

全国高等院校中西医临床医学专业规划教材

总主编 郑 健

中西医结合 科研实验方法学导读

主 编 陈文列 吴锦忠



科学出版社

国家中医药管理局中医药科研项目管理办公室

中国中医药出版社

中西医结合 科研实验方法学导论

王 强 主编 张 强 副主编

本书以中西医结合科研实验方法学为研究对象，系统阐述了中西医结合科研实验方法学的基本理论、基本方法和基本技能。全书共分八章，第一章为绪论，第二章至第八章分别为实验设计、实验动物、实验材料、实验方法、实验结果、实验讨论、实验报告。本书可作为中医药院校、中西医结合专业及相关专业的教材，也可供从事中西医结合科研工作的研究人员参考。

ISBN 7-302-11111-1

全国高等院校中西医临床医学专业规划教材

总主编 郑 健

中西医结合 科研实验方法学导读

主 编 陈文列 吴锦忠
副主编 林久茂 郑良朴 叶蕪芝

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《全国高等院校中西医临床医学专业规划教材》之一,共分为四篇,第一篇介绍组织显微结构与细胞超微结构研究方法(含光镜、电镜、激光扫描共聚焦显微镜实验方法与结构观察),第二篇介绍细胞生物学实验研究方法(细胞培养、免疫细胞分析、血液流变学、流式细胞术),第三篇介绍生化与分子生物学实验研究方法(核酸分析、PCR、分子杂交与克隆、蛋白表达与提取分析等),第四篇介绍中药与天然药物化学及其活性研究方法(化学成分指纹图谱、活性物质筛选等)。本书重点介绍实验方法、技术(经典、常用或新技术)的理论与操作,具有新颖性、实用性、系统性、可操作性强的特点。

本书可作为中西医结合专业硕士和博士研究生教学用书,以及从事中西医结合基础、临床应用基础及中医药现代化基础研究者的通用科研实验指导书。

图书在版编目(CIP)数据

中西医结合科研实验方法学导读 / 陈文列, 吴锦忠主编. —北京: 科学出版社, 2011. 4

(全国高等院校中西医临床医学专业规划教材 / 郑健总主编)

ISBN 978-7-03-030451-3

I. 中… II. ①陈… ②吴… III. 中西医结合-科学研究-实验方法-教学参考资料 IV. R2-031

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 034104 号

责任编辑: 曹丽英 杨 扬 / 责任校对: 林青梅

责任印制: 刘士平 / 封面设计: 范璧合

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 4 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2011 年 4 月第一次印刷 印张: 18 1/4

印数: 1—4 000 字数: 426 000

定价: 36.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

**全 国 高 等 院 校
中 西 医 临 床 医 学 专 业 规 划 教 材
专 家 指 导 委 员 会**

主 任 陈可冀(中国中医科学院)

副主任 杜 建(福建中医药大学)

吴伟康(中山大学)

委 员 马 融(天津中医药大学)

杜惠兰(河北医科大学)

肖鲁伟(浙江中医药大学)

贾金铭(中国中医科学院)

徐福松(南京中医药大学)

**全国高等院校
中西医临床医学专业规划教材
专家编写委员会**

总 主 编 郑 健

常务副总主编 刘献祥

副 总 主 编 杨 鸿 施 红 吴锦忠

编 委 (按姓氏笔画排序)

吴 竞 张敏建 陈文列 林东红

林燕萍 郭 军 蔡 晶

总 前 言

中西医结合医学是在医疗实践中逐步形成,并结合中医和西医的思维方式、理论基础和诊疗手段的一门学科。在临床医学的发展过程中,其比较中医、西医的异同点,吸取两者之长,融会贯通,并形成了一个有机的整体,创建新的医学理论体系,探索新的基本理论、思维方法、研究技术、实验方法、诊疗手段,是服务于人类健康和疾病防治的整合医学,具有重大的学术和社会意义,是中国医药卫生事业的重要组成部分。

