

石蜡切片制作(苏木精-伊红对染法)

实验原理：

石蜡切片是最基本的切片技术，冰冻切片和超薄切片等都是在石蜡切片基础上发展起来的。

苏木素与伊红对比染色法（简称 H.E.对染法）是组织切片最常用的染色方法。这种方法适用范围广泛，对组织细胞的各种成分都可着色，便于全面观察组织构造，而且适用于各种固定液固定的材料，染色后不易褪色可长期保存。经过 HE 染色，细胞核被苏木素染成蓝紫色，细胞质被伊红染色呈粉红色。

一、器材及试剂：

1. 器材：

切片刀，切片机，恒温箱，蜡杯，酒精灯，解剖刀，解剖剪，解剖盘，培养皿，镊子，单面刀片，毛笔，包埋盒，染色缸，盖玻片，载玻片，玻片盘，树胶，树胶瓶，显微镜，温度计，脸盆，水浴锅。

切片机，切片刀，温台，恒温箱，解剖刀，镊子，[剪刀](#)，解剖针，单面刀片，小台木，洒精灯，包埋纸盒，染色缸，烧杯，水盆，熔蜡炉，蜡杯。

2. 试剂：

中性福尔马林固定液、各种浓度的酒精、二甲苯、石蜡、蜂蜡、苏木精染液， 1%伊红酒精溶液，1%盐酸酒精溶液，甘油蛋白粘片剂，中性树胶。

卡诺（Carnoy）固定液，埃利希苏木精染液，1%伊红酒精溶液，1%盐酸[乙醇](#)液，各级酒精（30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%），二甲苯，甘油蛋白粘片剂，中性树胶。

3. 材料：

鼠肝、肾、心肌、骨骼肌或其他组织、大豆或小麦、绿豆、洋葱、大蒜、蚕豆的根、茎、叶等。

二、实验原理：

石蜡切片是最基本的切片技术,冰冻切片和超薄切片等都是在石蜡切片基础上发展起来的。苏木素与伊红对比染色法（简称 H.E.对染法）是组织切片最常用的染色方法。这种方法适用范围广泛,对组织细胞的各种成分都可着色,便于全面观察组织构造,而且适用于各种固定液固定的材料,染色后不易褪色可长期保存。经过 HE 染色, **细胞核被苏木素染成蓝紫色, 细胞质被伊红染色呈粉红色。**

三、试剂配法：

1. 中性甲醛固定液：

甲醛（37%-40%，市售，本所购买即为此浓度）	100mL
磷酸氢二钠	6.5
磷酸二氢钾（钠）	4g
双蒸水	900mL

2. 苏木精、伊红染色液为碧云天产品

3. 1%盐酸乙醇液

盐酸	1 份
70%酒精	100 份

4. 甘油蛋白贴片剂：

蛋白	50 ml
甘油	50 ml
水杨酸钠（防腐剂）	1g

配制时将鸡蛋一个打破入碗或杯中，去蛋黄留下蛋白，用玻棒调打成雪花状泡沫，然后用粗纸或双层纱布过滤到量筒中，经数小时或一夜，即可滤出透明蛋白液。此时在其中再加等量的甘油，稍稍振摇使两者混合。最后加入防腐剂（水杨酸钠）作防腐用。可保存几个月。

四、实验步骤：

1. 取材

颈椎脱臼法处死小鼠，打开腹腔，剪取肝组织（或其他组织）。

切取的组织块不宜太大，以利于固定剂穿透，通常以 5mm×5mm×2mm 或 10 mm×10 mm×2 mm 为宜。取下所需要的肝组织，切成一小块 2 - 3mm 厚。

注意事项：

- （1）取材动作要迅速，不宜作太久的拖延以免组织细胞的成分、结构等发生变化。
- （2）切片材料应根据需要观察的部位进行选择，尽可能不要损伤所需要的部分。

2. 固定

将切好的肝组织用生理盐水组织洗一下，立即投入中性福尔马林固定液中固定，固定 30 - 50min。

注意事项：

- （1）一般固定液，都以新配为好，配好后应贮存在阴凉处，不宜放在日光下，以免引起化学变化，失去固定作用。
- （2）有些混合固定液的成份之间会发生氧化还原作用，一定要在使用前才混合，如果混合太早，固定时就没有作用了。
- （3）固定材料时，固定液必须充足，一般为材料块的 20~30 倍，有些水分多的材料，中间应更换 1-2 次新液。
- （4）材料固定完毕后，保存于严密紧塞或加盖的容器里，同时在容器外上标签，并随同材

