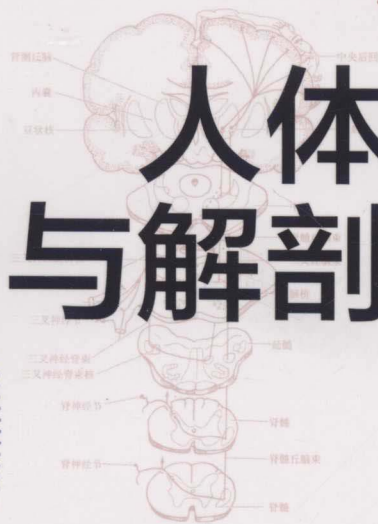




普通高等教育“十一五”国家级规划教材

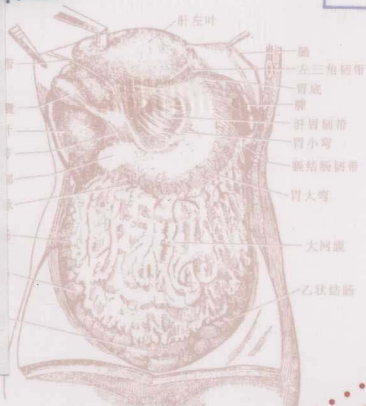
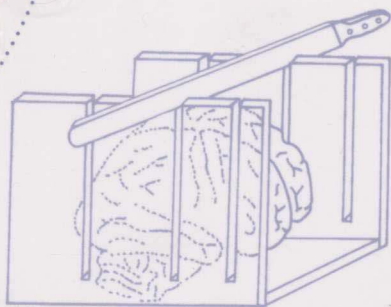


人体组织学与解剖学实验

(第5版)

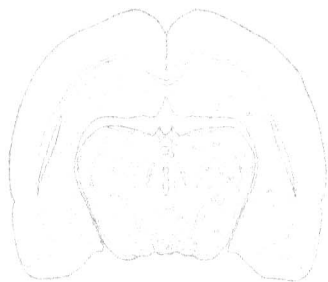
主 编
辜 清
郭炳冉
段相林

*Experiment for
Human Histology
and Anatomy*





普通高等教育“十一



人体组织学与解剖学实验

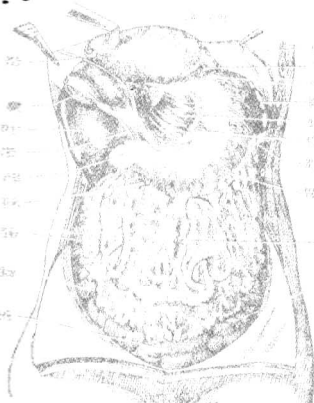
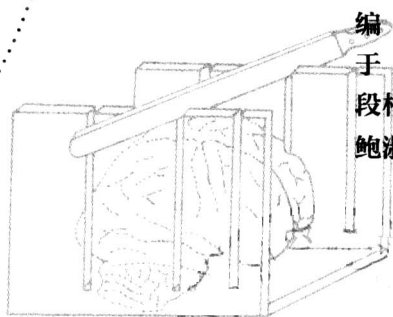
Renti Zuzhixue yu Jiepouxue Shiyān

(第5版)

Experiment for
Human Histology
and Anatomy

主 编 郭炳冉 段相林
辜 清

编 委 (按姓氏笔画排序)
手 鹏 王尚洪 刘 斌 吴 娣 林 刚
段相林 段菊如 徐金会 郭炳冉 辜 清
鲍淑兰 樊玉梅



内容提要

本书是为配合段相林等主编的《人体组织学与解剖学》(第5版)而编写的实验用教材。内容包括基本组织、各器官系统的大体解剖和显微结构、体视学参数测算、神经联系追踪、脑的立体定向、断层解剖、胚胎发育等27个实验。本次修订主要是根据前几版教材的使用情况和学科进展,更新了相关内容;并配套了数字课程,主要包括电子课件、相关的实验技术与操作技巧等。

