、颈、躯干、四肢和尾5部分。

头:小鼠的面部长形,嘴脸前部有长长的触须;眼有上、下眼睑;一对耳,耳廓大而薄;鼻孔1对,鼻孔下方为口。

颈:颈部明显,活动自如。

躯干:躯干长而背面弯曲;腹面末端有外生殖器和肛门;成熟雌鼠乳腺发达,胸部和腹部有较明显的乳头。

四肢:前肢肘部向后弯曲,具5指;后肢膝盖向前弯曲,具5趾;指(趾)端具爪。

尾:尾长约与体长相等,有平衡、散热和自卫功能。

健康小鼠一般应体型正常,背部不弓起,体肌丰满,运动快速、活泼有力;反应敏捷,食欲旺盛;被毛浓密有光泽,呼吸正常,孔腔无分泌物。

（二）小鼠的抓取

抓取与保定小鼠时应该避免被小鼠咬伤或抓伤,也不能伤害小鼠,影响实验。抓取时使小鼠头部不能转动,抓取部位不能离头部太远,太远小鼠就能够回头,容易伤人。抓取时,要对动物温和,如果动物受到惊吓,立即放回笼内,换一只抓,几分钟之后,动物就会熟悉。

用一只手提起小鼠的尾巴,放在鼠笼不锈钢丝笼盖上,小鼠作势向前爬行,略微提起小鼠的尾部,使两后肢不能用力。另一只手拇指与食指抓住两耳之后头颈部的皮肤,将小鼠拎起,翻过来使其腹面向上,小指和无名指将小鼠的尾根部勾住,轻抓小鼠尾巴。

（三）小鼠雌雄的鉴别

成年的雄鼠和雌鼠比较容易鉴别。雄鼠有明显外露的阴囊和睾丸,雌鼠腹部有明显的乳头。外生殖器与肛门之间距离的长短也可以作为鉴别特征。同龄的幼鼠,二者之间距离长的是雄性,距离短的是雌性;有明显生殖突起的是雄性,没有的是雌性;雄性生殖开口呈圆柱状,雌性生殖开口呈劈裂状。学习鉴别方法应该先观察成年鼠的性别特征,然后再观察和测量幼鼠。

（四）小鼠的处死

通常处死小鼠应该尽量减轻小鼠的疼痛感,使其死前不能有痛感和恐惧感。处死动物应该以最轻的疼痛和最短的时间使动物失去知觉和痛觉的方法来处理。可以使用 60% 二氧化碳和氧气混合气体、氮气、一氧化碳等气体吸入后死亡;也可以使用巴比妥盐类静脉注射使之深度沉睡死亡;也可以先麻醉,然后放血使其死亡;或者先麻醉,之后用颈椎脱臼法使之死亡。根据实验取材不同,选择不同的处死方法。颈椎脱臼法比较常用,把小鼠置桌面上,一只手用拇指和食指捏住小鼠头的后部(颅骨基部),稍用力下压;另一只手抓鼠尾,稍用力向后上方拉,两手同时用力,即可使小鼠颈椎脱臼,瞬时死亡。

（五）小鼠的内部解剖

将处死的小鼠放在 75% 乙醇消毒液里浸泡几分钟之后取出,放在解剖盘上,腹面向上,展开四肢,用大头针固定脚掌。沿腹中线剪开皮肤,前至下颌底、后至外生殖器前缘;剥离皮肤后,将剥开的皮肤向外侧展开固定。

沿腹中线剪开腹壁肌肉至剑状软骨,沿膈肌边缘剪开体壁肌肉,将腹部肌肉展开固定。观察完膈肌后,沿边缘剪开膈肌,再沿胸骨两侧剪断肋骨,移除胸骨。

在剪断第 1 肋骨的胸肋段时,注意避免伤及心脏底部发出的血管。分离颈部

的气管与其背面食管之间的结缔组织至胸腔。

1. 消化系统

口腔:剪开口角颊部皮肤,剪断下颌骨与头骨的关节,打开口腔。口腔底有肌肉质舌,上、下颌各有 2 个门齿和 6 个臼齿,无犬齿和前臼齿,门齿尖利。

消化腺:包括唾液腺、肝脏和胰脏。唾液腺中颌下腺 1 对,较大,近圆形,粉色,位于颌部腹面;1 对较小的舌小腺,位于颌下腺的外侧上方;1 对腮腺,位于耳的基部,似脂肪。肝脏在腹腔内,位于膈肌正后方,分为中央叶、左叶、右叶和尾叶。左、右肝叶之间是梨形胆囊。**胰脏**位于胃与十二指肠弯曲处,粉红色。

