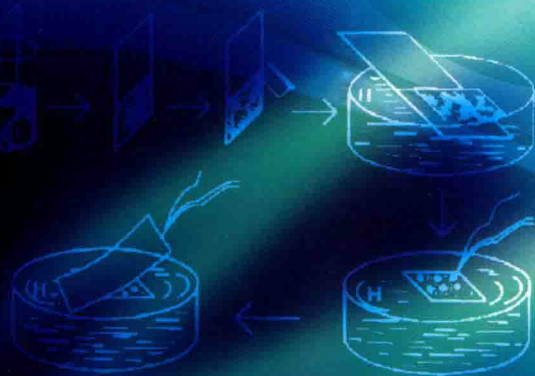


生物制片技术应用

● 吕林兰 董学兴 主编



化学工业出版社

非外借

生物制片技术应用

吕林兰 董学兴 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书介绍了生物切片法和非切片法制片技术及其应用,主要包括石蜡切片技术、冰冻切片技术、生物组织化学、免疫组织化学技术、免疫组织化学图像分析、原位杂交组织化学。主要以动物材料为对象,附制片实验项目。

本书可供生物科学、生物技术、生物化学专业技术人员参考,也可供生物专业本科、专科教学使用。

生物制片技术应用

图书在版编目 (CIP) 数据

生物制片技术应用/吕林兰,董学兴主编. —北京:
化学工业出版社, 2017. 12
ISBN 978-7-122-30802-3

I. ①生… II. ①吕…②董 III. ①切片 (生物学)-
制作 IV. ①Q-366

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 255233 号

责任编辑:李玉晖

文字编辑:孙凤英

责任校对:王静

装帧设计:韩飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:三河市航远印刷有限公司

装订:三河市瞰发装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张10 字数249千字 2017年12月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

生物制片技术是一门基础且应用极为广泛的实验技术，是生物学和医学最常用的研究手段。19世纪中期，随着生物、物理等学科的不断发展，以及显微镜、切片机等设备的日益完善，逐步建立起了完整的组织制片技术。20世纪50年代以来，随着免疫组织化学、原位杂交等新技术出现，组织制片技术进入了崭新的历史时期，其研究内容从基本组织结构观察延伸到了分子领域。近年来，随着计算机分析技术和光电检测技术的发展，以切片技术为基础的免疫组化和原位杂交技术在病理诊断和科学研究中得到了长足的发展及更为广泛的应用。

本书分为两篇。上篇共六章，为生物组织制片的理论和方法。第一章，常用生物制片的基本方法，介绍了石蜡组织切片、冰冻切片以及火棉胶制片技术的原理和方法；第二章，非切片法，介绍了非切片制片法的主要方法，包括整体制片法、压片法、涂片法、离析法和磨片法；第三章，生物组织化学，介绍了组织化学标本制备，以及糖类、脂类、核酸和酶组织化学理论和方法；第四章，免疫组织化学技术，介绍了免疫组化技术原理和技术；第五章，免疫组织化学图像分析，介绍了常用组织化学显微图像定量分析技术和计算机图像分析方法；第六章，原位杂交组织化学，介绍了原位杂交组织化学的基本程序和地高辛标记探针原位杂交方法。下篇为具体实验项目，介绍了涂布法——鱼血涂片、贝类外套膜石蜡制片——苏木精伊红染色法、鱼肠石蜡制片 Mallory 氏三色染色法、T 细胞表面分子 CD3 的检测、水产动物肠道琥珀酸脱氢酶定位——冰冻切片、鱼类性腺 GnRH 受体免疫组化定位等实验方法及应用。

本书以实用性和可操作性为目标，并注意理论与实践相统一，既注重传统制片技术介绍，又引入新技术。书中不仅对每种技术的原理和实验流程作详细阐述，还对免疫组化图像分析方法进行了说明。同时，参考其他著作、文献及编者工作实际，详细分析了实验过程常见问题，并提出了针对性解决办法，对相关领域教师、科研人员具有较高参考价值。

本书由吕林兰、董学兴主编，仇明、王爱民参加编写。本书的编写及顺利出版，得到了盐城工学院教务处、海洋与生物工程学院领导及海洋技术系教师的热切关心和大力支持，在此表示衷心的感谢。由于编者水平有限，书中难免存在不足，恳请广大读者批评指正。

编者

2017年9月

第一篇 生物制片技术

第一章 常用生物制片的基本方法	2
第一节 生物制片的基本原理	2
第二节 火棉胶切片	36
第三节 冰冻切片	38
第四节 超薄切片与半超薄切片	42
第二章 非切片法	53
第三章 生物组织化学	60
第一节 组织化学标本制备	60
第二节 糖类组织细胞化学方法	63
第三节 脂类组织细胞化学方法	68
第四节 核酸组织细胞化学方法	71
第五节 酶组织细胞化学方法	74
第四章 免疫组织化学技术	93
第一节 免疫组织化学的基本原理	93
第二节 抗体的基础知识	93
第三节 免疫组织化学组织取材和标本制备	96
第四节 抗原修复	99
第五节 免疫组织化学基本方法	101
第六节 免疫组化技术注意事项及常见问题	108
第五章 免疫组织化学图像分析	112
第一节 常用免疫组织化学显微图像定量分析技术	112
第二节 计算机图像分析方法	113
第六章 原位杂交组织化学	119
第一节 原位杂交组织化学基本程序	119
第二节 地高辛标记探针原位杂交方法	126

