

水稻组织石蜡切片

Paraffin Embedding Rice Tissues and Sectioning

程珂，都浩，欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 程珂，都浩，欧阳亦聃. (2018). 水稻组织石蜡切片. *Bio-101* e1010140. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010140.

How to cite: Cheng, K., Du, H. and Ouyang, Y. D. (2018). Paraffin embedding rice tissues and sectioning. *Bio-101* e1010140. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010140. (in Chinese)

实验原理: 用石蜡包埋组织块制作的显微切片。经取材、固定、洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与粘片、脱蜡、染色、脱水、透明、封片等步骤。在显微镜下可清晰观察细胞组织的形态结构。

实验目的: 石蜡切片是研究细胞生物学的基础技术，不仅是研究组织细胞形态的重要手段，更是 RNA 原位杂交、TUNEL 法检测细胞凋亡、免疫组织化学等分子细胞生物学的基本步骤。

关键词: 固定，包埋，组织切片

材料与试剂

1. 载玻片及盖玻片
2. 甲醛 (国药试剂)
3. 冰乙酸 (国药试剂)
4. 二甲苯 (国药试剂)
5. 无水乙醇 (国药试剂)
6. 固体石蜡
7. 番红
8. 固绿
9. 甲苯胺蓝
10. 加拿大树胶

11. 50% FAA 固定液 (见溶液配方)
12. 70% FAA 固定液 (见溶液配方)
13. 0.5% 甲苯胺蓝溶液 (见溶液配方)
14. 1% 番红 (见溶液配方)
15. 1% 固绿 (见溶液配方)

仪器设备

1. 切片机及刀片
2. 粘片台
3. 恒温箱

实验步骤

1. 取材与固定：将所需材料尽量剪小，加入预冷的 FAA 固定液中，固定液体积应不少于材料体积的 10 倍。固定液放冰上，抽真空 15 min，缓慢放气，再重复两次，直到材料沉底。

注：抽真空时要避免固定液沸腾，以免破坏细胞结构。因为抽真空时会导致固定液大量挥发，成分改变，抽完真空要将固定液倒出，换新鲜的固定液，固定过夜。

2. FAA 固定液固定样品 1-2 天，可直接用于下面的操作，如需较长时间保存，应移至 70% 酒精中可保存数月。
3. 脱水：将样品移至做石蜡切片的小瓶中，进行脱水步骤前，首先要用相应浓度的乙醇溶液洗去固定液中的甲醛、乙酸。如用 50% FAA 固定的，要先用 50% 乙醇替换固定液，一般换三次，每次 30 min；如果是用 70% FAA 固定，先用 70% 乙醇洗掉固定液，换三次，每次 30 min。然后梯度乙醇脱水：

乙醇溶液	时长
70% 乙醇	至少 1 h，可过夜,亦可长期保存
85% 乙醇	1 h
95% 乙醇 (含伊红或曙红)	1-2 h

注：此处伊红或曙红目的是组织着色，方便包埋及修蜡块。

4. 继续脱水和透明（可以用二甲苯或氯仿），二甲苯透明：

溶液	时长
无水乙醇	1 h
无水乙醇	1 h
3/4 体积无水乙醇+1/4 体积二甲苯	1.5 h
1/2 体积无水乙醇+1/2 体积二甲苯	1.5 h
1/4 体积无水乙醇+3/4 体积二甲苯	1.5 h
二甲苯	1 h
二甲苯	1 h

氯仿透明：

溶液	时长
无水乙醇	1 h
无水乙醇	1 h
4/5 体积无水乙醇+1/5 体积氯仿	2-3 h
3/5 体积无水乙醇+2/5 体积氯仿	2-3 h
2/5 体积无水乙醇+3/5 体积氯仿	2-3 h, 可过夜
1/5 体积无水乙醇+4/5 体积氯仿	2-3 h, 可过夜
纯氯仿	1 h
纯氯仿	1 h

5. 浸蜡：

溶液	温度	时长
二甲苯+碎蜡尽量多	42 °C	过夜
每 3-5 h, 待上次蜡溶解补碎蜡	42 °C	1-2 天
1/2 体积二甲苯+1/2 体积石蜡	48 °C	2 h
1/4 体积二甲苯+3/4 体积石蜡	50 °C	2 h
纯蜡	60 °C	1 h
纯蜡	60 °C	1 h
纯蜡	60 °C	1 h
纯蜡	60 °C	30 min-1 h

6. 包埋：预先折好纸盒，并在电磁炉上融化新的石蜡，置于 60 °C 温箱中备用，注意

包埋蜡温度不要过高，以免烫坏组织。包埋时，先铺一层包埋蜡，再将玻璃瓶中的材料倒进纸盒中，镊子稍加热，均匀排列材料。让材料自然冷却，可第二天再收。注意包埋蜡不要倒太多，蜡块厚度以 1-2 cm 为宜，太厚不好切片。

