

医学生物学 技术与原理

TECHNIQUES AND
PRINCIPLES
OF MEDICAL
BIOLOGY

主编 郭云良 谭兰 陈燕



中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS

医学生物学技术与原理

TECHNIQUES AND PRINCIPLES
OF MEDICAL BIOLOGY

主编 郭云良 谭 兰 陈 燕

中国海洋大学出版社
· 青岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

医学生物学技术与原理/郭云良,谭兰,陈燕主编.
青岛:中国海洋大学出版社,2009.6
ISBN 978-7-81125-330-6
I. 医… II. ①郭…②谭…③陈… III. 医学:生物学
IV. R318
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 087435 号

出版发行 中国海洋大学出版社
社 址 青岛市香港东路 23 号
网 址 <http://www.ouc-press.com>
电子信箱 book@ouc.edu.cn
订购电话 0532—82032573(传真)
责任编辑 冯冠铭
印 制 日照报业印刷有限公司
版 次 2009 年 6 月第 1 版
印 次 2009 年 6 月第 1 次印刷
成品尺寸 185 mm×260 mm
印 张 22
字 数 505 千字
定 价 40.00 元

邮政编码 266071

电 话 0532—85902469

编 委 会

主 编	郭云良	谭 兰	陈 燕	
副主编	孙妍萍	宋敬卉	张爱莉	郭恒照
编 委	(按姓氏拼音为序)			
	杜 芳	金丽英	李 琴	李 震
	刘广义	刘天蔚	谭金山	王 涛
	王进荣	徐新颖	杨学伟	张 睿

前 言

当今世界,科学技术的发展日新月异。生物科学是新世纪科学发展的前沿领域之一,同时也进入了空前繁荣的时期,21世纪将是生物科学的世纪。

由于人体结构和机能的复杂性,许多疾病的病因和发病机制至今尚不十分明了,在预防和治疗方面也缺乏行之有效的措施。随着分子生物学和基因工程等高新技术的发展,以及膜片钳、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪等先进仪器的出现,给医学生物学研究插上了腾飞的翅膀。相信在不远的将来,许多严重危害人类健康的重大疾病有望得到征服。

青岛大学医学院脑血管病研究所长期从事神经病学的基础和临床研究,在医学生物学实验技术方面积累了较为丰富的技术资料和工作经验。特别是2001年山东省脑病防治重点实验室对外开放以来,越来越多的研究生和科研工作者申请来本实验室开展工作。为了使广大来实验室工作的研究人员能够迅速了解本实验室的基本情况,掌握有关实验技术和方法,顺利完成科研工作,我们组织有关人员,参考国内外有关资料,编写了《医学生物学实验技术》讲义,供有关研究人员参考使用。我们本着理论联系实际、边实践边修改的原则,经过近几年的试用、反复修订,最后成书,作为我校研究生的试用教材。

本书首先简要介绍了常用的经典医学实验技术、医学动物实验技术和细胞培养技术,然后分别介绍了免疫组织化学技术、分子杂交技术、聚合酶链反应技术、基因重组和基因治疗技术、干细胞技术、显微切割技术,以及电子显微镜技术、激光扫描共聚焦显微镜技术、流式细胞技术、膜片钳技术、高效液相色谱技术等。本书内容由浅入深、注重实践、实用性强,可满足医学生物学等相关专业研究生开展科研工作的需要,也可供相关专业研究人员参考使用。

本书除编写人员外,同时吸收了部分研究生的建设性意见,在此表示感谢。

在编写过程中,青岛大学医学院及附属医院的有关领导给予了大力支持,在此表示衷心感谢。

由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,恳请读者指正。

编 者

2009年3月

目 次

第一章 经典实验技术	(1)
第一节 解剖学技术.....	(1)
第二节 生理学技术.....	(3)
第三节 病理学技术.....	(5)
第四节 生物化学技术	(11)
第五节 免疫学技术	(13)
第二章 动物实验技术	(17)
第一节 实验动物	(17)
第二节 动物模型	(19)
第三节 动物的给药途径	(28)
第四节 动物的生命体征	(30)
第五节 动物的标本采集	(30)
第三章 细胞培养技术	(33)
第一节 细胞培养的基础知识	(33)
第二节 细胞培养的基本条件	(38)
第三节 培养用液	(41)
第四节 清洗与消毒	(47)
第五节 细胞培养的基本技术	(49)
第六节 培养细胞的冻存复苏	(58)
第七节 培养细胞的性状检测	(60)
第四章 免疫组织化学技术	(64)
第一节 免疫组织化学理论基础	(64)
第二节 免疫荧光组织化学技术	(67)
第三节 免疫酶标组织化学技术	(71)
第四节 亲和免疫组织化学技术	(77)
第五节 免疫金银及铁标记技术	(82)
第六节 免疫组化双重标记技术	(87)
第七节 自身抗体免疫检测技术	(97)
第八节 病原体免疫检测技术	(99)
第五章 分子杂交技术	(101)
第一节 分子杂交基础知识.....	(101)

