

組織学技术实验指导

A. 布劳尔 著

人民教育出版社

组织学技术实验指导

王 昭 等 编

人民教育出版社

組織学技术实验指导

A. 布劳尔 著

張 叔 江 譯

人民教育出版社

本书系根据美国波盖斯出版公司(Burgess Publishing Company)出版的美国肯塔基大学动物系教授A. 布劳尔(Alfred Brauer)编写的“组织学技术实验指导”(Laboratory Directions for Histological Technique)1955年修订本译出的。

本书所叙述的实验法,主要是组织学技术实验的最基本的方法,内容比较全面,书末附有组织学实验室常用的化学品、试剂和染料以及切片制作过程简图。

本书可供综合大学和师范学院生物系组织学技术实验参考之用。

组织学技术实验指导

A. 布劳尔 著

张叔江 译

人民教育出版社出版 高等学校教材编辑
北京宣武门内承恩寺7号

(北京市书刊出版业营业许可出字第2号)

人民教育印刷厂印装 新华书店发行

统一书号 13010·782 开本 850×1168 $\frac{1}{32}$ 印张 $2\frac{1}{10}$ 插页 1
字数 47,000 印数 0001—4,500 定价(8) 半0.34
1960年5月第1版 1960年5月北京第1次印刷

目 录

I. 緒言.....	1
II. 材料、設備、仪器.....	1
III. 参考书籍.....	2
IV. 进行制作組織学切片的过程.....	2
V. 固定.....	3
固定的目的	
固定液	
VI. 冲洗.....	8
VII. 脫水.....	10
酒精.....	10
二氧六圓(脫水与透入).....	11
n-丁醇(脫水与透入).....	12
VIII. 透明.....	13
IX. 透入.....	14
X. 包埋.....	15
石蜡法.....	15
对用石蜡包埋法的建議.....	16
火棉胶法.....	17
XI. 切片.....	17
石蜡法.....	17
石蜡法的优缺点.....	18
火棉胶法.....	20
火棉胶法的优缺点.....	20
火棉胶-石蜡組合法.....	20
冰冻法.....	21
XII. 粘附切片于載玻片上.....	22
石蜡切片.....	22
注意事項.....	23
冰冻切片.....	24
火棉胶切片.....	24
火棉胶-石蜡切片.....	25

III. 清洁载玻片	25
IV. 染色与封藏(洋苏木素-伊红)	26
石蜡切片	26
冰冻切片的染色与封藏	28
将数载玻片同时染色的方法	28
火棉胶切片	29
多数切片同时染色的方法	30
V. 生物学染剂	30
欧利希氏酸性洋苏木素 (Ehrlich's acid haematoxylin)	30
曼氏洋苏木精 (Mann's hematein)	31
德勒菲氏洋苏木素 (Deiafield's hemataxylin)	31
海登汉氏铁洋苏木素 (Heidenhain's iron-hematoxylin)	32
伊红 Y	33
橘黄 G	33
伊红-次甲蓝	34
VI. 透明与透明剂	34
苯胺油	35
石炭酸	35
木馏油(山毛榉木)	35
玉树油	36
倍格真油	36
丁香油	36
香柏油	36
俄立干油	36
二甲苯	37
昆和舍氏混和透明液 (Kornhauser's clearing mixture)	37
VII. 整装片	37
蜡虫封藏法	38
VIII. 涂片技术	39
IX. 特殊技术	42
硬骨	42
结缔组织	43
麦洛利氏三色染色法	43
麦洛利氏结缔组织染色法	43
昆和舍氏四色染色法	45
神经组织	46
曼-柯契氏法 (Mann-Kopsch method)	46
次甲蓝法	47

胚胎.....	48
肝淀粉.....	49
脑垂体区别染色法.....	50
细胞质的细胞学技术.....	51
线粒体.....	51
洋苏木素-天青Ⅱ-伊红.....	53
IX. 切片机与切片刀.....	54
化学品、用剂、染剂.....	55
插表: 切片制作过程简图	

I. 緒言

本书内所写的实验指导及实验方法主要为数年来给我们动物学 101a 课学生的讲稿及油印讲义。为了使学生在工作结束时有一方法手册，要求他们交来笔记或实验方法提要。

这样作法实行了很多年，曾经做了许多修改、更换与增加。后来就在实验工作开始前发给学生油印讲义，其中概括地指出一些方法，给一些一般性的指示。这些提要和指示发展成现在的实验指导。

原来，只有动物学、生理学、细菌学和医预科的学生修读此课，但近十年来由于医科技术班的学生亦修读这门课而人数增加。由于学生来源的变更，编写此实验指导时将有关昆虫学及寄生虫学的技术尽量减少，而增加了组织学的技术。

