



实用 实验动物标本 处理手册

瞿智玲◎主编

SHIYONG
SHIYAN DONGWU BIAOBEN
CHULI SHOUCHE

华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

實用 實驗動物標本 處理手冊

謝雪心編著

SHIYONG

SHIYAN DONGWU BIAO BEN

CHULI SHOU CE

中國科學院動物研究所

北京動物研究所

北京動物研究所

实用实验动物标本处理手册

主 编 瞿智玲
审 校 敖启林

华中科技大学出版社
中国·武汉

图书在版编目(CIP)数据

实用实验动物标本处理手册/瞿智玲 主编. —武汉:
华中科技大学出版社, 2009 年 9 月
ISBN 978-7-5609-5751-7

I. 实… II. 瞿… III. 实用实验-标本制作-手册
IV. Q95-34

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 184227 号

实用实验动物标本处理手册

瞿智玲 主编

策划编辑:居 颖

责任编辑:许 杰

责任校对:张 琳

封面设计:潘 群

责任监印:熊庆玉

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中科技大学印刷厂

开本:850mm×1168mm 1/32 印张:5.875

字数:125 000

版次:2009 年 9 月第 1 版 印次:2009 年 9 月第 1 次印刷

定价:14.80 元

ISBN 978-7-5609-5751-7/Q·40

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

序

随着科学技术的迅猛发展,实验动物学技术越来越广泛地应用于医学基础研究、临床实验和药物前期实验中。作为实验动物学的基础,实验动物的取材和处理成为一项必须掌握的基本技能。然而,目前多数从事实验动物学的相关技术人员和广大中青年的科研工作者及在校的医学生物类研究生,由于缺乏可供参考的实验动物操作规范,没有接受系统的动物取材和处理方面的规范训练,因而在涉及动物技术处理的实际操作中,从一开始就处于不规范的环境,进而影响到后续的实验步骤和对实验结果的分析判断。本书作者正是基于这种现状,针对性地编写了这本有关实验动物取材和处理的参考书,可以说恰逢其时。

本书具备以下特点:一是简明扼要,针对不同的实验操作,选择不同的动物取材处理方法,覆盖面广,实用性强;二是文风朴实、不尚空谈、层次分明、言简意赅地介绍了操作步骤或实验流程,便于学习,易于掌握;三是本书由作者在二十余年来自身教学与科研的基础上,又参阅了大量的相关论著和文献精心编写而成,既有他人成熟的方法,也有自己积累的经验与改进,在应用方面有很好的可操作性和重复性。本书对于广大医药院校本科生、研究生及各基础和临床研究室的实验技术人员均有较大参考价值。

有鉴于此,我乐于向广大读者推荐此书,并感谢作者为编写本书所付出的辛勤劳动。

华中科技大学同济医学院病理学系主任

华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所所长

王国平

2009-5-29

前 言

随着科学技术的发展,病理学技术也有了长足的进步。除了石蜡包埋、HE 染色常规技术外,其他一些新发展的技术如免疫组织化学、原位分子杂交技术等形态学方面的技术,不仅在临床上得到大量的应用,而且更广泛地应用于科研领域上。医学在发展,医学教育在发展,与其有关的科学研究方法也在发展。生命科学的研究首先离不开生命个体和细胞的形态和功能,对生命个体和细胞的形态研究,首先要有好的标本制作,在此基础上才能对生命个体的正常结构有正确认识,然后才能认识个体异常的病理结构。所以,标本的形态学制作和染色,对生命个体正常和异常结构的认识起着非常重要的作用。

在基础和临床工作中,笔者发现很多医学研究生,在动物实验完毕后,不知如何处理标本,甚至标本未做任何处理也未妥善保存,最后造成实验失败。这不但浪费了人力、物力,更重要的是浪费了时间。所以,在动物实验与实验结论之间,标本的制作和染色是非常重要的环节。这两者不仅能保证实验结果的可靠,更能保证实验者本人更好、更合理地设计整个实验,确保实验的顺利进行。基于此本书以动物标本的收集和染色为主要内容,同时强调了实验环境的保护和个人防护,希望对广大的医学和生命科学研究者能提供帮助。