消化管:食管位于气管背面,后行穿过横膈肌与胃相连。胃呈弯曲袋状,可分为灰白色半透明状的贲门部和不透明的幽门部。小肠分为十二指肠、空肠和回肠。十二指肠紧接胃,其后为颜色偏红的空肠和内容物较多的回肠。大肠分为盲肠、结肠和直肠,盲肠是一个短的盲管,位于回肠和结肠之间。结肠较粗,直肠进入盆腔,开口于肛门。

2. 循环系统

心脏位于胸腔内的膈肌之前,略呈倒圆锥形。心脏的上半部被胸腺覆盖,胸腺是小鼠的免疫器官,幼鼠的胸腺粉红色,成年小鼠的胸腺偏白色。移去胸腺后,用眼科镊子和眼科剪子剪开心包膜,可见分界清晰的两个心房和两个心室,左心室的肌肉壁最厚。仔细分离与心脏相连的大血管周围结缔组织,观察心脏及与心脏相连的大血管。从体动脉弓向左后方弯转的弓形处向前发出 3 支动脉,自右向左分别为无名动脉、左总颈动脉和左锁骨下动脉。无名动脉向前延伸不久即分成两支,即右总颈动脉和右锁骨下动脉。

3. 呼吸系统

在颈部可以观察到有软骨环支撑的气管。将心脏翻向前方,可观察气管后行进入胸腔后分为左、右支气管,分别通入两肺。左、右肺分别位于胸腔两侧,淡红色,海绵状,其中左肺 1 叶,右肺 4 叶。

4. 排泄系统

在腹腔背壁,左、右两侧各有 1 个肾脏,右肾比左肾的位置略高,肾上方有淡黄色的肾上腺。肾包裹于肾脂肪囊内,剥离肾门附近的脂肪组织,观察由肾门发出的输尿管,输尿管下行通入膀胱,膀胱开口于尿道。

