

小鼠整体胚胎和新生鼠石蜡切片技术的改进

徐玉环, 刘颖, 徐艳峰, 黄澜, 李彦红, 韩云林, 邓巍, 秦川, 朱华

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨小鼠整体胚胎和新生鼠石蜡切片技术的改进。**方法** 收集不同胎龄和日龄的小鼠整体胚胎及新生鼠 14.5、15.5 及 16.5 d 的胚胎, 清洗后直接置于 4% 中性甲醛中固定 24 h 以上; 胎龄 17.5、18.5 d 及日龄 0、1、2 d 的小鼠, 先用注射器往胸腹部及脑部缓慢注入固定液, 再整体固定于标本瓶中 24 h 以上。经全自动密闭式组织脱水机编程脱水, 石蜡包埋技术制备小鼠整体胚胎和新生鼠切片。应用 HE 染色方法对切片进行染色检验, 光学显微镜下观察小鼠整体胚胎和新生鼠的不同组织结构。**结果** 使用全自动密闭式组织脱水机处理小鼠整体胚胎和新生鼠, 经过特定的脱水程序处理, 镜下观察不同胎龄及日龄的不同组织器官, 结构完整, 层次清晰, 一致性好。**结论** 本实验室利用全自动密闭式组织脱水机对小鼠胚胎和新生鼠进行处理, 通过设置合理程序, 能够同时处理不同胎龄和日龄的小鼠整体胚胎及新生鼠; 脱水后制备的石蜡切片结果稳定, 一致性好, 为小鼠遗传学和发育学研究提供了良好的技术支持。

【关键词】 全自动密闭式组织脱水机; 小鼠整体胚胎; 石蜡切片;

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0039-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.008

A modification of paraffin section preparation of whole mouse embryos and newborn mice

XU Yu-huan, LIU Ying, XU Yan-feng, HUANG Lan, LI Yan-hong, HAN Yun-lin, QIN Chun, DENG Wei, ZHU Hua
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To improve the method of paraffin section preparation of whole mouse embryos and newborn mice. **Method** Specimens of mouse embryos and newborn mice were collected. Embryos aged 14.5, 15.5 and 16.5 days were directly placed in 4% neutral formaldehyde and fixed for more than 24 hours. For embryos aged 17.5 and 18.5 days, and 0-, 1- and 2-day old newborn mice, a small amount of formaldehyde was slowly injected into the chest, abdomen and brain at first, respectively, and then the whole specimens were fixed for more than 24 hours. Tissues were processed together using a fully-enclosed tissue processor. Paraffin-embedded slices were observed under microscope after HE staining. **Results** The quality of specimens following the improved method was better than before. The structure of different tissues from both mouse embryos and newborn mice can be easily determined. No fragmentation was found in any organ tissue under the light microscope. **Conclusions** We can handle whole body specimens of both mouse embryos and

[基金项目] 国家自然科学基金(批准号 31301928)。

[作者简介] 徐玉环, 技师, 技术员。Email: yuhuanxu1109@163.com。

[通讯作者] 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。zhuh@cnilas.org。

newborn mice simultaneously by adjusting the program of the fully-enclosed tissue processor. The staining results of the sections which were dehydrated using this improved method are clear and stable. This improved method may provide a useful approach in research of genetics and developmental biology.

【Key words】 Fully-enclosed tissue processor; Mouse embryos; Newborn mice; Whole body paraffin sections

目前研究小鼠胚胎发育,国内外大多采用冰冻切片。但对于较大的小鼠胚胎和新生鼠由于各脏器的结构、密度差异较大易造成组织冻结不均匀,影响切片及染色效果。另外,冰冻切片不容易制作较薄的切片,染色后组织结构不如石蜡切片清晰。虽然新的病理技术不断涌现,石蜡切片还是应用最广,结果较可靠的一种病理制片技术。国内外学者通过石蜡切片研究小鼠胚胎发育,在脱水处理小鼠整体胚胎时多按不同胚龄和日龄分开操作,对于同时处理不同胚龄及日龄的小鼠,还未见报道。我室引入全自动密闭式组织脱水机多年,在实验动物大体标本石蜡切片制备中的应用已较为成熟。本文尝试使用全自动密闭式组织脱水机处理不同日龄的小鼠整体胚胎组织和新生鼠组织,进行包埋切片并进行观察比较。

