

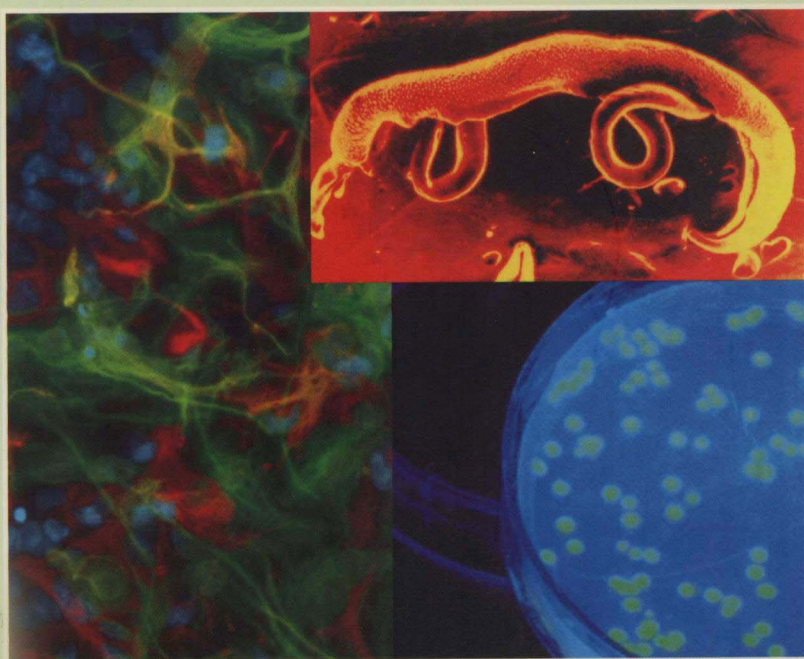
■ 供医学类本科使用

医学形态学

实验指导

(一)

冯一中 诸葛洪祥 徐培君 主编



◆ 苏州大学出版社

实验指导

第一册 力学实验 热学实验 电磁学实验



编 者 王 伟 王 伟 王 伟

医学形态学实验指导(一)

(供医学类本科使用)

主 编 冯一中 诸葛洪祥 徐培君

苏州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学形态学实验指导(一). /冯一中, 诸葛洪祥,
徐培君主编. —苏州: 苏州大学出版社, 2004. 8
(供医学类本科使用)
ISBN 7-81090-327-6

I. 医… II. ①冯…②诸…③徐… III. ①病理
解剖学—实验②微生物学: 医药学—实验③寄生虫学:
医学—实验 IV. R36-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 084256 号

医学形态学实验指导(一)

诸葛洪祥 徐培君 主编

责任编辑 肖丽娟

苏州大学出版社出版发行

(地址: 苏州市干将东路 200 号 邮编: 215021)

常州市武进第三印刷有限公司印装

(地址: 常州市湟里镇村前街 邮编: 213154)

开本 787×1092 1/16 印张 11.5 字数 287 千

2004 年 8 月第 1 版 2004 年 8 月第 1 次印刷

印数 1-2100 册

ISBN 7-81090-327-6/R·12(课) 定价: 25.00 元

苏州大学版图书若有印装错误, 本社负责调换
苏州大学出版社营销部 电话: 0512-67258835

《医学形态学实验指导(一)》编委名单

编 者 (按姓氏笔画排列)

冯一中(病理学教授)

徐培君(微生物学副教授)

夏超明(寄生虫学教授)

谢 芳(病理学讲师)

黄 瑞(微生物学教授)

诸葛洪祥(寄生虫学教授)

前 言

医学形态学是一门实践性很强的学科,不断改革和提高医学实验教学对提高学生的动手能力,促进他们创造性思维的形成和发展,提高他们分析问题和解决问题的能力有着十分重要的意义。在此基础上,我校成立医学形态实验中心,并编写这本《医学形态学实验指导(一)》,从形态学的角度进一步加强学生学与用的结合、理论与实践的结合、基础与临床的结合。该书包括形态实验总的情况介绍及以下三门课程的实验指导:病理解剖学、病原生物学·医学微生物学部分、病原生物学·人体寄生虫部分。每个部分既有内在相关性又有相对的独立性,同时我们也希望在今后的工作实践中,多开设一些切实可行的综合性实验。

从 50 年代起,在胡人俊、朱砚蕴、刘振延、吴德明、孟阳春、李允鹤、蓝明扬、唐学恒、孙溱安、王焕妞、张润生、林发榕和刘晓霞等几代相关学科专家们辛勤耕耘的基础上,该书历时一年多,由院系安排有关老师经反复讨论、修改和审定而成。在此对支持、参与该书编写工作的院系领导、实验室负责人、老师及实验技术人员表示衷心感谢。并希望各院系把意见和建议及时反馈给我们,以便今后做得更好。