中西医结合源于临床实践,逐渐演进为有明确目标和独特方法论的学术体系,有别于单纯中医、西医两种医学,是这两种医学的交叉领域,它反映临床各科发展的形式、途径和方法,并代表着医学科学发展先进的、前瞻的思想与观念,充分体现了我国临床医学的独特性和优越性。通过中西医的优势互补,对许多疾病尤其是一些疑难病和危急重症患者的诊治取得了突破性进展;临床实践证明,中西医结合治疗的临床疗效明显优于单纯中医或西医的临床效果,所以,许多临床经验和成果值得总结和推广。中西医结合事业的发展关键在于培养人才,而培养人才重在教育。因此,为适应新形势需要,许多高等院校(包括高等中医、西医药院校)及时开设了中西医结合系,使中西医结合高等教育得以快速发展,甚至在部分地区中西医临床医学专业成为“热门专业”。但是,中西医结合方面的教材建设明显滞后,呈现一片空白。

2005年福建中医药大学成立首家全国高等院校中西医结合研究院,由中国科学院院士陈可冀教授担任院长,此举为中西医结合学科发展提供了重要的临床和科研平台,并促进了中西医结合学科发展。按教育部公布的高等学校专业设置,中西医结合医学归属于中西医临床医学专业(代码100505W),为了反映学科建设的部分学术成就,由福建中医药大学组织全国有关专家、教授及临床一线工作人员编写了本套《全国高等院校中西医临床医学专业规划教材》。本套教材将分批分辑出版,第一辑出版《中西医结合肾脏病学》、《中西医结合内分泌与代谢性疾病》、《中西医结合老年病学》、《中西医结合骨伤科学》、《中西医结合男科学》、《中西医结合儿科学》、《中西医结合科研实验方法学导读》共7个分册。

本套教材是在总结以往教学内容建设成功经验和认真分析其存在问题与不足的基础上,借鉴了现行最新全国高等中医、西医药院校规划教材,根据目前中西医结合方向“两个基础、一个临床”(即中医基础、西医基础及中西医结合临床)的教学模式,遵循高等中医药院校教材建设的一般原则,综合我校中西医结合学科优势编写而成,注重教学内容的科学性、先进性和实用性,注重学生中西医结合临床思维、实践能力与创新精神的培养,努力做到中、西医学教学内容的有机结合,探索相互沟通,寻求彼此结合,突出



创新成果,认真构筑中西医结合人才必须具备的知识与能力素质结构,促使中西医结合方向的教学内容、学术观点与目前中医学、西医学相关专业的教学内容相协调,尽量反映我国现阶段中西医结合临床教学的先进水平,以满足本专业教学要求和中西医结合临床工作的实际需要。衷心地感谢本套教材指导和编写专家的积极参与和大力支持,也希望通过编写本套教材将中西医结合学科的新知识、新技术、新方法介绍给读者,以供中西医临床医学专业本科、研究生学习,也可供从事中西医结合临床工作者和研究者阅读;同时,也希望本套书的编写为我国中西医结合教育、中西医结合学科建设和中西医结合人才培养尽绵薄之力。

中西医结合学科目前尚处于不断探索阶段,本套教材中某些内容和学术观点也许还不太成熟,而且我们学校在规划组织和编写全国高等院校中西医临床医学专业规划教材方面尚属首次,没有太多可借鉴的经验,加之编写时间紧迫,编写水平有限,书中难免有不足之处,敬祈读者不惜斧正,以使本套教材不断完善,提高教材质量,共同为我国的中西医结合事业发展做出贡献。谨此,向指导、编写和使用本套教材的专家和学者表示衷心的感谢!同时也感谢科学出版社指导和支持!

