

# 用于组织学光镜检查的树脂包埋法

夏旭华 曾小鲁

(生物系)

用树脂Resin包埋组织块进行薄切片已成为组织学和病理学中的一项常规技术。过去树脂包埋只是用做超薄切片和电镜观察,但目前国外此项技术还专门用做薄切片用光镜观察。虽然不能说树脂包埋可以完全取代石蜡包埋法,但人们逐渐认识到树脂包埋法与石蜡包埋法比较有不少优点。它能切得较薄、产生的人工假象较少和微细结构更加清晰。另外如确有必要使用电镜观察时,树脂包埋的标本还能进一步成功地制成超薄切片。Reichert-Jung厂发表的通报介绍了这一方法,为了使能在国内推广使用,我们根据该资料和参阅有关资料,将此方法整理介绍如下。

## 一、固定

一般采用福尔马林固定,因为今后要采用组织学染色方法和用光镜观察,所以不能象电镜取材那样用锇酸来固定。也不能用戊二醛固定,因用此方法处理的组织块均较大(长、宽约3×4毫米,厚度最好不要超过2毫米),而戊二醛穿透较大组织块的能力有限,同时会使切片显出很异样的形态。用以下固定液固定效果较好。

福尔马林磷酸缓冲液:

二氢正磷酸钠Sodium dihydrogen orthophosphate	18.6克
氢氧化钠	4.2克
蒸馏水	900毫升

不断搅拌使之溶解后,再加入福尔马林100毫升。最终的pH值应为7.4。该溶液可保存6个月。在室温下固定至少4小时,如果制作的切片只做光镜观察,那么组织块在固定液中浸数周也无妨。

## 二、包埋

用于光镜观察的包埋剂目前多采用2-羟乙基甲基丙烯酸酯2-Hydroxyethyl methacrylate(简称HEMA)和Epon。前者至今仍是光镜观察的佼佼者。环氧树脂在电镜包埋材料是用得很普遍和较成功的,但在制作光镜包埋材料便不理想,因为环氧树脂粘度太高,而且对于组织学传统染料来说,其着色性也差。所以很少用它来作包埋剂。但随着低粘度的环氧树脂的出现,环氧树脂将会得到使用。

## 1、HEMA树脂包埋法

## 溶液配制

## (1) 溶液A

HEMA	80毫升
2-丁氧基乙醇 2-Butoxy ethanol	15毫升
过氧化苯甲酰 Benzoyl peroxide	0.3克

用磁力搅拌器助溶，不可加热使溶解。

## (2) 溶液B

聚乙二醇400 Polyethylene glycol	10毫升
N, N-二甲胺 N, N-dimethylaniline	1毫升

以上两液均应在4°C下保存，在使用前使之达到室温。在4°C时溶液可保存将近一个月。

## (3) 包埋剂

溶液A	50份
溶液B	1份

固定后的组织块经各级不同浓度酒精脱水、从50%—70%—80%—90%—95% (经2瓶) —无水酒精 (经2瓶)、每级中浸30—45分钟。脱水后浸入溶液A中，中途换三次新液，每次浸45分。待组织块透明时为止，然后用包埋剂包埋。

因HEMA为水溶性树脂，所以不经酒精脱水也可以完成处理。可先用蒸馏水将溶液A配成25%溶液A、50%溶液A和75%溶液A，然后将组织块依次浸入以上三种不同浓度的溶液中。每种溶液中浸30—45分钟。然后经过三瓶溶液A，每瓶中浸45—60分钟。以后步骤同前。

## 2、Epon包埋法

## (1) Epon包埋剂的配制

Epon 812	130毫升
硬化剂 DDSA	80毫升
硬化剂 MNA	75毫升
增速剂 DYO 64	4.2毫升

## (2) 氧化丙烯、Epon溶液的配制

氧化丙烯 Propylene oxide	50毫升
Epon 包埋剂	50毫升

包埋剂应保持于4°C温度下。在使用之前使它达到室温。过度的潮湿及水污染都会影响到包埋剂的效果，应加以避免。以上药剂最好是随配随用。

固定后的组织块需脱水，脱水方法同前法。脱水后组织块再经过两瓶氧化丙烯，每瓶中约浸20分钟。然后浸入氧化丙烯、Epon溶液中1小时。最后将组织块浸入37°C温度下的Epon包埋剂中1小时。至此组织块应是透明的。

