

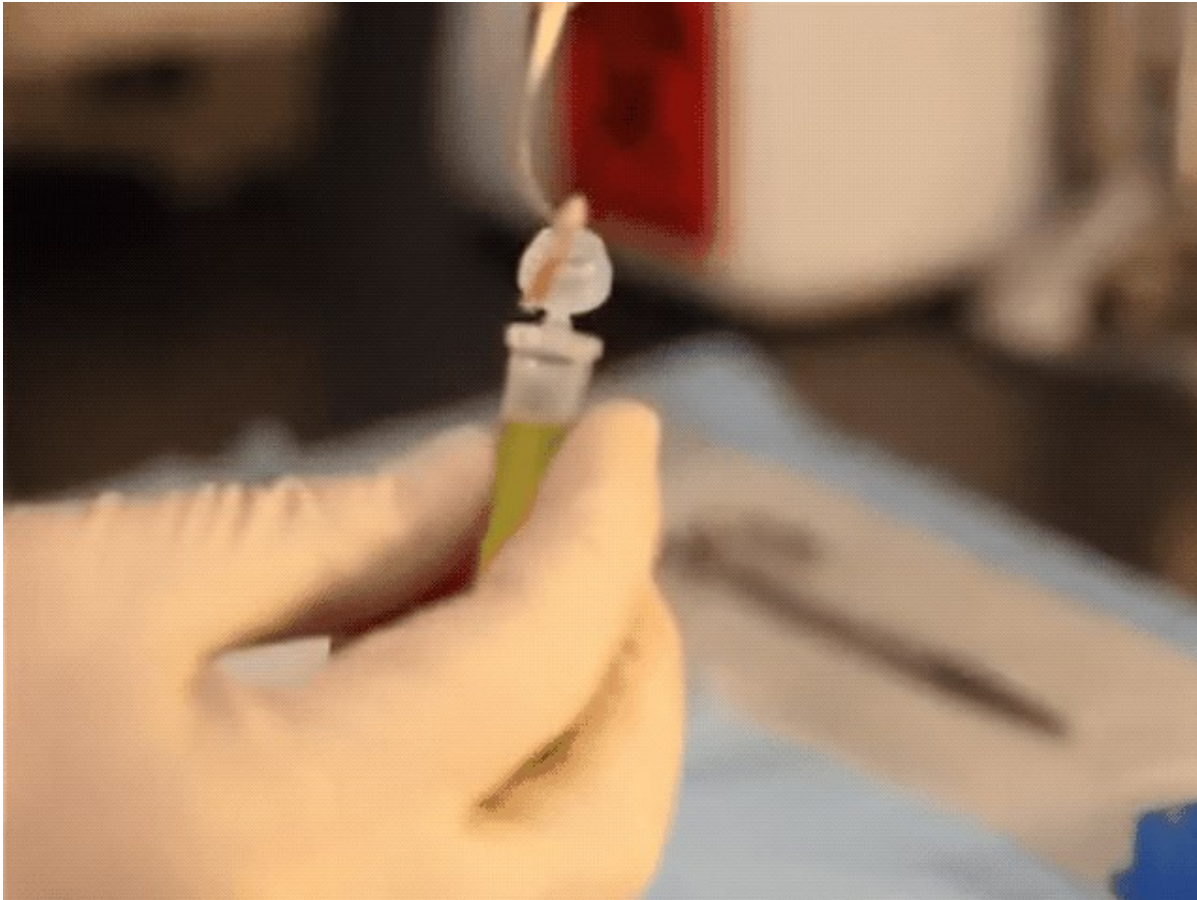


# 样品制备以及染色

2025. 05. 12

# 组织固定

1.组织固定，为了保存组织细胞内和细胞外的**蛋白质**并且**减缓组织降解**过程（抑制酶降解蛋白质，掩盖酶的作用位点使其不被识别防止降解的发生），固定的主要机制是：**交联和凝结**作用。



- **交联**作用：涉及蛋白质内部和之间共价键的形成，使组织硬化，抵抗降解。
- **凝结**作用：使用化学溶剂，例如酒精进行脱水，使得蛋白质的三维结构变形，从而蛋白质的疏水区域会转移到表面。

**凝结试剂**可以让**包埋试剂**如**石蜡**渗入到组织内部

# 组织固定

最常用**凝结试剂**之一是**福尔马林**(甲醛溶于水得到)。

固定过程中甲醛连接到伯胺上：位于氨基酸**谷氨酸**和**鸟氨酸**侧链上的氨基团，他们之间形成**亚甲基桥**的稳定**交联**，这个过程形成缓慢，会持续**一到两天**。

在固定之前要注意几个**问题**：

- 样品的**扩散能力**，固定试剂在组织内会以一定的扩散速度扩散一定的距离，当福尔马林到达样品中心后还需要一定时间来发生交联反应，因此样品的厚度应该限制在**4mm以内**，以达到完全的固定；
- **固定试剂的体积和PH值**，试剂：样品=40：1（试剂不会随着时间推移被耗尽），有些试剂需要在酸性条件下作用，而福尔马林的最好作用条件是在里面加入磷酸盐缓冲液来维持中心PH值，这样不会出现多余的酸导致组织中出现假象结果。



