

# 神經切片製作法

455

1

C.1

人民衛生出版社

# 神經切片製作法

杜 卓 民 編

人民衛生出版社

一九五五年 • 北京

## 內 容 提 要

本書專論神經切片製作及染色的特殊方法。一般論述組織切片製作法的書籍，多包括神經組織在內，但本書仍有其獨到之處。作者將經過考驗的常用方法肯定下來，並提供出個人的經驗和意見以供同道參考。在某些地方，作者指出可用國產材料代替舶來品，這一點尤其是有其積極意義的。

## 神 經 切 片 製 作 法

書號: 1768 開本: 787×1092/32 印張: 1 3/4 字數: 47千字

杜 卓 民 編

人 民 衛 生 出 版 社 出 版

(北京書刊出版業營業許可證出字第〇四六號)

• 北京崇文區鑄子胡同三十六號 •

人民衛生出版社印刷 • 新華書店發行  
長春印刷廠

1955年8月第1版—第1次印刷

印數: 1—3,000

(長春版) 定價: (7) 0.22元

## 前 言

這本書的目的是想集中一些神經切片的工作方法，通過這些方法好使實驗室的一般工作者盡可能地把神經組織的形態充分顯示出來。當然，在效果上也可能因為客觀條件的不同，多少會有些差別，不過，能够保證的是這裡所列的方法，大多數是我們在工作中經驗過的，幾年以來常接觸的方法。其中有些方法也許陳舊，可是因為還有它一定的成績，所以仍把它保留下來。

有極少是我們沒有做過的，也寫出來作為參考，如美藍的活體染色法。另外也介紹了一般常用的 Mallory 氏染色法的簡便改良染色步驟，希望能引起注意。

書的內容以神經原纖維和髓鞘的染色法佔的分量較大，對於虎斑的染色法步驟也簡單。這都是因為它們的應用較廣，同時為了方便，關於較特殊的試劑也多略去，因此，對於一般的工作者來說，我們主觀上認為是有帮助的。在各方法中也都會提到了我們在工作過程中的點滴心得，雖然很少，想也可以發生一些作用。我們的經驗還非常貧乏，非常誠懇的希望國內的工作同志們予以指導和批評。

振東、耕歷諸同志都曾參與協助，他們的成績也顯示在這本小書中。沸潛同志的支持與幫助使本書能够及時完成，和人民衛生出版社在審查中所提的許多寶貴的意見使本書能够經過一番修改後再出版，所有這些都是應該由衷地深深致以謝意的！

最後也應該聲明：書中所列的試劑染料等，除少數的例外，都可採用國產品，就是那些極少數的試劑，也已提出代用品或改變法，因此也就不一定非用它不可！也就是這樣，敢預料我們的工作者同志們也必會成功地完全以國產材料完成他所需要的工作。

杜 卓 民

於貴陽醫學院解剖科1954年9月12日

# 目次

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 一、製作神經切片時應注意事項 .....                      | 1  |
| 二、組織的固定和三種切片法介紹 .....                     | 3  |
| 1. 石蠟切片法 .....                            | 3  |
| 2. 火棉膠切片法 .....                           | 5  |
| 3. 冰凍切片法 .....                            | 8  |
| 三、各種染色法 .....                             | 9  |
| 1. 大體的腦切塊標本染色法 .....                      | 9  |
| 2. 一般染色 .....                             | 10 |
| (一)蘇木精和伊紅染色法 .....                        | 10 |
| (二)Weigert 氏蘇木精和van Gieson 氏液複染法 .....    | 12 |
| (三)Mallory 氏三色染色 .....                    | 13 |
| (四)Mallory 氏磷鉬酸蘇木精染色 .....                | 13 |
| 3. 神經細胞染色法 .....                          | 14 |
| (一)Golgi 氏鍍銀法 .....                       | 14 |
| (二)Cox 氏法 .....                           | 16 |
| 4. 細胞內含物的染色 .....                         | 17 |
| (一)Nissl 氏小體(虎斑) .....                    | 17 |
| (二)線粒體 .....                              | 17 |
| (三)高爾基氏體 .....                            | 19 |
| (四)色素 .....                               | 21 |
| (五)神經原纖維染色 .....                          | 21 |
| 5. 髓鞘染色 .....                             | 36 |
| (一)神經膜鞘細胞 .....                           | 36 |
| (二)Ranvier 氏結及 Fromann 氏線 .....           | 36 |
| (三)神經髓鞘漏斗膜 (Lantermann 氏裂隙, 漏斗或螺旋絲) ..... | 36 |
| (四)髓鞘染色 .....                             | 37 |
| 6. 神經膠質細胞染色法 .....                        | 44 |
| (一)星狀神經膠質細胞 .....                         | 44 |
| (二)寡突膠質細胞和微小膠質細胞 .....                    | 45 |
| (三)神經膠質纖維染色法 .....                        | 47 |
| 主要參考書籍 .....                              | 49 |
| 中外名詞對照表 .....                             | 50 |