II. 材料、设备、仪器

每一学生分配一个有锁的备有如下设备的桌子：

染色瓶、装有药品的药品瓶、装有树胶的滴管瓶、装有蛋白的滴管瓶、烧杯、漏斗、微火灯、切片镚、标本瓶、切片盘、滤纸、擦镜纸。

擦载玻片与盖玻片用的无毛手巾、擦染色瓶及桌子用的干净的布、解剖刀、剪刀、二根解剖针、滴管、尺、毛笔、载玻片与盖玻片。

除了备有锁的桌子内的设备外实验室还供应石蜡、干燥炉、切片机与切片刀、为特殊目的用的玻璃器皿、天平、冰箱。

在需要时供应额外的玻璃器皿与药品。损坏物件须赔偿。

III. 参考书

- Beck, R. C. Laboratory Manual of Hematologic Technic. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Conn, H. J. Handbook of Biological Stains. W. F. Humphrey Press, Inc., Geneva, N. Y.
- Galigher, A. E. The Essentials of Practical Microtechnique. Albert E. Galigher, Inc., Berkeley Calif.
- Guyer, M. F. Animal Micrology. University of Chicago Press.
- Kingsbury, F. F. and Johannsen, O. A. Histological Technique. John Wiley & Sons, New York.
- Krajian, Aram A. Histological Technic. C. V. Mosby Co., St. Louis.
- Lee, A. B. The Microtome's Vade-Mecum. P. Blakiston's Son & Co., Philadelphia.
- Mallory, F. B. and Wright, J. H. Pathological Technique. W. B. Saunders & Co., Philadelphia.
- Mann, Gustav. Physiological Histology. Oxford, Clarendon Press.
- McClung, C. E. Handbook of Microscopical Technique, P. B. Hoeber, Inc., New York.

IV. 进行制作組織学切片的过程

从动物体中取出組織→固定→冲洗(在各种固定液中取出后)→脫水(在逐漸增加濃度的酒精中)→透明→透入(用包埋基)→包埋→切片→粘附切片于載玻片上→复水→染色与复染→脫水→透

明→封藏。

如整体封藏的生物体当不需切片时，此过程可大大地縮短。
其过程如下：

固定→冲洗(如需要)→整体染色→分化或退染→脫水→透明
→封藏。

V. 固定

将新鮮材料制备作为在显微镜下观察的第一步驟即为固定。这一步驟对制备整装片^①或切片^②都极为重要。因为固定能起下列作用：

- 1) 可很快停止代謝作用。
- 2) 可預防从生物体取出后而引起的消退性变化。
- 3) 可保持标本的細胞学上和組織学上的結構。
- 4) 可保持标本的实际形态。
- 5) 可使軟組織硬化或堅韌，一般此現象系由于原生質或原生質形成物的凝固而引起。

6) 对組織分析性染色起媒染剂的作用。这样使形成光学上的分析力成为可能。能满足上列基本要求者即为良好的固定剂。不幸的是理想固定剂很难获得，因为不同組織及其組成部分彼此在物理組成和化学組成上有很大的差异。适合于保存某种物質的用剂往往会使另一种物質溶化或对一种組成部分能起媒染作用的染剂而对另一組成部分的染色起阻撓作用。

① 整装片系指将生物体或其某个部分全部封藏以供完整的研究用。例如小的动物、卵、精子、胚胎或其他类似的材料。

② 切片系指将生物体切成极薄的薄片，然后染色、封藏以供显微镜下观察用。例如器官与組織的薄片。

单纯的理想用剂是不存在的。例如：醋酸可满足透性与光学分析力的要求。它也可固定核质。但另一面它有使组织膨胀的倾向与溶化或破坏细胞质的组成部分。重铬酸钾透性很差，对核质会不充分地硬化并且保存力也较差。它能充分地保存细胞质的组成部分与作为它们的优良媒染剂。当这二药品用适当的比例混合，则所成的溶液在某种程度上可具有两者各自的优良特性并增加了铬酸物的透性。

将单纯的药品加以组合，即可得到几乎合于理想的为一般用与为特殊目的用的固定液。下列即为常用的标准固定液，这些固定液的作用已为人所尽知。

穆勒氏液(Muller's Fluid)

重铬酸钾	2.5 克
硫酸钠	1.0 克
蒸馏水	100 毫升

这是目前少用的一种古老的标准用剂。透性极差。不能固定细胞核。目前主要用作为某些染色法中与某些染剂的特殊媒染剂。使用说明：将小块材料在此液中固定 10 天至 2 周，每天至少更换溶液一次。固定后需将材料洗净。

俄氏液(Orth's Fluid)

重铬酸钾	2.5 克
硫酸钠	1.0 克
蒸馏水	90 毫升
福尔马林(商业用)	10 毫升

此液透性及硬化力均较穆勒氏液好，对神经组织与肾上腺作用良好。使用说明：将小块材料固定 3—10 天并经常以新鲜溶液更换。可按需要来冲洗材料。注：如将此溶液内的福尔马林用碳酸镁中和至 pH6.5，则此溶液为固定线粒体的良好固定液。

