

石蜡切片技术改进及细胞生物学实验的统筹

周 杰, 刘 艳, 张桂荣, 孟庆繁, 滕利荣
(吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130023)

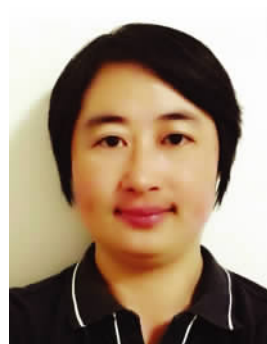
摘 要: 以细胞生物学实验为代表的生物学实验教学中, 存在知识点多、技术操作要点多、课时有限等具体问题, 针对细胞生物学实验课的教学实践, 以提高学生综合创新能力为目的, 围绕实验教学创新, 在实验内容、实验方法、时间统筹安排等多方面进行了探讨。在不增加实验投入前提下, 改进了以石蜡切片技术为代表的实验环节、基于技术改造调整实验时间, 使学生在有限的时间内掌握更多的实验技术, 并获得对同一实验进程从多角度多层次进行分析的训练, 提高了实验效率, 培养了学生综合分析解决实际问题的能力和科学思维, 提高了实验教学的质量。

关键词: 细胞生物学实验; 石蜡切片; 教学改革

中图分类号: G 642.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-7167(2014)05-0167-04



Improvement of the Technology of Paraffin Sections and the Time Arrangement in Cell Biology Experiments

ZHOU Jie, LIU Yan, ZHANG Gui-rong, MENG Qing-fan, TENG Li-rong
(College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract: In this paper, in order to improve the creativity of students, the experimental content, experimental methods and time arrangements are discussed based on the teaching experience of the cell biology experiments course. After the experimental techniques improvement and the experimental time adjusted, students can master the more experimental techniques in a shorter amount of time, and they can be able to be trained to analysis the same experimental process from multi-level and multi-angle. Thus the experimental efficiency is improved and the students obtain the ability to resolve practical problems and scientific thinking.

key words: cell biology experiments; paraffin sections; teaching reform

0 引 言

以细胞生物学实验为代表的生物学实验教学中, 存在知识点多、技术操作要点多, 课时有限等具体问

题。如何在有限的课时内, 既完成大纲要求的教学任务, 又激发学生的学习热情、培养学生综合分析解决实际问题的能力和科学思维, 就成为现代生物学实验教学及教学改革的重要内容及方向。

细胞生物学是一门实验性很强的学科, 也是生命科学领域中重要的基础课程, 学生通过细胞生物学课程了解细胞结构及细胞活动的基本规律, 细胞生物学理论课与实验课密不可分。细胞生物学实验课既是理论课程的验证和补充, 又是培养学生创新能力、独立思考能力、分析解决问题能力的重要手段^[1-3]。而细胞生物学实验专业性较强, 只有在顺利完成基础实验培训之后, 才有可能作进一步的设计创新实验及科研性实

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 吉林省中医药管理局项目(2010-PT053); 吉林大学第三批重大教学改革项目(ZD110503)

作者简介: 周 杰(1976-), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 副教授, 主要从事微生物与生化药学研究及生物学实验教学工作。

Tel.: 0431-85155310; E-mail: jzhou@jlu.edu.cn

通信作者: 滕利荣(1954-), 男, 吉林长春人, 教授, 副院长兼吉林大学国家级生物实验教学示范中心主任, 主要从事生物技术制药研究。

E-mail: tenglr@jlu.edu.cn

验,这就要求我们合理分配基础性实验与设计创新实验、科研性实验各部分的时间,充分提高时间利用率,使学生得到更多的独立动手机会,提高其独立思考、分析解决问题的能力。

笔者结合细胞生物学实验课的教学实践,对实验方法及时间统筹安排等方面进行了改进,希望通过本实验课教学,使学生在相对较短的时间内掌握基本的细胞生物学实验技术,增强学生对理论课知识的理解,为接下来的设计创新实验及研究性实验打下基础。

1 统筹安排实验时间

我院细胞生物学实验教学任务繁重,每学期64学时,参与实验的本科生人数近200人,分6组进行,每组需要做:①培养技术、切片机使用技术;②倒置显微镜的使用技术;③植物组织培养;④石蜡切片;⑤细胞内多糖观察;⑥细胞内核酸观察;⑦鸡血红细胞的融合实验等多个实验项目^[4-7]。我们曾经将每一部分分开进行(见图1),虽然这样可以避免各实验项目之间的相互干扰,减少错误发生率,但是会大大延长实验时间,学生完成实验需7天。由于实验时间分配不合理,有时学生忙的不可开交,不能很好掌握实验内容;有时却又无事可做,使学生产生厌烦情绪,对实验效果影响颇大。为此,我们将其中的部分实验进行整合,将实验分3天进行(见图2):第1天,进行仪器设备及相关技术培训,动物处死,组织切取及固定(过夜);第2天,进行植物伤愈组织培养、石蜡切片实验的脱水、透蜡、包埋(过夜)、动物细胞融合;第3天,进行石蜡切片实验的切片、展片、烘干、复水、HE染色与福尔根染色、PAS染色。但是由于实验时间限制,展片后烘干时间较短(1至2h),为避免在复水、染色步骤组织切片的丢失,学生往往利用酒精灯外焰对载玻片上的蜡带进行较长时间的展片操作,往往会造成蜡带熔化和组织破坏,学生很难针对展片程度进行准确判断,进而影响实验的成功率和效果。为了避免上述问题,学生通常