编 者

二〇〇四年五月

目 录

第一章 总 论

第一节	医学形态学实验室总则	(1)
第二节	显微镜的结构及使用方法	(1)
第三节	组织切片制作技术	(6)
第四节	电镜样品的基本制作技术	(7)

第二章 病理解剖学

第一节	实习须知	(10)
第二节	细胞与组织的损伤和修复	(11)
第三节	局部血液循环障碍	(14)
第四节	炎症	(17)
第五节	肿瘤	(20)
第六节	心血管系统疾病	(28)
第七节	呼吸系统疾病	(31)
第八节	消化系统疾病	(33)
第九节	淋巴造血系统疾病	(37)
第十节	泌尿系统疾病	(38)
第十一节	生殖系统疾病	(40)
第十二节	内分泌系统疾病(甲状腺疾病)	(42)
第十三节	传染病	(43)
第十四节	寄生虫病	(47)
第十五节	临床病理讨论	(49)

第三章 病原生物学·医学微生物学

第一节	细菌的形态与结构的检查法	(54)
第二节	细菌的培养法	(58)
第三节	细菌代谢产物的检查	(62)
第四节	细菌的分布	(64)
第五节	物理因素对微生物的影响	(65)
第六节	化学因素及生物因素对细菌的影响	(67)
第七节	细菌的遗传变异	(71)
第八节	细菌的致病作用	(79)
第九节	非特异性免疫	(82)
第十节	抗原抗体反应	(84)
第十一节	免疫标记技术	(86)

第十二节	化脓性球菌	(90)
第十三节	肠道杆菌未知标本的检查	(92)
第十四节	肠热症的血清学检查——肥达试验	(94)
第十五节	白喉棒状杆菌	(95)
第十六节	分枝杆菌	(96)
第十七节	芽胞菌	(97)
第十八节	革兰阴性小杆菌	(98)
第十九节	病毒的形态学	(99)
第二十节	病毒培养法	(101)
第二十一节	病毒的血清学试验	(106)
第二十二节	其他微生物	(109)
第二十三节	病原性真菌	(112)

第四章 病原生物学·人体寄生虫学

第一节	线虫概论、蛔虫、鞭虫	(114)
第二节	蛲虫、钩虫	(116)
第三节	丝虫、旋毛虫	(124)
第四节	华支睾吸虫、布氏姜片虫	(127)
第五节	血吸虫	(129)
第六节	卫氏并殖吸虫、斯氏狸殖吸虫	(134)
第七节	猪带绦虫、牛带绦虫	(136)
第八节	细粒棘球绦虫(包生绦虫)	(138)
第九节	血液和组织内寄生虫的实验诊断	(139)
第十节	医学蠕虫小结和复习	(140)
第十一节	溶组织内阿米巴(痢疾阿米巴)	(144)
第十二节	杜氏利什曼原虫、蓝氏贾第鞭毛虫、阴道毛滴虫	(147)
第十三节	疟原虫	(150)
第十四节	刚地弓形虫、结肠小袋纤毛虫	(155)
第十五节	医学原虫小结和复习	(157)
第十六节	蛛形纲: 蜱、螨	(159)
第十七节	蚊(附: 白蛉)	(161)
第十八节	蝇、蚤、虱(附: 蜚蠊、臭虫)	(163)
第十九节	医学昆虫小结	(165)
第二十节	总复习	(165)

[附录 I]	英语关键词	(171)
[附录 II]	溶液配制	(173)
[附录 III]	阿培脱异染颗粒染色法和艾力克平板	(174)
[附录 IV]	冯太奈镀银染色液的配制	(175)
[附录 V]	LD ₅₀ 的计算方法	(176)