第二篇 组织切片技术实验

实验一 涂布法——鱼血涂片	130
---------------------	-----

实验二	贝类外套膜石蜡制片——苏木精伊红染色法	131
实验三	鱼肠石蜡制片 Mallory 氏三色染色法	133
实验四	T 细胞表面分子 CD3 的检测	134
实验五	水产动物肠道琥珀酸脱氢酶定位——冰冻切片	135
实验六	鱼类性腺 GnRH 受体免疫组化定位	137
附录	常用缓冲液配制	140
参考文献	152

第一篇 生物制品技术



第一章 常用生物制片的基本方法

制片技术是生物科学必不可少的研究手段。要显示出正确、清晰的生物材料微观结构，必要将其制成适合于显微镜下观察的薄片，即生物制片。由于各种材料的性质及观察研究的目的不同，因而产生了多种生物制片的制作技术和方法。从不同的角度出发，生物制片分类结果不同。从保存时间的长短可分为“临时制片”和“永久制片”两大类。根据制作方法则分为切片法和非切片制片法两大类。其中，切片法包括石蜡切片、冷冻切片、半薄切片、徒手切片、滑动切片、火棉胶切片等，其特点是必须用刀把材料切成能透过光线的薄片。非切片法包括整体装片、涂片、压片、铺片、磨片等，其特点是不需要用刀把材料切成透光薄片，能保持原有状态，制作方法比较简单，需用新鲜材料。

第一节

生物制片的基本原理

虽然生物制片的方法各异，但它们的基本步骤和原理一样。在制作永久切片的过程中，基本上都要经过选材、固定、冲洗、切片、染色、脱水、透明、封藏等主要步骤。本节主要以生物制片常用技术——石蜡切片为主线来阐述生物制片的基本原理和步骤。

一、材料的采集与处理

在生物制片技术中，实验材料的正确采集处理是制片成功的关键步骤之一。一般实验材料的选择依研究目的而定。选择材料应注意以下几点：

1) 研究正常结构时，应该选择新鲜、健全而有代表性的部位取材，并预先考虑好切面方向。采集病理材料时，除取其病变部位外，还应从病变的中央部分向四周，连同正常组织一起采取，以利于观察分析。

2) 实验材料选择后应在较短的时间内杀死和固定，使其保持生活时的自然状态。采取标本前，要根据制片要求选择并配制好固定液。取材后应立即投入固定液，以防组织自溶和腐败。

3) 切取材料时，刀锋须锐利（一般可用新的单面保安刀片切取材料），动作要快而仔细。取材时切勿拉锯式来回切割，镊取时须轻夹轻放。总之，应尽量不要因切取不当而损伤所取材料。

4) 材料尽可能新鲜，并尽可能切小、切薄，这样有利于固定液的渗入。柔软组织不易切小，可先取稍大组织块进行预固定，待组织稍硬化后再修切成小块继续固定。过于细小的材料，为预防固定后失落，可连同其周围组织一起固定。对于膜厚而坚实的器官（如睾丸），须切开被膜，并在其上开口，以利于固定液渗入。对于大型标本，最好用注射固定法，将固定剂注入血管内可以固定得更好。

5) 取材时要详细记录日期、采集地点、标本名称、取材部位、断面和固定液等。

(一) 动物材料的采集与处理

因为在不加麻醉剂的条件下采集有的动物会收缩,因此,从活体动物上采集材料前一般应实施麻醉。但需注意的是,所用麻醉剂的种类、剂量不能影响细胞的结构。常用麻醉剂有水合氯醛、氯丁醇、薄荷脑、可卡因和酒精等。通常较大的动物用氯仿或乙醚作为麻醉剂,亦可应用氨基甲酸乙酯(尿烷或乌拉坦)进行静脉注射,剂量一般按动物体重 1kg 用 1g。较小的低等动物,如原生动物(草履虫)、腔肠动物(水螅)等,可用加热法或热的固定剂直接杀死固定。

若是开展细胞学方面的研究,对材料新鲜的程度要求严格,要尽量割取活着的动物组织块。例如,取蝗虫的精巢,可将活的蝗虫腹部剪开,将精巢取出,立即投入固定剂中。一般的组织学制片,可将动物直接杀死,然后迅速取其组织进行固定。小白鼠、蟾蜍等小动物可采用动物放血法。较大的动物,如兔子可采用空气栓塞法。不论使用哪种方法,都必须达到快速杀死动物的目的,以免动物细胞发生不良变化而导致病变现象的发生。

(二) 动物组织的处理

取下所需要的器官或组织,放入盛有生理盐水(家畜为 0.85% 氯化钠溶液,禽类为 0.9% 氯化钠溶液)的培养皿中,洗去血污和其他杂物,胃肠等管状器官要洗去管腔内的内容物。用锋利的刀片切下一块材料。切成的组织块必须小而薄,一般以 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ 、 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 、 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 为宜,最厚不超过 0.5cm,尤其细胞学制片,组织块厚度以不超过 0.2cm 为宜。如果材料太软,一次不易切成小块,可先切成较大材料块放于固定液中预固定几十秒,待组织稍硬化后切成小块再固定。切取材料愈新鲜愈好,胃、肠、肾等器官尤其应注意,要在死后立即采取。