## 一、製作神經切片時應注意事項

1. 任何玻璃器皿都應經清潔液浸洗後再用，這是絕對必要的。
2. 所有用過的器皿(如燒杯、燒瓶、玻瓶等)都應在未乾的情況下立即洗淨再泡於清潔液內。
3. 所用試劑、藥品等均以「化學純粹」為基本原則(事實證明，現在國產的許多試劑很合用)，尤其是硝酸銀，氯化金或其它還原劑等。
4. 注意應用新鮮的蒸餾水。
5. 所用酒精以不含金屬離子者為佳；也不必用加過去水硫酸銅的無水酒精。
6. 試劑的調配應求準確，不可馬虎。往往以為在某一過程將就一下，可以節約，事實反倒造成了浪費。因為某一步驟的不正確，往往就影響了其它的許多步驟。如配製硝酸銀水溶液時，例應溶液無色，假如配成後即或是顯極輕微的乳白色混濁或容器變色等都應毫不遲疑的棄去不用，把原因檢查出來重配。
7. 溶液的配製多取百分制；如 1.5% 硝酸銀水溶液就是以 1.5 克的硝酸銀晶體放入 100 毫升的蒸餾水內。但照例，試劑超過 10% 時常是溶媒相對的減少。例如配製 40% 的氫氧化鈉水溶液就是以 40 克氫氧化鈉加入 60 毫升水中而不是 100 毫升的水中。
8. 所有試劑、染劑等除少數的例外，多不必要大量配製儲存；也就是說，試劑、染劑等隨用隨配的機會是多是些。
9. 所有試劑、染劑等均須以清潔的有色瓶容盛。但臨時配了就用的可以例外。
10. 不要隨便用金屬器械去接觸組織塊、試劑等。如在應用鑷子時最好先沾上一層石蠟。
11. 採取神經組織時越新鮮越好，並且要取得輕巧，不使受或極少受到壓迫。組織不要太大(特殊的需要例外)，常是越小越好。
12. 由於神經組織本身極易收縮，所以在脫水時不應把酒精換的太驟(即濃度相差太大)。浸蠟的時間也要掌握好，否則這也是時常失敗

的原因。

13. 將組織放入溶劑瓶時，最好能在瓶底墊上一些脫脂棉或紗布，俾可使溶液浸入組織較易均勻。例如固定組織時即應如此。

14. 要準備一個可靠的恆溫溫箱；因為在製做過程中時常有需要加溫幾天的時候，如溫度高低不定就要影響成果。

15. 要準備一個小暗箱；因為在製做過程中常須避光，在暗中進行。例如多數的鍍銀過程即應如此。

16. 神經切片常是不需要很薄的，初學者往往喜歡切很薄的切片，以致常有因片薄而不能看出的地方，這是非常可惜的。

17. 工作中對於時間的要求，往往很不固定，這要看所取的材料和工作過程中的溫度而定。

18. 不應輕易改變每一製做法的內容，除非有了把握之後再試試。

19. 隨時記錄工作情況，這樣可以幫助以後的工作有把握，並且技術得以提高。

20. 多找參考資料，吸取別人的經驗。

## 二、組織的固定和三種切片法介紹

神經組織的固定在神經切片的製做範圍內佔非常重要的地位。沒有良好的固定是不可能得到滿意的切片的。此處所要應用的固定法都已列在每種工作法的開頭，故不再另外介紹。固定的方式不外是浸泡和灌注二法。