第二节	核酸分子杂交技术	(103)
第三节	Southern 和 Northern Blot 技术	(112)
第四节	原位核酸分子杂交技术	(120)
第五节	FISH 和 PRINS 技术	(130)
第六节	原位末端标记技术	(133)
第七节	基因芯片技术	(135)
第六章	聚合酶链反应技术	(142)
第一节	PCR 模板的制备	(142)
第二节	PCR 基本原理和技术	(150)
第三节	原位免疫 PCR 技术	(157)
第四节	逆转录 PCR 技术	(162)
第五节	定量 PCR 技术	(166)
第六节	特殊 PCR 技术	(169)
第七节	基因测序技术	(173)
第七章	基因重组技术	(177)
第一节	基本程序	(177)
第二节	常用工具酶	(179)
第三节	常用载体	(189)
第四节	体外重组	(194)
第五节	基因表达	(203)
第六节	纯化与鉴定	(206)
第七节	Western Blot 技术	(209)
第八章	基因治疗技术	(216)
第一节	基因治疗的基本策略	(216)
第二节	基因治疗的基本方法	(218)
第三节	基因治疗的临床应用	(221)
第四节	基因治疗的有关问题	(223)
第五节	核糖核酸干扰技术	(224)
第九章	干细胞技术	(229)
第一节	干细胞概述	(229)
第二节	胚胎干细胞	(233)
第三节	成体干细胞	(239)
第四节	神经干细胞	(243)
第十章	显微切割技术	(252)
第一节	显微切割技术概述	(252)
第二节	显微切割技术的应用	(254)

第三节	染色体显微切割技术·····	(256)
第四节	显微切割技术的进展·····	(260)
第十一章	电子显微镜技术·····	(261)
第一节	透射电子显微镜技术·····	(261)
第二节	扫描电子显微镜技术·····	(271)
第三节	电镜组织化学技术·····	(274)
第四节	电镜免疫细胞化学技术·····	(277)
第五节	电镜原位杂交技术·····	(284)
第六节	电镜放射自显影技术·····	(288)
第七节	电镜 X 线显微分析技术 ·····	(290)
第十二章	激光扫描共聚焦显微镜技术·····	(291)
第一节	LSCM 的基本原理 ·····	(291)
第二节	LSCM 的标本处理 ·····	(293)
第三节	LSCM 的主要功能 ·····	(294)
第四节	LSCM 的生物学应用 ·····	(297)
第五节	LSCM 常用荧光染色 ·····	(300)
第十三章	流式细胞术·····	(303)
第一节	基本原理·····	(303)
第二节	单细胞悬液的制备·····	(304)
第三节	细胞的荧光标记·····	(306)
第四节	流式细胞术数据分析·····	(310)
第五节	细胞凋亡的检测·····	(312)
第十四章	膜片钳技术·····	(315)
第一节	基本原理·····	(315)
第二节	膜片钳记录模式·····	(316)
第三节	全细胞膜片钳记录·····	(318)
第四节	穿孔膜片钳记录·····	(323)
第五节	脑薄片膜片钳记录·····	(324)
第十五章	高效液相色谱技术·····	(327)
第一节	高效液相色谱仪·····	(327)
第二节	高效液相色谱的固定相·····	(329)
第三节	高效液相色谱的流动相·····	(331)
第四节	高效液相色谱分析·····	(335)
第五节	高效液相色谱技术应用·····	(338)
主要参考文献 ·····		(340)

第一章 经典实验技术

尽管现代医学生物学研究技术的发展日新月异,但经典的实验技术仍然是不可缺少的,依然是医学生物学研究最基本的方法。

第一节 解剖学技术

迄今为止,解剖学研究早已超出了以大体形态为中心的范畴,但解剖学技术直接关系到所提供的标本和资料的系统性、完整性和可靠性。因此,必须重视有关解剖学技术。

一、大体解剖学技术

1. 标本收集:大体标本主要来自尸体和手术采集的活体组织标本。

2. 取材:标本越新鲜越好,要尽可能除去多余的组织。标本切面要保持平整,及时放入固定液或冷冻保存。不要将标本长时间暴露在空气中,以防水分丢失。

(1)实质性器官:固定液不易穿透实质性器官(如肝、脾等),通常用锋利的长刀沿器官长轴均匀地切成若干片(1~2 cm),将欲显示的切面朝上,平整地放于固定液中保存。若要保留整个脏器,需经血管灌注后,再放入盛有固定液的容器中保存。

(2)中空性器官:先把中空性器官(如胃、肠等)浆膜面的多余脂肪剪掉,然后将器官剪开使黏膜面向上,按其自然形状用大头针沿周边固定于木板上,将黏膜面向下悬浮于固定液中,6 h后去掉大头针,以防生锈。为保持器官的原形,可填充适量脱脂棉后再固定。

(3)骨组织标本:如只观察整骨的结构,可将骨的周围组织去除,锯一整齐的剖面进行固定。对骨肿瘤标本要注意,由于骨组织坚硬,肿瘤组织较致密,固定时间要适当延长,一般2~3周,体积较大的骨肿瘤标本,要固定4~5周。