本书在编写过程中,得到了华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所王国平教授、邓仲端教授、敖启林副教授的大力支持和帮助。王国平教授在百忙之中抽出时



间为本书作序,邓仲端教授提供了很好的建议,敖启林副教授对本书进行了审校,在此深表感谢。

由于笔者水平有限,书中可能有一些不妥之处,欢迎读者赐教,本人不胜感谢。

瞿智玲

2009年8月

目 录

第一章 医学实验动物标本的大体形态学观察	(1)
第一节 医学实验动物的各种组织器官的	
大体形态学观察及固定.....	(1)
第二节 医学实验动物的各种组织器官的染色	(3)
第二章 用于常规 HE 染色的实验动物标本的	
采集和染色	(9)
第一节 用于常规石蜡包埋切片-HE 染色的	
实验动物标本的采集和染色.....	(9)
第二节 用于冰冻切片的医学实验动物标本的	
采集和染色	(36)
第三章 用于特殊染色的实验动物标本的	
采集和染色	(39)
第一节 特殊染色方法的固定液的选择	(39)
第二节 常用的特殊染色方法	(41)
第四章 用于免疫组织化学的实验动物标本的	
采集和染色	(72)
第一节 免疫组织化学染色前的准备工作	(72)
第二节 组织标本的取材、固定和切片	(74)
第三节 常规免疫组织化学操作过程	(77)
第四节 免疫组织化学染色分类和基本方法	(81)
第五节 免疫组化染色结果的判断和注意事项 ...	(88)
第五章 用于原位杂交的实验动物标本的	
采集和染色	(91)
第一节 杂交前准备工作	(92)
第二节 原位分子杂交基本方法	(101)



第六章 用于超微形态学观察的实验动物标本的采集和染色	(104)
第一节 电镜标本采集和处理	(104)
第二节 常规电镜标本的制作	(116)
第七章 用于分子生物学实验的动物标本的采集	(120)
第一节 用于 RNA 提取的实验动物标本的采集和 RNA 的提取	(120)
第二节 用于 DNA 提取的实验动物标本的采集和 DNA 的提取	(123)
第三节 用于蛋白质提取的实验动物标本的采集和蛋白质提取	(128)
第八章 形态学实验室的基本设施和管理	(131)
第一节 形态学实验室的基本设施	(131)
第二节 形态学实验室的管理	(133)
附录一 常用病理形态学技术及新技术	(136)
附录二 溶液浓度的计算	(154)
附录三 常用固定液及其使用	(156)
附录四 常用免疫试剂的配制	(158)
附录五 各种封片胶的配制及使用	(162)
附录六 分子生物学实验常用溶液的配制	(164)
附录七 常用试剂中英文对照	(170)
附录八 实验动物被毛去除方法	(177)
参考文献	(179)

第一章 医学实验动物标本的大体形态学观察

实验动物的形态学观察方法有肉眼形态学观察、常规显微形态学观察和超微形态学观察。肉眼形态学观察即用肉眼观察实验动物的组织器官,如大小、形状、颜色、质地、有无出血坏死等。常规显微形态学观察就是将所要观察的标本经过一系列处理后,制成组织切片,经染色后在显微镜下观察。所用的染色法主要包括常规 HE 染色、组织化学染色、免疫组织化学染色、原位分子杂交等。而超微形态学观察就是指将组织标本制成超薄切片,借助电子显微镜观察细胞内线粒体、高尔基体、微管等各种细胞器的微细结构。

第一节 医学实验动物的各种组织器官的大体形态学观察及固定

实验动物被处死后,应立即将所需观测的组织器官暴露,对观察到的组织脏器的情况进行描述,并记录。观测指标包括这些脏器的重量、大小、形状、色泽、质地及其切面状况,需要时可进行在体拍照或离体拍照。

一、皮肤

动物皮肤上附有毛发,切取前应先对目标部位备皮,以



利于切片,并观察皮肤表面是否平滑(粗糙)、干皱,是否有水肿、糜烂、溃疡形成、斑痕形成、色素沉着或有凹陷或隆起。

二、管腔类组织

这类组织有食管、胃、肠、胆囊、膀胱和大血管等。一般沿其纵轴剪开,按其自然状态平铺于硬纸板上(注意目标处的暴露是否充分),并用大头针将标本边缘处固定于硬纸板上(注意防止其固定后自然卷曲而掩盖黏膜面的病变),并滴加 10% 中性福尔马林固定液固定标本(注意保持标本湿润)。