# 组织包埋-石蜡包埋

2.包埋组织（石蜡）：为了将样品支撑起来。

- 选择的包埋试剂要和样品本身有相似的机械性能，过硬和过软都容易在切片过程中造成瑕疵。
- 石蜡包埋之前要对样品进行脱水（乙醇代替组织中的水分），然后是二甲苯，最后是预热的石蜡（55℃）；石蜡进入到样品后小心加入更多石蜡，让样品在模具上固定并支撑，下一步将样品置于组织盒中用于切片。



# 组织切片

3. **组织切片**：将一个样品从包埋好模块切成薄片过程，用于光学显微镜切片通常厚度为**4-10微米**。

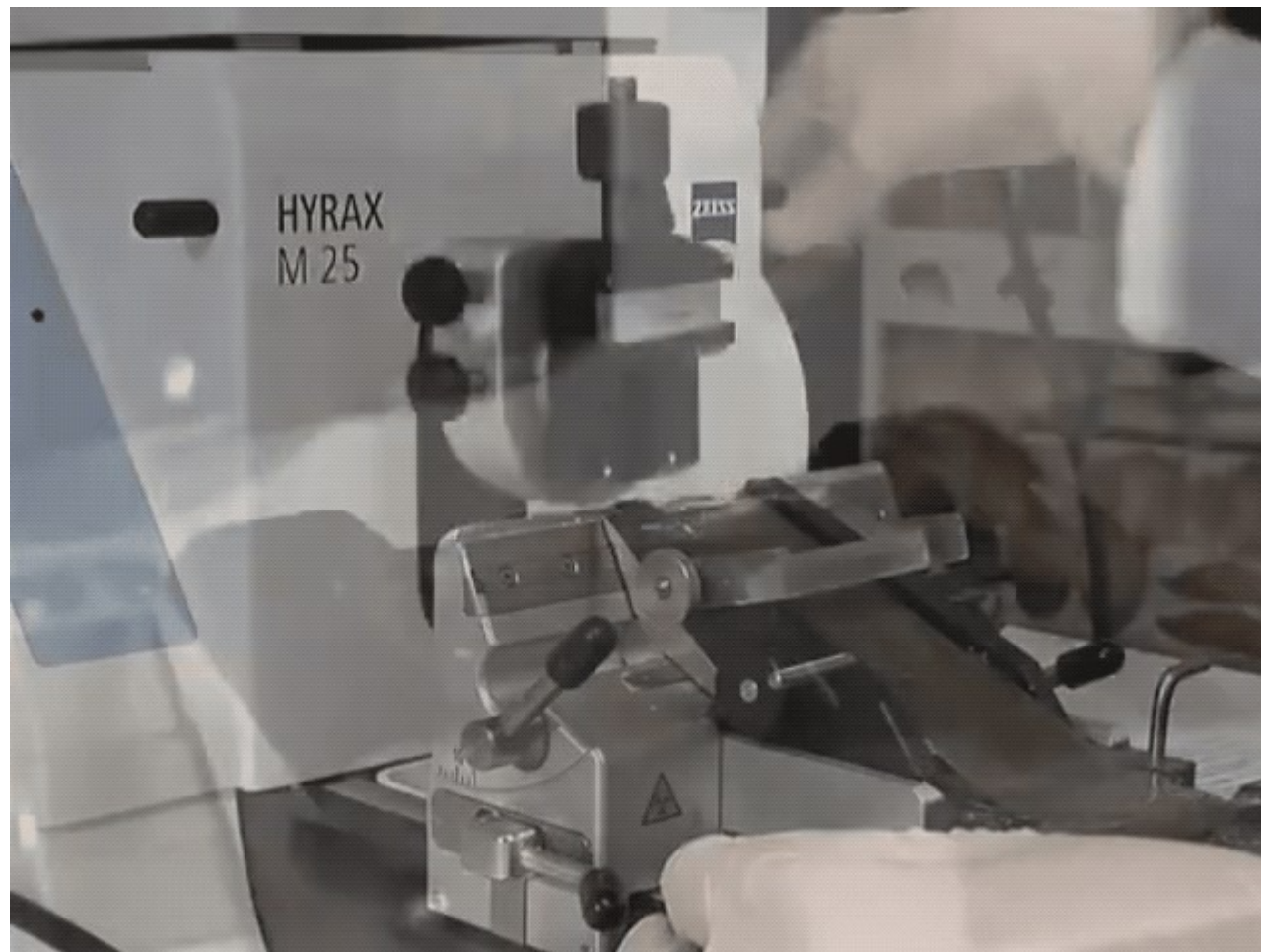
- 准备切片时，先在切片机上固定好一个金属的、玻璃的或砖石的**刀片**，然后将样品放入**样品池**，
- 接下来样品被移动到**切割刀面**，并沿刀片划过得到一个理想厚度**切片**，切片样品会形成薄带状，可将其放置于载玻片上；