3. 固定:甲醛(formaldehyde)是甲醛气饱和于水中的甲醛溶液。大体标本通常用10%的甲醛溶液(福尔马林)固定。甲醛固定液渗透力强、固定均匀、对组织收缩性小,主要起防腐和硬化作用,简便可靠,可以对标本进行长期保存。但甲醛对血色素有破坏作用,故经甲醛固定的标本失去了原有的颜色。

4. 染色:大体标本通常不需染色,但为了突出显示某些重要部分,可以对经甲醛固定的标本,流水冲洗12 h后,进行特殊染色。常用的染色方法有:

(1)脂肪组织:主要用于心、肝、肾脂肪变性,动脉硬化等标本染色。通常用0.1%苏丹Ⅲ溶液染色30 min,70%乙醇分化至脂肪组织呈橙红色为止,水洗后置于5%甲醛溶液保存。

(2)类淀粉样物质:通常用1%刚果红水溶液染色2 h,碳酸钾饱和水溶液浸泡2 min,再用80%乙醇分化,至类淀粉样物质呈红色为止,蒸馏水洗涤后置于5%甲醛溶液保存。

(3)含铁血黄素:通常用 Perls 染液(5%亚铁氰化钾和 10%盐酸水溶液各 100 mL 混合)染 5~10 min,至标本出现蓝色为止,流水冲洗数小时,置于 5%甲醛溶液中保存。

(4)脑灰质 Mainlund 染色:先用 10% FeCl_2 溶液(滴加盐酸使溶液呈淡黄色)染 1~2 min,流水冲洗 1~2 h。然后置于 1%铁氰化钾溶液中,至灰质呈蓝色为止,流水冲洗 1~2 min,1%盐酸处理 1~2 min,流水冲洗 12~24 h,置于 10%甲醛溶液中保存。

(5)脑白质:标本流水冲洗后,置于油红 O 染液(油红 O 10 g 和苯 640 mL)3~5 min,不断翻动标本至白质呈均匀红色为止,流水冲洗 12~24 h,用滤纸吸干表面水分,涂一层 1%明胶水溶液,待明胶干后置于 10%甲醛溶液中保存。

5. 原色标本:为了保留甲醛固定标本的原有颜色,可用特殊染色法处理。通常有凯氏(Kaiseling)法、柯氏(Klotz)法和一氧化碳法。现以 Kaiseling 法为例介绍:

(1)固定液:浓甲醛 200 mL,硝酸钾 30 g,醋酸钾 30 g,加 H_2O 至 1 000 mL。

(2)回色液:95%乙醇 1 000 mL。

(3)保存液:甘油 200 mL,醋酸钾 100 g,麝香草酚 2.5 g,加 H_2O 至 1 000 mL。

(4)染色:标本取材后在固定液固定 3~7 d,流水冲洗 12~24 h,再浸泡于回色液 1~3 h,待恢复至原色为止,用纱布吸干表面液体(切忌水洗),直接浸泡于保存液中保存。

6. 其他:如透明标本、灌注标本、铸型标本、塑化标本,各有不同的用途。

二、微体解剖学技术

微体解剖学系相对于大体解剖学而言,指生物体微观结构的解剖学,主要包括细胞学、组织学和胚胎学。详见本章第三节。

三、断层解剖学技术

随着影像学技术的发展,断层解剖标本显得越来越重要。断层解剖学是通过制作不同方向各种断面的方法,研究人体形态和结构的科学。由于它能在保持机体结构于原位的情况下,准确地展示结构的断面形态、位置和毗邻关系,还可利用连续断面进行追踪观察,或借助计算机进行定量分析和三维重建,重塑人体外部形态和内部结构的空间配布,因而已成为人体解剖学的重要组成部分。近年来,国内报道了“可视人”,将人体从头到足水平横切,间隔 0.1 mm,逐层拍照,然后通过计算机三维重建技术,建立立体的“可视”模拟人体结构,这对医学事业的发展具有巨大的推动作用。

1. 标本选择:正常人体断层解剖学研究,所选尸体的材料要尽可能新鲜,排除疾病和畸形。记录标本的来源、性别、年龄、身高、肢长、胸围、臀围等项目。其中年龄十分重要,儿童和青少年的许多器官尚未发育完善,老年则发生生理和结构的老化,均能影响断面结构的观察和分析。因此,从事该方面研究时,要进行性别和年龄分组。

2. 标本处理:将已选好的尸体标本按正常解剖体位放置,进行灌注。常用灌注液配方:10%~30%乙醇、10%福尔马林和 10%~20%甘油水溶液。根据不同实验的要求,可经股动脉、肱动脉或颈总动脉进行灌注,灌注液用量 10~15 L。灌注后将尸体移入相应的容器保存,注意避免尸体受压而变形。保存液用 5%福尔马林,固定 2~3 个月为宜。