本书可作为高等学校相关专业实验用教材,也可供相关人员阅读。

图书在版编目(CIP)数据

人体组织学与解剖学实验 / 辜清, 郭炳冉, 段相林
主编. -- 5版. -- 北京: 高等教育出版社, 2014.2
ISBN 978-7-04-039010-0

I. ①人… II. ①辜… ②郭… ③段… III. ①人体组织学-实验-高等学校-教材 ②人体解剖学-实验-高等学校-教材 IV. ①R32-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第006913号

策划编辑 赵晓媛 责任编辑 赵晓媛 李融 封面设计 于涛
责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 潮河印业有限公司
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 8.75
字数 280千字(含数字课程)
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 1981年10月第1版
2014年2月第5版
印 次 2014年2月第1次印刷
定 价 18.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 39010-00

数字课程（基础版）

人体组织学与解剖学实验

（第5版）

登录以获取更多学习资源!

登录方法:

1. 访问 <http://res.hep.com.cn/39010>
2. 输入数字课程账号（见封底明码）、密码
3. 点击“LOGIN”、“进入4A”
4. 进入学习中心

账号自登录之日起一年内有效，过期作废。
使用本账号如有任何问题，
请发邮件至：lifescience@pub.hep.cn



人体组织学与解剖学实验（第5版）

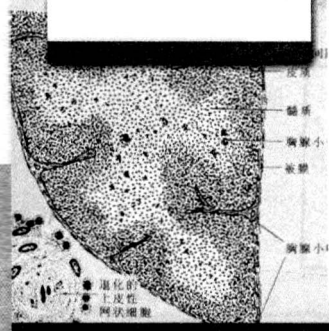
主编 卓清 郭炳冉 段朝林

内容简介 | 纸质教材 | 版权信息 | 联系方式



内容简介

本网站是与《人体组织学与解剖学实验》（第5版）相配套的数字课程，是纸质教材的扩展和补充。主要包括与书中各个实验所对应的电子课件，相关的实验技术与操作技巧等参考资料，以供教师教学和学生自学时参考。



高等教育出版社版权所有 2014

<http://res.hep.com.cn/39010>

请在具有 IE 内核的浏览器下访问该网站。其他浏览器访问，可能造成课程资源无法正常显示。

第 5 版前言

《人体组织学与解剖学实验》(第 5 版)是配合段相林等主编的《人体组织学与解剖学》(第 5 版)所编写的实验用教材。

此次修订,在实验内容的安排上基本保留了原教材的框架,主要是根据前几版教材的使用情况和学科进展,对部分实验内容进行了修订、改编,并为本书配套了数字课程,主要包括与书中各个实验所对应的电子课件和介绍相关实验技术与操作技巧的附录等,以供教师教学和学生自学时参考。

本教材的实验一至三、实验八、实验二十四由南昌大学辜清、吴娣编写。实验四至六由河北师范大学段相林、樊玉梅编写。实验七、十五、十八由河北师范大学段相林、于鹏编写。实验九、十及附录三至五、七、八、十一由山东曲阜师范大学郭炳冉编写。实验十二、二十二、二十三、二十五及附录六、九、十由南昌大学辜清、王尚洪编写。实验十一、十六由山东曲阜师范大学郭炳冉、徐金会编写。实验十七、二十七由山东曲阜师范大学郭炳冉、鲍淑兰编写。实验十三、十四、十九至二十一及附录一、二、十二、十三由南昌大学辜清、林刚编写。实验二十六及附录十四由南昌大学段菊如编写。附录十五由河北医科大学刘斌编写。全书由辜清负责统稿。

前四版的编者和出版社的编辑为本书奠定了较好的基础,在此次修订的过程中又得到高等教育出版社吴雪梅编审、赵晓媛编辑与李融编辑的热情帮助和编者所在单位的大力支持,并引用了同行其他作者的有关文献,在此一并表示诚挚谢意。

由于编者水平所限,书中难免有不足之处,恳请读者指正。

编 者

2013 年 10 月

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任；构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人进行严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话 (010) 58581897 58582371 58581879

