

# 组织学石蜡切片制作中固定方法的改良

刘 艳 周 杰 黄宜兵 张桂荣 姜 丹 邵 妍 李臣亮 孟庆繁\*

(吉林大学生命科学学院 吉林长春 130021)

**摘要** 固定方法是组织学中制作优良石蜡切片的基础。通过对小鼠组织取材方法的改进、不同固定液的对比、固定方法的改良,探索出一种简单且易于本科生实验教学的石蜡切片固定方法。

**关键词** 石蜡切片 固定方法 组织学

中国图书分类号:Q-33 文献标识码:B

组织学中石蜡切片及其染色是了解组织细胞的活动、分化及细胞间相互关系的最佳实验。如何使本科生在有限时间内制作出高质量的石蜡切片,加深对细胞理论的认识,笔者为此不断探究简单易行的操作方案。本文以固定方法为突破口,通过改良固定方法,提升学生获得理想切片的成功率。

在本科生物学石蜡切片实验教学中,固定化的目的在于:1)保持细胞、组织的固有形态和结构,减少并终止内源性或外源性的酶反应,防止组织或细胞的自溶;2)实现组织的硬化,便于后续的切片操作;3)增强后续染色作用。选择何种固定化方法对石蜡切片,以及染色实验的成功率及实验效果的影响很大,多数固定化试剂是由含有醛类(如甲醛、戊二醛)、氧化剂(如重铬酸钾、高锰酸钾)、蛋白变性剂(如甲醇、乙醇、醋酸)或氯化汞、苦味酸等试剂配制而成。为进一步提高本科生物学石蜡切片实验教学的安全性和实验成功率,以小鼠肝脏、脾脏、肾脏和心脏为对象,进行组织固定化试剂和固定化方法的探索。

## 1 取材

采用昆明小鼠的肝脏、脾脏、肾脏和心脏4个组织制作石蜡切片。以往实验采用小鼠颈部脱臼处死,但由于脏器内残留血液较多,特别是脾脏,影响了染色后的观察结果,导致部分学生实验结果不理想<sup>[1]</sup>。为此,采用剪断颈动脉,将小鼠头朝下倒空1 min,尽量将尸体内的残留血液控出,以减少脏器内多余的血液成分,此方法与灌流法相

比,简单易行,可达到预期的实验结果。为保持脏器结构的完整性,取材时尽量减少金属器械对脏器的碰触,夹取脏器时用2根棉棒小心地移取。剔除脏器周围的脂肪组织及切割组织时,应使用锋利且较薄的刀刃,避免对组织的反复切割,将组织切成约5 mm × 5 mm × 2 mm大小。

## 2 固定

**2.1 固定液的选择** 固定液中化学成分的pH、渗透力、固定时间等均影响石蜡切片的质量和染色观察结果,在以往教学中曾采用10%中性福尔马林作为固定液,但发现在切片时易造成明显破裂;尝试使用Bouin氏液(苦味酸、福尔马林、冰醋酸),但发现使用此种固定液会造成细胞质和细胞核的对比不明显;使用Heely氏液(重铬酸钾、硫酸钠、氯化汞、福尔马林)对肝、脾等脏器有较好的固定作用,但由于Heely氏液中含有毒性物质氯化汞,容易污染环境且不易管理,故未采用;目前将卡诺氏固定液(Carnoy's fluid)(v:v=乙醇75%:冰醋酸25%)进行改良,去除了卡诺氏固定液中的氯仿,改良后的卡诺氏固定液实验效果理想,且配制简单,安全环保,成本低廉。

**2.2 固定方法** 良好的固定基础是优质切片的保证,根据多年实验教学经验,采用二次固定法,即第1次固定30~40 min后,更换固定液,重新固定6~12 h。为保证固定充分,选用实验材料20~30倍体积的固定液进行固定,以10 mL EP管作为盛放固定液的容器,放置好实验材料后,扣好EP

\* 通信作者

管盖,并用保鲜膜将EP管口封严,防止试剂挥发,从而保证固定液中试剂的浓度。

固定过程中,实验材料容易沉淀在固定容器底部,造成实验材料固定不充分,以往实验中,要求学生在固定时翻动组织,由于固定时间长达6~12 h,学生不能保证经常翻动。为此,将实验材料包裹在3 cm×3 cm的纱布中,包裹时不可过紧,以免人为造成组织损害,然后将其放入固定容器,保证实验材料任何一个部位都不与固定容器壁直接接触,使实验材料充分固定。为了便于操作,对于小块组织,可将EP管放置在旋转摇动器上缓慢摇动,也