剪开耻骨联合,剥离结缔组织,观察雌性尿道开口于阴道前庭,雄性尿道通入阴茎,开口于体外,兼有输精功能。

5. 生殖系统

(1) 雄性生殖器官

睾丸:1 对,椭圆形,位于下腹部的阴囊内。用小镊子夹住精索,将睾丸、附睾等从阴囊内拉出,观察睾丸、附睾、输精管等结构。

附睾 1 对,分为附睾头、附睾体和附睾尾,附睾头紧附于睾丸上后缘,附睾体沿睾丸外缘下行,尾部延伸与输精管相接。附睾内的管道是弯曲的,输精管较直。

输精管:1 对,开口于尿道。

阴茎:为交配器官,顶端开口为尿道口。

副性腺:将小鼠的耻骨剪开,暴露出尿道的背面,观察副性腺,包括精囊腺(精囊)、凝固腺、前列腺和尿道球腺等。

精囊腺(精囊):1 对,乳白色,位于尿道前端,在膀胱和输精管通入尿道处的背后开口于尿道。

凝固腺:附着在精囊腺内侧的半透明腺体。

前列腺:位于精囊腺的后部、尿道的前端,分多叶,稍带红色,其通入尿道的开口不明显。

尿道球腺:1 对,近白色椭球形腺体,位于尿道较下部,嵌在尾基部的尾椎和腹部肌肉之间,将该处肌肉撕开即可见。

包皮腺:1 对,扁圆形,位于阴茎基部两侧的包皮下,剪开阴茎包皮观察。

(2) 雌性生殖器官

卵巢:1 对,位于腹腔背壁两侧肾后方。

输卵管:1 对,盘绕紧密,包围着卵巢。

子宫和阴道:输卵管后端膨大部分为子宫,左右子宫各以子宫颈连通阴道,阴道开口于体外。

在阴道口的腹面稍前方有一隆起,为阴蒂。

6. 免疫器官

胸腺:位于小鼠胸骨后,心脏前上方。幼鼠的胸腺分 2 叶,淡红色,覆盖在心脏的上半方,成年鼠的胸腺颜色比较淡,类似脂肪。

脾脏:将胃拨到右侧,在其左侧可以见到红褐色长椭圆形的脾。

7. 中枢神经系统

剥除头部皮肤和肌肉,用金冠剪从鼻腔位置开始。小鼠的头骨骨片较薄,剪时要小心。移除小鼠头部骨片后,用解剖针在脑的四周轻轻剥离,使脑与头骨基部分离。切断脑下方的脑神经,取出脑,放入清水中,以免干燥。

(1) 脑的背面观(由前向后观察)

嗅叶:1 对,位于大脑之前端。

大脑半球:占全脑的大部分。两大脑半球之间有一纵裂,在纵裂深处有白色连合组织称为胼胝体,将两半球连接在一起。在纵裂的后端可看到由间脑发出的松果体。

中脑:将大脑和小脑相接处用镊子轻轻掀开,可见中脑,包含 4 个球状隆起,即四叠体。

小脑:位于中脑后丘之后,在脑桥和延髓背侧,分为中间的小脑蚓部和两侧的小脑半球。

延脑:脑的最后部分,背侧有一明显的菱形沟窝。与脊髓相连,将小脑稍提起,即可见延脑背部的后脉络丛。

(2) 脑的腹面观

梨状叶:大脑腹面向外扩大的突起被称为梨状叶。

视神经交叉:位于间脑腹面,为一对粗大的神经。

脑下垂体:视神经交叉后,为一圆形突起。

大脑脚:脑下垂体的后方,中脑的腹面。

脑桥:位于小脑腹面隆起的部分。

(3) 脑的正中矢状面观

沿着脑的背中线作纵切,可观察到以下结构:

胼胝体:两大脑半球的连接处。

侧脑室:由胼胝体处向内陷入的空腔即为侧脑室。

第三脑室:也是间脑室,为前连合之后的一个狭窄的腔。

大脑导水管:为已被切开中脑中间的空隙,沟通第三与第四脑室。

小脑:由切面上可看到小脑灰质中有白质深入,树枝状,构成小脑髓树。

第四脑室:为延脑中的空隙,上面覆盖着后脉络丛。

六、思考题

1. 总结小鼠的解剖特点。
2. 总结小鼠的哪些方面能够代表哺乳动物的进步性特征?

参 考 文 献

- 黄诗笺,卢欣. 2001. 动物生物学实验指导. 北京:高等教育出版社.
- 刘凌云,郑光美. 2009. 普通动物学实验指导. 北京:高等教育出版社.
- 南开大学实验动物解剖学编写组. 1980. 实验动物解剖学. 北京:人民教育出版社.

实验二 小鼠重要脏器石蜡切片 和苏木精-伊红染色与观察

一、实验目的与要求

1. 学习与掌握小鼠重要脏器的石蜡切片和苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色技术。
2. 初步了解小鼠重要脏器的光学显微镜下结构。

二、实验原理与技术应用

石蜡切片技术是组织学、发育生物学研究的主要实验方法,同时也是病理组织学观察器官和组织病理变化的最常用实验手段,该技术被广泛地应用于临床病理诊断、教学和科研工作中。动、植物标本的形态学观察、免疫组化、原位杂交及原位PCR等技术手段,都离不开对标本组织的处理和石蜡切片的制作。随着新的仪器和新的研究技术的不断问世及使用,石蜡切片与其他新的技术方法相结合,使传统的老技术扩大了应用范围,开辟了许多新领域,增加了许多新的观察和研究内容;使组织学的观察研究从简单的形态结构深入到各种成分的定性观察,又从定性转向定量计测,将细胞组织的形态、功能及代谢相结合,从而达到定性可靠、定位准确及定量可测,使我们能很好地了解细微层面上生命变化的基本规律。

