

斑马鱼组织石蜡切片质量的优化

郑伟,严继舟

(上海海洋大学海洋科学研究院海洋生物系统和神经科学研究所/上海海洋大学水产与生命学院生物系,上海 201306)

摘要:斑马鱼作为模式生物已经广泛运用于生物学各个研究领域。传统方法制作的斑马鱼组织石蜡切片经常出现收缩、脆裂,主要原因是脱水和透明作用时间过长。为提高切片质量,本实验室摸索出了一套改善石蜡切片质量的方法:以组织透明作为标志,摸索最短的脱水与透明时间,并适时采用脱水能力弱的脱水剂,提高了切片的质量,缩短了试验时间。我们以斑马鱼的心脏、肠、脾脏为材料进行石蜡切片,结果表明,改进后的组织结构完整清晰,基本无脆裂现象。本优化技术适合于小型动物的石蜡切片制作。

关键词:石蜡切片;斑马鱼;透明;脱水剂

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0260-03

斑马鱼以繁殖能力较强、胚胎透明、性成熟期较短、个体短小、易养殖等特性,成为一种被广泛接受的模式生物。在药物筛选^[1]、遗传发育^[2]、环境毒理^[3]及神经科学^[4]等方面有诸多的应用。在对斑马鱼的研究中,组织切片技术是运用最多的技术手段。

组织切片技术是在组织胚胎学、生理病理学以及细胞生物学中,用来实时观察组织细胞变化的技术手段,该技术可以克服无法观察组织内部变化的不足。组织切片是反映组织实时状况最有效的手段,最接近体内状况的切片才能最真实地反映出组织的变化。在组织切片中,运用最多的是石蜡切片和冰冻切片。冰冻切片工序简单,省时,各种抗原丢失少, RNA 降解少,但不易得到清晰的组织结构,都会给前期观察及后期的免疫组化、原位杂交的定位带来麻烦。石蜡切片则能得到精细清晰的组织细胞结构,对后期免疫组化和原位杂交中信号定位是重要的,并且可以制成永久切片方便进行回顾性研究,不足之处是耗时过长,抗原易失活, RNA 易降解^[5]。在石蜡切片的制作过程中,固定就是让组织内的蛋白质、糖类、脂肪等转变成不溶性物质,同时使附着在组织上的微生物和细胞内的酶失去活性,进而防止组织的自溶,以使得组织与取材之前的结构和状态基本一致;脱水就是除去组织内部水分;透明就是将组织内部的脱水剂替换成透明剂(如二甲苯);浸蜡则是以熔融的石蜡替换透明剂,达到组织内部充满石蜡的目的;最后进入切片染色程序。纵观整个切片的制作过程,切片最终目的就是使得组织内部充满石蜡以便于切片。假若组织内的水分不能除尽,则后续的透明和浸蜡就无法进行;倘若组织内的乙醇未置换完全,也达不到组织内充满石蜡的要求。以上这2种情况都将导致无法切片。高浓度的乙醇处理时间过长,易引起组织强烈收缩;二甲苯处理时间过长易引起组织的脆裂^[6],因此找出合适的处理时间是改善石蜡切片质量的关键所在。笔者以斑马鱼为研究材料,摸索

出了一套优化石蜡切片的方案,通过优化试验条件,有效降低了组织发脆和收缩的程度,提高了切片质量,同时也缩短了制片时间。

1 材料与方法

1.1 材料

成年斑马鱼的心脏、肠、脾脏。固定液为波恩氏液,4%多聚甲醛磷酸缓冲液(PFA),均为新鲜配制。乙醇、二甲苯(宜兴市第二化学试剂厂生产,分析纯),叔丁醇(上海凌峰化学试剂有限公司生产,化学纯)。

1.2 方法

1.2.1 常规方法 将3种新鲜的组织分别按照如下步骤进行。分为2组:(1)波恩氏液(新配制)固定12 h,70%乙醇(加有1滴浓氨水)洗涤至黄色褪去。脱水、透明程序:70%乙醇1 h,80%乙醇1 h,90%乙醇1 h,95%乙醇1 h,无水乙醇1 h,无水乙醇-二甲苯等体积混合液0.5 h,二甲苯0.5 h(各液体用量均为500 μ L)。(2)4%多聚甲醛缓冲液固定12 h,流水冲洗4 h,脱水、透明程序同(1)。透明后于57 $^{\circ}$ C浸蜡,共2次,每次1 h。包埋,切6 μ m,HE染色,处理温度为室温。