反盗版举报传真 (010) 82086060

反盗版举报邮箱 dd@hep.com.cn

通信地址 北京市西城区德外大街4号 高等教育出版社法务部

邮政编码 100120

短信防伪说明

本图书采用出版物短信防伪系统，用户购书后刮开封底防伪密码涂层，将16位防伪密码发送短信至106695881280，免费查询所购图书真伪。

反盗版短信举报

编辑短信“JB, 图书名称, 出版社, 购买地点”发送至10669588128

短信防伪客服电话

(010) 58582300

目 录

实验一 石蜡切片法	1
实验二 透射电镜的样品制备	6
实验三 扫描电镜的样品制备	11
实验四 上皮组织	14
实验五 结缔组织	18
实验六 血与肌肉组织	22
实验七 神经组织	26
实验八 细胞形态计量体视学参数的测算	30
实验九 骨骼	35
实验十 骨骼肌	40
实验十一 循环系统	45
实验十二 免疫系统	50
实验十三 消化系统的大体解剖结构	53
实验十四 消化系统的显微结构	58
实验十五 呼吸系统	63
实验十六 泌尿系统	67
实验十七 生殖系统	70
实验十八 内分泌系统	75
实验十九 感觉器与皮肤	78
实验二十 脊髓的构造与脑干的外形	84
实验二十一 脑干的内部结构	88
实验二十二 间脑、小脑与端脑	95
实验二十三 周围神经系统	101
实验二十四 HRP 追踪神经联系法	105
实验二十五 脑的立体定向技术	108
实验二十六 人体断层概览	113
实验二十七 胚胎发育概论	125
参考文献	128

实验一 石蜡切片法

【目的和内容】

简要介绍石蜡切片的制作和苏木精(hematoxylin)-伊红(eosin)染色(简称 H-E 染色),借以了解石蜡切片制作的基本原理和一般方法。

进行组织学研究,必须把活的组织或器官制作成显微玻片标本,以便在显微镜下进行观察。显微玻片标本的制作方法很多,基本要求是尽量保持原结构的真相,应用不同的染色方法,使内部结构清晰易见。

石蜡切片法是最常用的一种显微玻片标本的制作方法。其制作过程包括以下步骤:取材、固定、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、烤片、脱蜡、复水、染色、脱水、透明和封固等。

【材料和用具】

新鲜脏器标本。

乙醇、固定剂、蛋白甘油、H-E 染色液、盐酸乙醇、二甲苯、切片石蜡、中性树胶、氨水。

解剖器^①、单面刀片、切片刀、切片机、载玻片、盖玻片、标本瓶、烧杯、量筒、漏斗、染色缸、树胶瓶、酒精灯、毛笔、绘图纸、滤纸、标签纸、熔蜡箱(或恒温箱)、展片台(或烫板)、小木块、蜡带盒、烤片盒、切片托盘、显微镜。

【操作】

一、试剂的配制

(一) 70%、80%、90%乙醇

95%以下的各级浓度乙醇是用95%乙醇加蒸馏水稀释而成。简单的稀释方法是:所需稀释的浓度是多少,就量取多少毫升95%乙醇,再加蒸馏水至95 mL即可。例如,配制70%乙醇,就量取70 mL 95%乙醇,然后加入蒸馏水至95 mL即成。

(二) 固定剂

常用的固定剂有4%甲醛溶液、Bouin液和Zenker液等。Bouin液在组织学制片技术方面

^① 本书所用“解剖器”包括:解剖刀、解剖剪、解剖镊、解剖针。

应用甚广,其配方如下:

苦味酸饱和水溶液	75 mL
4%甲醛溶液	25 mL
冰醋酸	5 mL

(三) 蛋白甘油

蛋白甘油是粘贴蜡片用的粘片剂。配法如下:取一新鲜鸡蛋的蛋清,充分搅拌成雪花状泡沫,然后滤去泡沫,加入等量甘油,搅拌均匀,再加入一小粒麝香草酚防腐。

(四) 染色液

以 H-E 染色为例,需配制苏木精染液和伊红染液。

1. 苏木精染液 苏木精是一种碱性染料,它可将细胞核染色质染成蓝紫色。配方有多种,现介绍 Harris 苏木精的配制:

甲液:苏木精	0.5 g
95%乙醇	5 mL
乙液:硫酸铝钾(或硫酸铝铵)	10 g
蒸馏水	100 mL
氧化汞	0.25 g
冰醋酸	几滴

先配制甲液,再将乙液的硫酸铝钾加入蒸馏水中,并加热使其溶解,然后将甲、乙两液混合煮沸,离开火焰后缓缓加入氧化汞。待冷却后过滤,加入几滴冰醋酸即成。

2. 伊红染液 伊红是一种酸性染料,它可使多种细胞的细胞质染成粉红色或红色。0.5 g 伊红溶于 100 mL 95%乙醇中即配成伊红染液。

(五) 盐酸乙醇

盐酸乙醇用于分色。配制方法是在 100 mL 70%乙醇中加入 1 mL 盐酸。

二、取材和固定

固定的目的在于保存组织内细胞原有的结构和形态,使其与生活时相似,因此要求所取的材料越新鲜越好。

用锐利的刀片切取小块组织,组织块的大小以厚度不超过 5 mm 为宜。然后,将取下的组织块迅速投入 Bouin 液中。固定时间为数小时至 24 h(需视组织块的大小而定)。

三、冲洗

经固定的材料,根据所使用固定剂的不同,分别用水或乙醇冲洗,以洗去固定剂。固定剂留在组织中会有碍染色。

用 Bouin 液固定的材料,可直接移入 70%乙醇中,多换几次乙醇进行冲洗,直至材料无黄色时为止。也可在乙醇中加入几滴氨水或饱和碳酸锂水溶液,以迅速洗去黄色。

冲洗后的材料若暂时不制片,可保存在 70%乙醇中。

四、脱水

柔软的组织是不易切成薄片的,故必须增加组织的硬度。石蜡切片法就是使石蜡渗入组织,以达到增硬的作用。水与石蜡是不相混合的,因此,在浸蜡、包埋前需将组织中的水分完全除去,这一步骤即为脱水。

脱水采用脱水剂,常用的脱水剂是乙醇。脱水时先从低浓度的乙醇开始,然后,递增浓度,直至无水乙醇。具体方法是:将材料依次经 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇(I)、95%乙醇(II)、无水乙醇(I)和无水乙醇(II),在各级乙醇分别历时 1~2 h。脱水应彻底,否则材料不能透明,将影响石蜡的渗入,致使难以切片。

五、透明

乙醇与石蜡也不能混合,因此,脱水后的材料在浸蜡前,还必须经过透明剂透明。透明剂既可替代组织中的乙醇,又能溶解石蜡,以利石蜡的渗入。二甲苯是常用的一种透明剂。

脱水后的材料依次经体积比为 1:1 的无水乙醇与二甲苯、二甲苯(I)和二甲苯(II),在各级历时 0.5~2 h,务使组织达到透明为止。

六、浸蜡

将已透明的材料移入熔化的石蜡内浸渍即为浸蜡。浸蜡的目的是去除组织中的透明剂,而使石蜡渗入整个组织,获得一定的硬度,以便切成薄的切片。

先将装有熔点为 56~58℃石蜡的三个蜡杯,即蜡杯(I)、蜡杯(II)和蜡杯(III),放在熔蜡箱内使石蜡熔化,熔蜡箱的温度要保持恒定(约 58℃),切勿太高或过低。然后将透明了的材料依次放入蜡杯(I)、蜡杯(II)和蜡杯(III)。浸蜡时间视材料大小而定,一般总的浸蜡时间为 2~4 h。

七、包埋

将浸蜡后的材料包埋于石蜡中,并使它凝固成蜡块,这一过程称为包埋。

包埋前,视组织块的大小先用绘图纸折成一纸盒,作为包埋的模具。纸盒折法如下(图 1-1):先折 1、2 线,次折 3、4 线,然后使 a、b 两折重叠,折出 5 线,同法折出 6 线,再折 c 线,最后依上法折出 7、8 线及 d 线即成。

