

ICS 07.080
B 41
中华人民共和国国家质量监督
检验检疫总局备案号：25943-2009

DB53

云南省地方标准

DB53/T 293.3—2009

实验动物病理学检测 第3部分：病理切片制备方法

2009-08-16 发布

2009-12-01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

本部分为 DB53/T 293-2009《实验动物病理学检测》的第 3 部分。

本部分由云南省科技厅提出并归口。

本部分起草单位：成都军区昆明总医院。

本部分主要起草人：杨举伦、徐文潋、李霞、李涛、赵玺龙、李学锋、戴芳。

实验动物病理学检测
第3部分：病理切片制备方法

1 范围

DB53/T 293 的本部分规定了实验动物组织标本的获取、处理、包埋、切片及染色。
本部分用于实验动物组织标本的病理切片制备。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

DB53/T 293.2 实验动物病理学检测 第2部分：病理剖检方法

3 组织标本的获取

实验动物组织标本按照DB53/T 293.2的规定进行病理剖检获取，也可通过手术获取。

4 组织标本的处理

4.1 试剂

4.1.1 4%中性甲醛液（pH7.0）

40%甲醛，化学纯	100 ml
蒸馏水	900 ml
磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）	4 g
磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）	13 g

4.1.2 80%乙醇

100%乙醇	800 ml
蒸馏水	200 ml

4.1.3 90%乙醇

100%乙醇	900 ml
蒸馏水	100 ml

4.1.4 95%乙醇

100%乙醇	900 ml
蒸馏水	50 ml

4.1.5 100%乙醇，化学纯

4.1.6 100%二甲苯，化学纯

4.2 设备

可选用脱水机、包埋机、切片机、摊片机、烤片机等设备。

4.3 处理程序

组织标本处理程序见表1，全部程序均可在自动脱水机内完成。

表1 组织标本处理程序

步骤	处理项目	试剂名称	反应室温度, °C	处理时间, min
1	固定	4%中性甲醛	37	60
2	脱水	80%乙醇	37	40
3	脱水	90%乙醇	37	40
4	脱水	95%乙醇	37	40
5	脱水	95%乙醇	37	40
6	脱水	100%乙醇	37	30
7	脱水	100%乙醇	37	30
8	透明	100%二甲苯	37	10
9	透明	100%二甲苯	37	10
10	透明	100%二甲苯	37	10
11	浸蜡	石蜡	62~63	30
12	浸蜡	石蜡	62~63	30
13	浸蜡	石蜡	62~63	30
14	浸蜡	石蜡	62~63	30

5 包埋

从脱水机中取出组织标本, 使用包埋机将其包埋于62 °C~65 °C石蜡中, 冷却后即组织蜡块。

6 切片

将组织蜡块固定于切片机上, 连续切3 μm~5 μm厚的蜡膜, 在摊片机水面上轻轻展平(水温40 °C~42 °C), 选择无颤痕、无皱褶、无开裂、无缺损的蜡膜裱于载玻片上, 在烤片机中60 °C~62 °C烤60 min或80 °C~85 °C烤20 min。

7 常规苏木素—伊红染色

7.1 染液配制

7.1.1 苏木素染液

苏木精6 g、无水乙醇300 ml、硫酸铝钾45 g、蒸馏水300 ml、甘油100 ml混合, 加入冰醋酸20 ml, 充分混匀后, 盛于无色小口瓶内, 使其自然成熟。若在其中加入碘酸钠, 使人工成熟, 短时间内即可应用。

7.1.2 伊红染液

伊红(曙红 Y) 3 g、蒸馏水 15 ml 溶解后滴冰醋酸于其中, 有沉淀生成, 至浆糊状再加蒸馏水数毫升, 并继续滴冰醋酸, 直到沉淀不再增加。保留沉淀物, 待其干燥。将干燥后的沉淀物溶于 95%乙醇 600 ml 中即成。