第一章 总 论

第一节 医学形态学实验室总则

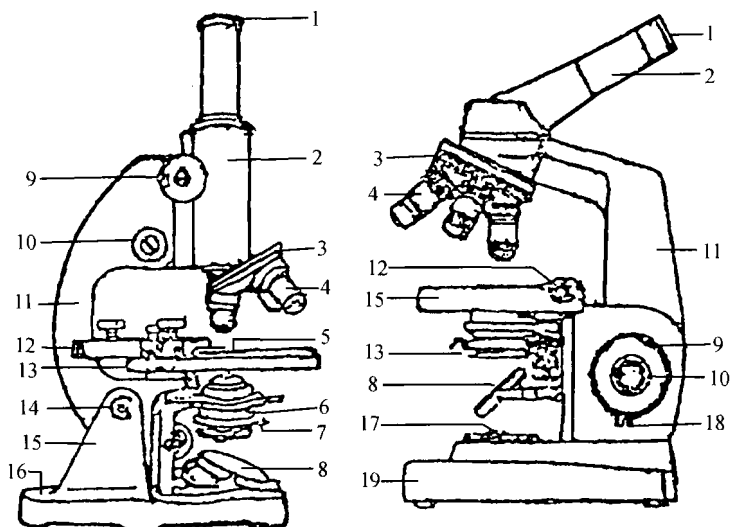
医学形态学实验的目的是使学生理论联系实际,验证与巩固课堂理论知识;同时,对学生进行与医学有关的形态学观察和操作技能的训练,培养学生独立思考、独立工作的能力;通过实验使学生树立实事求是的科学态度和严谨细致的工作作风,具有良好的社会公德和团结互助的精神。为此,在医学形态学实验课的教学中,学生必须遵守下列规则:

1. 实验前必须做好一切准备工作,预习该次的实验指导,了解实验的目的、内容和主要操作方法。同时,必须带齐与实验有关的用品,如教科书、实验指导、笔记本、绘图用具和显微镜卡等。
2. 认真听讲,听从老师的指导,严格按照实验指导的操作步骤进行实验。
3. 进实验室必须穿实验工作服。
4. 实验室内不准吸烟、吃东西。
5. 实验室用过的带有传染性物质的吸管、玻片等应分别放在指定的消毒器具内。待消毒或废弃物品必须放在指定的地点。
6. 如有传染性材料污染桌面、地面、书和衣物等,应立即报告老师,并用0.1%新洁尔灭溶液处理半小时,或用其他方法处理后洗净。
7. 如有活菌碰到手上应将手浸泡在0.1%新洁尔灭溶液中5~10 min,然后用自来水冲洗。
8. 实验时,应细心观察和操作,认真做好实验记录,分析实验结果,按时完成实验报告。
9. 遵守课堂纪律,不无故迟到或早退。保持课堂安静,不喧哗;不乱丢纸屑与实验废弃材料,保持实验室的整洁。
10. 爱护国家财产,爱惜仪器设备和标本,节约实验材料、药品和水电;损坏标本仪器应立即报告老师,并主动登记,按规定赔偿或酌情处理。实验完毕,应将有关的器具洗净擦干归还原处。
11. 实验完毕,桌面应整理清洁,不可将火柴梗、擦镜纸投入水槽内,用过的物品归还原处(如接种环、染色液、香柏油、火柴等),实验室打扫干净,关好水、电和门窗等。
12. 实验材料不得携带出实验室。
13. 用消毒液浸泡双手,再用自来水冲干净,脱去实验服,方可离开实验室。

第二节 显微镜的结构及使用方法

一、显微镜的结构

光学显微镜由机械、照明和光学三部分组成(图 1-1)。



1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜 5. 通光孔 6. 聚光器 7. 光圈 8. 反光镜
9. 粗调节器 10. 细调节器 11. 镜臂 12. 推进器 13. 载物台 14. 倾斜关节 15. 镜柱
16. 镜座 17. 照明装置 18. 粗调限位环凸柄 19. 滤光片座

图 1-1 显微镜的结构

(一) 机械部分

1. 镜座:通常为马蹄形,用以稳定和支持镜体。

2. 镜柱:与镜座和镜臂相连接的短柱。

3. 镜臂:镜柱上方的弯曲部分,便于握拿。镜臂、镜柱之间有一可动关节,称倾斜关节,使用时可使镜筒成一定角度的倾斜,但倾斜角度不应超过 45° ,以免翻倒。

4. 镜筒:连接镜臂前方的圆筒,上端装目镜,下端装旋转器。

5. 物镜旋转器:是镜筒下端一个能旋转的凹形圆盘,一般装有 2~4 个放大倍数不同的物镜,旋转它可以调换物镜。注意在旋转器的边缘,即每一物镜位置的正上方有一缺刻,而在旋转器基座的正后方又有一固定扣,当转换物镜时,一定要将该物镜上方的缺刻和基座上的固定扣相扣接,否则无法观察标本。