1.2.2 改进方法 由于无法通过一些现象来证明组织内的水已经完全脱去了,二甲苯透明这一步却可以通过组织透明即组织成半透明状这个现象来判断最短的透明时间。具体方案是:首先让组织脱水脱过,得出最短透明时间 t ;然后,不断缩短组织的脱水时间,直至组织不能在二甲苯中透明,前一时间即最短脱水时间 t ;最后通过切片染色来判断实际的效果。

参考常规方法,改进后脱水及透明程序为:70%乙醇1 min,80%乙醇1 min,90%乙醇1 min,95%乙醇1 min,无水乙醇1 min,无水乙醇-二甲苯等体积混合液1 min,二甲苯1 min,各溶液体积为50 μ L,处理温度为室温。

2 结果与分析

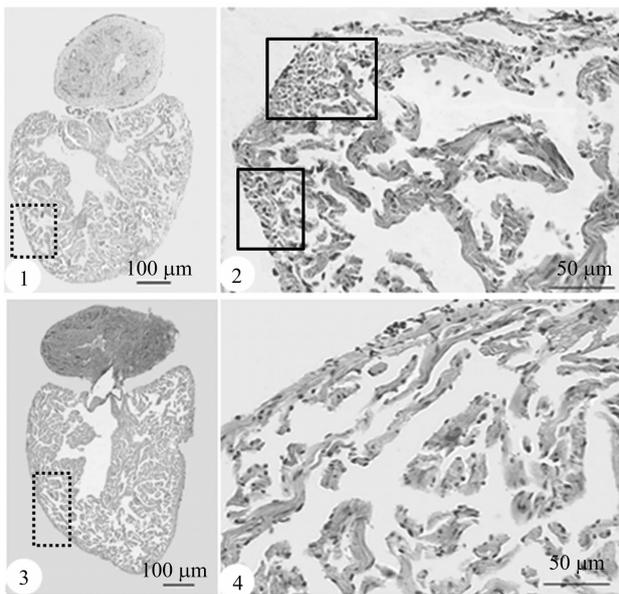
2.1 传统方法与改进方法效果的比较

从传统方法的结果中可以看出:心脏和肠都呈现出脆裂的现象(图1-2、图2-2),其中小肠绒毛上还出现了“空洞”