但是，我們需要知道，假如打算保存大體標本，將來慢慢做切片，最好還是用固定液灌注法；就是將動物的頸動脈或股動脈打開，藉插管將液灌入，對於小動物，則可由左心室注入。這種固定法較之浸泡法來得均勻而快，效果也好。

除各別特殊情況另加說明外，本書所介紹的切片法都可照下列各法進行。

### 1. 石蠟切片法

組織經固定後（固定後如須經水沖洗或其它處理時，必須在脫水前完成之），即應開始脫水，最先經過 50% 的酒精 2—24 小時，視塊之大小、厚薄而定，再逐步經 70%、85%、95% 各級酒精各 2—24 小時（對於細胞學的精細材料更應把各級酒精的相差數縮小，即如自 50% 起，逐步經 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 等次序）。

至此，再依下列各法之一進行最後的脫水、透明和石蠟包埋等步驟。

（一）以二甲苯（或甲苯）作透明劑（純淨汽油亦可代替）

（1）在 95% 酒精內換一次，4—24 小時；以後每換一次酒精時，最好將組織上的多餘酒精在吸水紙或潔淨乾毛巾上沾去，但切勿令組織變乾。

（2）移入無水酒精內，換 1—2 次；共 3—24 小時。

（3）在等量的無水酒精和二甲苯的混合液，2—12 小時。

（4）純二甲苯，1—12 小時，可換一次。在純二甲苯內要特別注意，應在組織透明後立刻取出，否則時間過長易脆（甲苯內較好些）。

(5) 浸入溶解的石蠟內（第一次蠟也可換為二甲苯石蠟混合液，然後再轉入純石蠟內）換 2 次；30 分鐘—6 小時。

所用石蠟以熔點  $52-56^{\circ}\text{C}$  者較為合適，如果不需要很薄的切片，可不必用熔點  $60^{\circ}\text{C}$  左右的石蠟。浸蠟的時間應掌握好，過久可致組織變脆和強度收縮。所謂 30 分鐘是指很小塊的組織而言，如小鼠等小動物的交感神經節，大約有 20 分鐘的浸蠟時間也就够了。

#### (6) 製成蠟塊以備切片。

製蠟塊時最好不用那種頗不方便的紙摺小盒或“L”形鐵板，而用染色缸的圓蓋。Coplin 型染色缸蓋就深淺適度，足可供一般蠟塊之用。我們是這樣的：先將蓋子裡面薄薄的塗上一層純淨甘油，再倒蠟。此時蠟立刻凝結一層，即將組織放入，端正位置（切面朝下），然後將蓋輕輕放在冷水面上，用口輕吹使蠟面加快凝結；凝後輕輕一鬆手，蓋子就沉下水底。這種方法的好處是：

（甲）放入水中時不必像用紙盒那樣必須用手壓着，必須全凝才可放手。

（乙）蠟塊凝好後它會自動的漂浮到水面上來。

但注意，必須待蠟面結好後再鬆手，不要過急，否則中心沒凝結的蠟常被壓出，致成廢品。

（二）用香柏油作透明劑 此處所用的較顯微鏡油鏡用的柏油稀薄些。用柏油透明的好處是組織不會變脆，因此如將組織放在油內時間長久也無大碍。但它的缺點是：柏油不能和石蠟溶混，故在把組織放入石蠟前必須用某種溶劑（如甲苯，二甲苯，苯等）把它除去才可放入蠟內，否則在切片時組織易脫離蠟片，甚至有浸蠟不足毛病。

（1）95% 無水酒精同前法。

（2）純柏油換兩次，4—24 小時，或直到透明為止。

（3）二甲苯 10—30 分鐘。不可過久否則組織易脆。

（4）浸蠟（在純石蠟內換 3—4 次）時間同前。製成蠟塊。

✓（三）以苯為透明劑 苯並不會使組織變脆，且透明快，又可與蠟混溶，所以我們很喜歡用它作為透明劑。方法與用二甲苯相同。僅以苯代替二甲苯。

上述三法，實際應用上可無明顯的分界，只是換換透明劑而已。但如果所取的組織帶有相當多的易脆物質（如肌肉，結締組織，腺體等），最好是用後二法。如果所需要的組織是非常精細的，那末在透明後浸蠟之前，可先把它放入等量的透明液和石蠟內（但柏油不可以如此）一個短時間（10分鐘—1小時），容器要加蓋，以防揮發；再轉入純石蠟之內就比較好些。

