

动物病理组织制片过程的体会

任 成 林

(河北省张家口农业高等专科学校 075131)

摘要 组织切片技术是兽医科学研究和临床学观察组织病理形态变化,进行疾病诊断的一种重要方法。制作优质的组织切片,取材新鲜、固定完全、脱水彻底、透明适度、浸蜡充分、切片要薄、染色良好。如在某一步骤上不加注意,即将会造成事倍功半。但在实际工作中,常由于某些人为因素,使切片质量不佳,甚至影响研究和诊断的结果。本文介绍了我室制片过程中人为现象及其原因和纠正方法的体会,从而制出优质的组织切片标本。

关键词 动物,组织,切片

病理组织制片是教学、科研、疾病检验工作中广泛应用的一种实验技术。制片质量对病理诊断有很大的影响,如能制出理想的切片,既有助于病理的正确诊断,也为科研和教学工作提供优质切片标本。经过多年来的反复尝试,不断改进,现将我室动物病理组织石蜡切片-H、E染色操作过程和容易出现的问题及其解决办法介绍如下,以供参考。

1 取材 材料新鲜,应争取在动物死后半小时

内处理完毕。选材部位以病灶与正常组织交界处的组织标本为好,取材要完整,还要尽可能注意到整个器官的结构特点。组织块的大小一般是1厘米×1厘米×0.5厘米为宜。

如制片后组织结构疏松、异位,组织间出现裂隙或腔体,组织变形,细胞成狭长而深染的丝状,难以诊断。由于取材时受机械性挤压、过分牵拉或刀剪不锋利、容器过细过窄、组织块束扎过紧,固定瓶口过小,又硬行挤入。所以在夹取

组织时不要用力压、揉、挤以免损坏组织。

2 固定 以10%中性福尔马林最常用,经济、简易、效果甚好。固定时间24—36小时,时间过短,影响染色不良;时间过长,影响染片质量。

如制片后组织着色淡,细胞模糊不清。由于组织块没有及时固定组织发生自溶,或组织较大而容器太小、固定液不足和浓度不够所致(固定液的量应为组织块的5—10倍)。

3 水洗 流水冲洗12—24小时。把固定液清洗出来,防止固定剂沉淀于组织中影响切片。

如胃肠粘膜脱落,骨髓流失等组织缺少某一部分结构,由于过度流水冲洗而引起的。

4 脱水 组织经固定水洗后,内含大量水分,这些水分必须除尽才利于透明、浸蜡。最常用的脱水剂是酒精。采用逐级提高酒精浓度,以防组织过度收缩、变脆或脱水不完全而影响制片效果。脱水一般在室温下进行,由50%、70%、80%、90%和95%酒精各2小时;100%酒精分为I、II两种各放入1.5小时。我室常把组织块在95%酒精中过夜,这样处理组织都能将水分脱净,且不会有过硬过脆现象;但组织块在100%酒精中容易变硬,时间不宜过长。

如切片后的蜡块中央呈灰白粗糙而不透亮,放置一天后蜡块中央出现一陷窝,这表明组织脱水不彻底,以后水分蒸发,蜡块中央收缩形成陷窝,严重时难以切出完整切片。要注意各级酒精浓度应尽量精确,定时更换新的脱水剂。

5 透明 采用二甲苯在室温下进行透明组织块。一般过程是100%酒精十二甲苯(1:1)20分钟、二甲苯分为I、II两种各放入15分钟。组织在二甲苯中贮留时间必须严格掌握,时间稍长,则使组织脆硬易碎;时间过短,石蜡又不易渗透进去。

6 浸蜡 此步骤是在温箱内进行的,温度应调至58℃左右,使它恰好熔化石蜡。浸蜡过程一般是二甲苯+石蜡(1:1)30分钟、石蜡分为I、II两种各放入2—3小时。一定要保持温箱的温度恒定严格掌握浸蜡时间。

在组织过度固缩,镜下见细胞和纤维都比正常小,排列致密,核深染,染色质不清楚成团块状。由于组织在浸蜡时温箱内温度过高,时间过长所致,要检查温箱的恒温性能,使维持在60℃以下。

7 包埋 包埋方法是把热的包埋框放平,将温箱中融化好的石蜡倒进包埋框内,迅速用热镊子轻轻将组织放入包埋框内,将要切的面朝下摆正位置,等到石蜡表面凝固之后,将包埋框轻轻放入冷水内,经30分钟后取出,拆开包埋框,取出蜡块,把组织蜡块的上下两端应修平,但需留有余蜡,否则石蜡切片弯曲而不挺直,或无法连成带状。蜡块左右两端应不留余蜡,否则切片容易皱折,不易摊平。