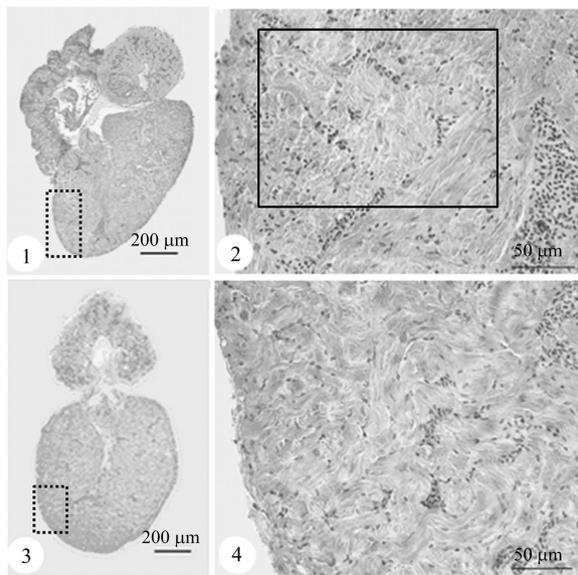
收稿日期:2013-03-16

基金项目:上海市教委科研创新项目(编号:13zz126)。

作者简介:郑伟(1986—),男,湖北武汉人,硕士,主要从事再生医学研究。E-mail:dtc2623@yahoo.com.cn。



1、2—传统方法；3、4—改进方法；□为选择的部位，▭为脆裂部位
图1 传统方法与改进方法的斑马鱼心脏石蜡切片（PFA固定）



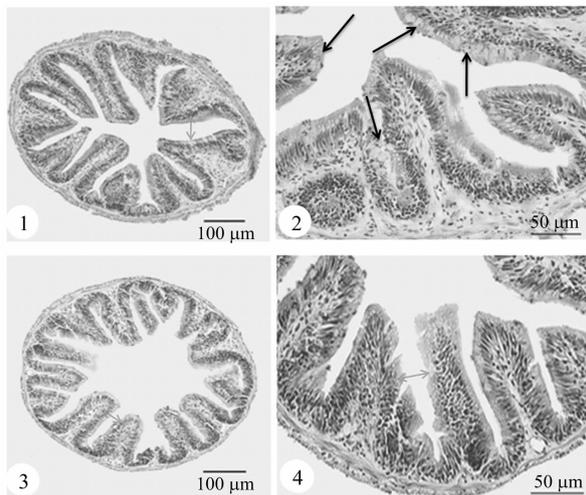
1、2—传统方法；3、4—改进方法；□为选择的部位，▭为脆裂部位

图2 传统方法与改进方法的斑马鱼心脏石蜡切片（波恩氏液固定）

（图3-2、图4-2）。由PFA固定心脏，心室是收缩的（图1-1、图1-2）。从改进后的试验结果可以看出，心脏已基本无脆裂产生（图1-4、图2-4），小肠绒毛上已无“空洞”（图3-4、图4-4），但心肌纤维还是收缩的（图1-3、图1-4）。比较得出，小肠绒毛上的“空洞”是由于脱水过度，而心脏组织上的脆裂是因二甲苯处理时间过长，而并非是组织本身存在的结构。这些现象均与前人研究结论一致，可以将脆裂和收缩作为切片质量的标准。试验结果说明传统方法不够准确，甚至会对组织的结构产生误判。

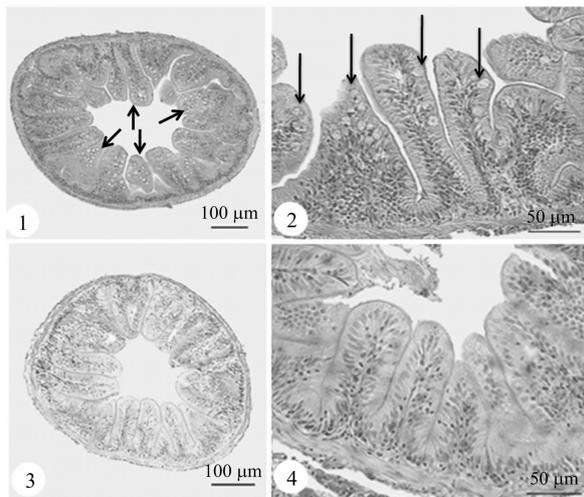
从试验时间上看，改进方法的每一步时间均为1 min，总

时间为7 min，而传统方法的脱水透明时间为6 h，相比之下试验时间极大缩短。在改进过程中，各步骤时间均为1 min，但并非最短时间，考虑到更换试剂所需操作时间，将1 min设为最短时间。因此对于组织小的脾脏和肠来说，在改进组中也呈现出脆裂现象（图3-4、图5-2）。