如將石蠟內加入約1%的純淨蜂蠟，對於切片時很有幫助。

蠟塊製成，切成需要的小方塊再藉熔蠟貼於金屬，木或紙壓成的托子上；用旋轉式切片機切片。

一般的石蠟切片多藉甘油蛋白貼於潔淨玻片上（甘油蛋白是將雞蛋白充分打攪後與等量甘油混合均勻，更加入少許麝香草腦防腐）；其法是薄塗一層甘油蛋白，放上切片，加水少許，用酒精燈微熱之，使切片全都伸張，但不可使蠟熱熔。另外，如將切片先放入溫水內使之伸展，再用塗了甘油蛋白的玻片在水中撈取也可。

如遇有某些鹼性溶液或染料時，這種貼法頗易使切片自玻片脫落，則可改用下二法，尤以後者為便。

（1）**明膠法** 溶50毫克明膠片於20—25毫升蒸餾水內，加熱使溶。用時將本液滴於玻片上，放上切片，加熱使切片伸平，再將多餘液除掉，然後放入45°C左右的甲醛液蒸氣內數小時或經夜。

（2）**火棉膠法** 切片仍用甘油蛋白貼好，烤乾後，經二甲苯等脫蠟。脫蠟後放入無水酒精內三數分鐘，再①放入1—2%火棉膠液內5分鐘（火棉膠液也可放於染色缸內，蓋口塗以凡士林）。②取出使片直立使多餘火棉膠液滴去，再放入③80%酒精內5—10分鐘，使火棉膠硬化。以後步驟如常。

## 2. 火棉膠切片法

這種方法的缺點是不能使切片切薄，和耗費時間太長，但是它有一個很大的優點，就是可以切較大的切片並不會破碎。在神經切片時常需要這樣的條件。其步驟約略如下：

（一）神經組織固定後，脫水經70%酒精，85%酒精以至於95%酒

精內，所需時間視組織大小而定，一般多在4—24小時。

(二)95%酒精換一次，24小時。

(三)換兩次100%酒精，24—48小時。組織塊過大者，仍須延長時間。

(四)等量的無水酒精加乙醚，6—36小時。這一步驟是爲了使火棉膠液易於浸入。

(五)稀火棉膠液(4%左右) 兩週。

(六)濃火棉膠液(10%左右) 兩週以上。

(七)濃火棉膠液(20%左右) 四週以上。

在前二項火棉膠內，主要的目的是要它充分的浸入組織，而最後的濃火棉膠不過是要它浸入組織表面少許，能够支持切片就成了。對於大塊組織，時間仍須加長。火棉膠液的配製是以等量的無水酒精、乙醚混合液來溶解乾火棉膠片，濃度視需要而定（如先以無水酒精來溶，可稍快）。

(八)用刻有縱橫深溝的硬質木塊（或用已製好的紙壓品或硬蠟作成均可），外包以韌紙，有時如組織塊切得規則，可以數塊重疊放入，再於乾燥皿內（皿內並不放入任何乾燥劑）。又，在組織塊放入之先，應在紙的裡面塗一薄層凡士林。