6. 镜台(载物台):与镜柱相连接的方形平台,用以放置玻片标本。镜台中央有一圆孔,可通光线,为通光孔。镜台后部装有玻片标本推进器(移动尺)。移动尺左侧附有弧形弹簧,用来夹持玻片标本;右侧有两个移动标本的旋钮,分别调节标本向左右或前后方向移动。移动尺上刻有刻度,是确定标本在视野中位置的标记。如果在第一次找到标本时记住横向及纵向两个刻度的读数,使用同一架显微镜时,根据读数可再次找到原观察到的标本。

7. 调节器:在镜臂上有大小两种螺旋,为调节焦距之用,称调节器。大螺旋为粗调节器,转动时可使镜筒以较快速度或较大距离升降,适于低倍镜使用;小螺旋为细调节器,转动时可使镜筒缓慢升降,适于高倍镜、油镜或分辨物像的清晰度和标本的不同层次。

(二) 照明部分

1. 反光镜:位于镜柱前方的一个圆形平、凹两面镜,能转向各方,将光线反射进入聚光器。凹面有聚光作用,适用于较弱光和散射光。当光线较强时采用平面镜。

2. 聚光器:位于镜台通光孔下方,由一组透镜组成,能聚集光线,增强视野的亮度。其左下方有一小螺旋,转动时可升降聚光器。上升时,光线增强;下降时,则光线减弱。

3. 光圈:装在聚光器下方,由许多金属片组成,外侧有一小柄,拨动时可使光圈扩大或缩小,以调节亮度。光圈大则光线强,适于观察深色的标本;色浅或透明的标本,则应缩小光圈观察。

(三) 光学部分

1. 目镜:装于镜筒上端,其刻有 $10\times$ 或 $15\times$ 等符号,以表示目镜放大倍数。为了便于指出观察目标,常在目镜筒内装一根头发丝作为指针,以指明观察目的物的部位。

2. 物镜:嵌在旋转器下,一般有 3 个物镜。依放大倍数不同,分为低倍镜($10\times$)、高倍镜($40\times$)、油镜($100\times$)三种。

显微镜的放大倍数是目镜的放大倍数与物镜的放大倍数的乘积。如目镜为 $10\times$,物镜为 $45\times$,其放大倍数就为 $10\times 45=450$ 。

二、显微镜的使用和原理

光学显微镜的物镜有低倍、高倍镜和油镜 3 种,微生物学实验室经常使用油镜,因此油镜的使用必须熟练掌握。

(一) 油镜头的识别

油镜头上一般刻有 $90\times$ 、 $100\times$ 、 $\times$ Oil 或在镜头的下缘刻有一黑圈等标记。

(二) 油镜使用法

1. 对光:用低倍镜对光,检查染色标本时光线宜强,要抬高集光器,放大光圈。

2. 观察标本:

(1) 滴加香柏油一小滴于染色标本片上,将标本置于载物台上,移置待检部分于接物镜下。

(2) 将油镜头移至中央对准标本,头偏向镜筒左侧,眼睛从旁观察,并缓慢向下转动粗调节器,使镜筒下降,直至镜头浸于镜油中,但不要碰到玻片。然后将眼睛移至目镜,一面观察一面向上徐徐转动粗调节器至视野中看到模糊物像时,再换用细调节器调节至物像清晰为止。

(3) 观察标本时,应两眼同时张开,左眼观察,右眼用于绘图并记录结果。

(4) 标本观察完毕,向上转动粗调节器将镜筒提起,取下标本,用擦镜纸将镜头上的油擦净,若油已干,可用擦镜纸沾少许二甲苯擦去油迹,随即用擦镜纸擦去二甲苯。因二甲苯能溶解粘住透镜的胶质,如其未被擦去,日久后镜片将移位或脱落。然后将接物镜转成“八”字形,以免损坏油镜。

(三) 显微油镜的原理

自标本玻璃透过的光线,因介质密度不同,部分光线因折射而不能进入物镜,使射入物镜的光线减少,当使用高、低倍物镜时,透镜的孔径比较大,影响不显著。但油镜透镜孔径很小,射入镜内的光线很少,视野暗,物像模糊不清。若在油镜与载物玻片之间加一滴和玻璃折光率($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.55$),使通过的光线不产生折射,增加进入透镜的光线,使视野亮度增加,因此能清楚地看到物像。

三、显微镜的使用方法

(一) 低倍镜的使用

1. 准备:右手握镜臂,左手托镜座,把显微镜放在自己左肩前方的实验桌上,镜臂对着胸前,镜座后端距桌边约 5 cm 为宜。

2. 对光:转动大螺旋,使镜筒略升高,再转旋转器,使低倍镜对准通光孔,当听到轻微扣碰

声时,目镜和物镜的光轴一致。打开光圈,上升聚光器,双眼睁开,用左眼向目镜内观察,并将反光镜转向光源,直到视野内光线明亮均匀为止。

3. 置片:将标本有盖玻片的一面向上置于载物台上(切不可放反),并用弹簧夹将其夹住,然后旋转移动尺螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的中央。