组织块在干净的Epon包埋剂中包埋，方法与HEMA法相似。不过在该方法中，聚合时无需隔绝空气。聚合过程在60°C温箱中过一个晚上就可完成。

用于显微技术中的所有树脂包括HEMA，都有引起皮肤或粘膜过敏的危险。大意操作会

使皮肤引起炎症。另外有些配料还有致癌活性的,操作中自始至终要戴手套。在操作过程中最好能在通风橱中进行。所有树脂一旦聚合之后,便都成为无害的物质。

### 三、树脂包埋块的切片(供光镜观察用)

用上述方法包埋的包埋块中的组织块均较大,加上所需的切片厚度又是1微米左右(甚至稍厚一些)。所以通常不宜用超薄切片机来切片。只需要用石蜡切片机(旋转式切片机)就可以切出这种厚度的切片,但效果往往不是很理想。目前国外厂商生产了适于用树脂包埋块的特制切片机或附件,如:美国光学仪器公司AO生产的S4型或S5型Autocut microtome及能装在AO820型旋转切片机上用的调整器附件。

用HEMA包埋块切出的切片,可用小镊子小心地从切片刀刀口上取下。置60°C水浴中,使其漂浮在水面上。取干净载玻片将切片捞附于载玻片上,然后再置80°C温箱1小时左右使切片干燥,以便以后染色。

用Epon包埋块切出的切片最好是先移入冷水中,然后再使其漂浮于60°C水浴中。用载玻片从水中捞起,切片的干燥同前法。

### 四、HEMA包埋切片的染色

染色方法非常简单,这正是树脂包埋在国外如此风行的原因之一。由于大多数水溶性和醇溶性染料能透过包埋介质使组织着色,所以在染色之前便没有必要将包埋介质除去(实际上也不可能除去)。大多数常规的组织学染色方法都可以不加修正地直接应用于HEMA包埋切片的染色。但那些能产生显明色彩对比的方法最适合于这种半薄切片。

### 五、Epon包埋切片的染色

在染色之前应使用氢氧化钠饱和的无水酒精脱去部分包埋介质。小分子的硷性染料如甲苯胺兰或美兰可穿透包埋介质使组织着色。如适当加热则更易于着色。但如采用较复杂的染色方法,则有必要先行彻底脱去包埋介质。把切片浸入盛有氢氧化钠饱和的无水酒精的染色缸内,缸底一直保持有少许没溶解的氢氧化钠。在室温下保持1小时。经过以上处理后再经无水酒精浸洗,继后在水中彻底漂洗。经过这样处理,很多染色方法都可采用,包括苏木精曙红染色法(也有人采用苏木精和焰红染料)、PAS法、Verhoeff氏弹性纤维染色法、Mallory氏三色法、Jones氏乌洛托品镀银法methenamine silver及Romanowsky氏染料染色。

### 参 考 资 料

- 1、汪涛等:生物医学超微结构与电子显微镜技术,科学出版社,1980。
- 2、G.A.Meek.著,中科院生物物理所译:生物学工作者实用电子显微术,科学出版社,1976。
- 3、Reichert—Jung; Resin embedding for light microscope in histopathology. Reichert—Jung INFORMATION. 1980.
- 4、Ruddell, C.L.: Embedding medium for 1—2  $\mu\text{m}$  sectioning. 2—Hydroxyethyl methacrylate combined with 2—butoxyethanol. STAIN TECHNOLOGY. 42: 253, 1967.

A Review of Resin Embedding for Light Microscopy in Histology

Xia Xuhua      Zeng Xiaolu

(Jiangxi University)

Abstract

This paper is a review of resin embedding for light microscopy in histology employing HEMA and Epon resins. Compared with ordinary wax embedding, this technique can produce thinner sections with less artificial appearance and more distinct structure. Moreover, specimens obtained in this way may be possible to proceed to electron microscope level if necessary.

Given in this paper are two detailed processing schedules for HEMA and Epon respectively, including the preparation of the embedding mixture, embedding procedure as well as other operations.