7.2 染色步骤

7.2.1 100%二甲苯(I)、100%二甲苯(II)脱蜡各 10 min。

7.2.2 100%乙醇(I)、100%乙醇(II)脱二甲苯各 2 min。

7.2.3 95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇水化各一次, 1 min。

7.2.4 自来水洗 2 min。

7.2.5 苏木素染液 5 min~10 min。

7.2.6 自来水洗 1 min。

7.2.7 1%盐酸分化 10 s~20 s。

7.2.8 自来水洗 1 min。

7.2.9 饱和碳酸锂蓝化数秒钟,水洗1 min后在显微镜下观察,若细胞核染色过深或不足,应再分化或重染。

7.2.10 伊红染液1 min~5 min。

7.2.11 70%乙醇、80%乙醇脱水各10 s。

7.2.12 95%乙醇(I)、95%乙醇(II)、100%乙醇(I)、100%乙醇(II)脱水各1 min。

7.2.13 100%二甲苯(I)、100%二甲苯(II)各透明3 min。

7.2.14 中性树胶封片。

7.2.15 贴标签,置60℃恒温箱中烘烤60 min。

7.3 染色结果

细胞核呈蓝色,细胞浆、肌纤维、胶原纤维、红细胞呈不同程度的红色。

8 特殊染色

8.1 网状纤维染色

8.1.1 试剂配制

8.1.1.1 氨银溶液:甲液,硝酸银10.2 g,蒸馏水100 ml。乙液,氢氧化钠3.1 g,蒸馏水100 ml。取甲液5 ml,滴加氨水至溶解清亮为止。再加入5 ml乙液,此时该液突然变为紫黑色,再滴加氨水至清亮为止。补加四滴氨水,用蒸馏水补足50 ml。

8.1.1.2 高锰酸钾氧化液:高锰酸钾0.5 g,蒸馏水95 ml,再加3%硫酸5 ml。

8.1.2 染色方法

8.1.2.1 石蜡切片脱蜡至水洗。

8.1.2.2 高锰酸钾氧化液中5 min,自来水洗1 min。

8.1.2.3 2%草酸漂白2 min,水洗2 min。

8.1.2.4 2%硫酸铁铵染2 min。

8.1.2.5 自来水、蒸馏水各洗2 min。

8.1.2.6 氨银溶液染30 s,蒸馏水洗二次。

8.1.2.7 20%甲醛液还原1 min,蒸馏水洗二次。

8.1.2.8 0.2%氯化金调色2 min,蒸馏水洗二次。

8.1.2.9 2%硫代硫酸钠固定2 min。

8.1.2.10 苏木素复染。

8.1.2.11 逐级酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

8.1.3 染色结果

网状纤维呈黑色,细胞核呈蓝色。

8.1.4 注意事项

8.1.4.1 所用玻璃器材及载玻片均达到化学洁净程度,以免杂质与银发生反应。

8.1.4.2 配制好的硝酸银液和氨银溶液,应在4℃冰箱中保存待用。

8.1.4.3 在染色过程中,在氨银溶液染色前后应用蒸馏水浸洗。

8.1.4.4 氯化金调色和硫代硫酸钠固定的时间不应太长,否则会引起纤维褪淡现象。

8.1.4.5 脱水和透明后及时封片,不宜在空气中停留时间过长,以免产生色素颗粒。

8.2 过碘酸-希夫(PAS)染色

8.2.1 试剂配制

希夫试剂:蒸馏水200 ml,煮沸后溶入碱性品红1 g,再煮沸1 min。冷却至50℃时加入1 mol/L盐酸20 ml,至35℃时加入偏重亚硫酸钠2 g,盖紧瓶塞,放暗处过夜。然后加入药用炭2 g,振摇1 min后过滤,滤液盛棕色瓶中,加盖,4℃保存。该液无色,变红不可再用。

8.2.2 染色方法

- 8.2.2.1 切片脱蜡至水洗。
- 8.2.2.2 1%过碘酸水溶液氧化 10 min, 水洗。
- 8.2.2.3 希夫试剂染色 10 min~15 min。
- 8.2.2.4 流水冲洗 5 min~10 min。
- 8.2.2.5 苏木素染细胞核, 流水充分洗。
- 8.2.2.6 1%盐酸酒精分化。
- 8.2.2.7 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

8.2.3 染色结果

糖原及其他 PAS 阳性物质呈红色, 细胞核呈蓝色。

8.3 阿尔新蓝 (AB) 染色

8.3.1 试剂配置

阿尔新蓝 1 g 溶于 3%醋酸水溶液 100 ml。

8.3.2 染色方法

- 8.3.2.1 切片脱蜡至水洗。
- 8.3.2.2 用 3%醋酸水溶液洗切片 3 min。
- 8.3.2.3 阿尔新蓝染 10 min~30 min。
- 8.3.2.4 3%醋酸水溶液洗切片 3 min, 吸水纸吸干。
- 8.3.2.5 1%中性红染细胞核 2 min~3 min。
- 8.3.2.6 自来水洗 2 min, 蒸馏水洗 1 min,
- 8.3.2.7 逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

8.3.3 染色结果

酸性粘液呈鲜蓝绿色, 细胞核红色。

8.4 Gram 细菌染色

8.4.1 试剂配制

- 8.4.1.1 苯胺油石炭酸复红液: 先将 0.5 g 碱性复红溶于 30%乙醇 70 ml 中, 加热至 90 ℃, 冷却后再加 1 g 石炭酸及 1 ml 苯胺油。
- 8.4.1.2 碘液: 碘片 1 g, 碘化钾 2 g, 蒸馏水 300 ml。
- 8.4.1.3 结晶紫液: 将 2 g 结晶紫溶于 95%乙醇 20 ml, 1 g 草酸铵溶于 80 ml 蒸馏水, 之后二液混合, 4 ℃保存。