3. 断层切面:按照解剖学(冠状面、矢状面、水平面)或实验要求的切面,在标本上划出基线,以此基线分别向上下、左右或前后方向等距离划线,冷冻后按上述划线断层锯切。

常用工具有马丁尺、角尺和直尺。划线方法有墨线或烫线,墨线以墨汁和棉线作为划线工具,烫线以拉直的电炉丝和可调变压器通电的方法进行烫线。

4. 冷冻锯切:冷冻的目的是使不同硬度的组织达到硬度均匀,便于锯切。锯切可用钢锯、木工锯、圆盘锯和带锯等。带锯具有速度快、锯路损耗小、使用范围广、断面质量高、操作稳定、安全准确等优点。现有木工带锯(锯耗 1~1.5 mm)和钻石线锯(锯耗 0.2~0.3 mm)两种,钻石线锯可用于切割生物塑化薄层断面标本,但价格较贵。

5. 冲洗修整:初锯切下的断层标本仍处于冷冻状态,表面附有锯屑,需流水冲洗解冻,洗去表面锯屑和血管内凝块。用细水流冲洗,以防细小结构漂流遗失。为防止断面结构在冲洗时离散和移位,最好将标本置于玻璃或塑料板上冲洗。用带锯锯切的标本,断面光滑平整,一般不需要刨工修整。当皮肤边缘有毛刺时,应加以修洁,使其美观整齐。对于断面内易于脱落的结构应仔细检查,按原位固定好,微小碎块可用明胶黏附固定。

6. 保存切片:将冲洗修整的标本置于有坐标的有机玻璃板上,左上角放标本编号,背侧置一标尺,高度与断面等高(目的是在照相放大或缩小后仍能掌握原标本的尺寸),调整好焦距后拍照,按要求装订成册,编号存档。拍照后的断层标本,用间隔玻璃片或有机玻璃片夹持固定,按顺序放入容器内。保存液含 20%~30%乙醇、1%樟脑(防霉)、5%福尔马林。对于较新鲜的断层标本,要洗净血迹后放入保存液内,而且酒精浓度不宜过高,否则容易导致标本变色和皱缩变形。新鲜标本最好先用流水冲洗,再用福尔马林固定,待标本定形后移入保存液内。断面标本若用作陈列标本,可用有机玻璃瓶或普通玻璃瓶封装,保存液在前述基础上,加入少量 10%甘油或 10%醋酸钾。

第二节 生理学技术

生理学技术的范围非常广泛,涉及各个系统的研究领域,本节主要简述与神经病学研究关系密切的几种常用的生理技术。

一、行为测试

动物和人类各有自己的行为活动习性,当发生疾病或人为造成疾病模型后,其原有习性将发生改变或发生一定程度的功能缺陷,通过量化可评定其行为功能。应用有关治疗措施干预后,可能使动物的习性恢复正常或功能缺陷得以改善。通过治疗前后的量化评分和统计分析,即可判断治疗措施的疗效。人类的行为功能和疾病的临床症状和体征,对疾病的诊断和预后判断极为重要。人类的高级智能活动是动物无可比拟的,因此,人类的行为功能和疾病的表现比动物要复杂的多,而且受个体自我意识的影响,给疾病的诊断带来很大的困难。所以,应正确评价人类的行为功能和症状体征的价值。目前临床上许多疾病都建立了评分标准,对疾病诊断、病情判断、疗效评价等,发挥了不可低估的作用,如神经行为功能缺损评分、Hachinski 缺血积分(HIS)和长谷川痴呆量表(HDS)等。

二、脑血流量测定

脑血流量(cerebral blood flow, CBF)系指单位时间内流经每 100 g 脑组织的血液流

量,以 $\text{mL}/100\text{ g} \cdot \text{min}$ 表示。单位时间内流经整个脑的血液流量称为全脑血流量,以 mL/min 表示。单位时间内流经局部脑组织的血液流量称为局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF),以 $\text{mL}/100\text{ g} \cdot \text{min}$ 表示。局部脑血流量随脑的血管分布和功能以及检查方法的不同而有所差异,Kety 和 Schmidt 应用一氧化二氮(N_2O)法测定的正常值为 $54 \sim 65\text{ mL}/100\text{ g} \cdot \text{min}$,Helmon 等以 ^{133}Xe 颈动脉注入法测定的正常值为 $43.3 \sim 60.21\text{ mL}/100\text{ g} \cdot \text{min}$ 。除直接应用核素方法测定脑血流量外,还有应用脑血流通过的时间、脑阻抗血流图和血液流变学等间接测量法。本节介绍几种有实用意义的、能被临床接受的测定方法。

1. 脑阻抗图(REG):国内常用电桥式阻抗血流图仪、双极或四极直接式脑阻抗血流图仪,通过脑阻抗的改变间接地反映脑血流量情况。生物体内血液和组织液的阻抗最小,导电率最高,血供的多少可以增加或减少阻抗,因此,头部血流量的改变直接表现在阻抗图的变化。但是,应用脑阻抗图反映脑血流量的改变,而不代表脑血流量。现已知道,REG 也部分地(30%)反映了颅外血管的变化,REG 的改变受环境、 PCO_2 以及情绪改变的影响。因此,REG 反映的值重复性差,不能真正地反映脑血流量。