郑 健

2011年1月

目 录

总前言

第一篇 组织显微结构与细胞超微结构研究方法

第一章 组织显微结构研究的光镜实验方法	(1)
第一节 组织学和病理学常规实验方法	(1)
第二节 光镜组织化学与特殊染色	(6)
第三节 光镜酶组织化学	(13)
第四节 光镜免疫组织化学	(15)
第五节 光镜原位杂交组织化学	(19)
第六节 原位凋亡检测技术(TUNEL法)	(21)
第七节 光镜显微镜图像定量分析	(22)
第二章 细胞超微结构研究的电镜实验方法	(24)
第一节 概述	(24)
第二节 透射电镜常规样品制备	(26)
第三节 示踪与离子电镜细胞化学	(32)
第四节 电镜特殊染色	(35)
第五节 电镜免疫细胞化学	(38)
第六节 细胞器标志酶电镜细胞化学	(40)
第七节 透射电镜、扫描电镜与超微结构图像定量分析	(44)
第三章 细胞超微结构与组织显微结构的观察	(51)
第一节 概述	(51)
第二节 细胞超微结构与常见变化	(52)
第三节 几类细胞的超微结构	(59)
第四节 组织显微结构与常见病变	(65)
第四章 常见器官的组织显微结构与细胞超微结构及病变	(71)
第一节 消化器官的显微结构与超微结构及病变	(71)
第二节 运动器官的显微结构与超微结构及病变	(76)
第三节 心血管的显微结构与超微结构及病变	(79)
第四节 内分泌器官和组织的显微结构与超微结构及病变	(81)
第五节 神经系统的显微结构与超微结构及病变	(83)
第六节 泌尿器官的显微结构与超微结构及病变	(86)
第七节 免疫器官的显微结构与超微结构及病变	(88)
第八节 呼吸器官的显微结构与超微结构及病变	(90)
第九节 血细胞的显微结构与超微结构及病变	(92)
第五章 组织和细胞立体结构与成分研究的激光扫描共聚焦显微术	(95)
第一节 概述	(95)
第二节 荧光探针的选择和荧光标记样品的制备	(96)
第三节 组织和细胞结构与成分观察实验	(100)
第四节 细胞器三维结构观察实验	(104)



第五节 细胞生理功能动态观察实验	(106)
第六节 激光扫描共聚焦显微镜	(111)

第二篇 细胞生物学实验研究方法

第六章 细胞培养与分析	(117)
第一节 细胞培养的基本原理与技术	(117)
第二节 细胞培养的方法	(118)
第三节 细胞的冻存、复苏与运输	(120)
第四节 体外培养细胞的观察	(122)
第五节 细胞增殖、凋亡分析	(124)
第七章 免疫细胞的分离与分析	(127)
第一节 概述	(127)
第二节 免疫细胞的分离制备	(127)
第三节 免疫细胞的功能分析	(129)
第八章 血液流变学研究技术	(139)
第一节 概述	(139)
第二节 血液黏度检测	(140)
第三节 血小板聚集、黏附功能检测	(141)
第九章 流式细胞术	(144)
第一节 概述	(144)
第二节 单细胞悬液的样本制备	(144)
第三节 流式细胞术的标记方法、结果分析与意义	(147)
第四节 流式细胞术在医学科学研究中的应用	(152)
第五节 流式细胞仪结构和原理	(154)

第三篇 生化与分子生物学实验研究方法

第十章 核酸提取分析	(156)
第一节 概述	(156)
第二节 DNA 提取	(157)
第三节 RNA 提取	(158)
第四节 核酸分析	(160)
第五节 核酸电泳	(161)
第十一章 分子杂交	(164)
第一节 概述	(164)
第二节 Southern 印迹杂交	(164)
第三节 Northern 印迹杂交	(167)
第四节 Western 印迹杂交	(170)
第十二章 聚合酶链反应(PCR)	(174)
第一节 概述	(174)
第二节 PCR 技术基本操作	(174)
第三节 RT-PCR	(176)
第四节 PCR 引物设计	(178)
第十三章 分子克隆	(180)
第一节 概述	(180)
第二节 目的 DNA 片段的获取	(180)



第三节	目的 DNA 片段的处理、纯化及鉴定	(183)
第四节	载体的选择与处理	(188)
第五节	载体与目的基因片段的连接	(189)
第六节	重组质粒转化感受态大肠埃希菌	(191)
第七节	重组克隆子的筛选与鉴定	(192)
第十四章	蛋白表达	(193)
第一节	概述	(193)
第二节	外源基因在大肠埃希菌中的诱导表达	(193)
第三节	外源基因在真核细胞中的表达(细胞转染)	(195)
第十五章	蛋白质的提取和分析	(201)
第一节	概述	(201)
第二节	蛋白的分离提取、纯化	(202)
第三节	总蛋白含量测定	(204)
第四节	酶联免疫分析	(205)
第五节	放射免疫分析	(208)
第六节	蛋白电泳	(210)
第十六章	常规生物化学实验技术	(213)
第一节	概述	(213)
第二节	糖类实验分析	(213)
第三节	酶类实验分析	(215)
第四节	脂类实验分析	(218)