**组织掉片**：使用**粘附性载玻片（荧光）**，预防操作中组织脱落。



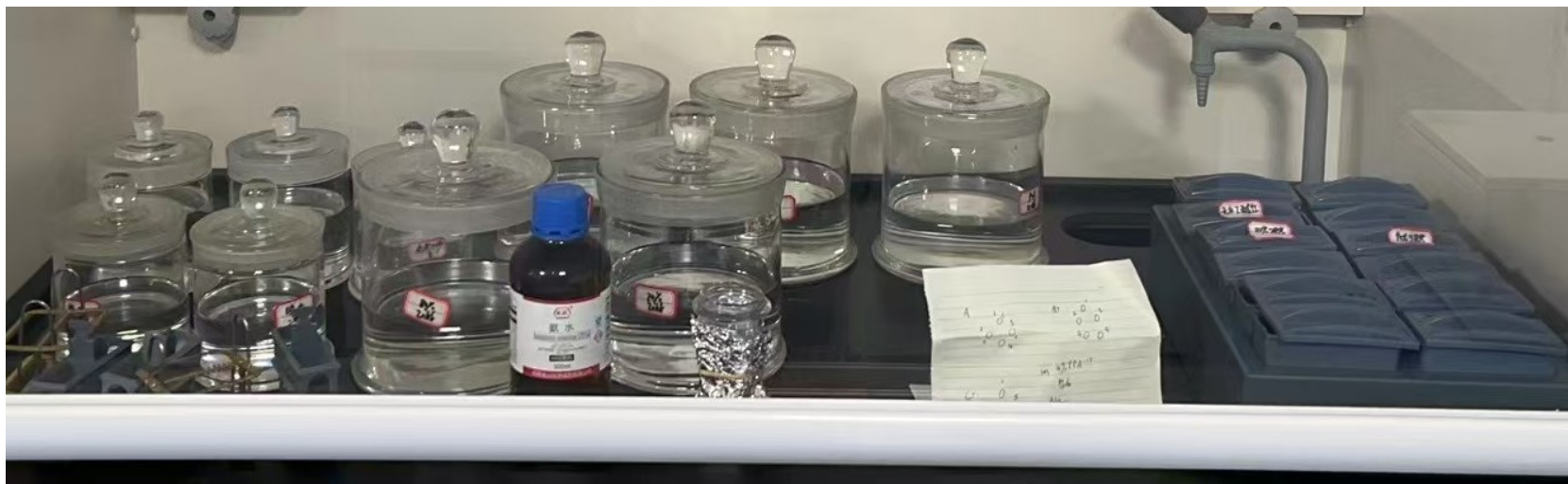
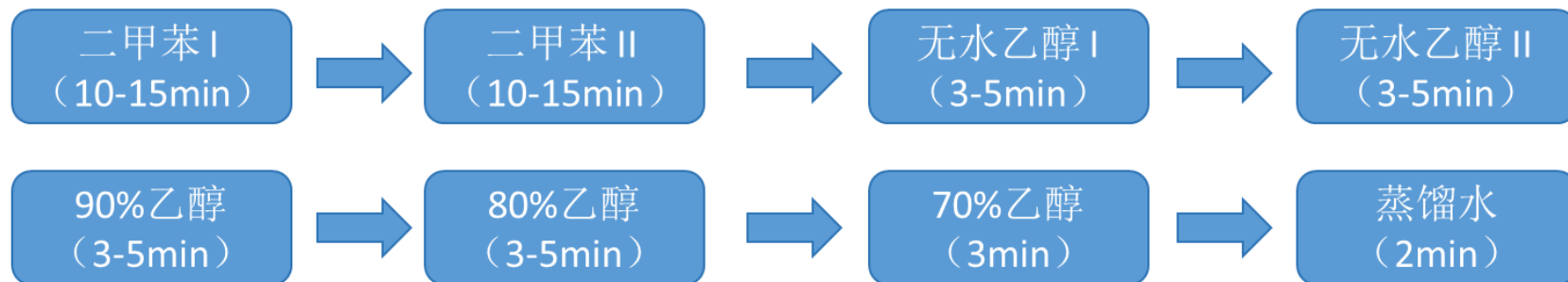
# 组织切片