(九)皿內置入少許乙醚，蓋好。如此可使火棉膠液的氣泡完全昇至表面來跑掉。除去乙醚，換以氯仿，使火棉膠液硬化。

(十)在氯仿中數小時以至數日。直到用手指輕壓火棉膠不再現出指紋的壓迹時才是合適的硬度。

(十一)將火棉膠塊存於70%酒精內備用。

(十二)用滑動式切片機切片。切片時有數要點：

(1)如果不是用自動調節厚度的切片機，就應先調節到所要求的厚度再切，但切片刀又必須在調節前先推到要切的位置。

(2)刀刃與火棉膠塊的角度以調節至刀刃盡其全長地都能經過火棉膠塊爲最好。

(3)切片刀的傾斜度不可過大，以刀刃與切面平行爲宜。

(4)火棉膠切片刀是一面平，一面凹，例應凹面向上。

- (5) 切時要隨加 70% 酒精於組織塊面上和刀的凹面上。
- (6) 通常多是右手推刀，左手以毛筆蘸 70% 酒精和挑取切片等。
- (7) 薄於 15 微米的切片，並不太好切。能否切好，視組織性質，切片技術，火棉膠的硬度和組織塊的大小而定。
- (8) 如切出的切片捲於刀上，則應在未切盡該片前先用毛筆輕輕使之展開於刀面上再繼續切完。否則已捲的切片多無法再展開或展平。
- (9) 不可推刀太快，否則常易扯破切片。
- (10) 火棉膠切片多不必貼於玻片即可染色。染色時可用培養細菌用的培養皿(Petri dish)來處理切片是很方便的。
- (11) 切片脫水勿過無水酒精，否則火棉膠被溶去，不易掌握切片。
- (12) 切片由 95% 酒精可直入下液透明：(見後)

|        |     |
|--------|-----|
| 木餾油    | 1 份 |
| 石炭酸，結晶 | 1 份 |
| 二甲苯或甲苯 | 8 份 |

由於上述的火棉膠包埋所經過程時間太長久，所以可將火棉膠加熱處理，以節省時間。方法是將組織及火棉膠放入螺旋口的暗色瓶內，旋緊瓶口倒置於 50—60°C 溫箱內（倒置玻璃瓶是為了避免乙醚蒸氣由瓶口縫逸出）經過很短的時間就成功了。火棉膠加熱處理是為了使乙醚的蒸氣壓力將火棉膠壓入組織，所以應選用好的瓶子，同時火棉膠也不要放的太多，以適能埋過組織為度。所有上述的(5)，(6)，(7)三步驟的時間可改為 12—72 小時，其餘照舊。

這裡也應該注意兩件事：(1)必須等火棉膠冷卻後才可旋開瓶蓋，(2)火棉膠、無水酒精、乙醚等極易着火（尤其是在夏天），所以絕不可用有直接火焰的燈火加熱以免危險。除此之外也應避開火種，如酒精燈，吸煙等。

用這種加熱處理所製的切片(如髓鞘染色)，成績很圓滿，並沒有因加熱所引起的收縮現象。

又，如欲保持切片的連續性，可將切片一角的火棉膠以布沾乾用濃墨筆寫上記號，乾後即不脫落。火棉膠切片的其它處理見染色法。

在這裡，應介紹一下雙重包埋法，即火棉膠石蠟包埋法。步驟如下：

- (1) 組織於脫水完成後轉入等量無水酒精乙醚混合液 4—24 小時。
- (2) 稀火棉膠液內三數日。然後取出組織置氮仿內數小時。
- (3) 放入麝香草油(白)內 2—4 小時,換一次;或塊大須延長時間,直到透明為止。香柏油亦可代替。
- (4) 石蠟內 2—4 小時,換數次然後做成蠟塊。
- (5) 用旋轉式切片機切片;處理法與石蠟切片法同。

### 3. 冰凍切片法

冰凍切片法是一種很省時間的切片法;普通例用液態二氧化碳,由鋼管導出,噴於組織上藉其蒸發時吸熱原理而使組織凍固。用氯乙烷也可代替,唯溫度不如二氧化碳低,且不經濟。步驟如下:

(1) 組織塊勿過厚大(5 毫米厚,小於一平方厘米最好),在組織托子上墊以薄紗布或棉紙一層(用氯乙烷時尤其必要),再將組織放在應切位置,滴水少許。

(2) 噴二氧化碳(或氯乙烷),噴後可輕吹氣,切片刀上也噴少許。

(3) 俟冰在開始解凍時,連續急切之;這時的切片最好(切早則切片崩掉,太脆;切遲則組織碎爛不能成片)。

(4) 用毛筆由刀刃將切片推入蒸餾水內以備染色(以後就用玻棒挑取,或用玻片藉水張力貼上也可)。

冰凍切片是用特殊但構造較為簡單的切片機來操做,假如沒有時,則滑動式切片機也可勝任。

冰凍切片法也不易切得薄片,所以不易切成 20 微米以下的切片。

### 三、各種染色法

#### 1. 大體的腦切塊標本染色法

爲了清楚的觀察大腦內景，首先須能分清大腦灰質與白質的佈置；藉切成的標本塊，無論是冠狀或水平切塊，都有助於觀察大腦內景的概況，如能將之染色則不但美觀，更易觀察了解。