二、固定

固定的目的在于把组织或细胞按生活的状态固定下来,使在以后制片的任何过程中不发生变化。杀死和固定两者之间的关系是极为密切的,是两个不同的步骤,但又是相互统一、相互作用的过程,杀死动物之后,不仅要使生物体立即死亡,而且还要使每个细胞差不多同时停止生命活动,才能达到固定的目的。

常用的杀死剂,一般都兼作固定剂,在选配时就应加以考虑。固定剂除了能迅速杀死原生质并保存原来的细微结构外,还要使组织适当硬化而便于切片,增加细胞结构及内含物的折光程度,使各部分结构更为清晰,适于在显微镜下观察。某些固定剂还具有促进生物组织对某些增强染色剂的媒染作用。因此,一种较理想的良好固定剂,应具备下列条件:

1) 渗透力强,能迅速渗透到生物组织或细胞的各部分,可立即杀死原生质并固定其细微结构,使其不发生变化;

2) 避免使组织或细胞发生收缩或膨胀;

3) 能增加着色能力或媒染作用;

4) 固定剂还应当是良好的保存剂(当然,并不是所有具有优良固定性能的固定剂都能作保存剂),材料经固定后能经久不坏;

5) 使组织适当变硬而具有一定的坚韧性以便于切片,但又不能使材料过于坚硬或变得松脆。

固定液种类很多，按照其组成可分为两大类：单一固定液和混合固定液。单一固定液往往会使原生质发生不同程度的收缩或膨胀，固定速率相差也较大。若将两种药剂按适当比例配制成混合固定液，则可相互抵消缺陷，性能更为优良。各种固定液具有不同的特性，在选用固定液之前，应根据不同的实验目的和实验材料选用相应的固定液。

(一) 单一固定液的种类、性质及其应用

常见的单一固定液主要有乙醇、福尔马林、乙酸、苦味酸、重铬酸钾、铬酸、锍酸和升汞等物质，根据它们对蛋白质的作用（主要指对白蛋白的作用）特点，可分为如下两大类：

1) 能使蛋白质凝固者，如乙醇、苦味酸、升汞和铬酸。其中，苦味酸、升汞和铬酸对两种蛋白质（即细胞内的白蛋白和细胞核内的核蛋白）都能凝固，乙醇虽能凝固白蛋白，但不能沉淀核蛋白。

2) 不能使蛋白质凝固者，如福尔马林、锍酸、重铬酸钾和乙酸等。乙酸不能凝固白蛋白（但能凝固核蛋白），福尔马林、锍酸和重铬酸钾对两种蛋白质都不凝固。

各种单一固定液的性质及其应用简述如下：

1. 乙醇 (ethyl alcohol) C_2H_5OH

乙醇通称酒精，为无色液体，是一种常用的固定液，可与水以任何比例混合，适合固定的浓度：70%~100%。酒精可使组织中的蛋白质发生不溶性沉淀，也可使核酸发生可溶性沉淀，其特点是杀死快、渗透力强、可使材料变硬。

(1) 纯酒精（无水酒精）

纯酒精的标准浓度为100%，是一种良好的杀死及固定剂。假如材料需要立即杀死与固定，纯酒精相当适用。但纯酒精具有使原生质发生收缩的缺点，故很少单独使用。如果单独应用，固定的时间一般不超过1h。例如，小型的菌类仅需1min，植物的根尖、茎尖、花药、子房等固定则需15~20min。纯酒精不但可以杀死和固定材料，而且还有脱水的作用，材料固定后只需要更换两次就能将组织中的水分彻底除去，即可进行透明。

(2) 95%酒精

它的标准浓度为95%~96%，是普通的杀死与固定剂，并可兼作保存剂。材料经固定后，不需要进行冲洗或换液等手续就可进行脱水，所以平时应用很多，其缺点也是能使原生质发生收缩。对植物细胞而言，因其细胞壁可保持原来的形状，一般制作无需保存细胞内含物的切片是很适合的。用95%酒精固定的时间，一般以15~30min为宜，较大的材料1~2h即可。若固定时间较长，材料则变脆而易折断，难以切片。若需长时间保存，则必须加入等量的甘油而成酒精-甘油混合液。材料经95%酒精杀死固定后，一般常换入70%酒精作保存液。

酒精单独使用时，可作为组织化学制片的固定剂，通常用95%酒精或纯酒精为宜。酒精本身是一种还原剂，很容易被氧化成乙醛，甚至成为乙酸，因此不宜与铬酸、重铬酸钾或锍酸等氧化剂配合，但与福尔马林、冰醋酸或丙酸等配合使用则固定效果良好。