对于石蜡包埋的样品，薄片要先放于**预热的**水浴中，然后将其从水中捞出，放在**载玻片**上**晾干**。



# 染色（各种染色包括荧光）-脱蜡

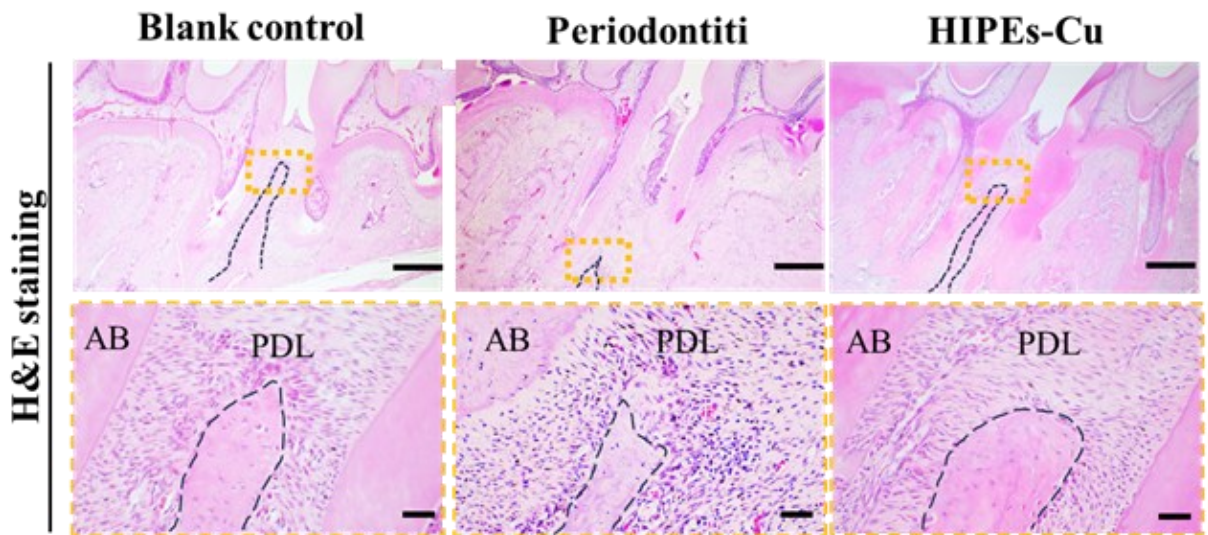
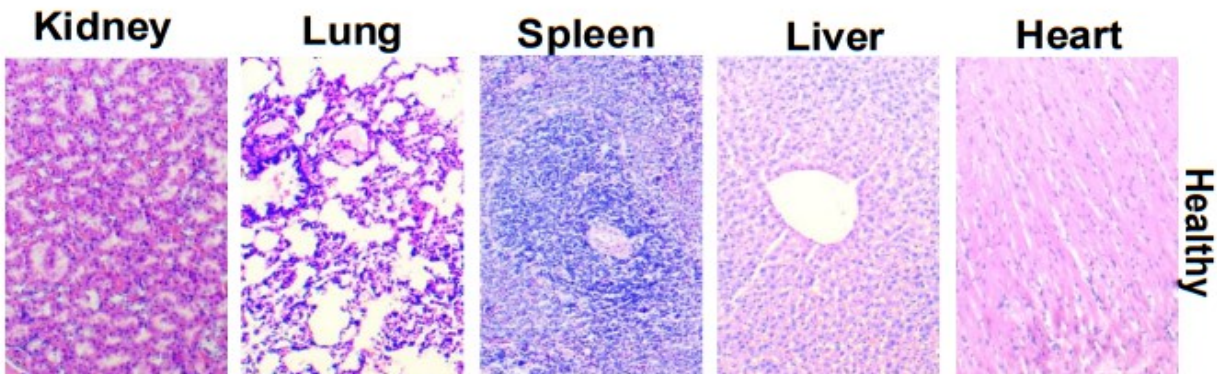
- 石蜡溶解：将切片置于 60 °C 烤片 60min。
- 脱蜡：烤过后的切片迅速放入二甲苯中，2 次。
- 梯度水化：100%、90%、80%、70% 的乙醇中各放置 5 min，蒸馏水放 5 min。



## ● 注意：

- ① 切片厚，室温低应增加脱蜡时间，脱蜡不净是影响染色不良的重要原因之一。
- ② 硬组织荧光/组化烤4h以上避免脱片，因为涉及抗原修复。
- ③ 石蜡包埋导致某些抗原位点结构变化，要根据目标分子的特性，分别选择热诱导修复（如柠檬酸缓冲液蒸，微波或高压加热）、酶法修复等。
- ④ 修复条件要优化，过度修复会损伤组织，修复不足则信号弱或无。

# H&E染色



- 苏木精染液

苏木精为碱性天然染料，可使细胞核着色。细胞核内染色质的成分主要是DNA，在DNA的双螺旋结构中，两条核苷酸链上的磷酸基向外，使DNA双螺旋的外侧带负电荷，呈酸性，很容易与带正电荷的苏木精以离子键或氢键结合而被染色。