2. 血液流变学间接法:根据 Hagen-Poiseuille 定律可推算脑血流量。

$$Q = \Delta p \pi r^4 / 8L\eta$$

其中, Q 为血流量, Δp 为压力梯度, r 为血管半径, L 为血管长度, η 为全血黏度。由于式中除 η 外,各因素在同一个体相对恒定,所以脑血流量与 η 成反比。当测定出红细胞压积(Hct)和纤维蛋白原浓度(C_f ,单位 mg/mL)之后,即可推算出脑血流量:

$$CBF = 103 - 40(C_f) - Hct$$

3. ^{133}Xe 吸入法:脑血流量测定的理想条件是机体没有损伤,既能测定全脑血流量又能测定局部血流量,重复性好,方法简便等。 ^{133}Xe 吸入法基本具备以上条件,它不需要颈内动脉穿刺,同时可以测定两侧半球的全脑血流量,能记录局部脑血流量,在数小时、数天内乃至数周内均可重复测定,而且计算方便、精确度高。 ^{133}Xe 吸入法的具体操作方法为,持续吸入 $5\text{ mCi}/\text{L}$ 的 ^{133}Xe 与空气的混合气体 1 min 后,记录大脑半球两侧的 ^{133}Xe 清除曲线,然后以二维彩色灰质血流量分布图,计算出局部脑血流量。

三、视觉诱发电位

大脑皮层自发的电位活动称为脑波,当给身体某种刺激引起大脑电位活动的改变,由头皮引导出的与该刺激有锁时(time-locked)关系的电位变化,称脑诱发电位(evoked potential, EP)。由感觉刺激(如光、声音、触觉等刺激)引起大脑某个部位表现出电变化,称为感觉性诱发电位,主要包括躯体感觉诱发电位(体感诱发电位)、视觉诱发电位、听觉诱发电位和运动诱发电位。视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)系指经视网膜给予视觉刺激时,在两侧后头部记录到的由视觉通路产生的电位活动。

1. 刺激方法:通常采用电视屏上显示的黑白棋盘方格图形,以一定速率相互交替转换构成有效刺激,称为翻转刺激法,诱发出的电位称为图形翻转视觉诱发电位(PRVEP)。对不合作者及昏迷病人可用护目镜(goggles)式刺激器进行刺激。

2. 记录技术:记录电极置于 $10/20$ 系统法的 O_1 , O_2 及枕外粗隆上 2 cm 左右各旁开 5

cm 处,参考电极置于 Fz。叠加 200 次,分析时间 300 ms,放大器带通滤波 1~100 Hz。

由于视网膜接受刺激后,神经冲动向两侧枕叶皮层投射,所以,视觉诱发电位往往左右对称,在枕叶最大。引导时,单极导出法的接受电极通常置于 10/20 系统的 O_1 、 O_2 部位,无关电极置于耳部或乳突。双极导出法可依据需要进行放置,如可用 C_3-C_2 、 C_4-C_2 等。导出电极与前置放大器连接,进行平均加算后,经示波器显示、照相或用 X-Y 记录仪记录。视觉诱发电位的波幅和潜伏期受闪光能量的影响较大。

3. 正常波形:正常 VEP 是一组复合多相电位波,由 N_{75} 、 P_{100} 和 N_{145} 等组成,其中 P_{100} 出现最稳定,是 VEP 正常与否的可靠指标,其源于视觉皮质 17 区(图 1-1)。

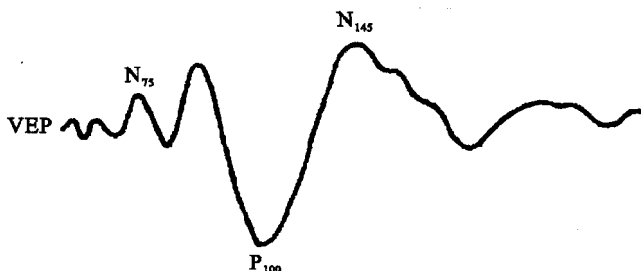


图 1-1 正常 PRVEP(示大正波 P_{100})示意图

4. 分析内容:主要测量波峰潜伏期及两侧波幅差。 P_{100} 波峰潜伏期延长,提示视觉传导路功能减退,两侧波幅差大于 $6 \mu V$, P_{100} 峰潜伏期差大于 8 ms 均为异常。

5. 临床应用:VEP 在神经系统疾病中主要用于视觉通路疾病定位,一侧视神经损害时,全视野、半视野刺激均显示异常,而刺激健侧时正常;视交叉部位病变,两颞侧半视野刺激时 VEP 异常;视束及枕叶病变,对侧同向半侧视野刺激时 VEP 异常。

第三节 病理学技术

在病理学研究工作中,制作高质量的组织切片是关键性的一步,切片的质量直接影响着病理诊断结果的准确性和可靠性,而一张好的组织切片与相应标本的采集和处理等过程有着密切的关系。

一、标本采集

具体工作中,不可能将所有组织都做成切片。为达到正确诊断的目的,不仅要求标本材料要尽可能新鲜,而且要有一定的数量和质量,根据需要确定取材的部位和数量。

1. 一般标本:组织块厚以 0.5 cm 为宜,也可根据情况略作调整。若过厚则固定不好,组织结构不佳,过薄则切片张数有限,有漏掉病变部位的可能性。一般来讲,常规组织染色的组织块以 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 为宜;用于免疫组织化学染色的组织块以 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 为好;用于电镜观察的组织块要小,以 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 为宜。