1、2—传统方法；3、4—改进方法；↔表示小肠绒毛之间的间隙，→为“空洞”出现的位置

图3 传统方法与改进方法的斑马鱼肠石蜡切片（PFA固定）



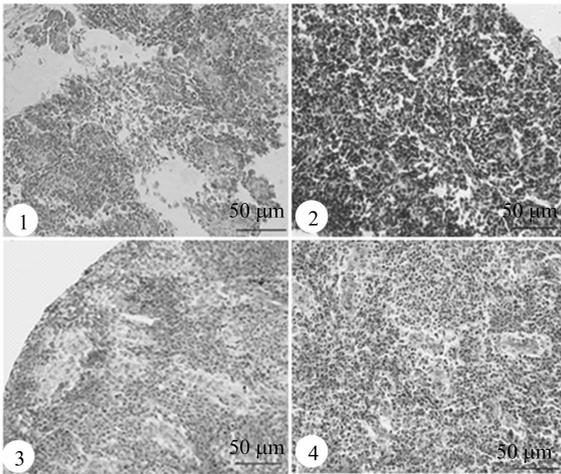
1、2—传统方法；3、4—改进方法；→为“空洞”出现的位置

图4 传统方法与改进方法的斑马鱼肠石蜡切片（波恩氏液固定）

2.2 叔丁醇的脱水效果

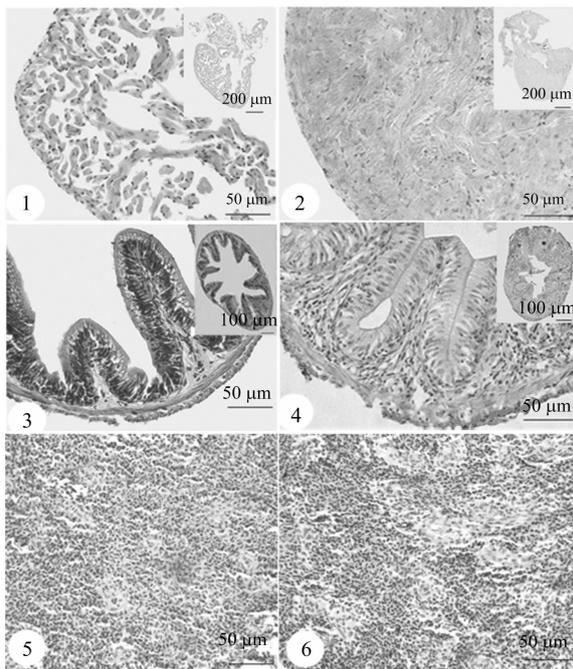
由上述结果可以看出，作为脱水剂的乙醇缩短脱水时间和减少脱水剂的量都已达到极限，即可认定乙醇脱水能力太强。脱水能力指的是在水中的溶解性，即溶解越快脱水能力越强，溶解越慢脱水能力越差。其他常用的脱水剂有正丁醇、叔丁醇、松油醇等，乙醇与水是任意比例互溶；正丁醇微溶于水（20℃溶解度为8.3 g），叔丁醇则是溶于水，松油醇几乎不溶于水^[7]，脱水能力由强到弱为乙醇>叔丁醇>正丁醇>松油醇。采用叔丁醇代替乙醇作为脱水剂，对这3种组织进行石蜡切片，脱水及透明程序见表1。

试验结果表明，肠的脆裂现象基本消失（图6-3），脾脏



1—传统方法, 波恩氏液固定; 2—改进方法, 波恩氏液固定;
3—传统方法, 波恩氏液固定; 4—改进方法, 波恩氏液固定

图5 传统方法与改进方法的斑马鱼脾脏石蜡切片



1、2—心脏; 3、4—肠; 5、6—脾脏; 1、3、5以PFA固定,
2、4、6以波恩氏液固定, 脱水剂均为叔丁醇

图6 以叔丁醇为脱水剂的斑马鱼心脏、肠和脾脏石蜡切片

的还有少许(图5-2)。对于PFA固定的脾脏而言, 组织结构的完整程度较传统组和改进组高了很多(图5-1、图5-2图、6-5)。在试验中发现, 经乙醇处理组织会发生硬化, 而叔丁醇处理的组织柔软, 无硬化发生, 减少了组织脆裂的概率。适当选择脱水能力弱且不硬化组织的脱水剂能进一步改善切片质量。

不同的组织脱水透明的时间亦不相同。试验中, 曾将斑马鱼的大脑以乙醇脱水, 获得每一步的时间最短为5 min(体积为200 μL), 因大脑较心脏、肠、脾脏体积大, 含水量高, 故每一步所需时间长。试剂的体积与组织体积比不能太高, 以1 mL的体积来脱水透明, 则时间可能不到1 min, 操作上无法实现; 试剂体积过高时, 小体积的组织放入, 则可能很快就与