此外，因酒精可以溶解大部分脂物，开展高尔基体、线粒体等细胞器的相关研究时要避免使用酒精作固定液。由于被酒精沉淀的蛋白质在0℃下易溶于水，故酒精亦不宜作低温固定。

2. 福尔马林 (formalin) $HCOH$

福尔马林是甲醛的水溶液，易挥发，有强烈的刺激性气味，一般市售品为含37%~

40%的甲醛，适合固定的浓度为10%福尔马林（即3.7%~4%的甲醛）。制作切片时，通常都是将40%的甲醛浓度当作100%福尔马林来配制固定液，例如，将10mL市售甲醛水溶液（常当作40%甲醛浓度）加上90mL水，配制10%福尔马林固定液。

福尔马林固定组织时渗透力强、组织收缩少，能使组织硬化并增高组织的弹性，固定组织较为均匀，但经过酒精脱水和石蜡包埋后收缩很大。福尔马林不能使白蛋白和核蛋白凝固，但能保存类脂物，可用于高尔基体及线粒体固定，为一般病理制片常用，不过很少单独用它来固定这些细胞组成。在测定细胞内DNA含量时，常用10%的中性福尔马林作为固定液。福尔马林固定后组织不需水洗，可直接投入酒精中脱水，但经长期固定的标本，须经流水冲洗24h，否则就会影响染色，特别是测定DNA含量时尤应注意。使用福尔马林固定的细胞，碱性染料染色效果比酸性染料好，故细胞核的染色较细胞质的好。

甲醛是一种强的还原剂，容易氧化成甲酸，故不能与铬酸或锇酸等混合使用。此外，甲醛贮存过久则会变成蚁醛酸，可加入5%吡啶来中和。甲醛对于脂肪既不保存也不破坏，对于磷脂则有保存的功用。

3. 冰醋酸 (glacial acetic acid) CH_3COOH

纯乙酸在低温时即凝结成冰花状结晶，所以又叫冰醋酸，它是带有强烈刺激性气味的无色液体，其熔点为 17°C ，能和酒精及水混合，为许多混合固定剂的成分之一。适合固定的乙酸浓度为0.3%~5%，固定组织常用5%的乙酸溶液。乙酸不能沉淀细胞质中的白细胞、球细胞，但能沉淀细胞核内的核蛋白，所以对染色质或染色体的固定与染色都有促进作用。由于乙酸不能固定脂质物，因此，在固定线粒体及高尔基体时不用高浓度的乙酸（若使用，也仅用0.3%以下浓度）。乙酸也不能保存碳水化合物。

乙酸主要的特点是渗透性很强，对适合的材料只需固定1h，一般可使细胞膨胀并防止收缩；同时，因为它不能凝固细胞质的蛋白质，所以组织不会硬化，常和酒精、福尔马林、铬酸等容易引起材料变硬和收缩的液体混合，以起到相互平衡的作用。

4. 铬酸 (chromic acid) H_2CrO_4

铬酸为三氧化铬(CrO_3)的水化物，红棕色晶体，是一种很好的固定剂，可以使蛋白质、核蛋白、核酸等产生良好的沉淀，而且所产生的沉淀不再溶解。铬酸对脂肪无作用，对其他类脂物作用未定，适合固定的浓度0.5%~1%。

铬酸很容易潮解，故平时存放的容器必须严密封紧。由于铬酸为一种强烈的氧化剂，因此不能与酒精或甲醛等还原剂预先混合，混合好后必须立即使用，否则失效。例如铬酸遇到酒精，很快被还原为氧化铬(Cr_2O_3)而失去固定的作用。

组织固定在铬酸中时，不能直接暴露在阳光下，否则会引起已固定的蛋白质分解。固定后的组织，必须经流水冲洗21h，或用大量静水洗并时时换水，直到组织中不含铬酸为止。如冲洗不干净，或直接投入酒精中，则将被还原为绿色的氧化铬，并发生沉淀，导致染色困难（特别对洋红的着色影响尤大）。

铬酸在制片技术上广泛使用，尤其在细胞学研究方面是必不可少的药剂，是许多杀死剂和固定剂的基本成分，其缺点是容易使组织收缩，渗透力较弱，且能使组织发生过度硬化，沉淀作用强烈，故很少单独使用，而是常与作用相反的其他药剂混合使用，克服上述缺点，从而得到良好效果。

5. 苦味酸 (picric acid) $\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$

苦味酸又名三硝基苯酚，是一种淡黄色具光泽的结晶，为一种强烈的爆炸药，干粉遇高

温或撞击时易爆炸，因此常以过饱和水溶液进行保存，它在水中的溶解度根据室内温度而有所变化，一般溶解度约为 0.9%~1.2%，亦可溶于酒精（4.9%）、氯仿、醚、二甲苯及苯（10%）中。适合固定的浓度为饱和水溶液（约为 0.9%~1.2%）。

苦味酸可沉淀一切蛋白质，该沉淀为苦味酸与蛋白质的化合物，不溶于水，它对类脂物无作用，也不能固定碳水化合物。苦味酸的渗透力强，能使组织发生较强收缩，但不使组织硬化，并可增进随后的染色效果。

