

介绍线粒体组织切片的一种制作法

姚允玖 沈默

(重庆医学院生物学教研室)

制作线粒体方法有 20 余种,但各有其技术特长。本文着重介绍一种线粒体组织切片的染色技术。我们在研制过程中参考了一些国内外专门资料,经实践创新了一种有效的方法,引用起来操作简便容易掌握;现将系列步骤简介如下。

(一) 方法

1.取材 取材必须新鲜,动物必须健康(小白鼠体重约 20—25 克,大白鼠最好为幼鼠),一般为小肠、肝、肾、胰腺,其中以小肠最为典型。

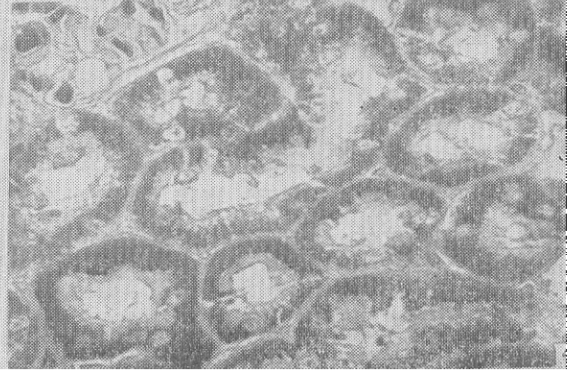
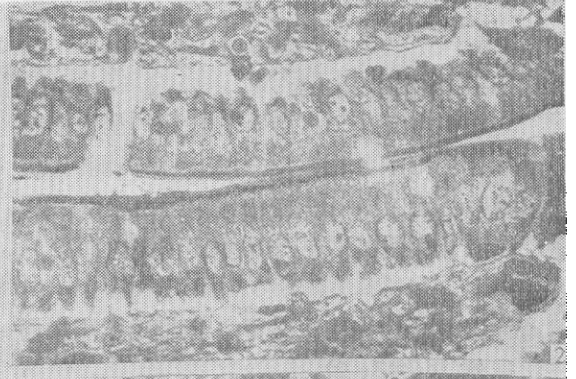


图1 大白鼠小肠上皮细胞中的线粒体 450倍；
图3 大白鼠肾小管周围的线粒体 450倍；

图2 大白鼠小肠上皮细胞中的线粒体 1000倍；
图4 大白鼠肾小管周围的线粒体 1000倍。

2. 固定 鉴于线粒体遇到酸类物质之后，极易溶化而破坏，故原则上应回避酸类物质，所用的福尔马林以中性为佳。再者，氯仿和酒精颇易使线粒体发生变化，故不但不可作固定液，且施行麻醉方法时亦不宜应用。

(1) 固定时选用绝对新鲜之薄小组织块，用雷戈特 (Regaud) 氏液固定 4 天。每天更换 1 次新液，贮放在冰箱内。

雷戈特氏液 3% 重铬酸钾溶液 40 毫升；
40% 福尔马林 10 毫升(宜用中性)。

(2) 以 3% 重铬酸钾水溶液媒染铬化 8 天，每 2 天更换新液。

(3) 自来水冲洗 24 小时。脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 3—5 微米。

(4) 附贴切片于洁净载玻片上、烤干、脱蜡，经逐级酒精，浸蒸馏水中 2 分钟→染色。

3. 染色

(1) 染色液配制

猩红*	2 克
磷钨酸	0.5 克
冰醋酸	5 毫升
蒸馏水	100 毫升

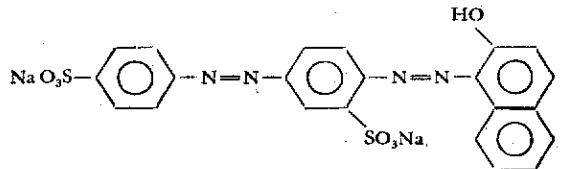
将上述配成染液待猩红彻底溶解，震荡过滤后使用。

(2) 染 2—3 小时，蒸馏水洗一洗，置 30% → 50% → 70% 酒精脱水兼分色 → 85% → 95% 酒精快绿液复染：

快绿	0.5 克
95% 酒精	100 毫升

* 猩红——英国“B. D. H”，Biebrich Scarlet (水溶性)，468550 厂商产品规格。

属酸性染料，其分子结构式：



复染 30 秒→100%酒精更换 3 次→透明、封固。

(二) 结果

1. 线粒体染成桔红色, 胞浆和核呈淡蓝色或淡绿色。细胞各部界线分明, 色泽美丽鲜艳, 轮廓清晰。尤其是肠上皮细胞内的线粒体靠近小皮缘端及细胞基底部分布多而清楚(见图 1、2)。