第四篇 中药与天然药物化学及其活性研究方法

第十七章	中药与天然药物化学成分的一般研究方法	(220)
第一节	中药与天然药物化学成分提取	(220)
第二节	中药与天然药物化学成分分离	(222)
第三节	中药与天然药物化学成分的研究各论	(225)
第十八章	中药与天然药物化学成分指纹图谱研究方法	(246)
第一节	构建中药与天然药物化学成分指纹图谱的技术要求	(246)
第二节	应用 HPLC 构建草珊瑚化学成分指纹图谱的研究实例	(249)
第十九章	中药与天然药物活性物质筛选方法	(253)
第一节	生物活性导向分离法筛选中药与天然药物活性物质	(253)
第二节	计算机模拟技术筛选中药与天然药物活性物质	(255)
第三节	中药与天然药物化学成分的生物活性测试法	(264)
第四节	中药复方药效物质基础研究方法	(276)

彩图

第一篇 组织显微结构与细胞超微结构研究方法

第一章 组织显微结构研究的光镜实验方法

第一节 组织学和病理学常规实验方法

一、概述

组织学和病理学实验方法在医学科学领域里占有重要地位,是医学教学和科研中不可缺少的一个组成部分。组织制片标本可以显示各种组织细胞的基本结构和形态,而制片的质量将直接影响科研教学观察和临床病理诊断。

最早应用的组织制片技术是冰冻切片,但冰冻切片显示的组织清晰度相对较差,目前通常用于术中快速诊断,或者用于显示组织中的脂类物质、某些酶等。随着冰冻切片的应用和实践,人们进一步利用石蜡的硬度,将要检查的组织块浸渍并包埋于这种坚硬的介质之中,制成了石蜡切片,石蜡切片不仅清晰度高,而且易于保存,可用于大部分的染色和检验,是目前最常用的制片方法。后来又利用明胶、火棉胶等物质的韧性来包埋组织,制成了明胶切片和火棉胶切片,用于较大、较坚硬、比较脆弱的组织和易于塌陷的器官等的制作;用塑料包埋或树脂包埋制作不脱钙的骨组织切片等。目前石蜡切片制作法仍是组织病理学的常规实验方法。

二、用途、原理、特点

1. 主要用途

石蜡切片可通过常规染色在光镜下观察其一般的显微结构,亦可通过特殊染色技术、免疫组织化学技术以及原位杂交等技术观察组织的特定结构成分。

2. 实验原理

将细胞和组织进行固定,使其保存原有的形态和固有物质;通过包埋剂渗透凝固后制作成有一定硬度的石蜡包埋块,再切成几微米厚的切片,经染色剂染色后可在光镜下观察其显微结构。

3. 特点

常规石蜡切片清晰度高,易于保存,可用于大部分组织的染色和检验。

三、实验操作(石蜡切片法)

(一) 简要步骤

简要步骤如下:①取材;②固定;③脱水;④透明;⑤浸蜡;⑥包埋;⑦切片;⑧染色;⑨封固。



(二) 具体步骤

1. 取材

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

- 1) 仪器或器材:剪刀、镊子、单面刀片或双面刀片、标本瓶、标签等。
- 2) 试剂:麻醉剂、生理盐水等。

(2) 实验操作

- 1) 预先准备好固定液(见固定章节),分装在标本瓶内,贴好标签。
- 2) 动物组织取材:将动物麻醉或处死,暴露所需的器官;用锋利的刀片切下所需器官或组织,进行初步修切后,尽快投入固定液。

3) 细胞取材:①涂片法。血液等可直接均匀涂在载玻片上,胸腔积液、腹水、尿液、脑脊液以及悬浮的培养细胞等细胞浓度小的标本,应先用离心机以 1500r/min 离心 10min,取沉淀涂片,干燥后固定。②爬片法。贴壁细胞可直接培养在盖玻片上,固定后染色。③包埋法。离心后固定细胞团,或用琼脂预包埋细胞后,再行常规脱水,石蜡包埋。

(3) 注意事项、出现问题与解决办法

1) 取材刀具:取材刀具必须锋利。切取标本不应挤压和揉擦,不应使用有钩镊子或血管钳等手术器械镊取标本,以免损害组织造成人为的组织变化。

2) 取材时间:取材要及时,并及时固定,越新鲜越好。

3) 取材顺序:根据死后组织结构改变的速度快慢而定。先腹腔后胸腔,先消化管后肝、脾等多血的器官,然后是神经组织、骨和皮肤等。

4) 取材部位及切面方向:组织块应包括各脏器的重要结构和主要病变部位,体积大和分叶的器官视不同组织取多个部位。病理组织最好选取病变与正常组织交界处,以便对比;取材时应取最有利于观察上述部位的切面方向。如肾脏组织应包括皮质、髓质和肾盂;长骨纵切可将其组织结构完整展现;纤维组织、肌肉组织、胃肠道、气管等取材时尽可能按与纤维和肌肉平行走向切取为佳,避免斜切或无规律切取。