苦味酸很少单独使用，常与其他溶液配合用作固定剂。材料用苦味酸溶液固定后，可用 50% 或 70% 酒精洗涤，而不能用水冲洗（否则沉淀物将会被破坏），也可不经专门酒精洗涤（因为脱水时要经过一系列不同浓度的酒精，这一脱水过程可起到洗涤作用，而且材料在染色过程又需经过酒精及二甲苯等，亦可不断地洗去此种物质）。经处理后，组织中虽存留着黄色，但此颜色对于染色并无多大影响。若要洗净，可在 70% 酒精中加入少许碳酸锂或氨水进行洗涤即可。

6. 锇酸 (osmic acid) OsO_4

锇酸即四氧化锇，是一种淡黄色的结晶，有剧毒。锇酸不是一种酸类，其溶液呈中性反应。此药品十分昂贵，通常将 0.5g 或 1g 结晶封储在小玻璃管内，配制溶液时，连同小管在瓶中击碎。锇酸是一种强烈的氧化剂，不能和酒精、甲醛混合，其水溶液饱和度为 6%，适合固定的浓度为 0.5%~2%，常备溶液为 2%。配制时需要特别小心，所用的蒸馏水要绝对纯净，还须贮藏在洗净的有玻璃塞的滴瓶中。在配制前须将玻管外商标洗去，并用酒精将有机物洗掉，然后在清洁剂中浸泡 10min，再用蒸馏水冲洗几次，待干后再投入滴瓶中加入一定量的蒸馏水，连同小玻管在瓶中击碎。如果所用的蒸馏水及盛具含有极微量的有机质存在时，也可使其还原为黑色，而失去固定的效应。配制好的锇酸溶液易挥发，故需密盖，外包黑纸，置于暗处或冰箱中。锇酸所挥发的气体能损害眼睛及黏膜，所以工作时不要接近面部。

为了便于保存，防止其还原，可用下列方法处理：

- 1) 在溶液中加入适量高锰酸钾，使溶液呈玫瑰色（如颜色减退，可再次加入）；
- 2) 将锇酸溶于 1% 的铬酸溶液中配成 1% 的溶液；
- 3) 在溶液中加入少许碘化钠；
- 4) 在 100mL 的 1% 锇酸水溶液中，加入 10 滴 5% 氧化汞。

锇酸是目前制片技术中最好的固定剂，特别是用于细胞学方面材料的固定效果更好，但由于其价格昂贵，故一般实验不常应用。电子显微镜技术超薄切片中常用锇酸作固定剂，同时亦作电子染色。锇酸不沉淀蛋白质，而是使蛋白质凝胶化，所以蛋白质被固定得很均匀，且可防止经酒精时使蛋白质发生沉淀，故用锇酸所固定的细胞能保持生活时的均匀性。锇酸还是类脂物的唯一固定剂，常用于高尔基体和线粒体的固定。锇酸被细胞中的油精 (olein, 存在于多数脂肪中) 还原成氢氧化锇 $[\text{Os}(\text{OH})_4]$ 成黑色沉淀，这样脂肪才不为多数脂溶剂（如苯）所溶解。但是，锇酸易溶于二甲苯，故制片时，最好以苯代替二甲苯，可得较好的结果。

锇酸的渗透力很弱，且不易将组织块固定均匀，往往材料外面固定过度而里面尚未完全固定，所以材料应该越小越好，待材料已全呈棕黑色时，表示固定作用完成。经此液固定的材料能保持组织柔软，且能防止组织经酒精时继续硬化。经锇酸固定的组织，能增强染色质对碱性染料的着色能力，而减弱细胞质的着色能力。

锇酸固定的材料，在脱水之前必须在流水中彻底洗涤，约需一昼夜时间，若切片后发现

内部仍呈黑色，可在等量的 3% 过氧化氢和蒸馏水混合液中漂白，否则在脱水时遇酒精即被还原而发生沉淀。

7. 氯化汞 (mercuric chloride) HgCl_2

氯化汞又名升汞，是一种剧毒的无色粉末，以针状结晶者为纯洁，能溶于水、醇、醚及吡啶中，适合固定的浓度为饱和或近似饱和水溶液，常备溶液为饱和（约为 7%）溶液。氯化汞不单独使用，而是常与乙酸等混合。

氯化汞是一种杀死力强、渗透力迅速、对蛋白质有强烈沉淀作用的固定剂，其缺点是容易引起细胞发生收缩现象。氯化汞不破坏类脂物及碳水化合物，但对它们亦无固定作用。

因为氯化汞易留存于组织中成为结晶体，故经氯化汞固定后必须彻底洗净。用饱和水溶液固定的要用水冲洗干净。用 70% 酒精为溶剂配制的氯化汞固定剂，则要用同浓度的酒精冲洗，如不能将它完全洗去则可在酒精中加一滴碘酒，酒精即成茶色，此时可将一部分黑色结晶除去；数小时后，由于碘与汞结合，茶色即消失，这时可再加几滴碘酒，直到加入碘酒后不再褪色即表明沉淀物已完全洗去。若汞去净后棕色的碘仍留在组织内，则可延长在 70% 酒精中的浸泡时间，或用 5% 硫代硫酸钠将碘液洗去。

经氯化汞固定的材料，要迅速进行包埋，以免材料久置后变质。含有氯化汞的固定液，对于细胞学的研究不宜使用。此固定液固定的组织对洋红、番红、苏木精等染色都很好，染色质能强烈地被碱性染料着色；而细胞质的结构也都能被酸性染料与碱性染料着色。

