

## 组织切片制备及染色技术

### （一）常规石蜡切片的制备：

（1）取材与固定：切取组织时应使用锋利的刀、剪，切取组织块时，从刀的根部开始向后拉动切开组织。组织块的厚度约为 0.2~0.3cm，大小为 1.5cm x 1.5cm x 0.3cm 为宜。取好的组织块用 10%福尔马林溶液固定 24~48h。

（2）包埋：先经梯度乙醇脱水后用二甲苯透明，然后入溶融的石蜡中浸透每次 30min，共 3 次；再包埋。

（3）切片：包埋好的石蜡块即可进行切片；切片的厚度为 5 $\mu$ m 左右。

### （二）苏木精—伊红（hematoxylin and eosin,HE）染色方法：

（1）脱蜡：主要用二甲苯脱蜡。

（2）梯度乙醇水化。

（3）自来水冲洗。

（4）苏木精染色：水化后的切片放入苏木精染液中浸 5~20min，染细胞核。自来水冲洗 3~5min。

（5）1%盐酸乙醇分化 5~30s。自来水冲洗 1~3min。

（6）弱碱性水溶液返蓝 30s~1min。自来水充分冲洗 5~10 分钟。

（7）伊红染色：充分水化后的切片直接入伊红染色液中，染细胞质 5~15min 左右。

（8）梯度乙醇脱水。

（9）二甲苯透明。

（10）中性树胶封片。

## 二、组织化学及免疫组织化学技术

（一）组织化学（histochemistry）：一般称为特殊染色，基本原理是通过应用某些能与组织细胞化学成分特异性结合的显色试剂，定位地显示组织细胞的特殊化学成分并保持原有的形态学改变，对一些代谢性疾病的诊断具有一定的参考价值。通过光镜或电镜观察，可以检测组织切片内的蛋白质、糖类、脂类、酶类、核酸与某些金属元素等。

1.过碘酸雪夫氏染色（periodic acid-schiff stain, PAS 染色）：过碘酸是一种氧化剂，它能氧化糖类及有关物质中的 1,2 乙二醇基使之变为二醛，醛与 Schiff 氏试剂结合，形成红色的取代色素而得到定位。PAS 染色可显示糖原、中性黏液物质、基底膜、软骨、垂体、霉菌

及寄生虫等物质。是广泛应用的染色方法。在肾小球肾炎时 PAS 染色可显示基底膜和系膜区的改变。

**染色方法：**

- (1) 切片按常规脱蜡水洗，再用蒸馏水洗涤。
- (2) 0.5%~1%过碘酸水溶液氧化 5~10min。
- (3) 蒸馏水充分洗涤，至少 3 次。
- (4) Schiff 氏试剂染 10~30min。
- (5) 倾去染液后，直接用亚硫酸冲洗液处理切片 3 次，每次 2 min，以达到分化。
- (6) 自来水冲洗 5~10 min，使之显现出红色。然后蒸馏水洗 1 次。
- (7) 明矾苏木精染核，自来水充分洗涤。
- (8) 95%乙醇及无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。

**结果判定：** PAS 阳性物质呈鲜紫红色，其它组织淡粉红色，细胞核呈浅蓝色。

**2.结缔组织的染色方法**

一般所说的结缔组织是指纤维性结缔组织而言，其结构特点是细胞间质内基质外含有较多的纤维成分，主要是胶原纤维、弹性纤维和网状纤维，我们仅简述这三种纤维的常见染色方法。

(1) Mallory 三色染色法：常用于判定多种组织、器官的病变程度及修复情况，区分肿瘤组织中的纤维成分与平滑肌。

**染色步骤：**

- ①中性甲醛液固定组织，石蜡切片，常规脱蜡至水。
- ②重铬酸钾液 10min。
- ③蒸馏水冲洗 2min，蒸馏水 2 次。
- ④酸性复红液 2min，蒸馏水稍洗。
- ⑤苯胺蓝液 20min，95%乙醇快速分化。
- ⑥直接用无水乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。

**结果判定：** 胶原和网状纤维呈蓝色。

(2) Van Gieson 苦味酸酸性复红法：可以显示组织、器官的损伤、修复及硬化情况，特别是用于鉴别肿瘤组织中的胶原纤维与平滑肌纤维，可为诊断提供重要依据。

**染色步骤：**

- ①组织切片按常规脱蜡水洗。
- ②用 Weigert 苏木素液染细胞核 5~10 min。

- ③自来水充分洗涤数分钟。
- ④用显微镜检查细胞核的着色程度，过深可用 0.5%盐酸乙醇分化。
- ⑤自来水洗至变蓝；用蒸馏水洗。
- ⑥用 Van Gieson 液染 1~5 min。
- ⑦倾去染液，直接用 95%乙醇分化和脱水。
- ⑧无水乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。