苏木精在碱性溶液中呈蓝色，所以细胞核被染成蓝色。

- 伊红染液

伊红染液是一种化学合成的酸性染料，在一定条件下可使细胞浆着色。伊红在水中离解成带负电荷的阴离子，与胞浆蛋白质带正电荷的阳离子结合，使细胞浆着色，呈现红色。

# H&E染色步骤

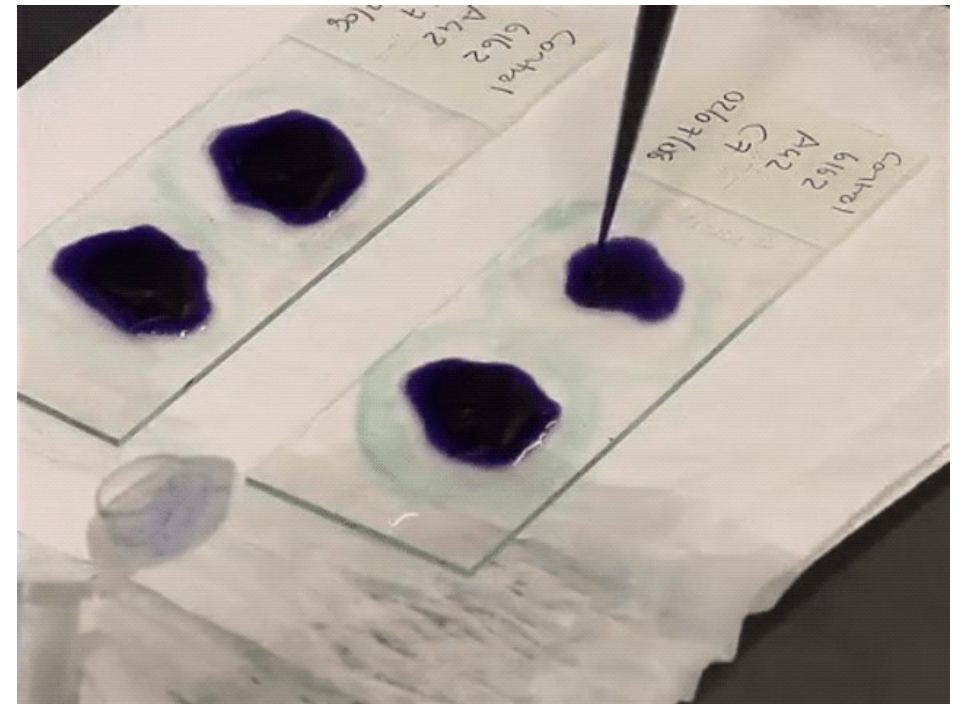
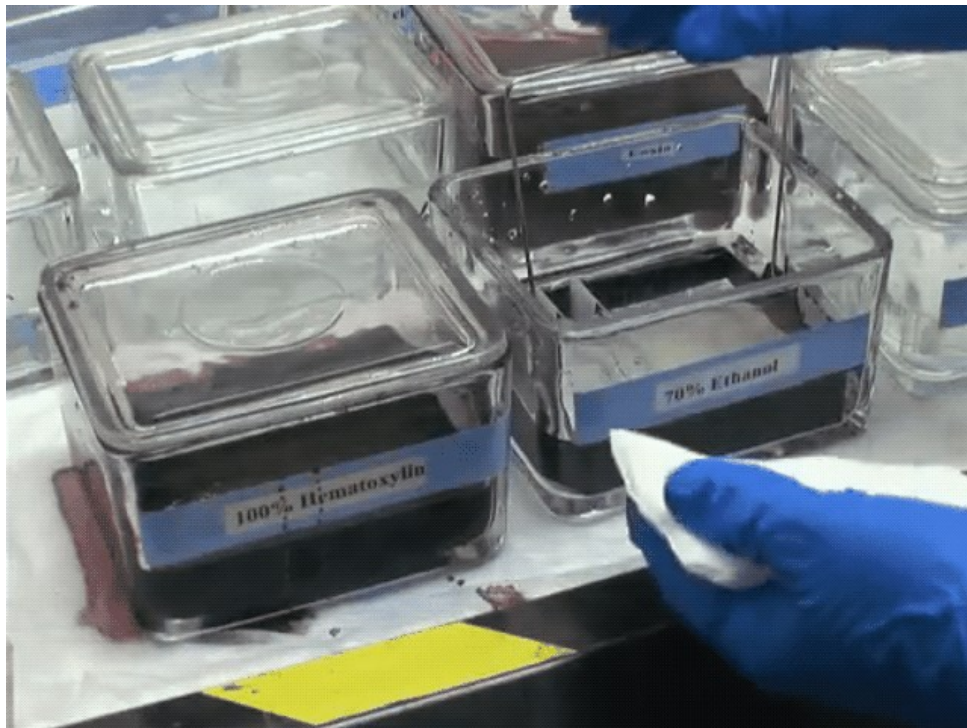
- **苏木精染细胞核**：苏木精，**3 min**，而后用蒸馏水洗去浮色。
- **分化（去除背景）**：1%的盐酸酒精分化液中分化**30s**→自来水 I，**3 min**→自来水 II，3min（反蓝）
- **伊红染细胞质**：伊红染液，**2 min**，而后用蒸馏水洗去浮色。
- **脱水**：75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇中各**1 min**。
- **透明**：二甲苯 I，**1 min**→二甲苯 II，**1 min**。最后封片