1 材料和方法

1.1 仪器及试剂

全自动密闭式组织脱水机,Leica ASP300 型(德国原装进口)。不锈钢脱水篮,塑料包埋盒。4%中性甲醛、乙醇、二甲苯、苏木素及伊红 Y 染色液均为国产试剂(北京益利精细化学品有限公司),石蜡(lot#1305083,Leica)。

1.2 不同胚龄及日龄小鼠整体标本的制备

断颈处死孕鼠,取出胚胎,用 0.01 mol/L 的 PBS 清洗。胚龄 14.5、15.5、16.5 d 的胚胎清洗后直接置于 4% 中性甲醛中固定 24 h 以上,不需要取材;

我们原来制备不同胚龄及日龄小鼠整体标本是分开进行的。由于胚龄 17 d 皮肤具有成体皮肤组织结构特征,18 d 以后皮肤的组织结构基本保持不变。因此在本次小鼠胚胎制备过程中,对胚龄 17.5 d、18.5 d 及日龄 0、1、2 d 小鼠的固定、取材方法及脱水程序进行了改进:在整体固定前先在局部注入固定液。由于不同胚龄的小鼠及新生鼠胸腹部及脑部体积相差不大,注射的固定液体积基本相同(表 1)。对取材的厚度(表 1)和二甲苯透明时间也做了改进(表 2)。

表 1 改进前、后不同胚龄及日龄小鼠整体标本制备的比较

Tab.1 Comparison of the mouse embryos specimen preparation before and after optimization

方法	固定	取材厚度
原方法	直接固定	3.5 ~ 4 mm
现方法	先用注射器往胸部(约 0.2 mL)、腹部(约 0.5 mL)及脑部(约 0.1 mL)缓慢注入固定液,再整体固定于标本瓶中 24 小时,取材后再固定 12 小时。	2 ~ 3 mm

表 2 改进前、后脱水程序设定的比较

Tab.2 Comparison of the dehydration process before and after optimization

步骤 Step	浸入试剂 Reagents	时间设置范围 Duration	
		改进前	改进后
1	4% 中性甲醛	40	40
2	50% 乙醇	40	40
3	70% 乙醇	40	40
4	80% 乙醇	40	40
5	95% 乙醇 I	40	40
6	95% 乙醇 II	40	40
7	100% 乙醇 I	40	40
8	100% 乙醇 II	40	40
9	二甲苯 I	25	30
10	二甲苯 II	30	30
11	石蜡 I	30	30
12	石蜡 II	30	30
13	石蜡 III	40	40

1.3 组织石蜡切片及染色

脱水后的组织经石蜡包埋制成蜡块,常规切片(切片厚度 4 μm)。石蜡切片经脱蜡至水进行 HE 染色,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后中性树脂封片。

2 结果

2.1 胚龄 18.5 d 的小鼠胚胎 HE 染色比较

在小鼠胚胎制备过程中,我们选取 18.5 d 的小鼠胚胎对取材方法及脱水程序进行摸索改进。根据常规实验动物脱水程序设定的 18.5 d 的小鼠胚胎经 HE 染色可见(图 1):改进前,不能完整切片;改进后,切片完整,各组织结构清晰。

2.2 小鼠整体胚胎及新生鼠 HE 染色结果

改进后的方法同样适用于小鼠整体胚胎 14.5、15.5、16.5、17.5 d 及新生鼠 0、1 和 2 d。用改进后

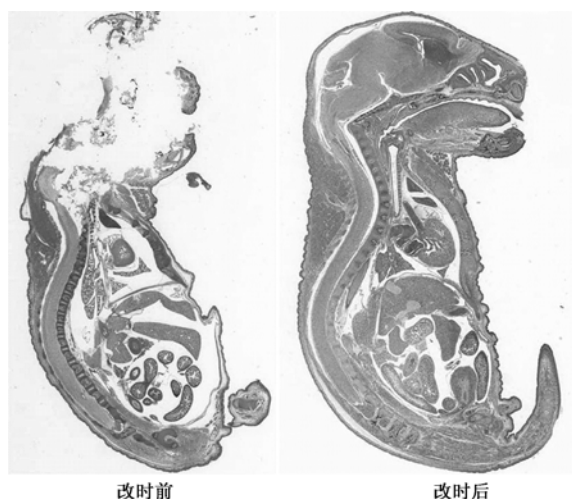


图 1 改进前后 18.5 d 小鼠整体胚胎比较

Fig. 1 Comparison of the sections of whole mouse embryos aged 18.5 days before and after optimization