關於大腦切塊的染色法，普通多用普魯士藍反應原理來處理。我們以爲，下面的改良 Le Masurier 氏法(1935)頗值一試；經本法染出的標本不但藍色輝煌，且灰質與白質分界明顯並無含混不清之弊。

腦標本最好是用 10% 甲醛液固定，固定時間約爲數日以上(灌注法)。用薄而長的鋒利腦刀，塗以甘油，依所需的切面切成厚約 1 厘米的切塊，以緩緩流水沖洗 24 小時(切前如能將標本沖洗 24 小時更好)以除去標本附帶的甲醛液。切後不應再用刀或手指去接觸切面，否則染色效果不良。以下的步驟是：

(一)在 Mulligan 氏液內，將 1、2 切塊維持在 60—65°C 約 2—5 分鐘，Mulligan 氏液(1931)配製法如下：

|        |             |
|--------|-------------|
| 石炭酸，晶體 | 40 克        |
| 純淨硫酸銅  | 5 克         |
| 濃鹽酸    | 1.25—1.5 毫升 |
| 蒸餾水    | 1,000 毫升    |

此液可應用多次。

(二)投入大量冷水(或冰水更好)內浸洗 1—3 分鐘。

(三)浸入 1% 氯化鐵水溶液內 1—3 分鐘，直到灰質明顯可見時爲止；爲時不可過久，否則染色太深。

(四)流水沖洗 1—3 分鐘，然後再浸於 1% 黃血鹽(亞鐵氰化鉀)水溶液內，直至灰質顯鮮艷藍色即應撈出用流水沖洗數分鐘。

(五)如藍色不足則可再浸於 1% 氯化鐵液內 1 分鐘(或更少)，然後水洗如上。

(六)保存於10% 甲醛液內，但其中應含有2%的鹽酸。此步驟可使白質變得更白，並除去不必要的多餘染色，同時也能很好的保持其鮮艷之藍色。

(七)如有必要須將藍色褪除，則可將大腦切塊浸於10% 氨水液內，直到所有藍色褪盡為止，然後再用水洗。此時切塊即變為不美觀的紅褐色，但若將其再放入2%鹽酸液內又用同法重染，效果不變。

我們曾染過從解剖室內取得的標本；這些標本多已變成因注射的固定液內含石炭酸所致的紅褐色，但結果仍極良好。事實證明第(六)步非常重要。經本法染出的標本其白質色白如紙，與灰質分界也極明顯；依同法染出的大人腦幹之厚切塊和小腦切塊效果均同樣良好。

再者，保存標本用的甲醛液最好不用曾盛於已生銹的鐵桶的貨色，否則其效果很惡劣。

## 2. 一般染色

如果沒有特別的要求，對於神經系統的一般結構，則用最普通的蘇木精伊紅(H. & E.)染色就可以了。爲了要看出結締組織和它的關係可用 Weigert 氏蘇木精染核，Van Gieson 氏染色法複染；有時用 Mallory 氏三色染色法也屬必需。用磷鉍酸蘇木精染色，不但可染一般的細胞，且還可染出神經膠質細胞的纖維突。

對於固定劑的應用，上述各法都沒有特殊的要求，一般的都用10% 甲醛液。不過磷鉍酸蘇木精染色法以用 Zenker 氏液固定較好。

(一)蘇木精和伊紅染色法 先配製蘇木精液，此液配好後須經日晒或多暴露空氣中，數週之後才好應用。這種處理就是讓蘇木精氧化[成熟]。

蘇木精的配方頗多，現只列出 Ehrlich 氏酸性蘇木精液以供參考。

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 蘇木精    | 2 克                 |
| 95% 酒精 | 100 毫升，蘇木精溶後再加下列各項。 |
| 蒸餾水    | 100 毫升              |
| 甘油     | 100 毫升              |
| 鉍礬或鉀礬  | 3 克                 |
| 冰醋酸    | 10 毫升               |