肾脏切片的线粒体在肾小管四周呈棒形栅栏状排列(见图 3、4)。

2. 经该法染色的切片标本, 可长期保存, 不易退色。

(三) 讨论

选择动物要年轻, 健康。取材动作要敏捷迅速; 不宜用麻醉药物处死, 直接用暴力处死。药物会损害线粒体, 避开它对保存线粒体有益。

尽量控制掌握好切片标本(经染色的)在酒精中脱水、分色停留时间。因为线粒体是一种类脂蛋白质, 酒精能溶解大部分类脂物, 影响线粒体着色。

从各种制作线粒体方法中, 采用一致公认的雷戈特氏^[1]液作固定液; 扬其重铬酸钾和中性福尔马林对线粒体之长处, 且试剂价格低廉极易配制。特别是此液固定线粒体把握性大, 成功率高。用什么染液显示线粒体的色泽, 这

是制片者所必须考虑的, 也是成败的主要关键! 如奥脱蔓 (Altmann) 氏^[2]染液染出标本色泽清楚, 但大的缺点系酸性复红不宜长期保存, 容易退色, 若计划要制作大量切片标本就得考虑退色这一弱点。所以从效益角度来看, 这对制片者自然会感到最困难环节之一; 贝达 (Benda) 氏^[3]染色法因手续繁琐, 除某些特殊情况外, 一般并无采用的必要; 贝斯莱 (Bensley) 氏^[4]和奥斯密克 (Osmic) 氏^[4]法均需用 2% 锇酸液作固定和染色。锇酸对类脂物的线粒体是较理想优良固定液。市场虽有此类试剂出售, 但因它价格昂贵不适使用。考虑其售价高, 尽力寻求价格低廉能达到同样效果之试剂来取代; 雷戈特氏铁苏木精染色是极为广谱的方法。制成切片标本能保存持久不退色。但此法从媒染→染色→分色时间需长, 线粒体染成黑色, 细胞内其他成分亦同时着色, 这给复染带来困难, 对学生用显微镜观察到的物像呈一片黑色, 不容易辨别。

参 考 文 献

- [1] 田中克己, 1965, 显微镜标本的制作方法, 科学出版社, 235—237。
- [2] 孟瑞朝, 1955, 组织病理标本制作方法, 人民卫生出版社, 106—107。
- [3] 郑若玄, 1980, 实用细胞学技术, 科学出版社, 86—91。
- [4] Gretchen L.H. 1979 *Animal Tissue Technique*, 4th ed 343—349, W. H. Freeman and Company San Francisco.

类固醇激素受体分析的样品制备 ——胞液和细胞核的分离及纯化

邹 继 超

(中国科学院动物研究所内分泌室)

在激素——受体相互作用, 激素及其受体复合物在细胞内的动态变化, 受体分子的物理化学特性分析以及某些与激素或受体有关的疾病诊断和治疗等很多方面的研究中, 受体的分析和测定技术的应用已日益广泛, 并要求操作

过程和方法的标准化和常规化。但由于在分析中所用的激素和材料来源不同, 操作过程, 仪器设备等在不同实验室中也有所区别, 因此, 往往会影响结果的一致性。在上述因素中, 除了一些客观因素外(如仪器设备, 材料来源), 在实验

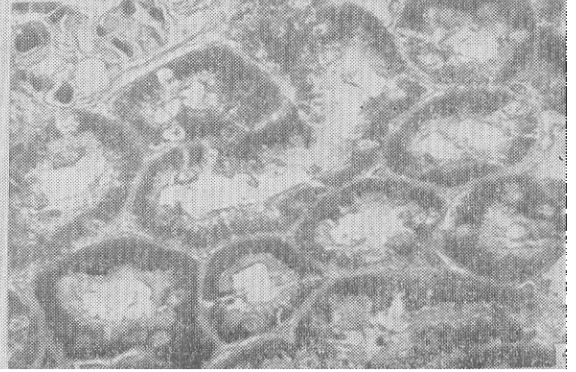
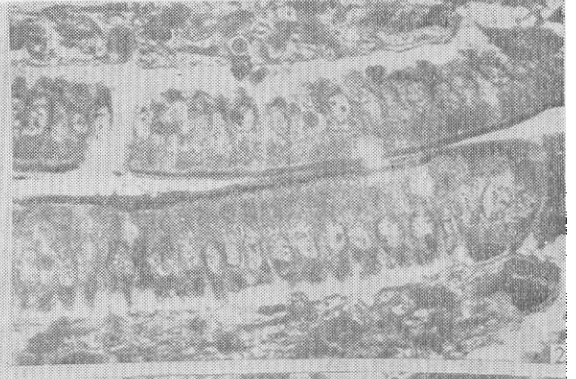
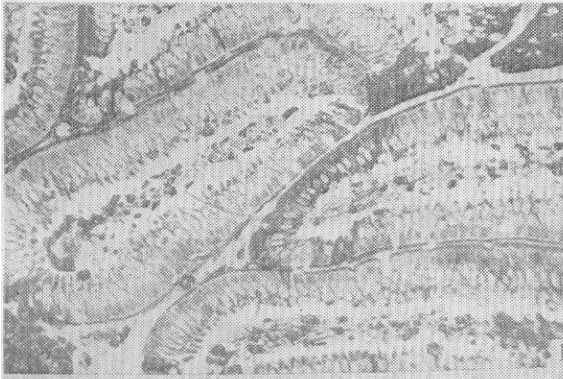


