

## 石蜡切片、冰冻切片及振动切片的区别

### 一、石蜡切片

把修好的蜡块装在旋转切片机上，即可进行切片(section)。切片必须保持切片刀锐利，切片厚度通常为5~7 $\mu\text{m}$ ，也可根据染色需要切成不同厚度，一般不旋转式切片器超过10 $\mu\text{m}$ 。切好的蜡带，放入40℃左右的温水中将蜡片展平。良好的切片应无刀痕、裂痕，切片厚度均一平整。切片如有上述问题，在进行免疫组织化学染色时会出现假阳性现象。

为能得到平整无皱褶的组织切片。可采用两次展片，即先将组织切片漂浮在30%的乙醇溶液中进行第一次展片，然后将切片捞起，再次放入45~50℃的水浴中进行第二次展片，乙醇的浓度和水温可视组织不同和石蜡熔点的高低自行调整。此过程是利用乙醇溶液与水之间的张力差展开切片的皱褶。

为防止脱片，载玻片要涂黏片剂。对HE染色的切片，可在载玻片上涂抹薄层蛋白甘油，但蛋白甘油因含蛋白易导致非特异性免疫反应，故用于免疫组织化学染色的切片常用多聚赖氨酸、3-氨基丙基-乙氧基甲硅烷等处理。

### 二、冰冻切片

冰冻切片(frozen section)是酶组织化学和免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法，其最突出的优点是能够较完好地保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性，以及抗原的免疫活性，尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜组织和已固定的组织均可作冰冻切片。为了得到高质量的冰冻切片，选择好的冰冻切片机和配套的一次性刀架是保证切片质量的关键。组织在切片前需要冰冻，而冰冻过程容易使组织中的水分形成冰晶，从而影响抗原定位。一般认为，冰晶体积大而量少时，影响较小；冰晶体积小而量多时，对组织结构损害较大。含水量较多的组织中较易出现冰晶。

#### 1. 防止组织中冰晶形成的方法

(1)速冻：使组织温度骤降，减少冰晶的形成。方法包括：

A:干冰-丙酮(乙醇)法：

将150~200ml丙酮(无水乙醇)装入小保温杯内，逐渐加入干冰，直至饱和呈黏稠状，再加干冰不再冒泡时，温度可达-70℃，用一小烧杯内装异戊烷约50ml，将此烧杯缓慢置入干冰-丙酮(或无水乙醇)饱和液内，至异戊烷温度-70℃时即可使用。将组织(大小为1cm×0.8cm×0.5cm)投入异戊烷内速冻30~60秒后取出，置恒冷箱内以备切片，或置-80℃低温冰箱内贮存。

B:液氮法：

将组织块平放于软塑瓶盖或特制锡纸小盒(直径约2cm)，可适量加OCT包埋剂浸没组织，然后将特制小盒缓缓放入盛有液氮的小杯内，当盒底部接触液氮时即开始汽化沸腾，此时小盒保持原位，切勿浸入液氮中，大约10~20秒后组织即迅速冰结成块。取出冷冻的组织块立即置入恒冷箱切片器冷冻切片或置入-80℃冰箱贮存备用。

(2)应用蔗糖溶液：

将组织置于20%~30%蔗糖溶液1~3天，利用高渗吸收组织中水分，减少组织含水量，可防止或减少冰晶的形成。

#### 2. 恒冷箱切片法

冷冻后的组织块即可用于恒冷箱切片，其过程包括以下步骤：

(1)组织包埋根据研究目的取所需组织(如切取小鼠肝脏1.0cm×1.0cm×0.5cm大小的组织块)，用滤纸吸去多余水分，将组织块平放于用特制锡纸小盒(直径约2cm)或软塑瓶盖内。加适量OCT包埋剂浸没组织，40℃浸透20—30分钟。为防止冰晶形成，包埋前可进行蔗糖处理。

(2)组织冷冻：按上述干冰-丙酮(乙醇)法或液氮法冷冻组织。

### (3) 切片：

切片前 1 小时将恒冷箱切片机的温度设定为 $-18^{\circ}\text{C}$ 左右，以备切片。切片时温度以 $-15^{\circ}\text{C}$ — $-18^{\circ}\text{C}$ 为宜，温度过低组织易破碎。刀的角度要适当，否则不易连片。用载玻片贴附组织切片时，勿上下移动。未经固定的新鲜组织在冰冻切片后应使用相应的固定剂固定 10 分钟。冰冻切片后如不立即染色，必须用电风扇吹干，贮存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内或进行短暂预固定后低温冰箱保存。染色前从冰箱内取出切片，置室温干燥 10 分钟，再经冷丙酮固定 5~10 分钟(未固定者)，PBS 漂洗 3 次后即可进入染色程序(HE 染色可用甲醛、冰醋酸和 95% 乙醇快速固定 1—2 分钟)。

### (4) 冰冻切片的保存：

冰冻切片后如不能及时染色，可在干燥后装入密封的标本盒内，外包塑料袋，贮存于低温冰箱，或进行短暂预固定后于低温冰箱保存。

## 三、振动切片

用振动切片机(vibratome)可以把新鲜组织(不固定、不冷冻)切成 20~400 $\mu\text{m}$  的薄片，或者切经过固定的动植物标本。以漂浮法在反应板内进行组织化学或免疫组织化学染色。因组织不冷冻，无冰晶形成也无组织抗原破坏，染色前又避免了组织脱水、透明、包埋等步骤对抗原的损害，故能较好地保留组织内脂溶性物质和细胞膜抗原。

振动切片主要用于显示神经系统抗原分布的研究。对于柔软的胚胎脑组织，可用低熔点( $45^{\circ}\text{C}$ — $55^{\circ}\text{C}$ )10%琼脂糖包埋，振动切片机切成薄片(40—100 $\mu\text{m}$ )，采用漂浮法在反应板内进行免疫荧光组织化学染色，激光扫描共聚焦显微镜观察。

振动切片方法简单、快速，能使组织比较完整的保留，适合组织电生理学等研究。与冰冻切片相比，无需冰冻组织，不会形成冰晶或破坏组织抗原。与石蜡切片相比，不需要脱水、透明、浸蜡等过程，避免对抗原的损害。