(1) 切片(石蠟切片須經二甲苯脫蠟,再由無水酒精,95%,85%,70%及50%等酒精至水內;火棉膠經70%,50%等酒精至水)在蘇木精液內染色15分鐘(如染色時間加長並無大碍,只要脫色時也加長即可)。

(2) 放入水內稍洗,再在酸性酒精內脫色(50%酒精加鹽酸數滴於染色缸內)至切片變為淡紅色或所含結締組織無色時為止,約一分鐘左右。

(3) 在普通水內三分鐘(不用蒸餾水),直至全現藍色為止。按:我們所以用普通水而不用稀氨液是因為氨液有時會使切片自玻片上脫落。

(4) 1%伊紅蒸餾水溶液複染30—60秒。

(5) 普通水洗至不再褪色為止。

(6) 擦去多餘水份,然後置入95%酒精內急洗,洗掉多餘的伊紅。此步驟開始時可在顯微鏡下檢查鑑定,至細胞質現紅色核為藍色為合度。

(7) 經95%酒精,無水酒精脫水。

〔如係火棉膠切片,則至95%酒精後即轉入下液之一:〕

|             |       |
|-------------|-------|
| (甲)純白石炭酸結晶  | 25 克  |
| 二甲苯         | 75 毫升 |
| 或(乙)純白石炭酸結晶 | 10 克  |
| 二甲苯         | 80 毫升 |
| 木餾油         | 10 毫升 |

後者可使切片變軟,因此蓋片時易於平整。經上述處理後,急轉入二甲苯清去上液,時間不可過長,否則切片又硬而彎捲了。至此,置於玻片上,加膠,蓋片。〕

(8) 轉入冬綠油(柳酸一烷),很快即可透明(火棉膠片不可如此)。

這一步驟有時不必要,但為檢查方便起見也屬必需。因在冬綠油內,它很快即可完成透明與脫水,且不太容易揮發,所以可不必加膠加蓋片的直接在顯微鏡下檢查以決定取捨。其它染色法皆適用。

(9) 經二甲苯兩次,每次三分鐘(此二甲苯是另外兩份,不可與脫蠟用的重複)。

(10) 滴適度的加拿大膠，蓋玻片。至此即告完成。

這種染色法極簡便，其結果核呈藍色；神經細胞體紅紫色；神經纖維、結締組織等桃紅色。

## (二) Weigert 氏蘇木精和 van Gieson 氏液複染法

Weigert 氏蘇木精液的配製如下：

第一液，仍須經數週後才好用。

蘇木精 1 克，溶於 95% 酒精 100 毫升內。

第二液，

三氯化鐵，29% 水溶液                      4 毫升

蒸餾水                                              95 毫升

濃鹽酸                                              1 毫升

用時將第一、第二兩液作等量混合；此染液不能保存長久，是其缺點。

van Gieson 氏液，有二配製法，雖強調後者特別適於神經染色，但二者都值一用。

(甲) 酸性複紅，1% 水溶液                      5 毫升

以安尼林藍，淡綠，Ponceau S 等代替均可，且後者不易褪色。

苦味酸飽和水溶液（約 1.22%）              100 毫升

(乙) 酸性複紅 1% 水溶液                      15 毫升

苦味酸飽和水溶液                              50 毫升

蒸餾水                                              50 毫升

染色法：(1) 切片經脫蠟下行至水後，在 Weigert 氏蘇木精液內染 10—15 分鐘，然後水洗之。

(2) van Gieson 氏液內染色 10—30 秒（一分鐘以內），如在此時間過長，可將 Weigert 氏法所染的核色脫去。

(3) 水洗一次，再以 95% 酒精區別之；意即除去多餘的染料。

(4) 經 95%，100% 酒精脫水，有時在脫水酒精內加數粒苦味酸結晶也有好處。

(5) 經冬綠油、二甲苯，加膠，蓋片。

結果：核黑色，細胞質及其它黃色，結締組織（尤指膠元纖維）紅色。