设定的程序经全自动密闭式组织脱水机制得的小鼠整体胚胎及新生鼠的蜡块,切片时手感柔润,蜡片平整光滑润泽。染色后镜下观察可见胚胎及新生鼠各组织结构完整,层次清晰。如图 2 所示:

3 讨论

观察大体标本后取材,制作石蜡切片,并对切片染色进行光学显微镜观察,以对疾病作出诊断的常规病理技术是病理技术和病理诊断的基础和核

心,具有重要的实验和临床应用价值和不可替代的地位^[1]。

疾病的研究和早期的胚胎发育联系越来越紧密,新的基因工程技术的广泛应用使得胚胎研究成为基础研究的重要组成部分^[2]。胚胎发育迅速,不同日龄的胚胎在组织结构上相差很大^[3],目前可查的文献记录中多使用手工操作对胚胎进行脱水包埋,以适应不同日龄胚胎的切片要求^[4,5]。但手工操作耗时费力,且很难进行批量操作,且由于多种条件的限制重复性较差。全自动密闭式组织脱水机以其安全高效和良好的处理效果等优点,受到病理技术人员的青睐,在病理学、解剖学、动物学等实验领域广泛应用^[6,7]。本研究通过实验,不断探索,成功利用全自动密闭式组织脱水机制备了不同胎龄小鼠整体胚胎及不同日龄的新生鼠标本。

通过实验处理小鼠整体胚胎及新生鼠组织,要注意以下几点:首先是固定,固定一定要彻底,这是第一步也是不可逆转的一步。由于不同时段胚胎大小不同,各个脏器的发育程度也不同,所以固定液浸入各脏器的时间有差别。尤其是肝脏,肺脏及脑部,即使固定时间超过 24 h,由于固定液难以及时完全浸入到组织内部,最后也会出现自溶现象。因此,对胎龄大于 18 d 的胚胎和新生鼠在整体固定前

(下转第 66 页)

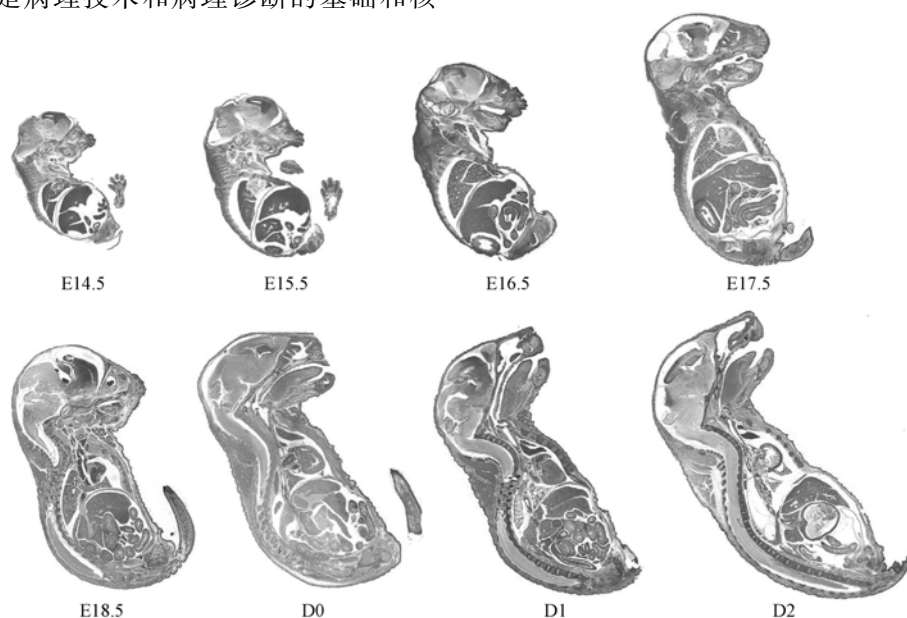


图 2 胚龄 14.5 d、15.5 d、16.5 d、17.5 d、18.5 d 及日龄 0 d、1 d、2 d 的小鼠 HE 染色结果。E 表示胚龄;D 表示日龄。

Fig. 2 Histological sections of whole mouse embryos. HE staining.