8. 重铬酸钾 (potassium dichromate) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

重铬酸钾是一种橙色结晶粉末，有毒，在水中溶解度大约 9%，其水溶液带酸性。适合固定的浓度为 1%~3%，常备溶液浓度为 3% 和 5%。

重铬酸钾是一种强烈的氧化剂，因此不能与酒精、甲醛等混合贮存。此外，重铬酸钾还是一种强烈的硬化剂。重铬酸钾能使蛋白质均匀固定而不沉淀，对脂肪无作用，对线粒体的作用因情况不同而异，由于其穿透速度慢且渗透力弱，固定后组织收缩很少，有时反而稍膨胀，不过，经过酒精脱水和石蜡包埋后，其收缩程度会变得明显，一般用于固定较小的材料。固定材料须经流水冲洗 12h 或用亚硫酸洗涤，若直接进入酒精，则将形成氧化铬 (Cr_2O_3) 沉淀于组织中。

重铬酸钾很少单独使用，常与其他药品配合使用。因为配合后酸碱度不同，对于组织的固定可以产生两种固定象。当重铬酸钾与酸性液体混合后，pH 值在 4.2 以下时，其固定性能像铬酸，可以固定染色体，细胞质、染色质则沉淀为网状，但不能固定细胞质中的线粒体，如果 pH 值在 5.2 以上时，染色体被溶解，染色质的网状不明显，但是细胞质则保存得均匀一致，尤其对线粒体固定有很好的效果。

9. 碘 (iodine) I_2

碘是一种很好的防腐剂，可与碘化钾配合成为良好的固定剂。配制方法：取饱和的碘化钾水溶液若干，加入碘的结晶直到饱和为止，经过滤再用蒸馏水稀释至淡棕色溶液，是低等单细胞生物、群体生物以及藻类植物等的良好固定剂。它的渗透力较强，如与冰醋酸或甲醛配合可得到良好效果。固定后用流水冲洗，如材料中还有淀粉核被着色未能洗去，可在水中加入 0.5% 鞣酸水溶液，即可将各种色彩除尽。

(二) 混合固定剂

混合固定剂是利用两种（或以上）单一固定剂各自的优缺点相互平衡而配成，配制的原

则一般有两点：①混合固定剂对组织的作用能够相互平衡，如一种固定剂使细胞收缩，另一种固定剂使细胞膨胀，则二者配合后使其优缺点相互抵消；②可利用一些固定剂的优点来弥补另一固定剂的缺点，如饿酸的杀死力极高，但渗透力却很低，可用乙酸来弥补它的缺点。需特别注意的是，强氧化性固定剂不能与强还原性固定剂同时配制在一起，若需混合使用，则两者分开配制，待临用时再混合。常见混合固定剂有：

1. 酒精-乙酸混合液

(1) 卡诺氏液 (Carnoy's fluid)

卡诺氏液能固定细胞浆和细胞核（尤其适用于染色体），故多用于细胞学研究制片。其中，纯酒精可固定细胞浆及沉淀肝糖，冰醋酸可固定染色质及防止酒精的硬化、收缩，并可增加渗透力，对外膜致密不易透入的组织特别适合。该液固定的组织适合各种染色法。

卡诺氏液常用配方有两种：

方法一：纯酒精 60mL、冰醋酸 10mL、氯仿（三氯甲烷）30mL；

方法二：纯酒精 75mL、冰醋酸 25mL。

卡诺氏液渗透力强、穿透速度快，小块组织一般固定 20~40min，大型材料不超过 4h。如：根尖固定 15min，花药固定 1h，蚕精巢 10min，马蛔虫子宫 30~40min，小白鼠睾丸 30~50min。如放置过久，对组织不仅会产生膨胀作用，且有硬化现象。此液尤其适用于固定染色体、中心体，对固定有丝分裂最合宜。此外，卡诺氏液对固定腺体、淋巴组织也具有较好效果，并能固定原生质动物的胞壳，固定后用 95% 酒精或纯酒精洗涤 3 次，即可很快进行透明。如材料经此液固定后不能及时进行下一步操作，可保存于 80% 酒精中。

(2) 吉耳桑氏液 (Gilson's fluid)

该液适用于固定肉质菌类，特别是柔软胶质状的材料（如木耳），也适用于无脊椎动物材料的固定。

配方：60% 酒精 50mL、冰醋酸 2mL、80% 硝酸 7.5mL、升汞 10g、蒸馏水 440mL。该混合液保存 24h 后即失效，须现配现用。

一般固定 18~20h，用 50% 酒精冲洗，残留在组织中的升汞必须洗掉。

2. 福尔马林-乙酸-酒精混合液

植物组织除单细胞及丝状藻类外均适用，也适于昆虫和甲壳类的固定，但不适于作细胞学研究。

配方：50% 或 70% 酒精 90mL、冰醋酸 5mL 或较少、福尔马林 5mL 或较多。

配制此液时，其分量差异甚大，视材料性质而异，例如：固定木材，可略减冰醋酸、略增福尔马林；易于收缩的材料，可用增冰醋酸。

如用于作植物胚胎材料，则其配方可改为：50% 酒精 89mL、冰醋酸 6mL、福尔马林 5mL。

处理柔软材料（特别是苔藓植物）时，可用低度（50%）酒精。固定时间最短需 18h，也可无限期延长。木质小枝须至少固定一周。冲洗时材料可直接换入 50% 酒精中洗一两次即可，但木质材料应流水冲洗 48h，并在酒精（50%）和甘油溶液（1:1）中浸 2~3d，使其软化。