表1 采用叔丁醇作为脱水剂的脱水及透明时间

| 溶液 | 透明时间 (min) | | |
|-----------------|------------|-----|----|
| | 心脏 | 肠 | 脾脏 |
| 30% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 40% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 50% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 60% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 70% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 80% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 90% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 95% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 100% 叔丁醇 | 2 | 1.5 | 1 |
| 叔丁醇 - 二甲苯等体积混合液 | 1 | 1 | 1 |
| 二甲苯 | 1 | 1 | 1 |

注: 溶液的体积均为50 μL , 处理温度为27 $^{\circ}\text{C}$ 。

试剂浓度一致, 操作上来不及。在实际操作中, 均以300 μL 为最高体积, 在随后的步骤中再慢慢优化。既可以节约时间和试剂, 又使得切片质量提高。作为透明剂的二甲苯, 处理时间过长易引起组织脆裂, 并对试验人员的身体不利。楼允东等将无水乙醇和二甲苯的步骤改为2~3道松油醇, 利用无毒的松油醇的弱脱水能力脱去残存的约5%水分, 同时松油醇又具有透明组织的作用, 使得组织脱水和透明同时进行, 最后浸蜡, 得到了不错的效果^[7]。将斑马鱼心脏用叔丁醇脱水至95%, 接着放入松油醇, 透明时间也很短, 获得了很满意的结果。

2.3 固定剂的选择

固定剂PFA和波恩氏液作用效果也不一样。经PFA磷酸缓冲液固定的心脏和肠, 较波恩氏液收缩的特别明显(图1-1、图1-3、图2-1、图2-3、图3-1、图3-3、图4-1、图4-3), 其中中心室的心肌纤维分散, 整体不完整(图1-2、图1-4、图2-2、图2-4); 而小肠绒毛之间不紧凑(图3-1、图3-3、图4-1、图4-3), 每个绒毛的黏膜肌分散, 与心肌的情况类似。研究认为, 经甲醛固定的组织再由乙醇脱水会引起强烈的收缩^[8], 于是改换不会引起收缩的叔丁醇^[9]作为脱水剂。从图2-1、图2-3可以看出, 由叔丁醇脱水的组织还是导致了心肌纤维和小肠绒毛的收缩, 继而将脱水剂更换为脱水能力更弱的松油醇, 结果还是引起了收缩, 表明引起这类收缩与脱水剂无关。结果可以看出, 若只是观察组织形态, 波恩氏液固定优于PFA。而石蜡切片不仅应用于观察组织变化, 同时也运用于免疫组化(IHC)和原位杂交(ISH), 因此切片质量的好坏将影响到最后结果的判定。免疫组化和原位杂交的固定液基本上都是PFA磷酸缓冲液, 对于斑马鱼心脏这类组织来说, 最好是应用冰冻切片技术(图7)。对于信号以细胞核定位的免疫组化和原位杂交来说, 固定液采用波恩氏液不是最理想, 经其固定后的组织不一定有信号, 推测可能是影响到核抗原的免疫活性^[10]。但是对于脾脏, 无论是波恩氏液还是PFA, 组织均未呈现收缩的现象。对诸如脾脏这样实质性器官而言, 信号定位更好判断。

3 结论

综上所述, 需根据要求选好固定剂, 以二甲苯透明为切入点, 首先确定最短的透明时间; 接着缩短脱水时间, 得到最短脱水时间后; 确定好合适的脱水剂和透明剂以及最优的处理

尹晓雯,谈永萍,魏智清. 大苞雪莲对中华鲟耐缺氧能力的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):263-264.

大苞雪莲对中华鲟耐缺氧能力的影响

尹晓雯,谈永萍,魏智清

(宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021)

摘要:在缺氧水中,把中华鲟分别放在不同剂量的大苞雪莲水溶液中进行密闭缺氧试验,观察中华鲟的存活时间,探讨大苞雪莲对中华鲟耐缺氧能力的影响。结果显示,在13~16℃水温下,不同剂量的大苞雪莲水溶液均可延长中华鲟的存活时间,有的剂量达到显著效果($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$)。说明一定剂量的大苞雪莲水溶液可显著提高中华鲟的耐缺氧能力。