陈克氏液(Zenker's Fluid)

重铬酸钾	2.5 克
------	-------

氯化汞	5.0 克
硫酸鈉	1.0 克
蒸餾水	100 毫升

此液在使用时需加入 1 毫升冰醋酸或每 10 毫升儲存液中加 0.5 毫升冰醋酸。

此液为常用的最好的固定液之一。在各种染色过程前必需使用此液。使用說明：將小块材料固定数小时，但需注意固定的時間不能超过全部固定液透入所需的時間，否則极易过度固定。固定后必需冲洗材料。除用二氧六圓脫水外，在脫水时均需用碘酊来除去氯化汞。陈克氏液会溶化某些細胞質組成部分。例如：蛋白質体与綫粒体。

海里氏液(Helly's Fluid)

甲醛陈克氏液

在每 10 毫升陈克氏液中加入 1 毫升商业福尔馬林即成。

此液不会溶化蛋白質体，并不似陈克氏液那样容易过度固定。此液使用后必需冲洗。但由于此液所含福尔馬林的剂量在冲洗后会使得組織膨脹，故不能令人滿意。注：如此液中所用的福尔馬林已被弱碱（如碳酸鋰或碳酸鎂）中和則可作为固定綫粒体的固定液。

福尔馬林

福尔馬林(商业用)	10 毫升
蒸餾水	90 毫升

此液为普通的固定剂。在解剖学与动物学實驗室中用此液作为普通的防腐劑。材料可长久无損地保存在此液中。由于蟻酸具有自动氧化結果产生染色后所需的光学分析力。作为特殊媒染作用的材料在福尔馬林中儲存后可用陈克氏液或海里氏液再固定。注：在福尔馬林中儲存的組織，取出后絕不可冲洗，因冲洗会使組織由于膨脹而变形。

曼氏液(Mann's Fluid)

热水	100 毫升
氯化汞	2.5 克
苦味酸	1.0 克

冷却后将此液过滤。用时在每 100 毫升储存液中加 10—25 毫升商业用福尔马林。

此液为极优良的常用固定液。在此液中固定的组织可直接移入 50% 酒精中。

波恩氏液(Bouin's Fluid)

苦味酸(饱和水溶液)	75 毫升
福尔马林(商业用)	20 毫升
冰醋酸	5 毫升

在动物实验室中此液为标准的固定液。材料在此液中没有过度固定的危险。固定后,将材料直接移入 50%—70% 酒精中并在脱水过程进行前更换溶液^①数次。

艾倫氏溶液 B(Allen's Solution B)

新配制的波恩氏液 100 毫升加热至 38°C。在此液内加入与溶化下列用剂:

铬酸(結晶体)	1.5 克
尿素(結晶体)	2.0 克

此液能在体温中进行固定,故无疑为固定与显示哺乳纲及鸟纲的染色体的最好的固定液。此液亦可作为固定无脊椎动物的染色体的优良固定液,但在固定无脊椎动物过程中加热则无意义。

吉生氏液(Gilson's Fluid)

氯化汞(饱和溶液)	20 份
(每 10 克氯化汞加蒸馏水 100 毫升)	
1% 铬酸	20 份
硝酸	2 份
冰醋酸	2 份

① 指 50%—70% 酒精——譯者。

动物杀死后立刻将其浸入此液。此液不使組織皺縮，可推荐作为固定无脊椎动物所用。例如：扁虫、环节动物、圓虫及昆虫的幼虫均可用此液。

本斯萊氏 A. O. B (Bensley's A. O. B)

鐵酸(2%溶液)	2 毫升
重鉻酸鉀(2.5%溶液)	8 毫升
冰醋酸	1 滴

此液广泛地被推荐作为固定綫粒体的固定液。

雷格氏液 (Regaud's Fluid)

3% 重鉻酸鉀溶液	80 毫升
福尔馬林(商业用)	20 毫升

此液对細胞質的固定作用一般均良好。如将其中的福尔馬林中和至 pH6.5 則可用之于固定綫粒体。在此液中重鉻酸鉀有繼起的固定作用。

酒 精

对組織的固定作用，一般來說酒精是較差的固定剂。因为酒精为盐基，它不能很好地固定核結構并且会溶解細胞質。由于它的迅速脫水作用因而皺縮組織。酒精对某些特殊的工作有价值，如固定神經組織显示尼司耳氏体(Nissl's bodies)。

卡諾氏液 (Carnoy's Fluid)