4. 调焦:从侧面注视低倍镜,向外转动大螺旋,使镜筒缓慢下降,当低倍镜距标本约 0.5 cm 时,用左眼从目镜中观察视野,再慢慢向内转动大螺旋,使镜筒慢慢上升,当视野中出现物像时,再调节小螺旋,直到视野中出现清晰的物像为止。注意显微镜所成的物像是倒像。如果物像不在视野中心,可调节移动尺将其调到中心。如果视野内的亮度不合适,可以通过升降聚光器的位置或开闭光圈的大小来调节。如果在调节焦距时,镜头上升已超过工作距离(>6.5 mm)而未见到物像,说明此次操作已经失败,则应严格地按上述步骤重新操作,切不可心急而盲目地下降镜头。

注:当物像清晰时,物镜镜面与标本之间的距离,称为工作距离。物镜放大倍数越高,工作距离越短,反之亦然。

(二) 高倍镜的使用

1. 按上述操作程序,先在低倍镜下找到物像,将要放大的部分移至视野中央。

2. 转动旋转器,使高倍镜对准通光孔。用左眼从目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像。慢慢转动小螺旋,使镜筒微微升降,直到物像清晰为止。

(三) 油镜的使用

1. 应用油镜前必须先经过高倍镜找到标本,并将要放大的部位移到视野中央。

2. 将高倍镜头移开通光孔,在需要观察部位的盖玻片上滴加一滴香柏油,然后换上油镜头,使其与油滴接触。

3. 左眼观察目镜,慢慢转动小螺旋,直到物像清晰为止。

4. 油镜用后,应取沾有少许二甲苯的擦镜纸将镜头和玻片标本上的油擦干净(无盖片的标本不能擦)。临时制片因有水分,不能用油镜观察。

(四) 使用显微镜的注意事项

1. 拿显微镜时,应以右手握镜臂,左手托镜座,切勿一手斜提,前后摆动,以免零件碰坏或脱落。

2. 在使用倾斜关节时,倾斜角度不能超过 45° ,以防倾倒落地。如是带有液体的临时装片,则不可使用倾斜关节。因事离开座位时,必须将倾斜关节复原,镜头转离通光孔后方可离开。

3. 不得随便取出目镜,以免灰尘落入镜筒内,更不得任意拆卸零件。

4. 要保持显微镜的清洁,光学和照明部分污染时,用擦镜纸蘸少许二甲苯揩擦,切勿用手指、手帕或其他硬质物品擦拭。

5. 要养成两眼同时睁开的习惯,以左眼观察视野,右眼用以绘图。

6. 使用完毕,应上升镜筒,取下玻片,并转动旋转器,使物镜与镜台的中央孔叉开,再下降镜筒,使物镜接近镜台,并关闭光圈,下降集光器,垂直反光镜,复原倾斜关节,然后将其送还显微镜室。

四、显微镜的种类

除上述介绍的普通显微镜外,目前在生物学和医学研究中,常用的有以下几种显微镜。

(一) 双筒解剖显微镜

解剖较小标本或观察玻片的全貌时,需使用解剖显微镜,以观察自然状态的较小的实体(正像)和较大的玻片标本,或解剖细小生物。

(二) 暗视野显微镜

这是一种具有暗视集光器或中央遮光板的显微镜。即在聚光镜上加一特殊装置,使光线从聚光器透镜的边缘衍射或反射到标本上,经标本反射投入物镜内,使整个视野变暗,故能在视野中见到被检物体衍射之图像。这种显微镜可观察运动着的有机体。

(三) 荧光显微镜

其特点是以紫外光为光源,利用紫外光照射,使标本内的荧光物质激发出不同颜色的荧光,以研究标本内某些物质的特征和位置。有些物质本身能发出荧光,有些物质须经荧光染料染色后才能发出荧光。

(四) 相差显微镜

一般活细胞在普通光镜下,不能分辨其微细结构。这是由于各细微结构的折光性很近或对比不够显著的缘故。相差显微镜则在聚光器上装一个环状光阑,其物镜是安有相反的相差物镜。环状光阑的作用是造成空心的光线锥,使直线光和衍射光分离。相反的作用是使直射光和衍射光发生干涉,导致相位差变成振幅差(即明暗差),使反差加强。所以,可以观察不用染色的活细胞中的微细结构。