图1 大白鼠小肠上皮细胞中的线粒体 450倍；
图3 大白鼠肾小管周围的线粒体 450倍；

图2 大白鼠小肠上皮细胞中的线粒体 1000倍；
图4 大白鼠肾小管周围的线粒体 1000倍。

2. 固定 鉴于线粒体遇到酸类物质之后，极易溶化而破坏，故原则上应回避酸类物质，所用的福尔马林以中性为佳。再者，氯仿和酒精颇易使线粒体发生变化，故不但不可作固定液，且施行麻醉方法时亦不宜应用。

(1) 固定时选用绝对新鲜之薄小组织块，用雷戈特 (Regaud) 氏液固定 4 天。每天更换 1 次新液，贮放在冰箱内。

雷戈特氏液 3% 重铬酸钾溶液 40 毫升；
40% 福尔马林 10 毫升(宜用中性)。

(2) 以 3% 重铬酸钾水溶液媒染铬化 8 天，每 2 天更换新液。

(3) 自来水冲洗 24 小时。脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 3—5 微米。

(4) 附贴切片于洁净载玻片上、烤干、脱蜡，经逐级酒精，浸蒸馏水中 2 分钟→染色。

3. 染色

(1) 染色液配制

猩红*	2 克
磷钨酸	0.5 克
冰醋酸	5 毫升
蒸馏水	100 毫升

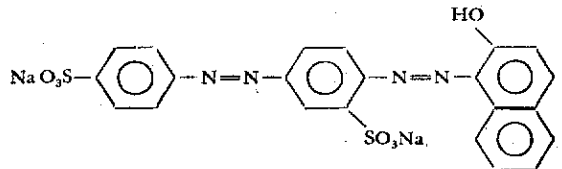
将上述配成染液待猩红彻底溶解，震荡过滤后使用。

(2) 染 2—3 小时，蒸馏水洗一洗，置 30% → 50% → 70% 酒精脱水兼分色 → 85% → 95% 酒精快绿液复染：

快绿	0.5 克
95% 酒精	100 毫升

* 猩红——英国“B. D. H”，Biebrich Scarlet (水溶性)，468550 厂商产品规格。

属酸性染料，其分子结构式：



复染 30 秒→100%酒精更换 3 次→透明、封固。

(二) 结果

1. 线粒体染成桔红色，胞浆和核呈淡蓝色或淡绿色。细胞各部界线分明，色泽美丽鲜艳，轮廓清晰。尤其是肠上皮细胞内的线粒体靠近小皮缘端及细胞基底部分布多而清楚(见图 1、2)。

肾脏切片的线粒体在肾小管四周呈棒形栅栏状排列(见图 3、4)。

2. 经该法染色的切片标本，可长期保存，不易退色。

(三) 讨论

选择动物要年轻，健康。取材动作要敏捷迅速；不宜用麻醉药物处死，直接用暴力处死。药物会损害线粒体，避开它对保存线粒体有益。

尽量控制掌握好切片标本(经染色的)在酒精中脱水、分色停留时间。因为线粒体是一种类脂蛋白质，酒精能溶解大部分类脂物，影响线粒体着色。

从各种制作线粒体方法中，采用一致公认的雷戈特氏^[1]液作固定液；扬其重铬酸钾和中性福尔马林对线粒体之长处，且试剂价格低廉极易配制。特别是此液固定线粒体把握性大，成功率高。用什么染液显示线粒体的色泽，这

是制片者所必须考虑的，也是成败的主要关键！如奥脱蔓(Altmann)氏^[2]染液染出标本色泽清楚，但大的缺点系酸性复红不宜长期保存，容易退色，若计划要制作大量切片标本就得考虑退色这一弱点。所以从效益角度来看，这对制片者自然会感到最困难环节之一；贝达(Benda)氏^[3]染色法因手续繁琐，除某些特殊情况外，一般并无采用的必要；贝斯莱(Bensley)氏^[1]和奥斯密克(Osmic)氏^[4]法均需用 2% 锇酸液作固定和染色。锇酸对类脂物的线粒体是较理想优良固定液。市场虽有此类试剂出售，但因它价格昂贵不适使用。考虑其售价高，尽力寻求价格低廉能达到同样效果之试剂来取代；雷戈特氏铁苏木精染色是极为广谱的方法。制成切片标本能保存持久不退色。但此法从媒染→染色→分色时间需长，线粒体染成黑色，细胞内其他成分亦同时着色，这给复染带来困难，对学生用显微镜观察到的物像呈一片黑色，不容易辨别。

参 考 文 献

- [1] 田中克己, 1965, 显微镜标本的制作方法, 科学出版社, 235—237。
- [2] 孟瑞朝, 1955, 组织病理标本制作方法, 人民卫生出版社, 106—107。
- [3] 郑若玄, 1980, 实用细胞学技术, 科学出版社, 86—91。
- [4] Gretchen L.H. 1979 *Animal Tissue Technique*, 4th ed 343—349, W. H. Freeman and Company San Francisco.