Mossman 氏液（福尔马林 10mL+95% 乙醇 30mL+冰醋酸 10mL+蒸馏水 50mL）渗透力较强，并兼有脱钙作用，适用于固定哺乳动物胚胎。

3. 铬酸-乙酸混合液

铬酸-乙酸固定液在生物制片中应用甚广，一般都可得到很好的效果，但多用于藻类、菌类、蕨类及其他植物组织的固定。铬酸与乙酸有几种不同的配合比例，主要根据材料和经验而加以变更。

配方一：10%铬酸水溶液 2.5mL、10%乙酸水溶液 5.0mL，加蒸馏水至 100mL。此液适用于容易穿透的植物组织，如藻类、菌类、苔藓、蕨类植物的原叶体，固定 12~24h 或更长。藻类和原叶体可缩短为数分钟到几小时。固定后流水冲洗 12~24h。

配方二：10%铬酸水溶液 7mL、10%乙酸水溶液 10mL，加蒸馏水至 100mL。该配方适用于植物组织，如根尖、小的子房或分离出来的胚珠。为了易于穿透，有时在该液中加入 2%麦芽糖或尿素，或 0.3%~0.5%皂草苷。固定时间 12~24h 或更长。固定后流水冲洗 24h。

配方三：10%铬酸水溶液 10mL、10%乙酸水溶液 30mL，加蒸馏水至 100mL。该配方适用于木材、坚韧叶子、成熟子房等植物组织。如有需要，可分别如上法添加麦芽糖、尿素或皂草苷。固定 24h 或更长。固定后流水冲洗 24h。

4. 铬酸-乙酸-甲醛混合液

铬酸-乙酸-甲醛固定液又名纳瓦申 (Nawashin) 固定液，该固定液系纳氏于 1912 年首创，此液到目前为止，经许多学者加以变更，种类较多。常用的改良纳瓦申固定液有以下几种 (表 1-1)。

表 1-1 纳瓦申固定液

单位: mL

常备液		纳瓦申原液	纳瓦申固定液改良配方				
			I	II	III	IV	V
甲液	1%铬酸		40	40	60		
	10%铬酸	15				8	10
	10%乙酸		15	20	40	60	70
	冰醋酸	10					
	蒸馏水	75	45	40		32	20
乙液	福尔马林	40	10	10	20	20	30
	蒸馏水	60	90	90	80	80	70

此固定液为细胞学和胚胎学研究最适用且效果良好的固定液。在固定植物材料时，一般先用卡诺氏液固定 5~10min，然后再换此液，因小麦的子房、芽等材料的外部密被绒毛，用水溶液的固定液不易渗透，采用这种方法效果较好。

甲液中的铬酸为强氧化剂，而乙液中的甲醛则为还原剂，因此两液不能预先混合，在使用之前才将甲、乙液等量混合。表 1-1 中 I~V 号固定液对一般细胞学及组织学都适用。具体选用哪种固定液，视材料的柔嫩或坚韧程度而定，柔嫩而含水多者可选低浓度固定液 I 或 II，坚韧者可选高浓度 IV 或 V。其中以 III 最为常用。

上述五种固定液的固定时间为 12~48h。I、II 号固定液可在水中冲洗；III、IV 号液可在 35%酒精中冲洗；V 号液固定后可直接移入 70%酒精中，每隔 0.5h 左右换一次，待绝大部分固定液洗去后，再移入 83%酒精中脱水。

5. 苦味酸混合固定液

苦味酸混合固定液又称为波恩 (Bouin) 液, 在动物制片中应用甚广, 如一般的动物组织、昆虫组织、无脊椎动物的卵和幼虫、胚胎学材料的固定。该液渗透迅速, 固定均匀, 组织收缩少, 可把一般的微细结构显示出来, 对苏木精及酸性复红易于着色。

一般组织固定 12~24h, 小块组织数小时 (4~16h) 即可。固定后即可加入 70% 的酒精洗去苦味酸, 可在每次更换酒精时加入一滴氨水以中和、漂白苦味酸, 或加入少许碳酸钾饱和水溶液以洗去黄色。组织在经酒精脱水时也可洗去苦味酸, 即使留有少量苦味酸, 对一般染色并无影响。

苦味酸混合固定液在植物制片中常易使材料变脆, 造成切片困难, 因而很少用原来的配方。目前在植物切片技术上所采用的均为经过改良的配方 (表 1-2), 对于裸子植物的雌配子体和被子植物囊胚自由核时期及根尖分裂细胞的固定效果良好, 因此在植物胚胎学的研究方面广为应用。

