小鼠脑组织冰冻切片

Cryostat Sectioning of the Mouse Brain

王雅娜[#], 田雨[#], 何苗^{*}, 龚玲^{*}

作者单位: 脑科学研究院, 复旦大学, 上海

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者邮箱: gling@fudan.edu.cn, hem@fudan.edu.cn

引用格式: 王雅娜, 田雨, 何苗, 龚玲. (2021). 王雅娜[#], 田雨[#], 何苗^{*}, 龚玲. Bio-101 e1010819.

Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010819.

How to cite: Jin, L. and Guo, B. C. (2021). Cryostat Sectioning of the Mouse Brain. Bio-101 e1010819. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010819. (in Chinese)

摘要: 在对脑组织进行免疫染色或原位杂交等实验之前, 需要对组织进行切片处理。冰冻切片是基础研究中的常用技术, 它是在低温条件下将生物组织快速冰冻至一定硬度后进行恒温冰冻切片的一种实验方法。与石蜡切片相比, 冰冻切片无需脱水、透明、浸蜡等复杂的前处理过程, 使细胞免于抗原活性损伤, 且操作简便快捷。相较于振动切片, 冰冻切片具有切片厚度限度宽、适用范围广等优点。本文以小鼠脑组织为实验材料, 对冰冻切片的操作步骤进行了较为详细的介绍。

关键词: 小鼠, 脑组织, 冰冻切片

材料与试剂

1. 沉糖后脑组织 (图 1A)
2. 长方体模具 (2×1.5×1.1cm, 不锈钢)
3. 48 孔板 (海门)
4. 铝箔纸 (佳能)
5. 解剖镊 (瑞沃德)
6. 防卷板 (Leica, 14047742497)
7. 切片刀 (Leica, 819)
8. 细毛笔 (HWAHONG)

9. OCT (optimum cutting temperature) 包埋剂 (SAKURA, 4583)
10. 封口膜 (Bemis, PM996)
11. 载玻片 (世泰)
12. PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. 冰冻切片机 (Leica, CM1950) (图 1 B-C)
2. 移液枪 (Eppendorf)

图 1. 实验用品与设备. A. 实验所需材料. B-C. 冰冻切片机控制面板. D. 手轮解锁. E. 手轮上锁。

实验步骤

一、实验准备

打开冰冻切片机电源开关 (图 2 A), 启动样品头压缩机 (图 2 B)。设置冰冻箱温度为 $-22^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$, 样品头温度为 $-18^{\circ}\text{C} \sim -21^{\circ}\text{C}$ 。确认手轮处于“锁住” (LOCK) 状态 (图 1 D-E), 等待降温。

图 2. 冰冻切片机程序设置. A. 冰冻切片机电源开关. B. 开启样品头压缩机. C. 冰冻切片机速冻按钮。

二、脑组织处理

1. 模具制作

- 1.1 裁取适当大小的铝箔纸，将其折叠为 3 层。
- 1.2 将铝箔纸沿长方体模具 (图 3 A) 的外周折叠，使其能够完全贴合并包裹长方体模具的 5 个面。
- 1.3 固定铝箔纸形态后，标记上 A (Anterior, 前)、P (Posterior, 后) 及脑组织编号。标记完以后，小心取出长方体模具，得到棱角分明、底面平整的空心铝箔纸模具，将其开口向上置于桌面 (图 3 B)。

注：取出长方体模具时要均匀用力，防止铝箔纸模具形变。

2. 脑组织包埋

- 2.1 将沉糖后的脑组织从蔗糖溶液中取出，用无尘擦拭纸吸干表面液体并晾置片刻，使表面完全干燥。
- 2.2 在成型的铝箔纸模具底部倒入少量 OCT 包埋剂，将脑组织腹侧向下平放入模具中，使大脑中缝平行于模具长边 (图 3 C)。
- 2.3 用解剖镊轻压脑组织表面，使组织沉于底部，加入 OCT 包埋剂至液面高于脑组织 2~3 mm (图 3 C)。