8.4.2 染色方法

- 8.4.2.1 中性甲醛液固定组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水。
- 8.4.2.2 苯胺油石炭酸复红液 5 min。
- 8.4.2.3 自来水洗, 蒸馏水洗。
- 8.4.2.4 4%甲醛 1 min, 蒸馏水洗二次。
- 8.4.2.5 苦味酸饱和液处理 2 min (当时看不见红色)。
- 8.4.2.6 经过 95%乙醇速洗后, 放入自来水中立即变红色。
- 8.4.2.7 蒸馏水洗二次后, 用结晶紫液染色 2 min。
- 8.4.2.8 自来水冲洗, 蒸馏水洗。
- 8.4.2.9 碘液作用 2 min, 用水洗后, 直接用滤纸吸干。
- 8.4.2.10 二甲苯与苯胺油等份混合, 进行分化 (镜下观察)。
- 8.4.2.11 二甲苯透明, 中性树胶封固。

8.4.3 染色结果

Gram 阳性细菌呈蓝色, Gram 阴性细菌呈红色, 细胞核呈红色。

8.4.4 注意事项

8.4.4.1 苯胺油石炭酸复红液是一种不稳定的混合液，染色液表面易产生氧化结晶，染色时应适当加热防止氧化物质污染切片。

8.4.4.2 二甲苯苯胺油分化后，须用二甲苯洗去苯胺油，才能在镜下观察。如果分化不足，可再进行褪色。

8.5 抗酸杆菌染色

8.5.1 试剂配制

石炭酸复红液：碱性复红1 g，无水乙醇10 ml，5%石炭酸水溶液100 ml。碱性复红溶于无水乙醇内，然后与石炭酸水溶液混合，用前过滤。

8.5.2 染色方法

8.5.2.1 中性甲醛液固定组织，石蜡切片，常规脱蜡至水。

8.5.2.2 入石炭酸复红液 1 h 以上。

8.5.2.3 自来水洗。

8.5.2.4 用 0.5%盐酸乙醇分化数秒钟。

8.5.2.5 水洗，用 0.1%亚甲蓝水溶液对比染色 2 min。

8.5.2.6 用 95%乙醇分化，使亚甲蓝脱色，显示清楚。

8.5.2.7 无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。

8.5.3 染色结果

抗酸杆菌呈红色，背景呈灰蓝色。

8.5.4 注意事项

8.5.4.1 石炭酸复红液加热 37℃~40℃，至少染色 60 min。

8.5.4.2 盐酸乙醇分化应严格掌握，一般经水洗后，0.5%~1%盐酸乙醇分化至切片的组织稍有淡粉红色。

8.5.4.3 亚甲蓝（美蓝）对比染色以后用 95%乙醇快速分化，防止过度脱色。

8.6 Grocott 六胺银真菌染色

8.6.1 试剂配制

8.6.1.2 六胺银原液：3%六次甲基四胺（乌洛托品）水溶液 100 ml，5%硝酸银水溶液 5 ml，用时将两液混合。

8.6.1.3 六胺银染液：六胺银原液 25 ml，硼砂（四硼酸钠）水溶液 2 ml，蒸馏水 25 ml。

8.6.1.4 亮绿染液：亮绿 0.2 g，乙酸 0.2 ml，蒸馏水 100 ml。

8.6.2 染色方法

8.6.2.1 石蜡切片脱蜡至蒸馏水。

8.6.2.2 5%铬酸水溶液氧化 1 h。

8.6.2.3 流水洗 5 分钟。

8.6.2.4 1%亚硫酸氢钠水溶液 5 min。

8.6.2.5 流水洗 5 分钟。

8.6.2.6 蒸馏水充分洗涤。

8.6.2.7 在 45℃~50℃的六胺银染液中染色 1 h。

8.6.2.8 蒸馏水充分洗涤。

8.6.2.9 0.2%氯化金调色 3 min~5 min。

8.6.2.10 蒸馏水充分洗。

8.6.2.11 2%硫代硫酸钠 5 min。

8.6.2.12 流水洗，蒸馏水洗。

8.6.2.13 亮绿染液对比染色。

8.6.2.14 流水洗；95%乙醇，无水乙醇脱水，二甲苯透明，封固。

8.6.3 染色结果

真菌呈黑色，背景绿色。

8.7 其它方法

根据不同的实验目的，必要时可采用冰冻切片、免疫组化、原位杂交、电镜等相关的制片方法。