5) 取材大小及数量:组织块力求小而薄,一般标本,以不超过 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 为宜,体积小的组织,如甲状腺和肾上腺可整体取材固定;用于免疫组化染色的组织块宜更小而薄;冰冻切片组织块可略厚。较容易发脆的组织,如甲状腺、肝脏、血块、淋巴结、大块癌组织等可适当厚一些,而脂肪组织、肺组织、纤维性肿瘤、平滑肌瘤等致密的或试剂不易渗入的组织应取薄一些。组织块的数量依具体情况而定,一般以满足相关研究需要为准。

6) 尽量保持组织的原有形态,防止其弯曲扭转。对神经、肌肉、皮肤等组织则可将其两端用线扎在木片或硬纸片上固定。胃肠、胰腺等组织,应先平展于草纸上黏着以后,慢慢地放入固定液中。标本上附着的软组织,如脂肪等,应在不影响观察的原则下,尽量剥去或切除。组织块上如有血液、黏液、污物等,应先用生理盐水冲洗,然后再投入固定液。

7) 骨组织或组织内的钙化灶,应在固定之后进行脱钙,再行修切。

2. 固定

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

- 1) 10% 缓冲甲醛固定液:甲醛 100ml,蒸馏水 900ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4g, Na_2HPO_4 (无水) 6.5g。
- 2) 4% 多聚甲醛固定液:多聚甲醛 40g,蒸馏水 600ml,加热,边加适量的 NaOH 慢慢溶解后,将 pH 调至 7.2 ~ 7.4,加入 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4g, Na_2HPO_4 (无水) 6.5g,蒸馏水定容到 1000ml。

(2) 实验操作

- 1) 组织放入固定液后,常温放置 24 ~ 48h。
- 2) 根据组织块大小,流水冲洗数小时后再进行后续操作。



(3) 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 组织固定越新鲜越好。
- 2) 组织块不宜过大。
- 3) 组织固定时间不宜太短,也不宜太长。
- 4) 固定液的要充分,固定液的量与组织的体积比应达到 10:1 左右。

5) 合理选择固定液。一般的标本都可以应用甲醛固定液来固定,但是甲醛对一些特殊物质固定不好,如要显示糖原,要选择无水酒精或丙酮来固定组织;显示狂犬病毒的包含体,必须采用丙酮来固定等。

- 6) 甲醛固定后要充分冲洗,否则可能会对各种染色造成影响。

3. 脱水、透明、浸蜡

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

- 1) 脱水机或磨砂口的玻璃缸。
- 2) 无水乙醇,95% 乙醇,蒸馏水。将无水乙醇或 95% 乙醇与蒸馏水按比例配成 70%、80%、90% 浓度的乙醇溶液。
- 3) 二甲苯。
- 4) 熔点为 52 ~ 54℃ (软蜡) 和 58 ~ 60℃ (硬蜡) 的石蜡。

(2) 实验操作

- 1) 脱水:70% 乙醇 1 ~ 2h,80% 乙醇 1 ~ 2h,90% 乙醇 1 ~ 2h,95% 乙醇 1 ~ 2h,100% 乙醇 I 0.5h,100% 乙醇 II 0.5h,100% 乙醇 III 1 ~ 2h。
- 2) 透明:二甲苯 I 30min,二甲苯 II 1 ~ 2h。
- 3) 浸蜡:石蜡加热到 60 ~ 65℃ 使其处于熔解状态,软蜡 0.5h,硬蜡 I 0.5h,硬蜡 II 1 ~ 2h。