能避免与容器壁的直接接触。

3 结论

方法改进前、后,学生获得的实验结果分别如图1和图2所示(本文附图见插页2),可以看出,改进后的方法操作简单,实验结果成功率高,达到了预期实验目的。

改进后的石蜡切片染色实验中,采用改良的卡诺氏固定液(v:v=乙醇75%:冰醋酸25%),避免了传统固定化方法及固定化试剂对环境和实验操作人员的危害,以及醛类、氯化汞、氧化剂的使用(表1),提高了实验的安全性和环境友好性。

表 1 固定化试剂组成成分及其安全性比较

固定化试剂	组成成分	危害
Bouin氏液	苦味酸	呼吸、饮食、透皮吸收,皮肤易被染黄,可导致头痛、头晕、恶心呕吐、引发末梢神经炎、膀胱刺激症状及肝肾损伤
	甲醛	刺激黏膜,引起过敏反应、皮肤炎或湿疹,疑似致癌物质
	冰醋酸	蒸汽对眼和鼻有刺激作用,灼伤皮肤一段时间(几小时)内易产生水泡,乳胶手套不能起到防护作用
Heely氏液	重铬酸钾	被国际癌症研究机构划归为第1类致癌物质,严重污染环境,实验中相关试剂废液不可直接排放到环境中
	硫酸钠	对眼睛和皮肤有刺激作用,未有特殊燃烧爆炸特性,对环境有危害,污染大气
	氯化汞	疑似致癌物,有致突变性,汞离子可使含巯基的酶丧失活性并失去功能;还能与酶中的氨基、二巯基、羧基、羟基及细胞内的磷酸基结合,引起相应损害
	甲醛	刺激黏膜,引起过敏反应、皮肤炎或湿疹,疑似致癌物质
卡诺氏固定液 (Carnoy's fluid)	乙醇	易燃、低毒
	冰醋酸	蒸汽对眼和鼻有刺激作用,灼伤皮肤一段时间(几小时)内易产生水泡,乳胶手套不能起到防护作用
	氮仿	主要作用于中枢神经系统,具有麻醉作用,对心、肝、肾有损害,污染环境,对水体可造成污染,疑似致癌物
改良卡诺氏液	乙醇	易燃、低毒
	冰醋酸	蒸汽对眼和鼻有刺激作用,灼伤皮肤一段时间(几小时)内易产生水泡,乳胶手套不能起到防护作用

石蜡切片的制作步骤繁琐、耗时长、用药量大、安全性差,在教学中应注重细节,调动学生的积极性、创新性,培养学生对实验细节的思考,使其更好地掌握实验原理及操作要点。安排好实验内容,使学生在有限的时间内掌握更多的知识;树立学生的安全意识和环保意识,养成良好的科研素养<sup>[6-8]</sup>。

无论在科研中还是在临床应用上,要想制作一张高质量的石蜡切片,都必须处理好每个实验细节并合理解决实验中出现的问題。为保证教学质量,达到良好的实验效果,在本科教学中更需要努力探索合适的操作方法,以便做出优质的石蜡切片。

主要参考文献

[1] 孙海梅,尚宏伟,张立新,等.不同固定液对大鼠脾石蜡切片

HE染色标本的影响.中国医学装备,2011,8(10):48.

[2] 侯春春,徐水.浅析影响石蜡切片质量的关键因素.中国农学通报,2009,25(23):94.

[3] 李洁.石蜡切片技术在本科实验教学中的应用.中国现代教育装备,2008(12):103.

[4] 滕利荣,孟庆繁,陈霞,等.生物学基础实验教程,3版.北京:科学出版社,2008.

[5] 王凤琴,张慧.组织学石蜡切片制作方法的改进.济宁医学院学报,2014,37(1):47.

[6] 周杰,刘艳,张桂荣,等.石蜡切片技术改进及细胞生物学实验的统筹.实验室研究与探索,2014,33(5):167.

[7] 杨捷频.常规石蜡切片方法的改良.生物学杂志,2006,23(1):45.

[8] 滕利荣,程瑛琨,孟庆繁,等.“生物学基础实验”国家精品课程的建设.中国大学教学,2009(1):85.