2. 冷冻切片:标本取材后立即用液氮速冻或包埋剂包埋后, -70°C 或 -40°C 保存。

3. 活检组织:组织量少,应根据需要分别进行固定保存。
4. 细胞标本:可通过印片法、穿刺法、沉淀法和活检法制备。

二、固定

1. 固定的目的:首先是把细胞可动的流体状态转变成不动的、稳固的胶体状态,而且这种胶体要在各方面尽可能地接近于生活时的有机状态;其次是防止在以后的制备切片过程中丢失或增加任何成分,并使其结构在电镜下有较好的反差。动物死后血液循环停止,细胞逐渐死亡,出现自溶现象,因而欲固定的组织越新鲜越好。固定剂可以防止组织自溶及腐败,并能沉淀或凝固组织内的蛋白质、脂肪、糖和酶等各种成分,使细胞结构保持相仿的生活状态。固定剂也有硬化作用,可增加组织的硬度,防止组织变形。

2. 常用固定剂:通常采用化学试剂即固定剂进行固定,固定剂能与细胞内的大分子物质,主要是蛋白质发生交联,使蛋白成分得以凝固,但固定过程可能对组织结构产生影响。所以,理想的固定剂应该能迅速、均匀地渗透到组织结构内部;稳定细胞各种结构成分,使之后处理过程中不致溶解和丢失;对细胞结构没有损伤,以保证电镜图像的真实性,并能增强图像的反差。固定时间的长短因组织块的大小和固定液的性质不同而异。对组织硬化作用较强的固定液,固定时间不宜过长,以免组织过硬,影响切片质量。

目前,实验研究最常用的固定液是4%多聚甲醛磷酸缓冲液,适用于光镜免疫组化法。通常先用此固定液对动物进行灌注固定,取材后再用该液浸泡后固定2~4 h。在固定液中加入5%蔗糖后,可用于组织标本的长期保存。多聚甲醛40 g + 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)1 000 mL,加热至60℃,边搅拌边加温至透明,滴加1 mol/L的NaOH调整pH值为7.3。

其他固定液可根据具体需要而选择,如重铬酸钾、苦味酸、升汞、醋酸、铬酸、钨酸、丙酮、三氯醋酸、乙醇,以及混合固定液。

3. 常用固定方法

(1)浸泡固定法:简单方便,适用于一些能在短时间停止血供仍能保持其功能和结构完整的器官或组织,是最常用的固定方法。为了达到组织固定效果良好,组织块不宜太大,厚度不宜超过0.5 cm;选择固定液时要考虑对组织的穿透力,同时也要考虑对组织收缩和膨胀的作用。固定液用量通常为组织块的30倍以上,固定时间不宜超过24 h。

(2)灌注固定法:一些取材比较复杂或对缺氧比较敏感的器官或组织,一般采用血管灌注固定。用于免疫组织化学实验的标本,通常采用灌注固定,以充分除去组织中的血液成分,避免其对染色的影响。灌注固定后的标本一般要放入后固定液继续固定2~4 h。

(3)涂片固定法:有浸入法和滴加法。用浸入法时,可将新鲜而湿润的涂片直接浸入固定液内。用滴加法时,将固定液滴在平放的玻片上,待自然挥发干燥即可。

(4)微波固定法:应用时应严格控制温度,否则会影响组织固定的质量。由于各器官的组织结构差别很大,因此固定的时间和温度也各不相同。

(5)蒸气固定法:要固定组织中的可溶性物质,一般选用蒸气固定法;较小而薄的标本,也可用钨酸或甲醛蒸气固定。

(6)双重固定法:采用两种固定剂固定,固定时间较单一固定法要适当缩短,一般戊二醛固定15~30 min,四氧化钨固定15~40 min。

三、脱水和透明

1. 光镜切片:脱水即是将固定后的组织内水份脱掉,透明是将组织在浸蜡之前,在苯类物质中呈现出透明现象,透明的好坏直接影响浸蜡的效果。常规脱水剂为乙醇,常规透明剂为二甲苯,其折射指数为 1.50。组织脱水和透明的时间应根据组织块的大小而定,在透明过程中可随时观察,直至使组织完全透明为止。对于 $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm} \times (0.2 \sim 0.3)\text{ cm}$ 的组织块,一般常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明的时间如下:

80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇 I、95%乙醇 II、100%乙醇 I、100%乙醇 II,依次各 2~4 h。如果将乙醇在温箱中加温,可适当缩短脱水的时间。

二甲苯 I、二甲苯 II 依次透明,各 15~30 min。

2. 脱钙:骨、牙及其他含钙组织在充分固定后,应进行脱钙处理,才能进行以后的制片过程。脱钙组织的厚度不宜超过 4 mm。脱钙方法有多种,主要有:

(1)硝酸脱钙:硝酸(加少量尿素)10 g 和 10%甲醛 90 mL 混合液,脱钙 2~3 d。

(2)盐酸脱钙:盐酸 8.5 mL,甲酸 5 mL,氯化铝 7 g, H_2O 100 mL,脱钙 2~3 d。

(3)EDTA 脱钙:乙二胺四乙酸(EDTA)10 g,溶解于 PBS 或 Tris(pH 值为 6.8~7.0)缓冲液 100 mL 中,每 4 d 换液 1 次,需脱钙数周。

3. 电镜切片:用于电镜观察的生物标本在包埋之前必须彻底脱水。目前常用的脱水剂有乙醇、丙酮和环氧丙烷(详见第十一章)。

四、浸蜡和包埋

1. 石蜡包埋:

(1)常规石蜡(paraffin)包埋:将组织从透明剂中取出,投入熔蜡箱中的软蜡(熔点 $52^\circ\text{C} \sim 54^\circ\text{C}$),然后入硬蜡(熔点 $56^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$)浸蜡。组织块不能在熔化的蜡中停留时间过长,温度不能超过 65°C 。石蜡充分浸入组织块之后,即可进行包埋。若组织块较小,在包埋铸块盒(或自制简易纸盒)内面涂少许甘油,然后徐徐倒入石蜡,用小镊子夹住组织块迅速放入石蜡中。拿组织块时,不能停留在空气中时间过长,以免组织块表面的石蜡凝固,造成组织块与包埋石蜡不能融合。包埋好的蜡块,修整后常温或 4°C 保存。

(2)快速石蜡包埋:从固定到浸蜡全过程都需加温,10~15 min 即可完成。

(3)碳蜡(carbowax)包埋:即聚乙烯二醇(polyethylene, PEG),为水溶性蜡。

2. 火棉胶包埋:火棉胶(celloidin)常用于大块组织的包埋(如眼球和脑),避免纤维组织和肌组织过度硬化,减少纤维组织的收缩和扭转,利于保持原有的组织结构。但切片较厚、相对费时、价格较贵。包埋好的组织块可放入 70%乙醇保存。

3. 明胶包埋:组织块在 5%, 10%, 20%~25%明胶酚水溶液内, 37°C 各浸 24 h。切取明胶组织块,稍干燥后入 10%甲醛溶液硬化 24 h 即可,也可长期保存于此甲醛溶液内。

4. 环氧树脂包埋:目前电镜超薄切片普遍使用的是环氧树脂(详见第十一章)。

五、切片和贴片

组织学技术利用染料使组织着色,显微镜下观察组织的微细结构,所观察的标本必须能透过自然可见光。所以,必须将不透光的大组织块首先切成可透光的薄片。

1. 石蜡切片

(1)玻片准备:新购置的玻片要用肥皂水充分清洗,泡酸 24 h,然后流水冲洗,再用蒸馏水清洗,置于温箱中烤干或自然晾干后备用。贴片前将黏片剂(一般用多聚赖氨酸)均匀涂于玻片的一端(磨砂片的光滑端),放入温箱烤干后备用。

(2)切片刀准备:切片前应先将切片刀磨好。在低倍显微镜下观察,刀刃如呈一条光滑的直线,说明刀刃锋利;如呈锯齿状,说明刀刃不锋利,需重新磨刀。

(3)切片和贴片:将切片机调试到最佳工作状态。预先修好的组织块先在冰箱中冷却,而后装在切片机固定装置上。将切片刀装在刀架上,刀刃与蜡块表面呈 5° 夹角。调整蜡块与刀至适合的位置,并移动刀架或蜡块固定装置,使蜡块与刀刃接触。

切片时多使用轮转式切片机,左手执毛笔,右手旋转切片机转轮。切片厚度 $5\sim 15\ \mu\text{m}$,通常为 $7\ \mu\text{m}$,切出蜡片后,用毛笔轻轻托起,正面向上放入展片箱(展片温度根据石蜡熔点进行调整,一般低于蜡熔点 $10^\circ\text{C}\sim 20^\circ\text{C}$),切片展平后,分片、捞片。捞起切片后立即编号,空气中略微干燥后即可烤片,一般 60°C 烤箱(或烤片机)内烤 30 min 即可。

2. 冷冻切片

(1)恒温冷冻箱切片:用于冷冻切片的组织取材后可直接进行切片,也可置于羧甲基纤维素包埋后用液氮冷藏备用。调节恒温冷冻箱切片机温度降至 -25°C 左右,打开观察窗,将组织固着器放置到速冻台上,先放置少量羧甲基纤维素,待冻结后将组织块放上,并在其周围加适量包埋剂,将组织块包埋。组织冷冻后,将组织固着器装在切片机上,调整组织的切面与刀刃平行并贴近刀刃,将切片厚度($10\sim 30\ \mu\text{m}$)调至适当位置后,关闭观察窗。初步修出组织切面后,放下抗卷板开始切片,切片用载玻片黏附后,吹干或固定,保存备用。冷冻切片省略了石蜡切片过程中的组织脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤,避免了上述过程造成的组织成分的丢失和破坏,因此,更适用于免疫组化染色等微量活性物质的检测。