无水酒精	60 毫升
氯仿	30 毫升
冰醋酸	10 毫升

將小块組織固定在此液中 30 分鐘至 $1\frac{1}{2}$ 小时。固定后，換入純氯仿中 30 分鐘，然后即可直接浸入已熔之石蜡中(石蜡应換三次)。將組織包埋入石蜡中。在此液中固定后不需脫水。

此法在作为一般組織学观察的快速石蜡切片法中尚可采用。如在切片过程中時間不为重要因素时最好不用此液，因此液会使組織起一定程度的皺縮現象。

酒精-福尔馬林-醋酸(A. F. A)

70%酒精	90 毫升
福尔馬林(商业用)	10 毫升
冰醋酸	2 毫升

此液广泛地在寄生虫技术中用于固定腸寄生虫。特別在整体裝片中更常用。此液固定后不需冲洗。如材料作整体染色則可經35%酒精而入水中。

VI. 冲洗

在水溶液用剂如重鉻酸鉀、氯化汞、鐵酸、鉻酸或穆勒氏液、陈克氏液、海里氏液、雷格氏液等中固定之后往往随后需进行冲洗。在媒染剂如重鉻酸鉀、鉀矾、鉍矾媒染后也常跟着进行冲洗。

在福尔馬林或含一定量福尔馬林的用剂如10%福尔馬林、波恩氏液、曼氏液、伊斯勒·艾倫氏液(Ezra Allen's solution)、或A. F. A后則絕不可冲洗。卡諾氏液后也不可冲洗。

冲洗可在流水中进行，水速至少每小时可将全容积的水更換者为佳；不可太快。

已固定的材料可用一层紗布包住，(最好附标签)然后进行有效的冲洗。此紗布包可悬挂在一个盘中，使水由盘底流入而由盘頂溢出。組織学實驗室应备有适当的冲洗盘或其他类似的器皿。如不能按上述的方法来冲洗則可将固定的材料用紗布包好悬挂于燒杯或普通玻璃中，使水緩緩流入底部并由頂部溢出亦可。如此，标本上洗出的物質将沉积于玻璃器皿的底部。

如固定的時間为数小时至一天，則整个冲洗所需的時間約为固定時間的一倍。如固定時間超出上述范围，則冲洗時間約为12—24小时。

如需防止材料在固定前发生消退性的变化，可将从动物体内取下的新鲜的、未固定的组织用生理盐水或缓冲液冲洗。

生理盐水可预防渗透性及原生质的变化。缓冲液不仅有上述效果，同时还能保持原生质的酸碱性平衡。

从动物体中切出的新鲜材料如心、肝、肠的一部分，胆囊、鸡胚盘或其他材料在固定前均需冲洗。这些新鲜材料都需在生理盐水或缓冲液中冲洗。

生理盐水

食盐(NaCl)	7.5—8.0 克
蒸馏水	1 公升

林格氏溶液(Ringer's Solution)

冷血动物用:	氯化钠	8 克
	氯化钙	0.2 克
	氯化钾	0.2 克
	碳酸氢钠	0.2 克
	蒸馏水	1 公升
热血动物用:	氯化钠	9 克
	氯化钙	0.24 克
	氯化钾	0.42 克
	碳酸氢钠	0.2 克
	蒸馏水	1 公升

缓冲液

在使用时使下列两种溶液按一定比例混和即可得到一定 pH 值的溶液。

溶液甲

磷酸钠(双盐碱性)Na ₂ HPO ₄	5.938 克
水(特殊二次蒸馏者)	500 毫升

溶液乙

磷酸鉀(單鹽基性) KH_2PO_4

4.539克

水(特殊二次蒸餾者)

500 毫升

使用時將二液混和再用特殊蒸餾水沖淡 2:1。

雙鹽基性磷酸鈉溶液與單鹽基性磷酸鉀溶液可按下表混和即可得下表所指定的氫離子濃度：

所需的 pH	Na_2HPO_4 溶液的容積	KH_2PO_4 溶液的容積
6.24	2.0	3.0
6.47	3.0	7.0
6.64	4.0	6.0
6.81	5.0	5.0
6.98	6.0	4.0
7.17	7.0	3.0

VII. 脫水

酒 精

脫水的目的很显然是为了除去組織內所含的水分。欲达到这目的，必須有一媒介物可取代水而占有原来水在組織中所占有的空隙。此媒介物还必须具有能与透明剂混和而又不会消除固定剂作用的特性，如軟化組織等。此外，它还必須在某种程度上能繼續硬化組織。由于純酒精能与最常用的透明剂混和，故一般脫水过程常为將組織經過一系列不同濃度的酒精。酒精的濃度由 35% 开始經 50%、70%、80%、95% 最后至无水酒精(98% 以上的酒精)。一般情况下 35% 酒精可省略。

脫水过程必須从 50% 酒精連續进行至 80% 酒精。在此濃度中則可长期保存直至便于完成余下步驟为止。80% 酒精是脫水过程中唯一可停頓之处。