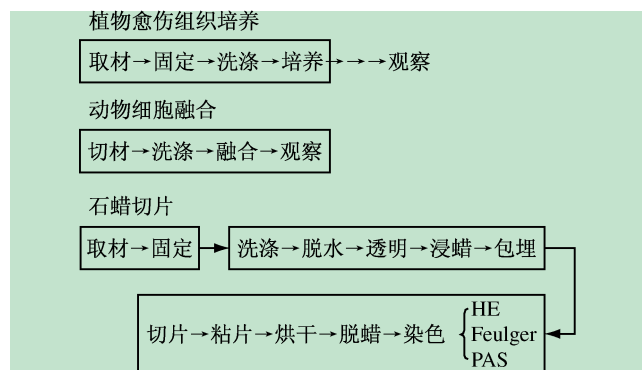


图1 细胞生物学实验安排

注:每个方框代表1天实验,每个实验分别安排,这样虽然可以避免实验之间的干扰,但占用过多时间

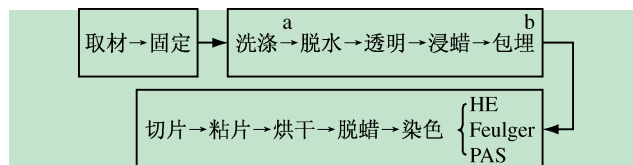


图2 改进后细胞生物学实验安排

注:每个方框代表1天; a: 植物愈伤组织培养实验; b: 动物细胞融合实验,将3个实验套作,节约一部分时间,但是这样安排实验烘干时间过短,容易在后续实验过程中造成组织丢失,很多学生看不到染色结果

会反复向教师询问,是否可以进行下一步操作,不仅大大增加了实验教师的工作量,而且来自教师多次否定的回答,使学生产生较强的挫败感,降低了对实验的兴趣。针对以上问题,我们对实验中的限速步骤进行了改进,缩短了操作时间,进而使展片、烘干操作提至前1天,然后过夜,充分延长烘干时间,下文将对实验方法改进进行进一步阐述。

另外,原来动物细胞融合实验安排在石蜡切片之后进行,学生观察到的细胞融合率非常低,经过分析,我们认为细胞融合率低的原因主要是由于融合时间比较短,于是对实验时间进行调整,将动物细胞融合安排在石蜡切片实验中间(从脱水到包埋步骤之间),具体时间由学生自主统筹。这样在石蜡切片实验过程中,学生可以随时观察细胞融合结果,感兴趣的学生还可以在实验教师的引导下,看到动物细胞融合状态随时间的变化,可以自主设计研究动物细胞融合实验中PEG添加量、融合温度对实验结果的影响,可以进行融合率与时间关系的研究,在不增加实验投入前提下,使学生能够得到在同一实验进程中从多角度多层次进行分析的训练,提高了学生的实验兴趣与科研能力。

2 改进实验方法

石蜡切片实验是细胞生物学实验的重要部分,迄今为止石蜡切片仍然是疾病诊断,尤其是病变性质判断的重要手段^[8-9]。实验中涉及到断头处死小鼠,剖开腹腔,取出组织,冲洗,修切成小块,加入固定液进行固定,各级乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片,染色,显微镜下观察等多个操作步骤,每一步操作都会对结果造成至关重要的影响,要求操作者具有很好的实验技巧,对于某些步骤(如包埋),不得不由实验教师进行演示实验,而学生不能参与,造成学生动手能力得不到提高,因此我们把其中某些步骤操作进行改进,使其更适宜学生操作,让学生更多的参与到实验中,动手动脑,不仅提高学生实验技能,而且使他们具有分析问题、解决问题的意识,提高其独立研究能力。