苏木素染色（5-10min），水洗

盐酸酒精分化（2S），水洗

氨水反蓝（30S），水洗

伊红染色（1-3min），水洗



# H&E染色-机染

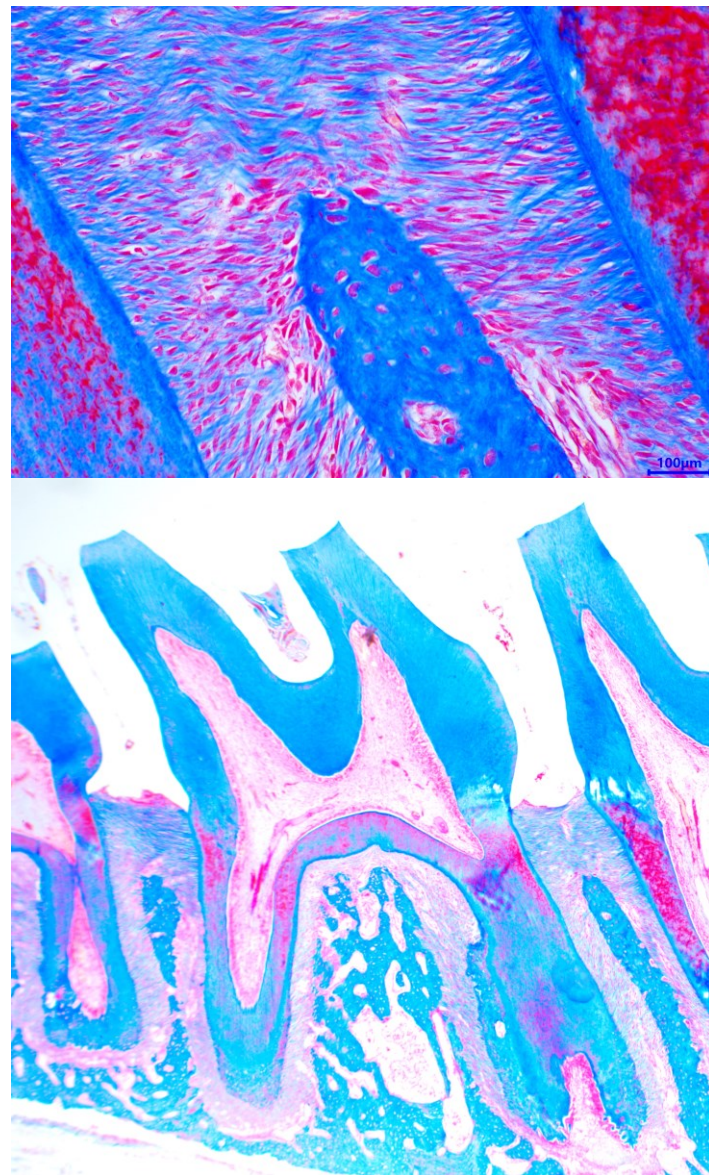


# Masson 染色

三色染色能选择性的显示**胶原纤维和肌纤维**。该法染色原理与阴离子染料分子的大小和组织的渗透有关:分子的大小由分子量来体现,小分子量易穿透结构致密、渗透性低的组织,而大分子量则只能进入结构疏松的、渗透性高的组织。

**结缔组织狭义上是指含有三种纤维,胶原纤维,网状纤维,弹力纤维**。胶原纤维是分布最广,含量最多的一种纤维。经过一系列研究发现红细胞对阴离子染料的渗透性最小,肌纤维和胞质次之,而胶原纤维具有最大的渗透性。酸性品红分子量小,而苯胺蓝分子量很大, **因此染色后红细胞呈橘黄色,核成蓝黑色,肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色**,主要用于区分胶原纤维和肌纤维。

**骨组织**中的矿化基质主要成分为**胶原纤维和无机盐**, Masson三色染色的第三色专门将胶原纤维结构染为蓝色或绿色,因此骨小梁、骨基质清晰呈蓝色,便于与红色的肌肉和细胞质区分。



# Masson 染色步骤

1. 烤片60℃ 1h,脱蜡至水。
2. 切片没在**Bouin固定液**中通风橱内室温过夜。(挥发剧毒,用后回收)
3. 流动自来水冲洗至无黄色,常规水中稍洗, 吸掉多余水分。
4. 浸染**丽春红酸性复红液**Biebrich Scarlet acid Fuchsin **10-15min**。
5. 蒸馏水中稍洗, 吸掉多余水分。
6. **滴染Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid**(1:1现配) **15-20min**, 不洗, 吸掉多余液体。
7. 浸染**苯胺蓝**Aniline Blue **5min**。
8. 蒸馏水中稍洗,吸掉多余水分。
9. 无水乙醇脱水,封片。

\* **调整4/5, 7/8中染色/浸洗时间来调整红蓝的深浅**

# Masson 染色-试剂配制

## Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution 100ml Volume 50ml Volume

|                  |       |        |
|------------------|-------|--------|
| Biebrich Scarlet | 900mg | 450mg  |
| Acid Fuchsin     | 100mg | 50mg   |
| acetic acid      | 1ml   | 500ul  |
| Distill Water    | 99ml  | 49.5ml |

Decreased red staining usually indicates that the staining solution has aged or been overused and should be discarded.

## Phosphotungstic Acid Solution 100ml Volume 20ml volume

|                      |       |      |
|----------------------|-------|------|
| Phosphotungstic Acid | 10g   | 1g   |
| Distill Water        | 100ml | 20ml |

1.25g  
25ml

## Phosphomolybdic Acid Solution 100ml Volume 20ml volume

|                      |       |      |
|----------------------|-------|------|
| Phosphomolybdic Acid | 10g   | 1g   |
| Distill Water        | 100ml | 20ml |

1.25g  
25ml

Freshly prepare Working Phosphotungstic/Phosphomolybdic Acid Solution by mixing 1 volume of Phosphotungstic Acid Solution and 1 volume of Phosphomolybdic Acid Solution with 2 volumes of distilled water. Discard after one use. Formation of a precipitate in Phosphomolybdic Acid Solution does not affect performance.

