

石蜡切片方法的改良

赵亚林, 闫青地, 冯佳佳, 肖 锋, 杨 卓, 王凤茹*, 董金皋*

(河北农业大学生命科学学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北保定 071001)

摘要 [目的]快速且安全高效制作石蜡切片。[方法]采用不同的方法,对植物材料进行透明和脱蜡以及包埋处理,把材料制成透明的玻片标本,利用正丁醇代替二甲苯作为透明剂和脱蜡剂,其他和传统的石蜡切片方法相同。[结果]正丁醇既能与乙醇混合,又能与中性树胶相融合;正丁醇作用相对较缓和,透明后的组织平整,没有明显的收缩、变形现象,并且不存在透明时间过长的的问题,还减少了对实验人员的伤害。[结论]该方法可以快速地制作石蜡切片,且安全有效。

关键词 石蜡切片;透明剂;正丁醇;花

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)32-0006-03

Method Improvement of Paraffin Section

ZHAO Ya-lin, YAN Qing-di, FENG Jia-jia, WANG Feng-ru*, DONG Jing-gao* et al (College of Life Science, Agricultural University of Hebei/Key Laboratory of Plant Physiology and Molecular Pathology in Hebei Province, Baoding, Hebei 071001)

Abstract [Objective] The aim was to make paraffin section safely and fast. [Method] Different methods were used to transparent and dewax the plant material and embedding, and the material was made into a transparent glass slide, and the n-butanol could instead of xylene. The other steps were the same as the traditional paraffin section method. [Result] The n-butanol not only could be mixed with ethanol, but also could be mixed with neutral gum. The n-butanol was relatively gentle, could obtain transparent tissue after formation, had no obvious shrinkage, deformation and transparent problem of long time, and reduced the damage to experimental staff. [Conclusion] The method could make paraffin section safely and fast.

Key words Paraffin section; Clearing agent; n-butanol; Flower

石蜡切片是植物或者动物组织学常规制片技术中最为广泛应用的方法。在传统的石蜡切片时,常采用二甲苯作透明剂和脱蜡剂。二甲苯的细胞学毒性主要体现在诱导线粒体解偶联和氧化应激反应^[1-2],石蜡切片不仅用于观察正常细胞组织的形态结构,也可以作为病理学和法医学等学科用以研究、观察及判断细胞组织的形态变化的重要方法,而且也已相当广泛地用于其他学科领域的研究中。教学中,光学显微镜下观察切片标本多数是石蜡切片法制备的。活的细胞或组织多为无色透明,各种组织间和细胞内结构之间均缺乏反差,在一般光镜下不易清楚区别;由于组织离开机体后很快就会死亡和产生组织腐败,原有的结构形态会发生变化,因此,组织要经固定、石蜡包埋、切片、染色等步骤,以免细胞组织死亡,从而能清晰辨认其形态结构。

有关石蜡切片技术方法改进的研究较多,也有文献报道利用葵酸丁酯作为透明剂^[3],经过长期的石蜡切片观察,人们用正丁醇代替二甲苯作为脱水剂和透明剂,发现其具有软化组织的作用,不易使材料变脆,有利于切出完整的蜡带,使得切片的难度得到改善,并使石蜡切片技术逐渐扩展、渗入许多新领域,作为基础技术提供有效的实验或使用样品。石蜡包埋组织切片还可用于细胞原位核酸分子杂交技术中,对材料中被杂交的 DNA 分子进行定位、含量分析或观察基因表达水平;聚合酶链式反应(PCR)技术可用于固定、石蜡包埋组织的 DNA 分析^[4],使研究进入了分子水平,但这些技术在短期内尚不能做常规使用。石蜡切片的步骤复杂,要做出

理想的石蜡切片,人们还需要从各步的细节着手并进行简化^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物组织。用锋利的刀片切取新鲜的拟南芥组织材料,同时取材应注意以下事项:①应取新鲜的材料,动作迅速,避免挤压损坏组织。②取材不易过老,否则切片有难度(过老的材料必须在滑走切片机上进行);对纵切的材料适当多取材,如根尖、茎尖等。

1.1.2 试剂与仪器。由于石蜡切片的步骤繁多,所以每一步试剂的选择都会对试验结果产生重要影响。常将固定、脱水、透明、脱蜡、复水、染色等步骤在有益容器中进行;更换试剂时,动作要迅速,以减少空气中的水分对试剂浓度的影响,也可避免切片吸收空气中的水分而影响最终的制片质量,并且尽量减少切片上残留的试剂,以降低试剂间的相互影响。主要仪器有石蜡切片机(AO)、恒温加热仪、磨刀机(Leica SP9000)、光学显微镜(OL-YMPUS IX71)。