(3) 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 乙醇脱水力强,但对组织有收缩、硬化和易脆的不良影响。因此,在使用时,通常是从低浓度至高浓度;时间不宜太短,也不宜太长,应根据组织的大小和质地灵活调整。
- 2) 二甲苯易致组织脆硬,因此,透明时间不宜过长,可随时观察,组织完全透明后即止。
- 3) 乙醇和二甲苯易挥发,且经脱水、透明后浓度易发生改变,应及时更换。
- 4) 蜡在高温下对组织和固有物质会有影响,因此浸蜡时间不宜太久。浸透后应立即包埋,如需耽搁,应停止加热让其降温凝固,包埋时再加热溶解。
- 5) 熔化石蜡必须在熔蜡箱内进行,不得用明火加温,且温度不得超过 65℃。
- 6) 熔蜡应及时过滤、更换。

4. 包埋

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

包埋机、冷冻台、一次性包埋盒、包埋模具、镊子等。

(2) 实验操作

- 1) 打开包埋机,让石蜡预热至 65℃ 左右;打开冷冻台预冷。
- 2) 在包埋盒上标记好标本序号。
- 3) 先将熔化的石蜡倾入包埋模具中,再用加热的镊子轻轻夹取已经过浸蜡的组织块,使组织块的最大面或切面向下埋入熔蜡中;包埋于同一蜡块内的多块细小组织应靠近并尽量位于同一平面上。
- 4) 盖上包埋盒,将包埋盒的背面凹槽用熔蜡填充。
- 5) 待包埋模具内的熔蜡凝固后,将蜡块取出备用。

(3) 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 包埋时要认真核对组织块的标本号顺序。
- 2) 必须严防各种异物污染,勿将无关组织埋入蜡块内。
- 3) 包埋过程要操作迅速,以免组织块尚未埋妥前熔蜡凝固。



- 4) 包埋块内避免气泡产生,可用加热的镊子去除。
- 5) 包埋定向组织时要注意将切面朝下,管腔组织和皮肤等需立埋。

5. 切片

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

包埋机、水浴锅、烘片机或烤箱、切片刀、毛笔、载玻片等。

(2) 实验操作

- 1) 将要进行切片的组织块固定于切片机标本架上,旋紧。
- 2) 调整好样品面与切片刀在 X/Y/Z 轴的合适位置,调整好样品面与切片刀间距离。
- 3) 修平切面,如果没有特定标志,原则上是暴露组织的最大切面。
- 4) 根据需要设置切片厚度并进行切片(一般 $4 \sim 8 \mu\text{m}$),用毛笔收集蜡带。
- 5) 选择佳片放入恒温水浴锅内展平后裱片,使切片平整地贴附在载玻片上。
- 6) 放入烘片机或烤箱内烘片 $3 \sim 5\text{h}$,使切片牢牢黏附在载玻片上。

(3) 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 切片刀必须锋利,切片时刀口从一侧开始使用,用钝后按顺序挪动一个刀口,避免损伤的旧刀口重复使用和浪费新刀口。
- 2) 切片速度要均匀,以 $40 \sim 50$ 次/min 为宜。
- 3) 切勿使毛笔触及刀刃,以免伤及刀口。
- 4) 载玻片要清洗干净,以免影响切片黏附,必要时可用多聚赖氨酸等防脱处理。
- 5) 裱片水温要适宜($40 \sim 45^\circ\text{C}$)、洁净,每切完一个蜡块后,必须认真清理水面,不得遗留其他的组织碎片。如切片不易展开,可先放入 30% 乙醇中预展片,再放入温水中。
- 6) 烘片温度和时间要适宜(60°C $3 \sim 5\text{h}$),时间过长、温度过高易导致固有物质受影响,尤其在免疫组化原位杂交时;温度低、时间短易导致切片黏附不牢而掉片。

6. H-E 染色、封固

(1) 主要实验仪器/器材/重要试剂

1) 苏木素: Harris 苏木素。苏木素 2.5g,无水乙醇 25ml,硫酸铝钾(钾明矾) 50g,或硫酸铝铵(铵明矾),蒸馏水 500ml,黄色氧化汞 1.25g,冰醋酸 20ml;配制溶液时,先将蒸馏水稍加温,加入苏木素并不停搅拌直至完全溶解,继而加入硫酸铝钾,令其充分溶解后,加入柠檬酸和水合氯醛,继续搅拌均匀,全部溶解后再加入碘酸钠,搅拌均匀,此时溶液的颜色变为深棕色,过滤后即可使用。Ehrlich 苏木素。苏木素 1g,无水乙醇 50ml,甘油 50ml,硫酸铝钾 7.5g,蒸馏水 50ml,冰醋酸 5ml;将苏木素溶于无水乙醇里,硫酸铝钾溶于蒸馏水中,然后所有的试剂都加在一起,充分搅拌均匀后,放于阳光充足的地方慢慢氧化成熟,大约 4 周才可使用。