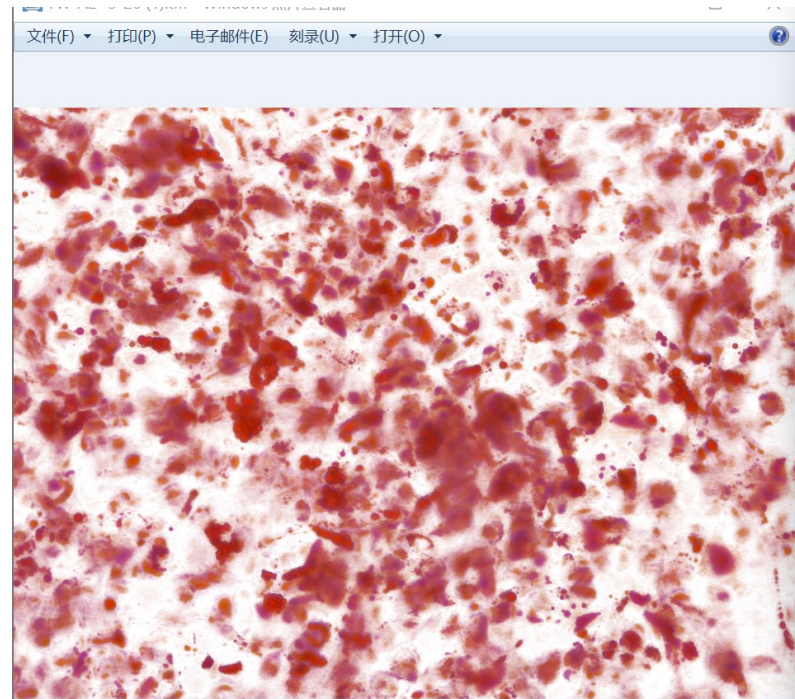
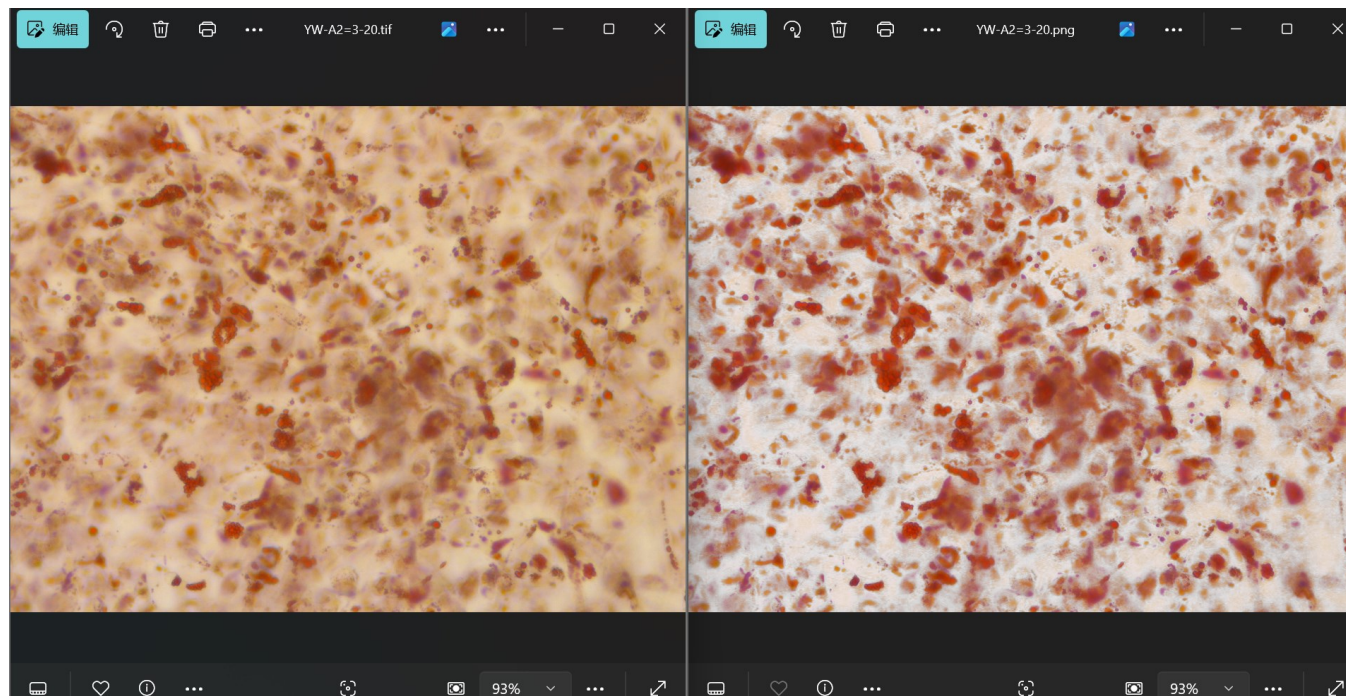
working soln  
: both 2:1

\*\* This allows for uptake of the aniline blue stain.