1.2 方法

1.2.1 固定。固定液的作用是使细胞的新陈代谢瞬时停止,并保持细胞或组织的形态构造及其内含物的状态不发生变化,达到使组织变硬从而便于切片^[6],增强内含物的折光度,令细胞易于着色的目的,同时具有防腐作用。以新鲜配制固定液效果较好。固定的时间依材料的种类、性质、大小等而定。良好的固定剂,应是穿透力强,使细胞立刻致死,原生质全部凝固;不发生任何变形,增强折光率,并且不妨碍染色。固定时间过长或固定液浓度高会使组织变硬,减弱固定液对组织的渗透能力,造成组织中间部分固定不好^[7]。

1.2.2 脱水。脱水剂是与水在任何比例下都能均匀混合的

作者简介 赵亚林(1990—),男,河南周口人,硕士研究生,研究方向:拟南芥的生长发育。*通讯作者:王凤茹,教授,博士,硕士生导师,从事拟南芥的生长发育研究;董金皋,教授,博士,博士生导师,从事玉米产业体系研究。

收稿日期 2017-09-06

液体,脱水要彻底,以利于后续步骤操作。传统所用的脱水方法是将材料静置脱水,而经过改进的方法是将脱水容器放在摇床上进行,可使材料均匀充分脱水,既节约试验时间,又可以提高工作效率。常用的脱水剂有乙醇、正丁醇等,在以正丁醇作为脱水剂时,应从低浓度到高浓度,以避免组织过度收缩带来的不良后果;正丁醇可与水、乙醇相混合,而且也能溶解石蜡,所以兼具脱水和透明作用,不会引起植物材料过度收缩和硬化。

1.2.3 透明。透明是脱水和透蜡的桥梁,其作用是使透明剂置换掉组织中的脱水剂,使得组织的折光系数增强。把脱水处理后的材料依次放在 100% 乙醇(2/3) + 正丁醇(1/3)(30 min)、100% 乙醇(1/3) + 正丁醇(2/3)(30 min)、纯正丁醇(30 min)透明剂中(表 1),期间最好更换 1 次透明剂,使组织得到充分透明^[8],为后续浸蜡做准备。正丁醇用作透明剂的优势是:其作用相对缓和,透明后的组织平整,没有明显的收缩、变形现象,并且不存在透明时间过长的问题。同时甲苯、香柏油等也常用作透明剂。在病理学上,也常常使用正丁醇代替二甲苯作为组织透明剂,也取得了理想效果^[9]。

1.2.4 浸蜡。浸蜡是包埋剂取代透明剂的过程。把透明处理好的材料放在提前融化的石蜡中,恒温箱温度应调整至高于石蜡熔点 2~3 ℃,配制体积比为 1:1 的正丁醇-纯石蜡混合液,使用纯石蜡替换上一级溶液,每隔 12 h 换一次纯石蜡溶液,共替换 3 次^[10]。

1.2.5 包埋。传统使用的方法是将充分浸蜡的材料倒入已事先叠好的牛皮纸纸盒中,石蜡凝固前要摆正材料方向,将包埋盒放入冷水中迅速冷却备用;该试验探索利用长方形金属包埋框对组织进行包埋处理,包埋框的长度和宽度能够进行调节,包埋前将金属框放在平铺的玻璃板上,将充分浸蜡的材料倒入已事先备好的金属框架中,利用热的解剖针摆正材料方向^[11]。在石蜡完全凝固但未变硬之前取下金属框对

包埋块进行修块处理,从而提高工作效率。

1.2.6 切片、染色、封片。调整切片机的厚度为 10 μm,调节刀口与蜡块的距离、蜡块的位置。将蜡带置于多聚赖氨酸处理过的载玻片上,加蒸馏水展平蜡带后于 42 ℃ 展片台上烤干。将玻片放入染缸,再将甲苯胺蓝染液加入染缸至淹没玻片,染色 10 min,再用双蒸水清洗玻片,42 ℃ 烘箱中烘干。正丁醇浸泡玻片 2 次,每次 10 min,取出玻片,在载玻片干之前滴加加拿大树胶,盖上盖玻片封片^[12-14]。