将纸盒盛满已熔化的石蜡,随即将第三杯中已浸蜡的材料放入其中,应注意使组织块的欲切片的面朝向盒底,位置放正。然后速将纸盒半浸于冷水中,待石蜡表面凝结后,将纸盒全部浸入水中冷却。石蜡全部凝固后,拆去纸盒即成蜡块。组织在蜡块

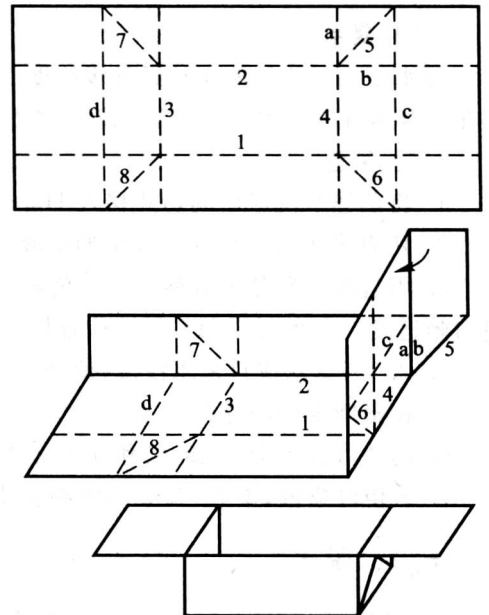


图 1-1 包埋纸盒的折法及折成的包埋纸盒

中可长期保存。

八、切片

切片前,先用单面刀片将蜡块修整成切片面上下两边平行的方形或梯形。应注意使切片面上下两边要平行,否则切出的蜡带弯曲不直,或无法连成带状。

将修整后的蜡块用蜡粘在小木块上,小木块装在切片机上,以待切片。

在旋转式切片机上将蜡块切成4~8 μm 厚的薄片。切下的薄片会连成蜡带。用毛笔轻托轻取蜡带,放在蜡带盒内备用。

九、贴片和烤片

用小玻棒蘸取一滴蛋白甘油滴于一干净的载玻片上,用手指涂匀,并加几滴蒸馏水于载玻片上。将蜡带按要求切成适当长度的蜡片,然后用小镊子将蜡片轻放在载玻片的水面上,再把载玻片放在展片台上(温度为45 $^{\circ}\text{C}$ 左右)。蜡片受热后,即慢慢展平,待完全展平后,用解剖针将切片位置拨正,倾去载玻片上的余水,将其放在烤片盒中置于50 $^{\circ}\text{C}$ 左右恒温箱内烤干。

十、脱蜡、复水和染色

染色剂多为水溶液,故切片染色前必须先经脱蜡、复水等步骤。染色方法众多,对H-E染色而言有下列步骤:

(一) 脱蜡

将烤干的切片依次放入二甲苯(I)和二甲苯(II)中,各历时5~10 min,以溶去切片上的石蜡。

(二) 复水

复水是将脱蜡后的切片经各级浓度乙醇逐渐下降到水的过程,即将二甲苯(II)中取出的切片依次移入无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇和蒸馏水,在各级溶液中停留1~5 min。

(三) 染色

1. 将蒸馏水洗涤后的切片移入Harris苏木精染液中10~30 min,使细胞核着色。
2. 用自来水洗去切片上残余的染液。
3. 用盐酸乙醇分色数秒钟。分色就是褪去细胞质等不应着色部分的颜色,而使细胞核的着色清晰适度。分色时需用显微镜检查切片的分色效果,保证分色适度。
4. 入1%氨水或自来水浸洗,使切片颜色呈蓝色。
5. 在蒸馏水中浸片刻。
6. 切片依次入70%、80%和90%乙醇,各历时1~2 min。
7. 入伊红染液,染2~5 min,使细胞质着色。