## Aniline Blue Solution 100ml Volume 50ml Volume

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| Aniline Blue  | 2.4g | 1.2g |
| acetic acid   | 2ml  | 1ml  |
| Distill Water | 98ml | 49ml |

# 图片处理-调色

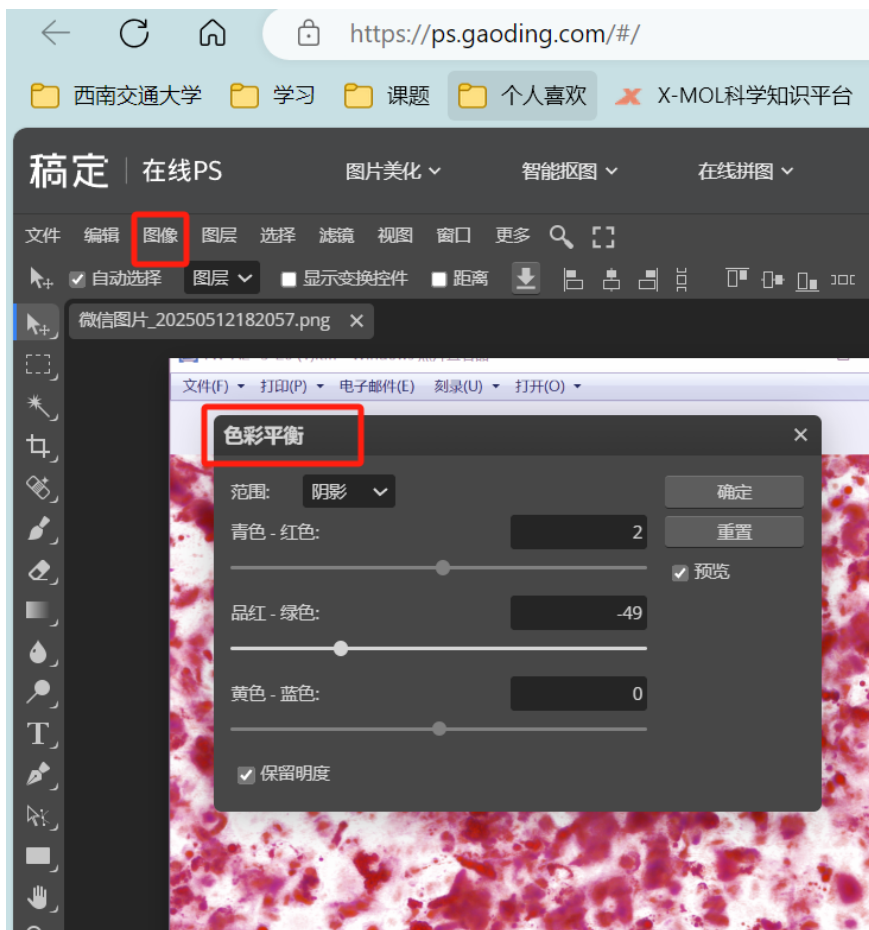
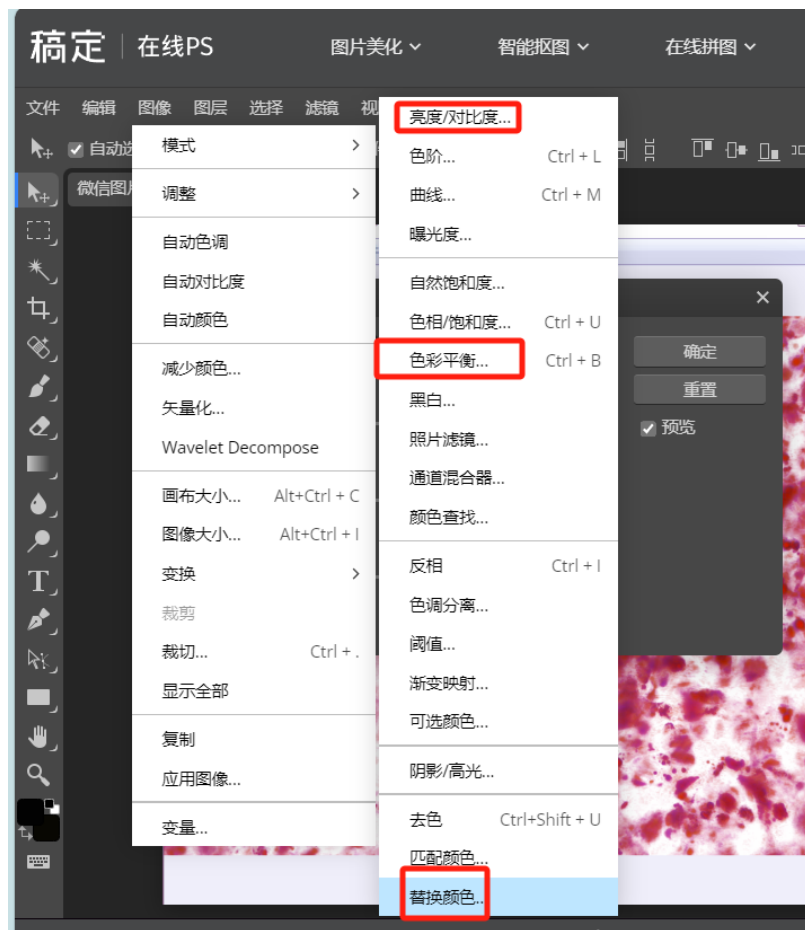


# 图片处理-在线ps/PPT/其他软件

随时随地，创作**更高效**

导入图片/PSD

在线PS专业版



【在线PS】PS软件网页版，[ps在线图片处理工具photopea-](https://ps.gaoding.com/#/)  
[稿定设计PS \(gaoding.com\)](https://ps.gaoding.com/#/)

**谢谢！**