E: 14.5-, 15.5-, 16.5-, 17.5-, 18.5-day old mouse embryos. D: 1-, 2-, 3-day-old newborn mice.

- 生虫检测报告 [J]. 中国实验动物学杂志, 1991, 21: 41-46.
- [15] 隋丽华, 范薇, 杨敬, 等. 实验动物微生物、寄生虫抽样调查及分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 04: 259-262.
- [16] 耿志贤, 时彦胜, 邱业峰, 等. 北京地区实验动物寄生虫感染状况调查 [J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(5): 313-314.
- [17] 魏杰, 林建伟, 付瑞, 等. 2009—2013 年北京地区实验动物质量抽检结果分析 [J]. 实验动物科学, 2014, 02: 1-6.
- [18] 王胜昌, 林金杏, 胡建华. 2011 年上海市啮齿类实验动物寄生虫检测结果分析 [J]. 华东地区第十二届实验动物科学学术交流会议论文集, 浙江宁波, 2011, 78-80.
- [19] 吴玉娥, 张钰, 赵维波, 等. 广东省 2007-2008 年实验动物寄生虫检测结果分析 [J]. 第九届中南地区实验动物科技交流论文集, 广西南宁, 2009, 159-162.
- [20] 李金福, 李建华, 陈艳, 等. 实验动物中心等级大鼠和小鼠的寄生虫监测 [J]. 贵阳医学院学报, 2001, 26(2): 176.
- [21] 王菲, 曹淑祯, 崔立云, 等. 实验用大白鼠蛲虫感染状况调查 [J]. 大理学院学报, 2013, 09: 29-31.
- [22] 路莉, 乔静. 开放系统实验动物(啮齿类和兔类)寄生虫感染状况调查 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 04: 82.
- [修回日期]2014-09-18

(上接第 41 页)

增加了局部注射固定这个步骤。在注射过程中要注意两点:缓慢注射避免造成对脏器的挤压;选择腔隙或组织分布较稀疏的部位注射,以免损伤组织,影响组织学观察。其次是取材,取材厚度不宜超过 3 mm,尤其是脑部组织。由于脑部组织磷脂含量高且与水结合牢固,不易脱出。取材太厚,会造成脱水不完全,不能完整切片。脱水时间也是方法中应该注意的,要照顾到胚胎的各个脏器均脱水完全又不能过度脱水。胚龄 17 d 以后皮肤具有成体皮肤组织结构特征,需要稍微增加二甲苯透明时间。和其他脏器相比,脑部所需脱水时间也要长一些,而肝脏和脾脏却易脱水过度。在本次研究中,经过多次尝试,在其它步骤保持不变的前提下,将第一步二甲苯透明的时间增加了 5 min,使取材后不同胚龄及新生鼠整体标本可以同时脱水。最后就是脱水机换液,累计脱水达到 600 块时,脱水机要换液,但换液时不要把全部液体更换成新的,而是逐级上移,只更换最后一个步骤的液体,使脱水过程更柔和。

应用改进过的方法处理的小鼠整体胚胎及新生鼠,其切片同样可以用于免疫组化及特殊染色,这

为小鼠胚胎及新生鼠的发育研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 董学易, 孙保存, 赵秀兰, 等. 常规组织制片技术在病理学实验教学中的应用 [J]. 基础医学教育, 2013, 15(7): 685-686.
- [2] Pérez-Pomares JM, Foty RA. Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: biomedical implications [J]. Bioessays, 2006, 28(8): 809-821.
- [3] Theiler K. The house mouse atlas of embryonic development (second printing) [M]. Springer-Verlag, New York. 1989: 1-185.
- [4] 冉黎, 张全波, 陆长青, 等. 不同时期大鼠整胚石蜡标本的制备 [J]. 四川解剖学杂志, 2007, 15(3): 14-16.
- [5] 刘淑琴, 秦建民, 曾锦章, 等. 不同时期小鼠胚胎整体石蜡标本的制备技术 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28(6): 721-723.
- [6] 胡海霞, 刘俊堂, 熊正文. 全自动密闭式组织脱水机在石蜡切片组织处理中的应用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(6): 738-739.
- [7] 耿佳. 全自动密闭式组织脱水机的应用 [J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 376.

[修回日期]2014-09-19