石蜡切片-HE染色技术是发育生物学、细胞学、组织学和病理组织学应用最为广泛的核心技术,具有较强的实验性和经验性。

常规石蜡切片的制作过程包括实验设计、石蜡组织块制作、切片和染色。具体的制作过程是:取材→固定→冲洗→脱水→透明→浸蜡→包埋→切片→贴片→烤片→染色→封固。

该实验经过下述操作步骤,即实验设计、取材、固定、脱水与包埋、切片、HE染色和封片等步骤,制备出永久保存的切片。借用光学显微镜,观察者对切片的镜下结构进行观察与分析,并做出这是什么器官或组织、该器官或组织是否有病理改变的诊断。

下面简述具体各步骤的实验原理。

固定:其目的是尽可能保持活体器官与组织的固有形态结构与位置。具体操作是将器官或组织置于特定固定液中。固定液可迅速凝固或沉淀细胞和组织中的各种成分、终止细胞的一切代谢过程并防止细胞或组织自溶等变化;固定剂还能使组织硬化,这有利于切片的进行;固定剂也有一定的媒染作用,有利于组织着色。

固定剂的种类有多种,应根据不同的组织和实验目的来选择。最常用的固定剂是10%中性福尔马林(即4%甲醛 PBS 液)和4%多聚甲醛 PBS 液。

脱水:因为大部分透明剂是苯类,而苯类和石蜡又均不与水融合,如不除去器官和组织内水分就无法进行随后的透明、浸蜡与包埋。水分若不脱尽,则苯类不能浸入。乙醇为常用脱水剂,它既能与水相混合,又能与透明剂相混合。为了减少器官和组织的急剧收缩,请按照从低浓度到高浓度,即脱水剂浓度递增的顺序对器官和组织进行脱水。

透明:因为无水乙醇不能与石蜡相溶,因此多用能与乙醇和石蜡都相溶的媒浸液,如二甲苯,替换出组织内的乙醇。二甲苯是最常用的脱水剂。

浸蜡:这是将经过脱水、透明后的器官和/或组织置入石蜡中,使组织变硬而利于切片的过程。一般要经过3次浸蜡过程。本实验室最常用蜡的熔点是58~60℃。

包埋:借用特定的包埋模具,将透明后的器官或组织置入液状石蜡中做成具有一定几何形状的蜡块即包埋。石蜡是组织切片技术中应用较为广泛的包埋剂。

切片:使用石蜡切片机切出4~6 μm 厚的蜡片,借用水浴展片机和烤片机将蜡片贴放于洁净的载玻片后进行烤片。

染色:组织或细胞的许多结构在自然状态下是无色或带有很淡的颜色。染色的目的是使组织或细胞的某一部分染上与其他部分不同深度的颜色或不同的颜色,使组织或细胞内各部分的构造可被清楚地显示出来,产生不同的折射率,以便利用光学显微镜进行观察与研究。

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin)染色法,简称 HE 染色法,是石蜡切片技术里最常用的染色法之一。苏木精液是带有阳离子的染料,所配制的苏木精染液呈碱性,核内染色质及胞质内核糖体等物质对这类染料具有高亲和性,这些结构被染成蓝色或紫蓝色,故称这些结构具有嗜碱性。而伊红液是带阴离子的染料,所配制的伊红染液呈酸性,细胞质、膜成分及细胞外成分对这类染料具有高亲和性,这些结构被染成粉红色,故称这些结构具有嗜酸性。而对碱性染料和酸性染料亲和力都比较弱的物质或结构被称为具有中性。染色液的 pH 可以影响切片的染色反应。

石蜡切片技术和 HE 染色技术在组织胚胎学、病理组织学与各学科的形态学研究中是最核心和最基础的光学制片及染色技术。在此基础上进行的普通细胞和组织化学技术、免疫组织化学技术与原位杂交技术等,在各种病理模型制备、新药开发、器官重构、抗癌机理研究、病原体致病与耐药机制探究和各种疫苗的开发等许多研究过程中都发挥重要作用。