料在溶液中投入相应的标签，以免相互混淆。标签上注明固定液、材料来源、日期等。标签上的文字，应用黑色铅笔或绘图黑墨水书写。

3. 洗涤

材料经固定后,流水冲洗，数小时或过夜。

4. 脱水

材料依次经 70%、80%、90%各级乙醇溶液脱水，各 30min，再放入 95%、100%各 2 次，每次 20min。各

注意事项：

- (1) 脱水必须在有盖的玻璃品中进行，防止吸收空气中的水分。
- (2) 在更换高一级的脱水剂时，最好不要移动材料以免损坏，可用吸管吸出器皿中的脱水剂，再用吸水吸尽器皿内剩余液，然后于皿中加入高一级脱水剂。
- (3) 在低浓度酒精中，每级停留不宜太长，否则易使组织变软，助长材料的解体。
- (4) 在高浓度或纯酒精中，每级停留的时间也不宜太长，否则会使组织变脆，影响切片。
- (5) 如需过夜，应停留在 70%酒精中。
- (6) 脱水必须彻底，否则不易透明，甚至使透明剂内出现白色混浊现象

5. 透明

纯酒精、二甲苯等量混合液 15min，二甲苯 I 15min、II 15min（至透明为止）。

由于乙醇与石蜡不相溶，而二甲苯既能溶于乙醇又能溶于石蜡，所以脱水后还要经过二甲苯以过渡。当组织中全部被二甲苯占有时，光线可以透过，组织呈现出不同程度的透明状态。

透明注意事项

- (1) 使用透明剂时，要随时盖紧盖子，以免空气中的水分进入。

(2) 更换每级透明剂，动作要迅速，一方面为了不使材料块干涸，另一方面能避免吸收湿气。

(3) 在透明过程中，如果材料周围出现白色雾状，说明材料中的水未被脱净，应退回纯酒精中重新脱水，然后再透明。

6. 透蜡

放入二甲苯和石蜡各半的混合液 15min，再放入石蜡 I、石蜡 II 透蜡各 50-60 分钟。

透蜡的目的是除去组织中的透明剂（如二甲苯等），使石蜡渗透到组织内部达到饱和程度以便包埋。透蜡时间根据组织大小而定。透蜡应在恒温箱内进行，并保持箱内温度在 55-60℃ 左右，注意温度不要过高，以免组织发脆。一般置于恒温箱 0.5h。

透蜡注意事项

- (1) 尽量保持在较低温度中进行，以石蜡不凝固为度；
- (2) 透蜡温度要恒定，不可忽高忽低；
- (3) 操作要迅速，力求在最短的时间内完成石蜡透入过程，以免引起组织变硬、变脆、收缩等。

7. 包埋

包埋时，用镊子夹取石蜡模子（金属质地）在酒精灯上稍加热，放在平的桌面上，从温箱中取出盛放纯石蜡的蜡杯，倒入少许石蜡。再将镊子在酒精灯上稍加热，夹取材料将切面朝下放入蜡模中，排列整齐。再放上包埋盒，轻轻倒入熔蜡。

8. 切片

- ① 将已固定和修好的石蜡块装在切片机的夹物台上。
- ② 将切片刀固定在刀夹上，刀口向上。
- ③ 摇动推动螺旋，使石蜡块与刀口贴近，但不可超过刀口。

- ④调整石蜡块与刀口之间的角度与位置，刀片与石蜡切片约成 15 度左右。
- ⑤调整厚度调节器到所需的切片厚度，一般为 4-10 微米。
- ⑥一切调整好后主可以开始切片。此时右手摇动转轮，让蜡块切成蜡带，左手持毛笔将蜡带提起，摇转速度不可太急，通常以 40-50r/min。
- ⑦切成的蜡带到 20-30cm 长时，右手用另一支毛笔轻轻将蜡带挑起，以免卷曲，并牵引成带，平放在蜡带盒上，靠刀面的一面较光滑，朝下，较皱的一面朝上。
- ⑧用单面刀片切取蜡片一小段，放在载玻上加水一滴，置于放大镜或显微镜下观察切片是否良好。
- ⑨切片工作结束后，应将切片刀取下用氯仿擦去刀上沾着的石蜡，把切片机擦拭干净妥为保存。