图 3. 脑组织包埋. A. 长方体模具. B. 铝箔纸模具. C. 包埋有脑组织的模具。

三、脑组织切片

1. 冰冻切片机零件组装

- 1.1 将实验所需细毛笔、切片刀、防卷板等工具放入切片机冰冻箱中预冷。
- 1.2 将包埋好的脑组织放入冰冻箱内的速冻区域 (温度: -50°C)速冻 10 min, 等待 OCT 包埋剂凝固 (图 4 A-B)。

注: 包埋后需立即将模具转入速冻区域, 开始速冻。

图 4. 脑组织速冻. A. 速冻区和样品托. B. 已被速冻的脑组织。

- 1.3 将样品托取出, 在室温条件下复温 1 min。
- 1.4 在样品托表面加入少量 OCT 包埋剂 (图 5 A), 将速冻完成的脑组织从铝箔纸模具中取出 (图 5 B)。先切除多余的 OCT 包埋剂, 然后将脑组织按切片所需

方向粘贴在样品托上 (图 5 C-D)。随后将样品托放入冰冻箱速冻区域速冻, 使 OCT 包埋剂迅速凝固, 将脑组织固定在样品托上。

*注: 冠状: 大脑中缝垂直于底座、小脑向下; 矢状: 大脑中缝平行于底座、侧面
面向下; 水平: 大脑中缝平行于底座、腹侧向下。*

如果是提前置备并保存在 -80°C 的脑组织, 将其固定在样品座上以后, 需放入冰冻箱内复温约 30 min。

图 5. 脑组织粘贴. A. 样品托上添加 OCT 包埋剂. B. 取出脑组织. C. 脑组织粘贴至样品托上. D. 脑组织固定在样品托上。

1.5 将切片刀安装至刀片架上 (图 6 A-C)。

图 6. 安装切片刀. A. 未安装切片刀. B. 已安装切片刀. C. 护刀器。

1.6 用样品夹将样品托固定于样品头上, 调整样品头角度 (图 7 A), 使脑组织前端长边与切片刀的刀刃保持平行 (图 7 B)。

图 7. 脑组织安装于样品头上. A. 样品头. B. 脑组织前平面与切片刀的刀刃平行。

2. 冰冻切片

2.1 调节切片刀与脑组织之间的距离。首先用控制面板的“快速前进”按钮调节组织快速向前。至二者距离较近时，改用“慢速前进”按钮调节组织慢速向前 (图 8 A)。至二者距离非常微小时，解锁手轮。按顺时针方向转动手轮，调节样品头前进。

2.2 修整样品。先将切片厚度设置为 50~100 μm (图 8 A)，转动手轮。在脑组织未暴露出来时，可快速切去前端多余的 OCT 包埋剂固体，直至脑组织出现。观察脑组织左右形态是否对称，若不对称，可适当调小切片厚度并略微调节样品头，再修去一侧，使两侧对称。

注：按顺时针方向转动手轮，每转动一圈，样品头上下运动一次，前进一个设定的单位距离，同时切下设定厚度的 OCT 包埋剂固体或脑组织。

图 8. 位置调节. A. 冰冻切片机控制面板. B. 防卷板位置调节旋钮。

2.3 安装防卷板并调整位置。调节防卷板相对于切片刀的位置 (图 8 B)，确保切片顺畅、不卡顿，并且切出的脑片平整、不卷曲。

2.4 收集脑片。根据实验需求设置切片厚度，开始切片收样。

注：此时冰冻箱温度以-20 °C 为宜，如果脑组织温度过低，脑片容易卷曲；如果脑组织温度过高，脑片容易褶皱。

漂片：在 48 孔板上注明脑组织编号及实验日期，在每孔中加入 1 ml 的 PBS。

用细毛笔将切下的脑片按顺序收集至 48 孔板中。从第一个孔开始每孔 1 张脑片至 48 孔全部填满，再重新从第 1 个孔开始收集，以此类推，直至收集全部所需脑片。将 48 孔板置于 4 °C 保存 (或将脑片收集于防冻液中，-20 °C 保存。防冻液配方：50% PBS + 30% 乙二醇 + 20% 甘油)。