经上述步骤,制备出的切片能永久保存,借用光学显微镜,观察者可以对切片的镜下结构进行观察与分析,并做出该器官是何种器官、是否有病理改变的诊断。

有关小鼠各重要脏器的光学显微镜下的结构特点,建议同学们参考有关的理论书籍。

三、主要仪器设备

1. Leica ASP 200S 全自动石蜡脱水机
2. Leica EG 1150 H+C 石蜡包埋机
3. Leica RM 2235 石蜡切片机
4. Leica 水浴展片机
5. Leica 烤片机
6. 60℃烘箱
7. HE 染色系列等

四、实验动物、试剂与耗材

1. B6 小鼠若干只
2. 麻醉剂:7.5%水合氯醛、20%乌拉坦和乙醚等
3. 固定剂:10% 中性福尔马林液(即 4%甲醛 PBS 液, pH 7.2~7.4)、4%多聚甲醛 PBS 液(pH 7.2~7.4)
4. pH 7.2~7.4 的 PBS 液
5. 切片下行脱蜡与水化系列
6. 包埋剂:石蜡
7. 苏木精染液
8. 0.5%盐酸乙醇分色液(用 70%乙醇配制)
9. 0.5%氨水返蓝液
10. 水溶性伊红染液
11. 切片上行乙醇脱水系列
12. 封片剂:液态中性树胶
13. 载玻片、盖玻片、染色缸、染色架、小毛刷和铅笔等。

五、实验方法与操作步骤

1. 取材

处死动物的方法可依据取材器官的不同而有所不同,如静脉放血、颈髓横断、腹腔注射麻醉剂和麻醉剂吸入等。较常用的麻醉方法是腹腔注射麻醉剂,如 7.5%水合氯醛腹腔注射麻醉,25g 小鼠用量 200 μ L。

麻醉指征:小鼠呼吸变浅、慢,有心跳,小鼠痛觉消失(用镊子夹捏小鼠肢体末端无痛感)。也可用颈髓横断的方法处死小鼠。

迅速解剖以取得制片用的相应器官和组织,如小鼠乳腺、心脏、肝脏、脾脏和肾脏等。

2. 固定

固定分为前固定和后固定。

(1) 前固定:多用 10% 的中性福尔马林,或用 4% 多聚甲醛 PBS 液固定 4~6h,4℃ 冰箱保存。所取器官和/或组织与固定液体积比是 1:10。请注意,动物器官或组织不能紧贴固定用瓶的瓶壁。

也可在动物被麻醉致死前,采用左心室体循环灌流方式进行前固定,即先用肝素抗凝的 15~20mL 的 PBS 液(pH 7.2~7.4)预灌流,随后再用 15~20mL 的 4% 多聚甲醛 PBS 液灌流。

(2) 后固定:前固定后,更换新固定液,继续固定 12h。

固定完成后,用 PBS 缓冲液洗两次,每次 0.5h,最好使用摇床振荡加以洗涤。随后对实验器官进行修块,最短边不大于 3mm。

3. 脱水与透明

应用自动脱水机完成此步骤。

4. 包埋

提前打开包埋机,预热包埋模具和石蜡。将实验器官和组织置于特定模具内,使其最大面贴于模具底面且位居正中放入包埋用蜡,确定器官和组织位置后,置于冰台上凝固。

5. 切片、展片、捞片和烤片

使用石蜡切片机等设备完成切片、展片、捞片和烤片。切片厚度 5 μ m。

6. 脱蜡水化过程

将切片依次放入下述溶液:二甲苯 1,15min;二甲苯 2,15min;100%乙醇 1,15min;100%乙醇 2,10min;95%乙醇,10min;80%乙醇,5min;70%乙醇,5min;37℃ 水洗切片 5min,不可用水流直面切片组织,以免冲掉切片;蒸馏水常温或 37℃ 水浴 2~5min。

7. HE 染色

浸切片于苏木精液中染色 2min,随后 37℃ 流水冲洗以达到分色至无蓝色的目的(镜检标准:深蓝色,胞质无色);或应用盐酸乙醇分化和氨水返蓝的方法。随后浸切片于 2% 伊红水溶液 4min;37℃ 水冲洗 3~5min 至冲后的水无色(镜检时胞质呈粉红色为佳)。