十一、脱水

切片依次入95%乙醇(I)、95%乙醇(II)、无水乙醇(I)和无水乙醇(II),在各级溶液中停留1~5 min。

十二、透明

切片入体积比为 1 : 1 的无水乙醇与二甲苯、二甲苯(I)和二甲苯(II),在各级溶液中停留 1~5 min。

十三、封固

将切片从二甲苯(II)中取出,用纸或布擦去材料周围的二甲苯。在材料中央滴一小滴中性树胶,然后用镊子加盖盖玻片。

切片封好后,放在切片托盘上待树胶干燥。贴上标签,写明切片名称,即可用于观察。

染色结果:细胞核呈鲜艳的蓝色,细胞质及细胞间质呈粉红至红色。

【思考题】

1. 制片是一个连续的操作过程,往往要连续几天才能完成,因此,事先一定要制订工作日程计划,应按顺序进行工作。如不能一次完成制片全过程,可在哪几个步骤时中断操作,保存组织?
2. 制片的各个步骤都是互相关联的,为什么脱水不彻底就会影响到透明的程度,以至影响蜡块的质量?

实验二 透射电镜的样品制备

【目的和内容】

简要介绍超薄切片技术,借以了解透射电镜的样品制备方法。用透射电镜观察组织细胞的超微结构,超薄切片标本的制备是个关键。它要求将生活状态下细胞的细微结构完好真实地保存下来。超薄切片技术的基本原理和步骤与石蜡切片法基本相似,包括取材、固定、浸洗、脱水、浸透、包埋、聚合、制膜、切片及染色等步骤。

【材料和用具】

新鲜脏器标本。

戊二醛、锇酸、Sørensen 磷酸缓冲液、Palade 醋酸-巴比妥缓冲液、丙酮、双蒸水、环氧树脂 618 或 Epon 812、十二碳烯琥珀酸酐(也称十二烷基琥珀酸酐, dodecanyl succinic anhydride, 简称 DDSA)、甲基内次甲基四氢苯二甲酸酐(也称六甲酸酐, methyl nadic anhydride, 简称 MNA, 或 nadic methyl anhydride, 简称 NMA)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, 简称 DBP)、2,4,6,-三(二甲氨基甲基)苯酚[2,4,6-tris-(dimethylaminomethyl)phenol, 简称 DMP-30]、Formvar(聚乙烯醇缩甲醛)、氯仿、醋酸双氧铀、硝酸铅、柠檬酸钠。

注射器、烧杯、青霉素小瓶、试剂瓶、载玻片、4~6 mm 厚硬质玻璃、酸度计、恒温箱、冰箱、解剖器、滤纸、牙签、双面刀片、铜网、医用胶囊或包埋模板、胶带、制刀机、超薄切片机。

【操作】

一、试剂的配制

除包埋剂外,所用试剂最好在使用的前一天配好,置冰箱中(4℃)备用。

(一) 缓冲液

1. Sørensen 磷酸缓冲液

A 液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61 g
(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	53.65 g
(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.64 g
双蒸水	加至 1 000 mL

B液: 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液

NaH₂PO₄ · H₂O 27.60 g
 (或 NaH₂PO₄ · 2H₂O 31.21 g)
 双蒸水 加至 1 000 mL

A液与B液按表 2-1 比例混合后,即得所需 pH 的缓冲液,若再用双蒸水将溶液稀释一倍,则配得 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液。

表 2-1 磷酸缓冲液配制表

pH(25 °C)	5.5	6.8	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5
A液/mL	6	49	61	67	72	77	81	84
B液/mL	94	51	39	33	28	23	19	16

2. Palade 醋酸-巴比妥缓冲液

巴比妥钠 2.89 g
 无水醋酸钠 1.15 g
 (或含 3 分子结晶水的醋酸钠 1.90 g)
 蒸馏水 加至 100 mL

此液较稳定,4 °C 下可保存数月。

(二) 固定剂

1. 1%~5%戊二醛固定剂 市售戊二醛多为 25%水溶液,可按表 2-2 配制所需的戊二醛固定剂:

表 2-2 戊二醛固定剂配制表

戊二醛最终浓度(%)	1	1.5	2	2.5	3	4	5
0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2~7.4)/mL	50	50	50	50	50	50	50
25%戊二醛水溶液/mL	4	6	8	10	12	16	20
加双蒸水至/mL	100	100	100	100	100	100	100