贴片：在载玻片上注明脑组织编号及实验日期，用细毛笔将切下的脑片展平，放到载玻片上，再将手指置于脑片下方的载玻片底部，利用体温使脑片升温，迅速粘贴到载玻片上。

2.5 切片结束，锁住手轮。清理冰冻箱和样品托，调节冰冻箱温度在-10 °C 以下，关闭样品头压缩机 (图 9)，使冰冻切片机进入待机状态。

图 9. 关闭冰冻切片机样品头压缩机

以上操作步骤参见视频 1。

视频 1. 小鼠脑组织冰冻切片

注意事项

1. 为防止反复开启压缩机造成冰冻切片机损坏，一般情况下，切片机为 24 h 开机，处于常开机状态。
2. 不同的生物组织水份含量不同，切片时的适宜温度亦存在差异。使用时可根据实际情况调整冰冻切片机的冰冻箱温度和样品头温度，但应保证冰冻箱温度低于样品头温度（王园园 等, 2020）。
3. 在将脑组织包埋前一定要完全除去表面的液体，防止冷冻时形成冰晶损伤组织。
4. 在包埋或切片前，可用切片刀在非所需侧脑区切出小切口用于区分左右。
5. 在样品托上粘贴包埋好的脑组织时应加入足量的 OCT 包埋剂，防止粘贴不牢固，造成切片时组织掉落。
6. 将速冻后的脑组织放于样品托上速冻时，应注意不要在样品托的底部粘上多余 OCT 包埋剂或其他液体，避免样品托被粘贴在速冻区上。
7. 将速冻后脑组织放于样品托上速冻时，应注意观察脑组织是否始终垂直于样品托，如果发生倾斜，应及时调整至垂直（Arcega *et al.* 2019）。
8. 在将-80 °C 保存的脑组织粘贴在样品托上后需将脑组织放入冰冻箱内复温，避免直接切片时因脑组织温度过低导致脑片出现裂痕。
9. 将脑组织安装在样品头上、调整样品头角度及安装防卷板时，应用护刀器遮住切片刀，防止实验者受伤。
10. 调整脑组织与切片刀之间的位置时，应注意控制样品头移动的速度，避免组织与切片刀距离过近，使切片时组织与切片刀碰撞而掉落。

11. 在切片时，一次切取的脑片数量不应过多，避免收集时前后顺序被打乱。
12. 用毛笔取脑片时应触碰其冰冻的 OCT 包埋剂固体处，防止对脑片造成物理损伤。

表 1.常见问题与解决方案

常见问题	解决方案
脑片卷曲	防卷板的位置太过靠前、切片刀温度较高或脑组织未速冻完全，应将防卷板的位置向后调节、切片刀提前降温或延长速冻时间。
脑片褶皱	冰冻箱内温度过高，应将箱体温度适当调低。
切片时脑组织被撞落	防卷板或切片刀距离脑组织过近，单次切片厚度过厚，应将样品头的位置向后移动，调节脑组织与切片刀至合适距离。
脑片破碎	防卷板上存在缺口或冰冻箱内温度过低，应及时更换防卷板或将冰冻箱温度适当调高。
脑片不对称	可微调样品头位置，切除调节后的组织突起部分；若收集全脑切片或已经开始收集脑片则不能调节冻头，只能弃去之前收集的脑片后调节冻头位置或更换脑组织。

溶液配方

1. PBS 缓冲液

用分析天平按如下配方称取试剂，与 800~900 ml Milli-Q 水共同倒入专用烧杯中。使用磁力搅拌器充分溶解 (无任何固体)，滤器过滤后以 Milli-Q 水定容至 1 L，测量 pH 值为 7.4。室温或 4 °C 保存。

试剂	Na ₂ HP ₄ ·12H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NaCl	KCl
配制 1 L 所需的质量 (g)	3.5814	0.2450	8.0067	0.2013

致谢

感谢张琪和吴锦云演示实验操作。

参考文献

1. 王园园, 王涛, 李新, 王斌, 江魁. (2020). [小鼠不同组织冰冻切片技术探讨](#). *中国比较医学杂志*. 30 (09): 59-63.
2. Arcega, R. S., Woo, J. S., Xu, H. (2019). [Performing and Cutting Frozen Sections](#). *Methods Mol Biol* 1897:279-288.