三、肝、脾

由器官凸面,沿其长轴纵向剖开,观察切面情况并记录,然后平放于装有 10% 中性福尔马林固定液的容器中(注意避免标本弯曲,较多块组织放在一个容器中时,应避免相互间的叠压),容器底部应预垫脱脂棉。

四、肾

沿肾外缘中线朝肾门方向作一水平切面,并用上述方法固定。

五、肺叶

肺组织常漂浮于固定液液面上,可在其表面覆盖浸润了固定液的薄层脱脂棉,或者从支气管注入适量固定液。

六、脑

由于脑组织较软,通常先整体固定 2~3 h,再切开,继续固定。

七、淋巴结

淋巴结沿其长轴切开固定,也可整体固定 2~3 h 后,再沿其长轴切开固定。

八、肿瘤

应描述其毗邻组织器官,肿瘤的大小、形状、数目、色泽、质地、活动度、生长方式,切面上是否有出血、坏死等。

第二节 医学实验动物的各种组织器官的染色

一、脂肪组织染色

(一) 试剂配制

试剂配制方法如下。

苏丹Ⅲ或Ⅳ	0.5 g
70%酒精	250 mL
丙酮	250 mL

先将酒精和丙酮混合,再加入苏丹染料,充分溶解后过滤使用。

(二) 染色步骤

(1) 标本用 10%中性福尔马林固定液固定后,流水冲洗 12 h,蒸馏水浸洗数次。

(2) 用滤纸吸干标本表面的水分,把标本放入苏丹染液中浸染 30 min。

(3) 用 70%酒精分化,至脂肪组织呈橙黄色为止,其他组织不着色。

(4) 水洗后,浸存在 5%甲醛溶液中,可加入适量防



腐剂。

(三) 染色结果

脂肪组织呈橙红色(苏丹Ⅲ染色)或猩红色(苏丹Ⅳ)染色;其他组织不着色。

二、含铁血黄素染色法

(一) 试剂配制

Perl 染液配制方法如下。

5%亚铁氰化钾水溶液 100 mL

10%盐酸水溶液 100 mL

临用前将两液等量混合。

(二) 染色步骤

(1) 标本用10%中性福尔马林固定液固定后流水冲洗12 h,蒸馏水浸洗数次。

(2) Perl 染液浸染5~15 min,至标本出现蓝色为止。

(3) 流水冲洗数小时,用5%甲醛生理盐水液浸存标本。

(三) 染色结果

含铁血黄素的组织呈蓝色;其他组织不着色。

用此方法染色后,组织标本中含铁血黄素的颜色能维持较长时间。若出现褪色,则可用过氧化氢液恢复标本原有的颜色。

三、早期心肌梗死染色

(一) 所需试剂

(1) 孵育液的配制方法如下。

硝基四唑蓝 10 mg

蒸馏水 10 mL

0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值为7.6) 10 mL

先将硝基四唑蓝溶于蒸馏水中,临用前加入磷酸盐缓冲液,充分混合后使用。

(2) 生理盐水。

(3) 10%甲醛生理盐水液。

(二) 染色步骤

(1) 将新鲜心肌标本切成 2~3 mm 厚,用生理盐水洗净表面液体。

(2) 将标本置于 30℃ 孵育液内作用 10 min。

(3) 用生理盐水洗 3 次。

(4) 10%甲醛生理盐水固定及浸存。

(三) 染色结果

正常心肌呈深蓝色,早期心肌梗死及病变心肌、纤维结缔组织、瘢痕组织呈浅蓝色或不显色。

(四) 染色注意事项

(1) 为了防止心肌酶的活性减弱或丧失,标本应及时进行染色。标本越新鲜染色效果越好,最好控制在标本离体后 6 h 内。

(2) 避免孵育时间过长,因为长时间的孵育会导致心肌酶的弥散而影响标本染色的对比度。

(3) 孵育液须临用前现配现用。

(4) 染色后的标本存放暗处,染色结果能保存数月。

四、脑组织染色

脑取出后,先经血管灌注 10% 中性福尔马林固定液,然后悬浮固定于 10% 中性福尔马林固定液中 5~7 d。固定后的脑组织标本用流水充分冲洗,然后剥去蛛网膜和血管,根据需要将其切成 1~2 cm 厚的冠状或矢状切面标本。再将其放在平底容器内,继续用流水冲洗数小时后即可进行染色。