2. 钨酸固定剂 钨酸毒性较大,应在通风橱内配制,一般用双蒸水配成 2%贮存液。固定用 1%钨酸溶液,其配法较多,现介绍两种方法如下:

(1) Palade 钨酸固定剂

2%钨酸贮存液 25 mL
 Palade 醋酸-巴比妥缓冲液 10 mL
 0.1 mol/L 盐酸 10 mL
 双蒸水 5 mL

混合后,用酸度计测定,调节溶液的 pH7.2~7.4。

(2) 钨酸磷酸缓冲液固定剂

2%钨酸贮存液 25 mL
 0.2 mol/L 磷酸缓冲液, pH7.2~7.4 25 mL

(三) 包埋剂

常选用环氧树脂 618 或 Epon 812。

1. 环氧树脂 618 的配方

环氧树脂 618	6 mL
DDSA	4 mL
DBP	0.3~0.8 mL(夏季减半)
DMP-30	0.1~0.2 mL(临用时加入)

2. Epon 812 的配方

A 液: Epon 812	10 mL
DDSA	16 mL
B 液: Epon 812	10 mL
MNA	8.9 mL

分别将 A 液、B 液配好,然后根据不同的硬度要求量取不同比例的 A、B 液。A 液多则包埋块软, B 液多则硬。一般在冬季 A、B 液的配制体积比为 1:4,夏季为 1:9。混合 A、B 液后,以 1%~2%的容积比加 DMP-30,充分搅拌。

(四) 染色液

1. 醋酸双氧铀染色液

醋酸双氧铀	2 g
50%乙醇	100 mL

染色液呈淡黄色,应避免光保存。出现絮状沉淀或变色时,废弃不用。

2. 柠檬酸铅染色液

硝酸铅	1.33 g
含 2 分子结晶水的柠檬酸钠	1.76 g
蒸馏水	30 mL

放入 50 mL 容量瓶中,用力振荡 30 min 后,溶液呈乳白色浑浊液。加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 8 mL,溶液变为透明液,用蒸馏水定容至 50 mL。

二、取材与固定

取一小块组织放在预先冷却(4℃左右)的固定剂中,然后取出置一清洁的载玻片上,滴一滴预冷的固定剂在组织块上。再用锋利的刀片将材料修切成小于 1 mm³ 的小块。在炎热的夏天操作时,需在载玻片下放置冰块。

将修切好的组织块用牙签移入盛有固定剂的青霉素小瓶中。贴上标签,注明所取材料及日期。

固定常用戊二醛、锇酸双固定法。先用 3%~5% 戊二醛固定剂进行前固定,4℃下固定 24 h,然后在 4℃下用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2~7.4)浸洗 4 次,每次 10 min(可在最后一次浸洗液中置冰箱中过夜)。再用锇酸在 4℃下进行后固定 1~2 h,固定时间不宜过长,否则材料易变脆。

一些对缺氧敏感的器官及脑组织等,最好先灌流,即从心脏或动脉处注入戊二醛固定剂,然

后再取材,将组织切成小块继续作常规的双固定。

三、浸洗与脱水

用磷酸缓冲液(pH7.2~7.4)进行浸洗,在4℃下洗4次,每次10min。组织块经彻底浸洗后,可按下列顺序进行脱水。

依次入50%丙酮、70%丙酮、80%丙酮和90%丙酮,4℃下每级15~20min,再在室温下入纯丙酮(2~3次),每次10~15min。如当天不能完成后续的浸透、包埋等步骤时,可置于70%丙酮中过夜,绝不能在高浓度的丙酮中过夜。

四、浸透与包埋

脱水后,在室温、相对湿度不超过75%(尽可能干燥)的条件下,将组织块置各级浸透液中逐级浸透至包埋。步骤如下:

1. 入1:1丙酮和包埋剂中浸透1h。
2. 入1:3丙酮和包埋剂中浸透6~10h(至少需3h)。
3. 入纯包埋剂中(35~37℃)浸透5h或过夜。

包埋时,可先用注射器注入少量包埋剂于已烘干的医用胶囊或包埋模板中,再用牙签将浸透的组织块挑起,放入胶囊或包埋模板的底部,然后将胶囊或包埋模板灌满包埋剂,放上标明组织块名称的标签。包埋剂应在临用时配制。

五、聚合

将包埋好的样品置60℃恒温箱中经48h,变硬后即完成聚合。聚合也可37℃(12h)→45℃(12h)→60℃(24h)依次逐步进行。

六、包埋块的修整

聚合后的样品即是组织包埋块。包埋块若暂不切片应放在有盖小瓶中,再放入干燥器内保存,以防包埋块返潮变软。

切片前需修整包埋块,将包埋块夹在样品夹内,先用刀片粗修,然后在实体镜下或用专门的修块机细修。

修整时,先削去顶端的包埋剂暴露组织,然后沿组织的四个边修整,使之成为一个四边形的锥体。切片面要求修得较光滑,呈梯形或长方形,面积以1mm²左右为宜。

七、制膜

光学显微镜的切片标本是放在载玻片上进行观察的,而超薄切片标本要耐受电子束的轰击,需放在载网(常用的为铜网)上进行观察。载网上还需附有支持膜,支持膜通常选用Formvar膜。制备方法如下:

1. 制备0.2%~0.4%的Formvar氯仿溶液作为制膜液。
2. 用洁净的载玻片浸入制膜液中静置后取出,倾斜放置,干后玻片上即结有一层很薄的膜。
3. 用锋利的刀片或针头沿玻片周缘将膜划破,放入蒸馏水中,使膜漂浮于水面。

4. 将洗净的铜网按适当间距排于膜表面,再用滤纸贴附于铜网上,当滤纸湿润时,用镊子夹住滤纸边缘,将带有铜网的滤纸从水面捞起,晾干后备用。

八、切片与切片的捞取

切片用玻璃刀切片,玻璃刀可选用4~6 mm厚的硬质玻璃手工或用专用的制刀机制备。制成的玻璃刀呈三角形,其斜面锐利的一端即为刀刃面。在刀刃下端的斜面上,要用胶带做一刀槽,底边用石蜡封死,内盛蒸馏水,使切下的切片可漂浮于水面上。

切片时,将修整过的包埋块装在超薄切片机上夹紧,安好玻璃刀,调节好角度再进行切片。切片的厚度可利用切片的干涉色进行判断,一般以银灰色的切片为好,其厚度为50 nm左右。

用睫毛毛制作的睫毛针将所需的切片集在一起,把蘸有氯仿的滤纸放在切片的上方,利用氯仿蒸气使切片展平,然后用载网捞取。

捞取切片可用镊子夹持附有支持膜的铜网,使膜面向下与切片迅速接触,让切片贴附于铜网上,把铜网移出水面置无尘处晾干后即可染色。

九、染色

未经染色的切片,在透射电镜下观察反差较小,染色可提高样品的反差,显示出清晰的超微结构。一般是用重金属盐来达到染色的目的,最常用的方法为醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法。染色在蜡盘(可用培养皿灌石蜡制成)上进行,其步骤如下:

1. 将醋酸双氧铀染色液逐滴加在蜡盘上。
 2. 把铜网附有切片的一面与醋酸双氧铀染色液表面相接触,染30 min。
 3. 取出铜网,经3次蒸馏水漂洗后用滤纸吸干。
 4. 用另一蜡盘,逐滴将柠檬酸铅染色液加在蜡盘上,并在蜡盘四周放上几粒固体氢氧化钠,以防染色液产生沉淀。
 5. 将经醋酸双氧铀染色后的铜网有材料的一面与柠檬酸铅染色液表面相接触,染30 min。
 6. 取出铜网,经3次蒸馏水漂洗后用滤纸吸干置干燥器中。
- 经以上步骤制作的标本即可用透射电镜观察。

【思考题】

1. 超薄切片与石蜡切片有什么不同?
2. 超薄切片有哪些主要步骤?