(五) 倒置显微镜

物镜位于标本的下方,而光源位于标本的上方。主要用于细胞培养时观察培养瓶中细胞的生长情况。

五、显微测微尺的用法

显微测微尺分为目镜测微尺和镜台测微尺,两尺要配合使用。

1. 目镜测微尺是一块圆形玻片,上面刻有 50 等分的刻度(图 1-2 上)。这种刻度只能代表相对长度(没有绝对值),所以在测量标本的大小时,首先要在不同倍数的物镜下由镜台测微尺进行标定后,才能代表真实长度。

2. 镜台测微尺是在一块特制的载玻片中央,封固一圆形的具有刻度的标尺(图 1-2 下),全长为 1~2 mm,上有 100 或 200 等分的小格,每小格的长度为 0.01 mm。

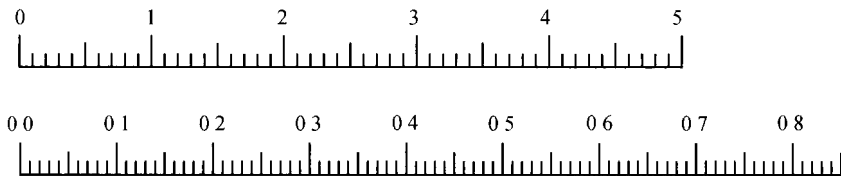


图 1-2 目镜测微尺(上)和镜台测微尺(下)

目镜测微尺的标定:

(1) 将镜台测微尺置于载物台中央,用低倍镜观察,找出镜台测微尺的刻度,每一大格为 0.1 mm,每一小格为 0.01 mm。

(2) 将目镜测微尺装进目镜中,再按常规操作找到镜台测微尺,把它移到视野中央,转动目镜,使目镜测微尺和镜台测微尺刻度平行,再移动镜台测微尺,使两尺重叠,零点对齐。记录目镜测微尺的全长所对应的镜台测微尺中的毫米数,并计算目镜测微尺每格的长度。

如在低倍镜下所标定的目镜测微尺的全长为 0.68 mm,其每小格的长度为:

$$\frac{0.68 \text{ mm}}{50 \text{ 格}} = 0.0136 \text{ mm/格}$$

这时可将镜台测微尺移去,换以标本。然后用目镜测微尺的刻度衡量物体的格数,再乘以每格的毫米数,即为物体的实际长度。

(3) 如需要用高倍镜时,用同样方法对高倍镜重新计算每格的绝对长度。

(4) 根据测量结果可计算各种细胞及细胞核的体积(V),公式如下:

椭圆形 $V = 4\pi ab^2$ (a 为长半径, b 为短半径)

圆球形 $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ (r 为半径)

第三节 组织切片制作技术

组织切片制作方法有许多种,为了达到某种目的而采取不同的切片技术和染色技术,其基本过程大都是:取材→固定→切片→染色等步骤。切片技术有石蜡、火棉胶及环氧树脂等。现以最常用的石蜡切片,苏木素(Hematoxylin)-伊红(Eosin)染色(简称 HE 染色)标本制作方法为例,简单介绍如下。

一、取材

从人尸体或动物身上取出所需组织或器官,越新鲜越好,组织块的大小一般为 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm} \times 3.0 \text{ cm}$,最厚不超过 0.5 cm。

二、固定

将取下的新鲜材料迅速投入固定液中,以防细胞腐败、自溶,尽可能保持原有结构。常用固定液有 10% 福尔马林, Bouin 液(由苦味酸、福尔马林、冰醋酸混合配成)及 Zenker 液(由重铬酸钾、升汞、冰醋酸混合配成)等,固定时间 12~24 h。

三、水洗

组织块通常用流水冲洗 12~24 h,水洗可将组织块内外残留的固定液清除,以免妨碍染色。

四、脱水

将组织块中的水分逐渐除去,以便透明剂和石蜡的渗入,称脱水。常用脱水剂是酒精,脱水的程序是:50%→60%→70%→80%→90%→95%→无水酒精,在每级酒精中停留 6~12 h。

五、透明

透明对组织块有脱酒精和透明两个意义。常用的透明剂是二甲苯,透明的步骤一般是将组织块由无水酒精移至无水酒精与二甲苯各半的混合液中 30 min~2 h,然后再放入二甲苯中 30 min~1 h 即可(更换一次二甲苯),组织块被二甲苯充分渗入时呈半透明状态。