2) 0.5% 伊红:伊红 1g,70% ~ 75% 乙醇 200ml;先将伊红用蒸馏水(少许)调成糨糊状,再加入乙醇,边加边搅拌,直到彻底溶解,此时试剂有些混浊,加入少许冰醋酸,试剂逐渐转变为清亮,呈鲜红色。

3) 1% 盐酸乙醇:70% 乙醇 100ml,盐酸 1ml。

4) 染色缸,染色架,盖玻片,梯度乙醇,二甲苯,中性树胶。

(2) 实验操作

- 1) 二甲苯脱蜡(2 缸)各 $10 \sim 15\text{min}$ 。
- 2) 梯度乙醇入水:无水乙醇,95%、90%、80%、70% 乙醇,蒸馏水各 $5 \sim 10\text{min}$ 。
- 3) Ehrlich 苏木精液染色 $20 \sim 30\text{min}$ 或 Harris 苏木素 $2 \sim 3\text{min}$ 。
- 4) 流水洗去苏木精液,1% 盐酸乙醇 $1 \sim 3\text{s}$,水洗,返蓝 $20 \sim 30\text{min}$ 。
- 5) 伊红液染色 $1 \sim 3\text{min}$,快速水洗。
- 6) 梯度乙醇脱水(与入水相反),二甲苯透明 $2 \sim 3\text{min}$,中性树胶封片。

(3) 注意事项、出现问题与解决办法

1) Harris 苏木素成熟快,染色快,但只能用 3 个月左右就慢慢失效;Ehrlich 苏木精成熟慢,染色



久,但用它染后,细胞核染色清晰,不易过染,可长期使用,对于用酸脱钙组织细胞核的染色,该试剂优于其他各种苏木素,可根据需要选择。

- 2) 二甲苯脱蜡要彻底,时间为 10 ~ 20min,试剂要及时更换,否则均影响染色。
- 3) 苏木精液染色液每次染色前应过滤或用纸把液面的氧化膜去除,以免污染切片。
- 4) 染色过程中所用的时间要根据染色时的室内温度、染液的新鲜程度等灵活掌握。
- 5) 低浓度乙醇对伊红有分化作用,切片经低浓度乙醇脱水时间不宜久置。
- 6) 苏木素过染用 1% 盐酸乙醇分色,伊红过染用低浓度乙醇分色;若染色太浅均可再染。
- 7) 中性树胶用二甲苯稀释后再用,封片时避免产生气泡。

四、几种特殊组织切片技术

(一) 骨组织脱钙切片制备

骨骼组织是一种坚硬的结缔组织,有机成分凝胶和无机成分骨盐两种成分紧密结合形成骨基质,使其变得十分坚硬,不能直接制片。因此,需脱钙处理,使钙盐溶解,组织变软后才能制作石蜡切片。脱钙后制作方法同软组织。在诸多脱钙方法中,EDTA 脱钙法是一种较为理想的、可行的方法。

1. 主要实验仪器/器材/重要试剂

10% EDTA 脱钙液: EDTA 10g,先用 600 ~ 800ml 蒸馏水将其溶解(需加适量 NaOH 助溶),然后加蒸馏水至 1000ml,调 pH 至 7.2 ~ 7.4。

2. 实验操作

- 1) 将 1cm × 0.5cm × 0.3cm 大小的骨组织浸泡在 5 ~ 10 倍的 EDTA 脱钙液中。
- 2) 脱钙时间:一个月左右,具体视标本大小、室温而定。
- 3) 效果判定:用大头针扎入脱钙后的骨组织,没有明显阻力,类似软组织即可。

3. 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 脱钙液要勤换,每 2 ~ 3 天更换新液一次,否则影响脱钙速度。
- 2) 标本不可太大,可在脱钙过程中组织较软后二次修切,以加快脱钙速度。
- 3) 震荡、加温和微波等可加快脱钙速度,但温度不可过高,否则影响组织的抗原性等。