(一) 脑灰质染色

1. Mainlund 染色法

(1) 所需试剂:1%二氯化铁水溶液、1%黄血盐水溶液和1%盐酸水溶液。

(2) 染色步骤。

① 用滤纸吸干脑组织表面的水分,然后用1%二氯化铁水溶液染1~2 min。

② 流水冲洗1~2 min。

③ 1%黄血盐水溶液中浸染至脑灰质呈蓝色为止。

④ 流水冲洗1~2 min。

⑤ 1%盐酸水溶液处理1~2 min。

⑥ 流水冲洗,若背景颜色过深,则可用稀氨水或过氧化氢液褪色至满意为止。

⑦ 流水冲洗12~24 h,然后在10%甲醛溶液中浸存。

2. Lemaevier 染色法

(1) 试剂配制。

硫酸铜混合染液主要成分如下。

结晶苯酚	40 g
硫酸铜	5 g
蒸馏水	1 000 mL
浓盐酸	1.25 mL

(2) 染色步骤。

① 将切开的脑组织标本用蒸馏水浸洗1 h,期间需更换3次蒸馏水。

② 用滤纸吸干脑组织表面的水分,将其放入硫酸铜混合染液(预先将硫酸铜混合染液放置于60~65℃温箱中预热)中浸染1~2 min。

③ 用冷蒸馏水(4℃冰箱预冷)处理1 min。

④ 1%三氯化铁水溶液处理数分钟。

⑤ 流水冲洗 12~24 h, 置于 10% 甲醛溶液浸存。

(二) 脑白质染色

脑白质中的髓磷脂为脂肪组织中的一种类脂, 而脑灰质不含脂肪, 故可以用脂溶性染料染脑白质, 结果脑白质着色, 脑灰质不着色。

(1) 试剂配制。

油红 O 染液的主要成分如下。

油红 O	10 g
苯	640 mL

(2) 染色步骤。

① 将脑组织标本用蒸馏水浸洗 1 h, 期间需更换 3 次蒸馏水。

② 用滤纸吸干脑组织表面水分, 然后在油红 O 染液中浸染 3~5 min, 染色期间应翻动标本数次, 以便于标本均匀着色。

③ 流水冲洗 12~24 h, 用滤纸吸干脑组织表面水分, 再在脑表面涂一层 1% 明胶水溶液, 最后待明胶干了后, 将标本浸存于 10% 甲醛溶液中。

(三) 脑灰质及脑白质染色

(1) 所需试剂: 1% 硫酸铜水溶液和 1% 黄血盐水溶液。

(2) 染色步骤。

① 将新鲜脑组织或甲醛固定后的脑组织, 用 70%、80% 和 90% 的酒精分别浸泡 2~3 天。

② 1% 硫酸铜水溶液中浸染 20 min, 至标本变为蓝色为止。

③ 将步骤②处理后的标本放入 1% 黄血盐水溶液浸泡 3 min, 标本由淡蓝色变为淡褐色, 脑灰质变为深灰色。

④ 流水冲洗后, 在 10% 甲醛蒸馏水溶液中浸存。



五、组织淀粉样变染色

(一) 所需试剂

所需试剂为1%刚果红水溶液和碳酸钾饱和水溶液。

(二) 染色步骤

- (1) 标本经常规10%中性福尔马林固定液固定后,流水冲洗12 h。
- (2) 用1%刚果红水溶液染色2 h。
- (3) 碳酸钾饱和水溶液浸泡2 min。
- (4) 80%酒精分化,直到淀粉样物质呈红色为止。
- (5) 蒸馏水洗,5%甲醛溶液浸存。