六、包埋

是使一种较硬的物质渗入组织块的内部并将组织块包埋起来,以普遍提高组织块硬度,在保存细胞组织固有形态结构和相互关系的情况下达到制成菲薄切片的目的。常用的包埋剂是石蜡,组织块放入已溶化的石蜡中,渗透的时间为 1 h 左右。最后将溶化的石蜡倒入包埋槽

里,把组织块放入其中,待石蜡冷却凝固,组织块便被包埋在小块石蜡中。

七、切片

用石蜡切片机将组织石蜡块切成 $5\sim 7\ \mu\text{m}$ 的薄片。切片在温水中展开,贴在洁净的载玻片上以便染色。

八、染色

染色法有多种,各自能显示出组织中某些特殊结构。常用的石蜡切片染色为 HE 染色,即苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin)。苏木素为碱性染料,能使细胞核呈蓝色。伊红为酸性染料,使细胞质呈红色,染色步骤如下:

1. 切片浸入二甲苯 1 min, $38\ ^\circ\text{C}$ 温箱中融去石蜡。
2. 从 $100\%\rightarrow 90\%\rightarrow 80\%\rightarrow 70\%$ 梯度酒精各 5~10 min 去除二甲苯。
3. 蒸馏水 5 min 去除酒精。
4. 苏木素染液数分钟。
5. 水洗片刻。
6. 1% 氨水溶液还原。
7. 流水冲洗 1 h。
8. 入 70% 、 80% 酒精各 10 min。
9. 95% 酒精伊红染液 2~3 min。
10. 95% 酒精分色。
11. 100% 酒精两次各 10 min。
12. 二甲苯两次各 10~15 min。

九、封固

切片上滴入中性树胶,覆上盖玻片,待干燥后可观察并能长期保存。

第四节 电镜样品的基本制作技术

现有的电镜样品制作技术大致可分为两大类:一类是电镜样品的基本制作技术,包括超薄切片法、负染法和扫描电镜制作技术等;另一类是特殊生物样品制作技术,包括冷冻蚀刻法、细胞化学法、免疫电镜法、放射自显影电镜技术等。本节着重介绍超薄切片技术。

一、取材

取材是超薄切片技术非常关键的一步。要依据“快、准、轻、小”的原则。“快”是指不管是从麻醉或处死动物身上取材,还是临床手术取材,都应保持样品的微细结构,使其保持生活状态。操作要迅速,使样品必须在离体 2 min 内浸入固定液,以防止细胞自溶。“准”是指取材部位一定要准确可靠,要考虑到定位和定向的问题。“轻”是指一切操作都应动作轻柔,以避免对组织的挤压及牵拉,器械要锋利,否则将造成组织结构的人为损伤。“小”是指固定液的穿透能力比较弱,为了保持样品近于生活状态的微细结构,取材大小要与固定液的穿透率相适应,一般以 $1\ \text{mm}^3$ 为宜。

二、固定

固定的目的是在分子水平上使被研究的组织和细胞,如同生活时一样,精确地保持结构的每一细节,并尽可能地减少细胞的死后变化。常用的固定剂是戊二醛和锇酸,戊二醛渗透力

大,可较好地保存蛋白质结构,保存糖元,保存酶的活性,对细胞内的微管及滑面内质网、线粒体等膜性结构保存较好;钨酸能使蛋白质分子固定,使脂肪酸固定,它是惟一能保存脂类的固定剂,还能固定脂蛋白,使生物膜结构的主要成分磷脂蛋白稳定。现在大多用戊二醛做预固定(前固定),然而用钨酸做后固定,这种双重固定法可使两者相互补充其优点,对组织的微细结构有较好的固定效果。

戊二醛-钨酸双重固定法的操作步骤如下:

1. 将生物样品先放入预冷(4℃)的2%~4%戊二醛内固定1~2 h。
2. 为了彻底清除戊二醛的残余,避免与钨酸之间出现不必要的反应。前固定后必须经磷酸缓冲液反复清洗0.6~2 h(中间每隔15 min换液一次)。
3. 再放入1%钨酸室温下后固定1~2 h,组织呈黑色。
4. 缓冲液反复清洗钨酸残余0.6~2 h(中间每隔15 min换液一次)。

三、脱水

脱水是将组织内所含的游离水完全清除的过程,属于包埋前必经的步骤。常用的脱水剂为乙醇和丙酮。脱水时必须逐级提高有机溶剂的浓度,而且每一级脱水时间不宜过长,一般以10~15 min为宜,具体脱水程序为:

50%乙醇或丙酮→70%乙醇或丙酮→80%乙醇或丙酮

10~15 min 10~15 min 10~15 min

90%乙醇或丙酮→100%乙醇或丙酮

10~15 min 2次,每次30 min

游离和培养细胞的脱水时间可适当缩短。

四、浸透与包埋

经过脱水处理后的样品,即可用包埋剂进行浸透,其目的是用包埋剂逐步取代样品中的脱水剂,使细胞内外所有空隙都被包埋剂填充。浸透好的样品块放入灌满包埋剂的胶囊或适当的模具中,经加温聚合即可制成包埋块。

(一) 常用的包埋剂及其配方

常用的包埋剂为环氧树脂,它具有三维交联结构,包埋后可保存细胞内的微细结构,对组织损伤小,聚合后体积收缩率低(仅2%左右),耐受电子束轰击性能好。其缺点是粘度较大,操作不便,切片较为困难,而且反差较弱。包埋块切片时的难易,与树脂、固化剂、增塑剂及催化剂之间的比例有关,而且还取决于聚合的温度、时间等因素。常用的催化剂有2,4,6-三(二甲氨基甲基苯酚)简称为DMP-30、二乙基苯胺及乙二胺等,其主要作用是可以催化聚合反应。常用的固化剂(又称硬化剂)有十二烷基琥珀酸酐(简称DDSA)、六甲酸酐(简称MNA)等,它们参与树脂三维聚合中的交联反应,并被吸引到树脂链中。常用的增塑剂为邻苯二甲酸二丁酯(简称DBP),其主要作用是提高包埋块的弹性和韧性,改善其切割性能。

(一) 环氧树脂包埋剂配方如下:

1. 国产618#树脂包埋剂配方:

618#树脂	6 mL
DDSA	4 mL
DBP	0.3~0.8 mL
DMP-30	0.1~0.2 mL

2. Epon 812 包埋剂配方:

甲液:Epon 812	10 mL
DDSA	16 mL
乙液:Epon 812	10 mL
MNA	8.9 mL

上述两液宜分别配制贮存,使用时根据不同的硬度要求,量取不同比例予以混合。一般冬季用甲:乙=1:4,夏季用1:9。乙液比例越下,包埋块越硬。待上述两液混匀后,再按1.5%~2%的体积比,在充分搅拌中逐滴加入DMP-30。

(二) 浸透的程序

脱水后样品→丙酮、环氧丙烷等量混合液(15 min)→环氧丙烷(2次,各15 min)→环氧丙烷,包埋剂等量混合液(数小时)→纯包埋剂(数小时)→包埋。

(三) 包埋的程序

包埋前先将包埋板或胶囊放入60℃干燥箱里烘干(2 h左右),用吸管吸取配好的包埋剂灌满胶囊或包埋板,在其一侧放入用透明纸塞好的样品标签小纸条,再用牙签挑起组织块,放入胶囊中央,数小时后样品会自然下落到胶囊的底部。然后将上述胶囊或包埋板放入恒温箱内加温聚合。加温时先入37~45℃(24 h),然后入60℃恒温箱(24 h),如直接以60℃恒温箱加温聚合48 h亦可。聚合固定后样品块剥掉胶囊,即可进入切片程序。

五、超薄切片

一般透射电镜观察样品时,电子束无法穿过0.1 μm以上的切片,所以需将样品切成10~50 nm的薄片才能观察,故透射电镜的切片称为超薄切片。目前透射电镜观察最合适的厚度为30~40 nm。包埋块在超薄切片机下切成定制的薄片。薄片飘浮在水槽液面上,用一根睫毛针捞取切片沾附于铜网上,用滤纸角吸掉铜网上多余的水分,放入培养皿的滤纸上等待染色。

六、染色

(一) 块染色

多在脱水之前进行。样品块经锇酸固定后,可用醋酸铀、70%乙醇饱和液整块染色,时间为30 min。这样,不仅可以提高切片的反差,而且还可以增强成分的稳定性,降低脱水所引起的磷脂丢失。

(二) 切片染色法

最常用的是醋酸铀-柠檬酸铅双染色法,是当前增强切片反差的常规染色技术。醋酸铀主要用以显示细胞核与结缔组织。柠檬酸铅主要可以提高细胞质内各种成分的反差,其操作步骤为:将有切片的铜网置于蜡盘里,用毛细吸管吸取柠檬酸铅染液,逐滴加在每一铜网上,再翻转铜网,使其切片面向下并飘浮于滴液之上,盖好蜡盘,染色时间为30 min,而后逐一取出铜网,经蒸馏水清洗3次后,用滤纸吸去水分,待自然干燥即可电镜观察。