石蜡切片过程中,最易受操作人员实验技术影响的步骤是浸蜡、包埋,而且包埋效果直接影响到实验结果的好坏。原来本科学生浸蜡、包埋部分操作成功率

仅为10%~16%,甚至更低,不仅大大降低整体实验的速度、延长实验时间,而且由于大量重复操作,很容易造成学生产生厌烦情绪,对实验失去信心。已经有相关研究人员对常规石蜡切片方法进行了研究,并取得了较好的效果^[10-13]。中国科学技术大学的杨捷频提到在夏季、冬季分别选择高熔点(58~60℃)高硬度的蜡和选择低熔点(54~56℃)低硬度的蜡,并且不同组织采用硬度不同的蜡。但是在本科教学实验中我们试用之后效果并不明显,这可能与本科生实验操作技术的熟练程度有关,所以进一步发掘新的实验技术改进,降低这一操作的技术门槛,除了对相关研究人员具有一定的辅助意义外,对本科生石蜡切片实验教学就显得尤为重要;弯雪燕等自制铁皮包埋盒,利用这一改进实验设备,取得了较好的效果,但是该设备改造仅适用于小规模应用,不适于40人甚至更多人同时参与的本科生实验,而如果扩大设备规模,则会增加实验成本。

经过了多次实验改进探索,试图降低这一实验步骤的技术门槛,提高操作的成功率,先后进行了下面4个实验:①烘箱或培养箱辅助蜡盒包埋,我们分别采用电烘箱和培养箱,保证石蜡的温度,这样做虽然保证了操作的成功率,但是由于参与实验学生较多,频繁开关设备的门,对这类仪器设备损耗较大;②eppendorf管直接包埋^[14],我们用水浴锅在4.5 mL eppendorf管中直接进行浸蜡、包埋,待蜡凝固后,破坏eppendorf管,取出管内的蜡块,但是这样得到的蜡块是圆柱形,不仅给修蜡造成麻烦,而且由于修蜡除去的部分较多,组织也易丢失;③水浴锅边缘热台蜡盒包埋,在恒温水浴中化蜡,把蜡盒放在水浴锅边沿,以提高包埋盒内外温度,尽量缩短浸蜡、包埋之间的时间间隔,保证温度变化较小,但是由于实验中操作人员较多,水浴锅边沿较窄,容易因操作人员间的相互拥挤,使包埋盒落水,造成实验的频繁失误和失败;④浮漂热台蜡盒包埋,经过多次探索,我们采用在4.5 mL eppendorf管中装入2至3 mL石蜡对样品进行最后一步浸蜡,利用浮漂使其漂浮在恒温水浴锅中,同时在装载了样品的eppendorf

管上部配以较重的器物,保证装载样品的eppendorf管全部浸入并漂浮在60℃水浴锅中,同时另取一个浮漂放在此水浴锅中,把容积为2至3 mL的包埋盒放在浮漂上,待浸蜡结束后,马上将样品管中的样品和熔蜡倒于包埋盒中,此时样品在包埋盒内部处于接近凝固的固液混合态,可以利用浸泡在同温度下的蜡缸内取出的牙签对目的样品组织进行位置调整,最后从浮漂上取出蜡盒,将蜡盒置室温、冷却,整个过程一气呵成,有效避免了浸蜡、包埋过程中的温度变化,提高了操作成功率,而且可以手动调整样品组织的位置,避免了组织位置不适对下一步的修蜡造成的影响,保证了切片质量。

经过对197名本科学生的教学实践证明,实验方法改进后学生操作成功率由原来的10~16%,提高到83~91%,实验操作时间由原来的4至5 h缩短为1至2 h,此方法具有操作简单、经济实用、节能降耗等优点,又能充分保证和改善包埋质量,提高工作效率,大幅度缩短实验时间,在后续的切片及染色实验中证明新方法制得的组织包埋蜡块具有与传统方法相同或者相近的实验效果,更为重要的是,新方法的使用避免了样品组织沉浸在蜡块底部、样品组织在蜡块中排布取向不合理、样品组织周围存在空洞等常见问题的出现。

另外在实验时间由4至5 h缩短为1至2 h的基础上,我们将实验时间进行进一步调整(见图3),将原来第3天实验内容中的切片、展片、烘干操作调整至第2天实验内容中,新的第2天实验内容为:植物伤愈组织培养、动物细胞融合、石蜡切片实验的固定、脱水、透蜡、包埋、切片、展片、烘干(过夜)。这一调整的意义在于可以提高蜡带在载玻片上的固定程度,避免在复水、HE染色与福尔根染色、PAS染色等实验步骤中组织切片的丢失。我们改造了包埋技术后,调整实验时间,使得烘干时间由过去的1至2 h延长为10 h以上(过夜),这将极大地提高蜡带的固着程度,降低外焰展片操作对学生带来的实验失败、技术困窘与厌烦情绪,实验成功率提高和实验效果改善也极大地激发了学生的学习和独立操作兴趣。