如组织边缘部分凹陷形似溃疡灶,但周围无炎症和肉芽组织。由于在包埋时先把镊子放在酒精灯火焰上加温过度,然后去镊取组织所致。注意不要把镊子加温过热。

8 切片 切片过程是将烧热的解剖刀平烙蜡块底面,迅速粘贴在木块上,固定在切片机上。装上锋利的切片刀(刀的斜度为15度)调整蜡块切面使之与刀口平行。把厚度调节器调在4微米左右。左手平持毛笔,右手旋动切片机把,切片带出来之后,用毛笔轻轻托起,切片切取一定长度之后,用毛笔或镊子轻轻取出至纸盘上准备贴片。

如镜检细胞互相重叠组织密集,核深染,由于切片过厚。切片有直线缺痕,宽狭不一,主要是切片刀有大小不等的缺口应磨刀。切片有皱褶,由于切片刀不够锋利或刀的斜度太大所致,应磨刀并调整刀的角度。切片厚薄不均,染色后深浅不一,由于刀夹或蜡块松弛,应拧紧切片机的每一个螺旋。

9 贴片 将一个盛水的恒温水箱,加温到40—45℃,将切片光泽面向下铺于温水上。等切片展开后用清洁的载玻片从水中捞出,拨正位置,把贴好切片的载玻片放在染色架上竖立排水,然后立即烤片。

如切片有泡状褶迹、着色不良。由于贴片时水中有小气泡上升附于切片下面,或放片时

切片入水角度不当,烘干时气泡逸出,形成一个泡状褶迹。应在切片入水前用玻璃棒在水底搅动,赶走水底的气泡,注意贴片入水角度,尽量不用粘贴剂,展片所用温水应先煮沸冷却至所需温度为好,避免撞动产生气泡。

10 烤片 把贴有切片的载玻片直立放在染片架上立即送入 45℃ 左右的温箱中烘烤 2—4 小时,直到蜡片成半透明状。

11 染色 H、E 染色的程序是将切片浸入二甲苯分为 I、II 两种各 15 分钟(应完全透明)、二甲苯+100%酒精(1:1)、100%酒精分为 I、II 两种、95%、90%、80%、70%和50%酒精、蒸馏水各 2 分钟,苏木精染液 10 分钟,自来水、1%氨水、自来水、50%、70%、80%、90%和95%酒精各 2 分钟,1%伊红酒精染液 5 分钟,95%酒精、100%酒精分为 I、II 两种、100%酒精二甲苯(1:1)、二甲苯分为 I、II 两种各 2 分钟。

如切片染色不均匀,部分组织染色良好,部分呈地图形不着染。由于脱蜡不彻底,常见于冬季室温低,脱蜡用的二甲苯使用时间太久所致。在冬季应把二甲苯适当加温至 30—35℃ 脱蜡,或更换新的二甲苯。切片有污染,在一处或多处出现棕褐色或污蓝色不规则的污斑。由于染液有沉淀所致,应经常把染液过滤。切片呈现片块状裂隙如龟裂状,由于在染色时使切片干燥所致,所以在染色的每个步骤都不要使切片干固。切片模糊、呈云雾状,由于 100% 酒精已含有水分,应定时更换新的脱水剂。

12 封片 由二甲苯中取出切片,注意正反面,用纱布迅速擦净组织周围多余的二甲苯,组织上滴一滴树胶,盖上盖片即可。

如盖片下有气泡是由于在封片前用玻璃棒搅动树胶产生气泡,或放盖片角度不当所致。应经常检查树胶的浓度,事先稀释才能使用,放盖片时先将盖片的一边放在切片上,然后慢慢地降下盖片,或置 40℃ 温箱中烘烤,促使气泡排出。

13 镜检 完成染色封片后,放在显微镜下检查,细胞核呈蓝紫色,细胞质、胶原纤维、肌纤维呈粉红色,效果良好。

病理组织制片是难度较大的技术,失当的现象是多种多样的。以上仅是我室多年来摸索的一点经验和见到的一些问题。每制出一张理想的病理切片标本,需要在操作过程中认真注意每一环节,就能防止和避免在制片过程中由于处理失当而出现的缺点,为教学、科研和病理诊断作出高质量的切片标本。

参 考 文 献

- 1 麦兆煌编著。病理组织标本制作技术。人民卫生出版社出版,1963。
- 2 C.F.A, 卡林著,孔庆雷译。组织病理学与组织化学技术手册。科学出版社出版,1982。
- 3 杜卓民主编。实用组织学技术。人民卫生出版社出版,1982。
- 4 曾小鲁主编。实用生物学制片技术。高等教育出版社出版,1989。