(二) 不脱钙骨组织切片

硬质切片也称不脱钙骨组织切片,因不脱钙而保持钙盐分布。以丙烯酸树脂(GMA),TBBA 环氧树脂及甲酯甲基丙烯(MMA)等包埋,结合硬质切片机切片,用于骨组织形态学研究,如哈弗管、骨小梁的观察。这里以 MMA 包埋为例。

1. 主要实验仪器/器材/重要试剂

- 1) 洗涤剂:称取氢氧化钠 50g,氯化钠 200g,加蒸馏水至 1000ml 溶解备用。
- 2) MMA 准备:①洗涤:洗去 MMA 单体中的阻聚剂,将 MMA 与洗涤剂按 2:1 体积比加入分液漏斗,充分摇匀,静置分离,弃去下层,共 2 次;②用蒸馏水洗 3 次,方法同上;③吸水:无水氯化钙吸水 30min,过滤去水;④贮存:2 ~ 4℃ 保存。

3) 过氧化苯甲酰(市售试剂含水)使用前作干燥处理,将试剂盛于玻璃平皿,置干燥器待水分吸干备用。

4) MMA I 液配制:加速剂过氧化苯甲酰 1.5g 溶于 100ml MMA。

5) MMA II 液配制:加速剂过氧化苯甲酰 3.5g 溶于 100ml MMA。

6) 各级乙醇,二甲苯。

2. 实验操作

- 1) 常规固定、乙醇脱水与二甲苯透明。



- 2) MMA I 液 24h × 2 次。
- 3) MMA II 液 24h × 3 次。
- 4) 加入 MMA II 液,抽真空 30min,待气泡完全排出,盖上瓶盖,用密封纸封口,于室温下约 7d 时间开始凝结,并逐渐变硬。
- 5) 硬质切片机切片 80 μ m,常规裱片,染色。

3. 注意事项、出现问题与解决办法

- 1) 包埋必须在彻底脱水和渗透之后进行。
- 2) 包埋时温度不宜过高,以不超过 40℃ 为宜。
- 3) 市售 MMA 含有稳定剂防止固化,使用前需洗去稳定剂方可使用。
- 4) 骨切片在染色时易脱片,因此载玻片应作防脱处理。

(三) 冷冻切片的制作方法

冷冻切片是直接新鲜组织冰冻后获得一定的硬度,然后进行切片制作,目前主要用于临床术中快速诊断和脂溶性物质的检测,以及其他在组织常规石蜡切片制作过程中易受影响的物质的检测,如一些酶类等。

1. 主要实验仪器/器材/重要试剂

冷冻切片机,冷冻切片包埋剂,载玻片,固定液等。

2. 实验操作

- 1) 打开冷冻切片机预冷,降至所需温度;
- 2) 取出组织支撑器,放平摆好组织,周边滴上包埋剂,速放于冷冻台上冰冻。
- 3) 将冷冻好的组织块,夹紧于切片机支撑器上,启动粗进退键,转动旋钮,将组织修平。
- 4) 调好欲切的厚度,一般在 5 ~ 10 μ m 间。
- 5) 调好防卷板至适当的位置。
- 6) 切出切片后,取一载玻片,将其附贴上。
- 7) 将切片放入固定液固定 1min 后即可染色。

3. 注意事项和出现问题与解决办法

- 1) 防卷板和切片刀应保持干净,不得有残余的包埋剂黏于刀或板上,否则会破坏甚至撕裂切片。
- 2) 组织块不须经各种固定液固定,尤其是含水的固定液,在未达到固定前,更不能使用。如果使用未完全固定的组织作冰冻切片,就会出现冰晶,影响切片。
- 3) 应视不同的组织性质选择不同的冷冻度。如:切脑组织、肝组织和淋巴结,在 -15 ~ -10℃ 左右;切甲状腺、脾、肾、肌肉等组织时,可调在 -20 ~ -15℃ 左右;切带脂肪的组织应调至 -25℃ 左右,组织含大量的脂肪时,应调至 -30℃。
- 4) 用于附贴切片的载玻片最好经防脱处理,以防掉片。载玻片不能存放于冷冻处,于室温存放即可,否则切片不易黏附。

(黄云梅 黄美雅)

第二节 光镜组织化学与特殊染色

一、简介

特殊染色是常规染色(HE 染色)的必要补充,也是染色技术中一个不可缺少的组成部分。HE