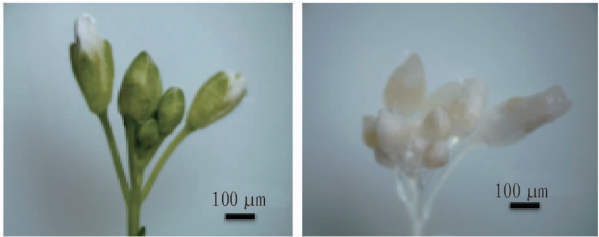
2 结果与分析

对拟南芥的花蕾固定结果见图 1。透明前后的拟南芥花见图 2。



图 1 新鲜的拟南芥花

Fig.1 Fresh flowers of Arabidopsis



注:a.透明前;b.透明后
Note:a. Before transparent ; b. After transparent

图 2 透明之前及透明之后的拟南芥花

Fig.2 Transparent and transparent after the Arabidopsis thaliana flower

表 1 透明试剂及最佳透明时间
Table 1 Transparent reagent and optimal transparent time

方法 Methods	透明过程 Clarifier process		
	I	II	III
传统方法(二甲苯)Traditional method(Xylene)	2/3 乙醇 + 1/3 二甲苯(45 min)	1/3 乙醇 + 2/3 二甲苯(45 min)	二甲苯(60 min)
改进方法 I Improved approach I	2/3 乙醇 + 1/3 正丁醇(30 min)	1/3 乙醇 + 2/3 正丁醇(30 min)	正丁醇(30 min)
改进方法 II Improved approach II	2/3 乙醇 + 1/3 硬脂酸(30 min)	1/3 乙醇 + 2/3 硬脂酸(30 min)	硬脂酸(30 min)

利用 3 种方法分别对材料进行透明处理,并对最终的结果进行比较分析,发现改进的方法 I 透明效果较好,对后续材料的包埋和切片效果最理想,并且缩短了透明时间。

利用上述改进的方法对拟南芥花药进行石蜡切片,正丁醇代替二甲苯作为透明剂和脱蜡剂,对不同发育时期拟南芥花进行切片^[15-16],同样能够做出完整的石蜡切片(图 3)。在保证试验结果的同时,很大程度上降低了二甲苯对实验人员的伤害,是一种理想的二甲苯替代物。

3 讨论

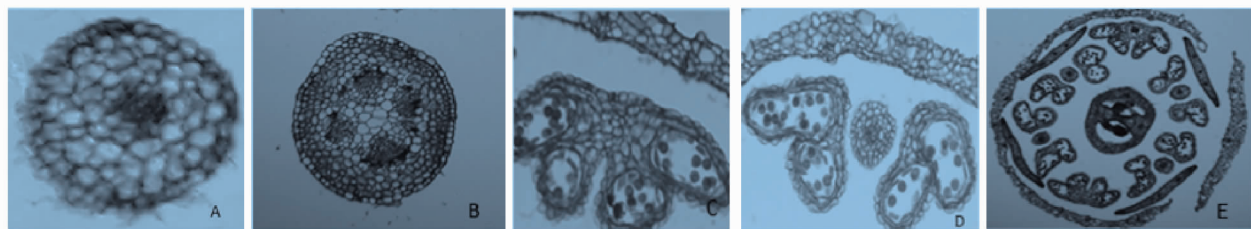
传统使用的透明剂和脱蜡剂是二甲苯,二甲苯是一种有芳香气味的刺激性、易挥发液体,有毒性,主要对中枢神经和

植物神经有麻痹和黏膜刺激作用,并对人牙周组织造成伤害,二甲苯对女性月经及生殖结构也有影响,是一种潜在的致癌物质,对人体危害大^[17-18],广大病理工作者一直在探索寻找二甲苯的代替物;正丁醇与二甲苯相比属于低毒类化学药品,除一次性吸入大量化学药品会引起轻微的头痛外,还没有发现有其他毒性方面的报道^[19],为了保护实验人员的安全,工作人员应注意佩戴口罩和手套等防护用具;同时,正丁醇属于易燃液体,在使用时应注意通风透气,以降低对工作人员的伤害。

同时利用甲苯胺蓝作为染色剂,使组织的染色鲜亮,核质分明,结构清晰,克服了二甲苯作为透明剂时染色不佳的

问题。拟南芥作为河北省植物生理与分子病理学重点实验室研究的模式植物,花药可以作为植物生殖生长的研究对象。该试验只是利用改进的方法对拟南芥的花药进行石蜡

切片的处理,后期还将该方法应用于拟南芥的其他组织进行石蜡切片,以期获得更多数据。



注:A.花粉原基细胞的分裂;B.四分体花药的初步形成;C~D.成熟花粉的形成;E.完整的花结构

Note:A. The split of pollen primordium;B. Preliminary form of anthers of tetrad;C~D. The form of mature pollen;E. The whole structure of flower

图3 不同时期拟南芥花的发育状况

Fig. 3 The developmental status of *Arabidopsis thaliana* flower at different periods

4 结论

利用改进的方法对组织材料进行处理,不仅节省了试验时间,同时降低了对实验人员的伤害,提高了工作效率。但是对不同的材料处理所需的时间和方法也不尽相同,仍需进一步研究。该研究对拟南芥的花药进行不同部位的石蜡切片^[20],利用正丁醇作为透明剂和脱蜡剂,大大降低了传统透明试剂二甲苯对实验人员的危害;利用包埋框对材料进行包埋处理,缩短了时间,并且提高了效率。用正丁醇处理材料,透明效果好,浸蜡充分,容易连续切片,脱蜡快速且干净,组织结构保持完整。综上所述,正丁醇可以作为一种相对安全有效的二甲苯替代物,应用于植物组织切片中。