**结果判定：** 胶原纤维呈深粉红色，肌纤维、胞浆及红细胞黄色，细胞核呈棕黑色或兰黑色。

(3) 网状纤维染色—Wider 染色法：可以用来显示病变组织网状支架的破坏情况。特别是在肿瘤病理诊断中，网状纤维染色对于鉴别来源于上皮组织和间叶组织的恶性肿瘤具有重要价值。

**染色步骤：**

- ①组织切片脱蜡至水。
- ②10%磷钼酸，2~5min。蒸馏水冲洗，5min。
- ③1%硝酸铀，5s。蒸馏水冲洗，10s。
- ④氧化银溶液，5~10min。
- ⑤95%乙醇速洗，1~2s。
- ⑥还原液还原，1~2s。蒸馏水冲洗，2min。
- ⑦0.2%氯化金调色，2~20s。蒸馏水冲洗，5min。
- ⑧5%次亚硫酸钠，2min。蒸馏水冲洗，2min。
- ⑨核固红染细胞核，5~10min。水稍洗。
- ⑩常规无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。

**结果判定：** 网状纤维呈黑色、细胞核呈红色。

3.脂肪的染色方法：脂肪染色常用脂溶性色素，如苏丹III、苏丹IV、油红 O 等。这类染料既能溶于有机溶剂如乙醇、丙酮内，又能溶于脂肪内。由于该类染料在脂质中溶解度较大，染色时染料便从染液中转移到被染的脂质中去，使脂质呈染液的颜色。主要用于显示组织脏器的脂肪变性和类脂质的异常沉着。

**苏丹III（IV）染色方法：**

- (1) 冰冻切片用 70%乙醇漂洗，不超过 30s。
- (2) 切片入苏丹III（IV）染液中 3~15min 或延长至 1h。

(3) 新 50%~70%乙醇分化，直至洗去切片上的浮色为止，蒸馏水洗。

(3) 用稀释 1 倍的明矾苏木精浅染核 1min 或稍长。

(4) 用滤纸将切片及周围的水分吸干。

(5) 用甘油或甘油明胶封固。

**结果判定：**脂肪呈桔黄色或桔红色，细胞核浅蓝色。

(二) 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC)：是指应用免疫学和传统的组织化学的原理，利用抗原抗体特异性结合反应对组织、细胞中的特定抗原(或抗体)进行定位和定性的一种染色技术。具有较高的敏感性和特异性，其特点是将形态学改变与功能、代谢变化结合起来，直接在组织切片、细胞涂片或培养细胞爬片上定位一些蛋白质或多肽类物质的存在，并可精确到亚细胞结构水平，利用计算机图像分析系统或激光共聚焦显微镜技术等可对被检物质进行定量分析。标记物为荧光、酶、免疫金银及铁标记技术等。

IHC 可用于各种蛋白质或肽类物质表达水平的检测、细胞属性的判定、淋巴细胞的免疫表型分析、细胞增殖和凋亡的研究、激素受体和耐药基因蛋白表达检测，以及细胞周期和信号传导的研究等。

**染色步骤：**

(1) 石蜡切片脱蜡至水（放入二甲苯中脱蜡后，梯度乙醇至水化）。

(2) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育 5~10min，以消除内源性过氧化物酶的活性。

(3) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min，(如需采用抗原修复，可在此步后进行)。

(4) 5%~10%正常山羊血清（PBS 稀释）封闭，室温孵育 10min。倾去血清，勿洗，滴加适当比例稀释的第一抗体或即用型第一抗体，37℃孵育 1h 或 4℃过夜。

(5) PBS 冲洗，5min×3 次。

(6) 滴加适当比例稀释的生物素标记二抗（1%BSA-PBS 稀释）或滴加生物素标记二抗工作液，37℃或室温孵育 10~30min。

(7) PBS 冲洗，5min×3 次。

(8) 滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素（PBS 稀释）或辣根酶标记链霉卵白素工作液，37℃或室温孵育 10~30min。

(9) PBS 冲洗，5min×3 次。

(10) 显色剂显色（DAB 或 AEC）。

(11) 自来水充分冲洗，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，苏木精复染，中性树胶封片。

**结果判定：**在光镜下，阳性细胞显示出棕褐色 (DAB)或鲜红色 (AEC)。