(2)明胶冷冻切片:多用于冷冻切片易碎的组织,特别是某些有树枝状突起的组织,可避免易碎组织切片入水后分散、丢失和间隙较多的组织移位而失去固有位置关系。

3. 火棉胶切片:使用滑动式切片机。切片刀与滑行轨道的角度 $20^\circ\sim 40^\circ$ 为宜,清除角(刀与胶块平面的夹角)为 $4^\circ\sim 6^\circ$,切片厚度 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 。连续切片时,不要立即贴片,应先放在 $70\%\sim 80\%$ 乙醇中,做好顺序标记,剩余的胶块也保存在 $70\%\sim 80\%$ 乙醇中。

4. 振动切片:用振动切片机可把新鲜组织(不固定,不冷冻)切成 $20\sim 100\ \mu\text{m}$ 厚的切片。可用漂染法在反应板上进行免疫组化染色,检出免疫阳性部位。组织经修整后,再进行后固定,按照电镜样品的要求脱水、包埋、超薄切片和染色观察。

5. 超薄切片:一般厚度为 $10\sim 100\ \text{nm}$ 的切片称超薄切片,用于透射电镜观察,制作过程与石蜡切片原则上基本相同,而且更为细致、复杂,要求严格(详见第十一章)。

六、组织学染色

细胞及亚细胞结构变化是最直观和最可靠的观察指标。未经染色的标本不能直接在显微镜下观察,必须根据标本中不同成分的理化性质,选择相应的染料染色,增加不同结构之间的反差,从而提高分辨率。本节只介绍两种有代表性的经典染色方法。

(一)苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色(Hematoxylin-Eosin, HE)是根据细胞内成分的化学性质不同,对

不同染料着色不同的原理,通过染色和着色深浅而区分不同的细胞结构。苏木精习惯上称嗜碱性染料,实际上不是染料,只有经过氧化后才成为酸性染料苏木红,苏木红和铝结合形成一种带正电荷的、呈碱性的蓝色色精。染色时带有负电荷的脱氧核糖核酸与蓝色色精靠极性吸附使核酸着色。伊红属嗜酸性染料,对蛋白质等酸性物质着色。因此,在HE染色切片上,细胞核呈紫蓝色,细胞质呈红色。此外,钙盐和各种微生物也可染成蓝色。迄今为止,HE染色仍然是一种最经典的、不可代替的常规组织学染色技术。

1. 苏木精染液:苏木精有许多配方,各有特点,常用的主要有以下两种。

(1)Ehrlich 苏木精染液:染色作用持久、稳定,但配制后1~2个月后才能使用。

配方:苏木精6g,无水乙醇300mL,双蒸水300mL,甘油300mL,冰醋酸30mL,钾矾过量。先将苏木精溶解于无水乙醇内,依次加入上述试剂,不断摇晃,直至瓶底出现钾矾结晶沉淀为止。置于室温下1~2个月,使苏木精氧化成苏木红,用时过滤。

(2)Harris 苏木精染液:使用氧化汞促进苏木精氧化为苏木红,配后即可应用。

配方:苏木精1g,无水乙醇10mL,钾矾20g,氧化汞0.5g,双蒸水200mL。苏木精溶解于无水乙醇内,钾矾加热溶解于蒸馏水中,将两液混合后加热煮沸,加入氧化汞再加热直至染液变成深色,冷却过滤备用。用前加入冰醋酸8mL,可使染色细致,并能选择性的染细胞核。

储存的苏木精染液表面有一层发亮氧化膜,此膜消失意味着苏木精染液失效。

2. 伊红染液

(1)酸化伊红染液:伊红0.5g,乙醇100mL,冰醋酸1~2滴,溶解后4℃储存备用。

(2)水溶性伊红染液:伊红Y0.5g,蒸馏水100mL,溶解后4℃储存备用。

3. 实验方法

石蜡切片分脱蜡、水化、染色、脱水、透明、封片几步,冷冻切片无需脱蜡,染色步骤较为简单。具体步骤如下:

(1)二甲苯Ⅰ脱蜡10min,二甲苯Ⅱ脱蜡5min。

(2)100%乙醇Ⅰ洗去二甲苯1min,100%乙醇Ⅱ洗去二甲苯1min。

(3)95%乙醇Ⅰ水化1min,95%乙醇Ⅱ水化1min。

(4)90%乙醇水化1min,85%乙醇水化1min。

(5)自来水洗2min;苏木精染色1~5min。

(6)自来水洗1min;1%盐酸乙醇分色20s。

(7)自来水洗1min;1%稀氨水返蓝30s。

(8)自来水洗或蒸馏水洗1min;伊红染色20s~5min。

(9)自来水洗30s;85%乙醇脱水20s,90%乙醇脱水30s。

(10)95%Ⅰ乙醇脱水1min,95%Ⅱ乙醇脱水1min。

(11)100%乙醇Ⅰ脱水2min,100%乙醇Ⅱ脱水2min。

(12)二甲苯Ⅰ透明2min,二甲苯Ⅱ透明2min。

(13)中性树胶或加拿大树胶封片。

4. 结果判断:光镜下观察,细胞核呈蓝色,细胞浆、肌肉、结缔组织、红细胞和嗜伊红颗粒等结构呈不同程度的红色。钙盐和各种微生物也可染成蓝色或紫蓝色。