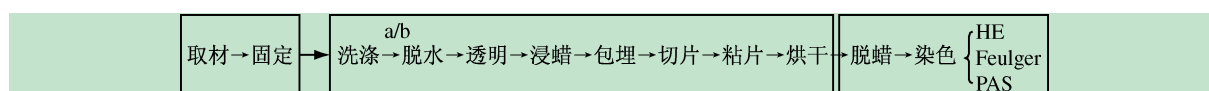


图3 包埋技术改进后细胞生物学实验安排

注:每个方框代表1天;a:植物伤愈组织培养实验;b:动物细胞融合实验,在新的实验安排中,由于包埋技术改进,缩短了实验时间,将后续步骤提前,使烘干可以过夜,改善烘干效果,提高实验成功率;另外a和b两部分实验时间由学生自主掌握,充分调动学生实验积极性,提高学生自主创新意识

3 结 语

笔者针对石蜡切片实验教学过程中存在的问题,对包埋方法进行改进,在不增加实验成本基础上,使实

验成功率大幅度增加、缩短实验时间、提高工作效率、保证包埋质量、获得质量较好的切片。在此基础上,统筹安排细胞生物学实验教学时间,使得学生通过自主时间统筹,将动物细胞融合实验和石蜡组织切片实验

的实验时间有机的穿插起来,使整个细胞生物学实验教学时间安排更加合理,有效减少学生重复操作次数,提高实验成功率。在不增加实验投入的前提下,使得学生能够在有限的时间内获得对同一实验进程从多角度多层次进行分析的训练,使得学生尝试并掌握了自主统筹安排实验时间的实验技巧,提高了学生的实验兴趣与科研能力,为发展学生创新思维能力,进一步获取和创造新知识打下基础^[15-16]。

参考文献(References):

- [1] 吴莹. 细胞生物学实验教学改革[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(7): 262-263.
WU Ying. Teaching reform on experiments of the cytobiology course [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2010, 29(7): 262-263.
- [2] 闫晓梅. 细胞生物学实验教学改革中的一些探索[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(10): 352-355.
YAN Xiao-mei. Reform of cell biology experimental teaching [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2012, 31(10): 352-355.
- [3] 张盛周. 细胞生物学实验教学的改革[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(5): 107-108.
ZHANG Sheng-zhou. Discussion on the reform of the experimental teaching of cell biology under the new situation [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2009, 28(5): 107-108.
- [4] 滕利荣. 生物学基础实验教程[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [5] 滕利荣. 生命科学仪器使用技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] 滕利荣. 生物学基础实验教程[M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1999.
- [7] 滕利荣. 生命科学基础实验教程[M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 2001.
- [8] 莫晚莉. 手术中快速石蜡切片病理诊断的临床意义[J]. 实用医技杂志, 2012, 19(4): 421-422.
- [9] 方捷迪. 改良术中快速石蜡切片技术的应用[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(11): 1205-1206.
- [10] 弯雪燕. 常规石蜡切片中浸蜡包埋方法的改进[J]. 诊断病理学杂志, 2000, 7(4): 303-304.
- [11] 杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良[J]. 生物学杂志, 2006, 23(1): 45-46.
YANG Jie-pin. Improvement of traditional paraffin section preparation methods [J]. Journal of Biology, 2006, 23(1): 45-46.
- [12] 柏美玲. 实验动物肝组织石蜡切片制作中易发问题探讨[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(20): 121-122.
- [13] 杜慧芳. 蒜薹成熟期石蜡切片方法研究及解剖学观察[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(3): 17-20.
DU Hui-fang. Method of paraffin section of garlic scape in its maturity and the anatomical structure [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2013, 32(3): 17-20.
- [14] 侯阿澧. 蛹虫草治疗腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1103-1105.
HOU A-li. Effect of cordycepsminlitaris on adenine-induced rat chronic renal failure [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(5): 1103-1105.
- [15] 潘清. 创新实验教学探索[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(8): 24-26.
Pan Qing. Exploration of innovative experiment teaching [J]. Experimental Technology and Management, 2010, 27(8): 24-26.
- [16] 由继红. 实验室与创新教育研究[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9): 16-17.
You Ji-hong. Research on the laboratory and the innovative education [J]. Experimental Technology and Management, 2010, 27(9): 16-17.

把教育摆在优先发展的战略地位。教育优先发展是党和国家提出并长期坚持的一项重大方针。各级党委和政府要把优先发展教育作为贯彻落实科学发展观的一项基本要求,切实保证经济社会发展规划优先安排教育发展,财政资金优先保障教育投入,公共资源优先满足教育和人力资源开发需要。充分调动全社会关心支持教育的积极性,共同担负起培育下一代的责任,为青少年健康成长创造良好环境。完善体制和政策,鼓励社会力量兴办教育,不断扩大社会资源对教育的投入。

——摘自《国家中长期教育改革和发展规划纲要》