参考文献

- [1] MATTHEWS J B. Influence of clearing agent on immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissue[J]. Clinical pathology, 1981, 34(1): 103-105.
- [2] REVILLA A, PESTANA C R, PARDO-ANDREU G L, et al. Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling[J]. Toxicology in vitro, 2007, 21(5): 782-788.
- [3] LYON H, HOLM I, PRENT P, et al. Non-hazardous organic solvents in the paraffin embedding technique: A rational approach[J]. Histochemistry and cell biology, 1995, 103(4): 263-269.
- [4] 刘宏, 牛建新, 韩晓燕. 适合原位 RT-PCR 的石蜡切片制作方法[J]. 生物技术通报, 2006(1): 58-60.
- [5] 侯春春, 徐水. 浅析影响石蜡切片质量的关键因素[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 94-98.
- [6] 魏永敬, 汪兆亮. 硬脂酸代替二甲苯透明在石蜡切片中的应用[J]. 西

南军医, 2007, 9(1): 57-60.

- [7] GREER C E, PETERSON S L, KIVIAT N B, et al. PCR amplifications from paraffin-embedded tissues: Effects of fixative and fixation time[J]. Am J Clin Pathol, 1991, 95(2): 117-241.
- [8] 林加涵, 魏文玲, 彭宣宪. 现代生物学实验(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 87.
- [9] 李海, 邓志勇, 陈金珍, 等. 正丁醇及乙醇在病理组织制片中的改进应用[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(31): 4389-4390.
- [10] 郑兴峰. 石蜡切片法中细长或薄片状材料的包埋[J]. 生物学杂志, 2003, 20(4): 43-46.
- [11] WANG J P, ZHANG J M. Manufacture of paraffin section on Chinese pulsatilla flower[J]. Journal of xinyang normal university (Natural Science Edition), 2008, 21(4): 573-576.
- [12] 阮建波, 何洪标, 田宋先. 快速石蜡切片的探讨[J]. 实用医学杂志, 1994, 10(6): 589-592.
- [13] 帅焕丽, 杨途熙, 魏安智, 等. 杏花芽石蜡切片方法的改良[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 536-539.
- [14] 邓利群. 快速制作常规石蜡切片[J]. 湖北民族学院学报, 2001, 18(4): 59.
- [15] 靳丹丹. 晚莲花芽分化形态发育以及相应时期生理生化的动态研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [16] 刘艳, 周杰, 黄宜兵, 等. 组织学石蜡切片制作中固定方法的改良[J]. 生物学通报, 2016, 51(1): 47-51.
- [17] 刘志敏, 王春华, 刘志勇, 等. 苯甲苯和二甲苯作业女工对月经及生殖结局的影响[J]. 天津医学院学报, 1994, 18(3): 3-5.
- [18] 程金霞, 杜程悦. 苯类化合物与牙周组织疾病关系的研究[J]. 职业与健康, 2001, 17(1): 8-9.
- [19] 王慎. 制作石蜡切片用正丁醇做组织脱水 and 透明剂的体会[J]. 甘肃中医学院学报, 1986, 7(1): 2-3.
- [20] 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.

科技论文写作规范——标点符号

标点符号按照 GB/T 15834—2011 执行, 每个标点占 1 格(破折号占 2 格)。外文中的标点符号按照外文的规范和习惯。外文字母、阿拉伯数字、百分号等并列时, 其间用“,”, 不用顿号“、”。注意破折号“——”、一字线“—”(浪纹线“~”)和短横线“-”的不同用法。破折号又称两字线或双连划, 占 2 个字身位置; 一字线占 1 个字身位置, 短横线又称半字线或对开划, 占半个字身位置。破折号可作文中的补充性说明(如注释、插入语等), 或用于公式或图表的说明文字中。一字线“—”(浪纹线“~”)用于表示标示相关项目(如时间、地域等)的起止。例如 1949—1986 年, 北京—上海特别旅客快车。参考文献范围号用“-”。短横线用于连接词组, 或用于连接化合物名称与其前面的符号或位序, 或用于公式、表格、插图、插图、型号、样本等的编号。外文中的破折号(Dash)的字身与 m 宽, 俗称 m Dash, 其用法与中文中的破折号相当。外文的连接符俗称哈芬(hyphen)。其中, 对开哈芬的字身为 m 字身的一半, 相当于中文中范围号的用法; 三开哈芬的字身为 m 字母的 1/3, 相当于中文中的短横线的用法。