关键词:大苞雪莲,中华鲟,耐缺氧能力

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0263-03

大苞雪莲(*Saussurea involucrate* Kar. et Kir.)别称新疆雪莲、天山雪莲,系菊科风毛菊属多年生草本植物,主产于新疆天山、昆仑山,生长在雪线以上,民间以全草入药。据中医文献记载,雪莲性温,味微苦,入肝、脾、肾三经,具有散寒除湿、活血通经、强筋助阳、抗炎镇痛、收缩子宫等功能,主要用于治疗风湿性关节炎、肺寒咳嗽、宫寒腹痛、闭经、胎衣不下、阳痿和麻疹不透等病症。现代医药学研究表明,大苞雪莲具有降血压、改善血液循环、抗氧化、抗疲劳、抗衰老等功能^[1-2]。杨燕等报道,发现大苞雪莲醇提取物可显著增强小鼠的体力、耐

力、耐缺氧能力和非特异性抵抗力^[3]。但是,尚未见有关大苞雪莲对鱼类抗缺氧影响的报道。本试验拟初步研究大苞雪莲水浸液对鱼类的抗缺氧作用,为大苞雪莲在抗缺氧方面的广泛应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

缺氧水:将自来水煮沸后加盖密封,自然冷却后即缺氧水。试验水温13~16℃。大苞雪莲:购自新疆伊犁特克斯。中华鲟(*Rhodeus sinensis* Gunther),俗称鲟鱼(以下简称鲟鱼):购于银川市西夏区同心路鱼市,体重(0.21±0.06)g,体长(2.99±0.14)cm。

1.2 试验方法

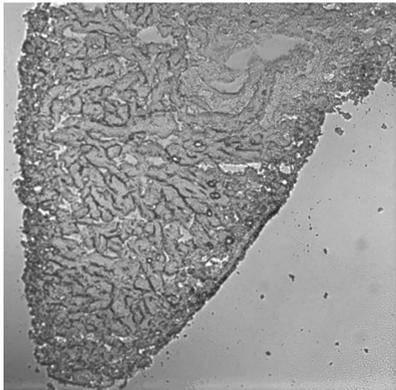
1.2.1 大苞雪莲水浸液的制备 大苞雪莲水浸液:称取大苞雪莲5g,加200mL热开水浸泡30min,然后用滤纸过滤得到大苞雪莲第1次水浸液,将第1次浸泡过的大苞雪莲用同样

收稿日期:2013-04-08

基金项目:宁夏大学科学研究基金(编号:NDZR10-26)。

作者简介:尹晓雯(1973—),女,江苏金坛人,实验师,主要从事生化和生理研究工作。E-mail:yinxw@nxu.edu.cn。

通信作者:魏智清,硕士,教授,主要从事动物生理学研究。E-mail:nxweizhiqing@163.com。



PFA固定,4℃过夜,经过10%、20%、30%蔗糖溶液脱水,以6μm进行冰冻切片

图7 斑马鱼心脏冰冻切片

时间,才能获得满意的切片效果。

参考文献:

[1]刘昌盛,穆宇,杜久林. 斑马鱼在生命科学研究中的应用[J].

生命科学,2007,19(4):382-386.

[2]桂建芳. 分子发育生物学的理想模式——斑马鱼[J]. 生物工程进展,1995,15(3):30-33.

[3]李洁斐,李卫华,王强毅,等. 斑马鱼应用于毒理学研究的现况[J]. 实验动物与比较医学,2005,25(4):247-252.

[4]邹苏琪,殷梧,杨昱鹏,等. 斑马鱼行为学实验在神经科学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(1):5-12.

[5]张晖,张晔,周郦楠. 浅谈两种常用组织切片技术[J]. 中国冶金工业医学杂志,2012,29(5):593-594.

[6]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.

[7]楼允东,王逸妹,傅予昌,等. 关于改革石蜡切片工艺的试验[J]. 动物学杂志,1986(1):33-35,2.

[8]王晓冬,汤乐民. 生物光镜标本技术[M]. 北京:科学出版社,2007:28-29.

[9]龚志锦,詹榕洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:17-18.

[10]Ananthanara Y V, Pins M R, Meyer R E, et al. Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative[J]. Journal of Clinical Pathology,2005,58(3):322-324.