表 1-2 波恩液及其改良配方

常备液		波恩原液	改良配方			
			I	II	III	IV
甲液	苦味酸饱和溶液/mL	75	75	75	20	35
	福尔马林/mL	25	25	15	10	10
	10%乙酸/mL				20	
	冰醋酸/mL	5	5	10		5
乙液	1%铬酸/mL				50	50
	铬酸/g		1.5	1		
	尿素/g		2	1		

改良配方 I 称为埃伦式改订液 B-15, 适用于哺乳类组织, 特别对染色体的固定最适合; 也适用于植物组织, 特别是对芽的固定有良好效果, 对细胞分裂中期和后期染色体的固定特别好。该固定液的配制方法为: 先将甲液加热到 37℃, 然后加入 1.5g 铬酸, 搅拌均匀后, 再加尿素 2g, 此时即可放入材料, 温度保持在 37~39℃。配制时所用药品必须纯净, 如福尔马林不纯, 加尿素后将有沉淀; 如配合后出现黑色而不是红棕色, 可能是福尔马林或铬酸不纯。此混合液中铬酸易被福尔马林还原, 配制后约 0.5h 即可转变为绿色, 很快失去效用, 因此该液配制后须立刻使用。一般在 1~4h 内可完全固定, 但材料仍可留在其中过夜。可直接在 70% 酒精中洗涤, 时时更换, 直到无黄色为止。

改良配方 II 称为埃伦式改订液 B-3, 该固定液适用于直翅目昆虫生殖细胞染色体固定。配制方法: 将甲液加 1g 尿素后, 稍加温并搅拌到完全溶解为止。同时可在 5mL 此液中加 50% 的铬酸水溶液 4 滴。使用方法同 B-15。

改良配方 III 和 IV 称为萨斯氏改订液。该固定液适用于百合科植物的芽和花药, 也适用于植物胚胎学材料的固定。使用之前将甲、乙两液等量混合。使用方法同 B-15。

6. 升汞混合液

(1) Zenker 氏液

配方: 升汞 5.0g
重铬酸钾 2.5g

碳酸钠	1g (可略去不用, 因无固定作用)
蒸馏水	100mL (以上为 Zenker 贮存液)
冰醋酸	5mL (用时加入)

配制此液可将升汞、重铬酸钾一起置于蒸馏水中, 加温至 40~50℃使其溶解, 冷却后过滤, 贮于棕色瓶内, 用时取贮存液 95mL, 再加入冰醋酸 5mL 即成, pH 值 2.3。

升汞混合液的固定作用是铬酸、乙酸和升汞产生的, 其中铬酸由乙酸加入后重铬酸钾酸化而产生。铬酸和升汞为蛋白质沉淀剂, 也能沉淀染色质, 乙酸为染色质沉淀剂。铬酸可防止升汞过分硬化组织, 乙酸可减少组织被铬酸收缩的倾向, 并可弥补铬酸穿透慢的弱点。

Zenker 氏液为组织学、细胞学及病理学研究常用的固定剂, 多用于一般组织, 能使细胞核和细胞浆染色较为清晰, 固定时间 12~36h, 加热固定可以加快渗透作用。固定后流水冲洗 12h, 在乙醇 (70%) 脱水过程中加入碘液 (0.5% 碘酒精) 以去汞。

(2) Helly 氏液 (Zenker-formol)

将上述 Zenker 氏液配方中的冰醋酸换成甲醛液 5mL 即成 (因加入甲醛 24h 后即生成沉淀而失效, 故须在用时加入)。

配方: 升汞	5.0g
重铬酸钾	2.5g
碳酸钠	1g (可略去不用, 因无固定作用)
蒸馏水	100mL
甲醛 (40%)	5mL (用时加入)

此液的固定作用在重铬酸钾、升汞及甲醛。重铬酸钾可固定类脂体, 故能把线粒体固定得很好。升汞可防止重铬酸钾对染色质的溶解, 也是蛋白质沉淀剂, 故细胞浆固定良好。甲醛为促染剂, 使细胞浆、线粒体易于染色。

Helly 氏液常用于研究线粒体、细胞浆、细胞核固定较好, 也为固定细胞颗粒最好的固定剂, 用于造血管器、脾、肝等组织最为适宜。一般大小组织固定 12~24h, 固定后流水冲洗 12~24h, 用碘酒精去汞。

(3) Maximov 氏液

配方: Zenker 贮存液	100mL
甲醛 (中性)	10mL

此液主要使用甲醛代替 Zenker 氏液中的冰醋酸, 因此不产生铬酸成分。重铬酸钾未酸化, 对细胞浆固定很好。甲醛稍有促染细胞浆的作用, 增加对酸性染料的亲和力。升汞对细胞核染色较好。

(4) Heidenhain 氏 “Susa” 液

配方: 升汞	4.5g
氯化钠	0.5g
三氯乙酸	2g
冰醋酸	4mL
甲醛	20mL
蒸馏水	80mL

此液为正常或病理组织较好的固定剂之一, 因含有三氯乙酸和氯化钾, 对较硬的组织特别有用, 如皮肤、蛔虫、昆虫幼虫等角质层较厚的组织均可采用。该液渗透力强, 2mm 的薄块组织只需 3h, 固定后直接投入 95% 酒精中 (勿入水或低浓度酒精, 以免结缔组织膨