(E-mail:liuyaorui@126.com  
mengqf@jlu.edu.cn)





图 1 白头叶猴 (汤练宗、梁霁鹏摄)

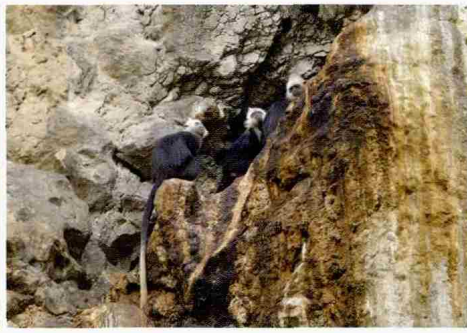


图 3 夜宿石洞 (汤练宗、梁霁鹏摄)



图 4 破碎化的栖息地



图 5 采食嫩叶 (汤练宗、梁霁鹏摄)



图 6 飞檐走壁 (汤练宗、梁霁鹏摄)



图 2 不同实验处理对溶液颜色变化的影响

## “白头叶猴对喀斯特石山生境的适应”一文附图

## “对‘检验光合作用需要二氧化碳’实验的改进”一文附图

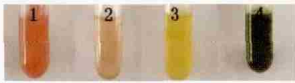


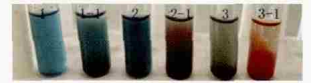
图 1 4 种匀浆液 (试管 1~4 内依次为西红柿、西瓜、桔子、韭菜匀浆)



图 2 4 种匀浆加入斐林试剂后颜色变化

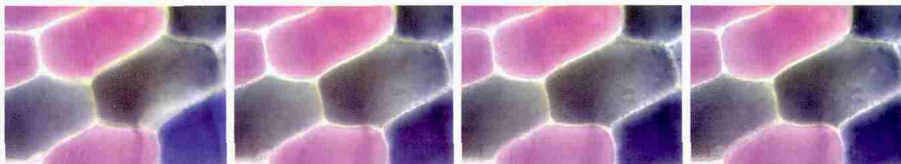


图 3 4 种匀浆加入斐林试剂并水浴加热 2 min 后颜色变化

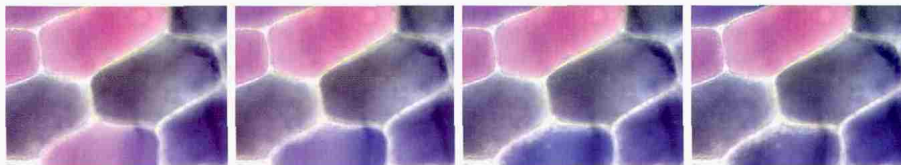


(葡萄糖溶液浓度: 试管 1、1-1 为 2 g/L, 2、2-1 为 3 g/L, 3、3-1 为 4 g/L)  
图 4 葡萄糖溶液在水浴加热与酒精灯直接加热后的颜色变化

## “关于‘还原糖鉴定实验’的探究”一文附图



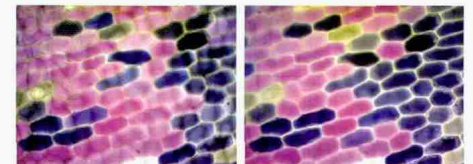
22:57 22:59 23:00 23:03



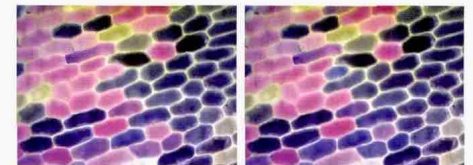
23:14 23:15 23:16 23:17

(图中数字表示实验时刻; 此图采用 motic 数字显微镜拍摄, 放大倍数为  $10 \times 40$ )

图 1 钼酸钠水溶液处理洋葱外表皮细胞实验结果图



23:25 23:40



23:49 23:52

(放大倍数为  $10 \times 10$ )

图 2 钼酸钠水溶液处理洋葱外表皮细胞实验结果图

## “简单易行的离子跨膜运输实验”一文附图



图 1 四色小球标记示例 (2 对、3 对)



图 2 摇奖机模拟雌、雄生殖器官示例

## “摇奖机在‘性状分离比模拟实验’中的开发利用”一文附图

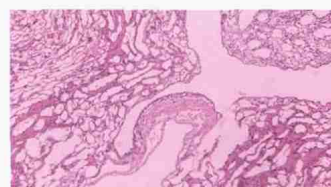


图 1 方法改进前 (Bouin's) 学生的肾脏切片染色结果

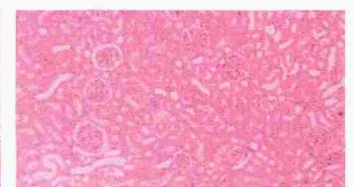


图 2 方法改进后学生的肾脏切片染色结果

## “组织学石蜡切片制作中固定方法的改良”一文附图