9. 展片、贴片

打开水浴锅，使水温维持在 40-45℃，另准备 30%乙醇溶液。

- ① 切片时，将一碗 30%乙醇溶液放于切片机旁的桌面上。
- ② 用小镊子夹取预先用刀片割开的蜡带，放在乙醇溶液的水面上，使切片展开。
- ③小镊子轻轻地将连在一起的切片分开，用一个载玻片将切片完整，已展开的切片捞至温水中，使之充分展开。
- ④ 另取洁净的载玻片，捞起展开的切片，使其位于切片 1/3 处，另一端（磨边，粗糙的一端）磨面上标记或贴上标签，放于切片架上。

10. 脱蜡复水

将水浴锅温度调至 60℃，待水温控制在 60℃时，将切片连同切片架放入一干燥的染色缸内，放入水浴锅中，盖上盖子（可密封），30min 至蜡熔化。

之后，石蜡切片经二甲苯 I、II 脱蜡各 5min，然后放入 100%、95%、90%、80%、

70%各级酒精溶液中各 3-5min，再放入蒸馏水中 3min。

11. 染色

切片放入苏木精中染色约 10-30min。

染色时间应根据染色剂的成熟程度及室温高低，适当缩短或延长。室温高时促进染色，染色时间可短些，否则可适当延长时间，冬季室温低时可放入恒温箱中染色。

12. 水洗

用自来水流水冲洗约 15min。使切片颜色变蓝（或放入碱性水中也可），但要注意流水不能过大，以防切片脱落。

13. 分化

将切片放入 1%盐酸乙醇液中褪色，约 2 秒至数十秒钟。见切片变红，颜色较浅即可。

14. 漂洗

切片再放入自来水流水中使其恢复蓝色。

15. 脱水 I

切片入 50%乙醇→70%乙醇→80%乙醇中各 3-5min。

16. 复染

用 0.5%伊红乙醇液对比染色 1-3min。

伊红主要染细胞质，着色浓淡应与苏木精染细胞核的浓淡相配合，如果细胞核染色较浓，细胞质也应浓染，以获得鲜明的对比。反之，如果细胞核染色较浅，细胞质也应淡染。可在伊红乙醇液中滴加数滴冰醋酸助染，促使细胞质容易着色，并且经乙醇脱水时不易褪色。

17. 脱水 II

将切片放入 95%乙醇中洗去多余的红色，然后放入无水乙醇中 3-5min。最后用吸水纸吸干多余的乙醇。

18. 透明

切片放入二甲苯 I、II 中各 3-5min。

二甲苯应尽量保持无水，应经常更换，或用纱布包无水硫酸铜放入染色缸内吸收水分。

切片如在二甲苯中出现白雾现象，说明脱水未尽，应退回乙醇中重新脱水，否则切片难以镜检。

19. 封藏：中性树胶封存

因切片经二甲苯透明，使用中性树胶作为封藏剂，树胶可用二甲苯稀释至合适的稠度。

封藏的方法：

封片前应根据材料的大小，选用不同规格的盖玻片。材料透明后，在桌上放一张洁净的吸水纸，将含材料的载玻片从二甲苯中取出放在纸上（切片的一面向上），迅速地在切片的中央滴一滴树胶（千万不能待二甲苯干燥后再进行），用右手持小镊子轻轻地夹住盖玻片的右侧，稍为倾斜使其左侧与封藏剂接角，然后再缓慢地将盖玻片放下，这样就可以减少或避免产生气泡。如胶液不足，可以用玻棒再滴一滴树胶从盖玻片边缘补足。如胶液过多，可在干燥以后用刀刮去，并用纱布蘸二甲苯拭去残留的树胶。

染色结果：细胞核被苏木素染成蓝色，细胞质被伊红染色呈粉红色。