请注意,染色时间和分色程度与季节(室温)的不同、染色液已被使用的时间长短和所染切片数量的多少等有关,请灵活掌握。

8. 脱水、透明和封片

浸入液体:70%乙醇,10s;85%乙醇,10s;95%乙醇,10s;100%乙醇 1,10s;100%乙醇 2,3min;100%乙醇 3,3min;二甲苯 1,5min;二甲苯 2,5min;最后两步要求二甲苯液中严格无水。

封片时,保证切片未干,以防组织卷曲。选择大小适宜的盖玻片,使组织周围有 2mm 空白被覆盖。滴适量中性树胶于载玻片器官上,封片初始时盖玻片平面与载玻片平面呈 30° ,自下至上轻轻盖上盖玻片,应避免产生气泡。

9. 镜下观察有关脏器结构

学生可以根据自己的兴趣对所制备的小鼠脏器进行制片和观察,如淋巴结、乳腺、肝脏和脑等器官。制备好的切片染色效果请参考下面的图 2-1 和图 2-2。

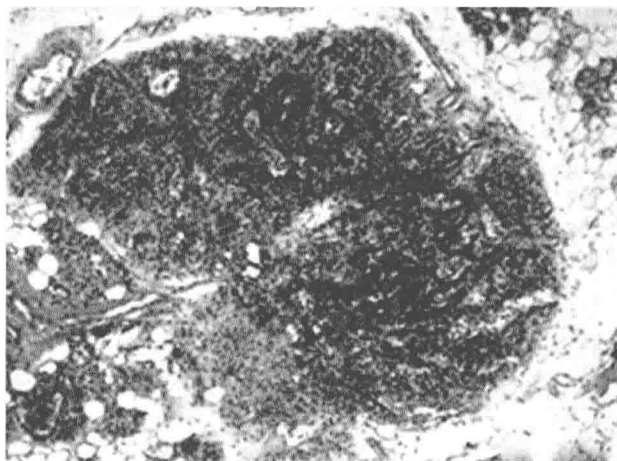


图 2-1 小鼠淋巴结 HE 染色(100×)

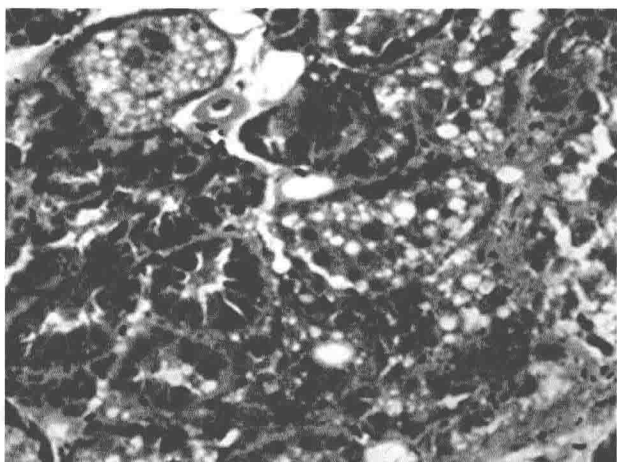


图 2-2 小鼠乳腺泌乳期第 21 天的 HE 染色(400×)

六、思考题

1. 处死动物的常用方法有哪些？如何根据取材部位和实验目的的不同决定处死动物的方法？
2. 最常用的固定剂包括哪些？如何决定所使用固定剂的种类？
3. HE 染色的染色原理是什么？
4. 健康小鼠乳腺、淋巴结、肝脏和大脑等器官的光学显微镜下结构是怎样的？

参考文献

- 侯春春,徐水. 2009. 浅析影响石蜡切片质量的关键因素. 中国农学通报, 25(23): 94-98.
- 倪灿荣,马大烈,戴益民. 2006. 免疫组织化学技术及应用. 北京:化学工业出版社.
- 芮菊生,杜懋琴,陈海明. 1980. 组织切片技术. 北京:人民教育出版社.
- 郑伟. 2006. 苏木精染液中媒染剂用量的探讨. 解剖学杂志, 29(1): 21-29.
- Avwioro G. 2011. Histochemical uses of haematoxylin-A review. JPCS, 1: 24-34.
- Ovalle WK, Nahirney PC. 2014. Netter's Essential Histology: with Student Consult Access, 2e. Saunders Elsevier.