7. 修蜡块：将冷却好的蜡块从纸盒中取出，翻过来，可看到被伊红或曙红染色的材料。用单面刀将材料修成上窄下宽的梯形台。注意上面被刀片切割的平面要呈长方形，如果被切割的面不平行，切出的蜡带将不能成为直带。修块时要根据需要将材料摆成纵切或横切的方向，比如切子房、SAM 需要纵切，而花药需要横切。
8. 粘接：在切片前需要将蜡块粘在长方体的蜡座上，一般用长方体的小木块，避免用圆形的离心管等。将刀片粘少许碎蜡在酒精灯上烧热，抹在木块上，迅速将蜡块粘在木块上，冷却后就可以粘牢了。
9. 切片：将小木块夹在切片机样品台上，将蜡块平行对准刀片，调整好切片厚度，旋转切片机把手，开始切片。用笔杆或刀柄接蜡带，在切片完毕，将蜡带小心平铺在干净的纸上。如果切片时蜡带向上翻卷，应小心用镊子将蜡带向下压，使其贴向刀面。如果蜡带从中间劈开，说明刀锋被划伤或者粘到蜡，可用面巾纸顺着刀锋的方向将刀锋擦净，或者挪动刀片，换个切口。如果切片不能呈连续的蜡带，或蜡带中出现较多空洞，说明蜡没有均匀的渗透到样品中，此时尽可能重新取材，在取材后将材料进一步剪小，并适当延长脱水、透明和浸蜡各步骤的处理时间，使蜡渗透充分。
10. 粘片和展片：要使蜡带牢固的粘在载玻片上，要先将载玻片涂上粘片剂。推荐使用 0.1% poly-L-lysine 溶液 (Sigma 或生工)。抹片方法：在超净台上，先铺一张干净的 A4 纸张，将载玻片正面朝上排成两列摆在纸上 (磨砂面方便用铅笔写字，为正面)。在其中一列载玻片中央加 20 μ l poly-L-lysine，然后依次将滴有 poly-L-lysine 的和无 poly-L-lysine 的载玻片面对面涂抹均匀，注意不要有气泡，涂完后放置在干净的切片盒中。37 °C 烘干，至少 1 h。

注：磨砂面在粘片时一定要注明样品的名称。

11. 展片：展片时，将需要的蜡带切成小段，平铺在载玻片上，在载玻片上滴加双蒸水，使蜡带完全漂浮在双蒸水上。将载玻片移至 40 °C 展片台上，放置不超过 5 min，用面巾纸吸走多余的水分，放入切片盒中，38-42 °C 烘干，一般 2-3 天。

注：展好片的样品可以在室温干净地方长期放置备用。

12. 脱蜡和复水：

溶液	时长
二甲苯	20 min
二甲苯	20 min
50%二甲苯+50%无水乙醇	2 min
无水乙醇	2 min
无水乙醇	2 min
95%乙醇	1 min
85%乙醇	1 min
70%乙醇	1 min
50%乙醇	1 min
30%乙醇	1 min
15%乙醇	1 min
双蒸水	1 min
双蒸水	1 min

注：目的是将石蜡脱去，换成水溶性溶液，以备水溶性染料进入组织染色，因为二甲苯为挥发性有毒液体，此步骤应在通风橱中完成，并且二甲苯是可以回收重复利用的。

13. 染色：染色可用 0.5% 甲苯胺蓝溶液染色 30 min 至 1 h。如果用番红固绿复染，先用 1% 番红染色 (番红溶解于蒸馏水中) 2-3 min，在后续的脱水环节染固绿 (固绿溶解于 95% 乙醇) 1-3 min。(染料溶液见溶液配方)

14. 脱水、透明:

可用步骤 12 中的脱蜡和复水的染缸反顺序使用。

双蒸水	1 min
双蒸水	1 min
15%乙醇	1 min
30%乙醇	1 min
50%乙醇	1 min
70%乙醇	1 min
85%乙醇	1 min
95%乙醇	1 min
固绿(1 g 固绿+100 ml 95%乙醇), 如使用甲苯胺蓝染色, 此步省略	1-3 min
无水乙醇	1 min
无水乙醇	1 min
二甲苯	5 min
二甲苯	5 min

15. 封片: 封片剂推荐使用加拿大树胶。使用前, 树胶需要用二甲苯稀释 (体积比 1:2-1:6), 向试剂瓶中先倒入加拿大树胶原液, 再加入二甲苯, 用玻璃棒搅拌均匀, 最终稀释成浅黄色、较粘稠的状态, 太稠或太稀封片效果都不好。封片时, 用镊子将切片从二甲苯中取出, 平铺在面巾纸上, 趁二甲苯没有挥发掉之前滴加一到两滴封片剂, 用镊子夹取一张干净的盖玻片, 将盖玻片左侧边缘接触二甲苯, 缓缓放下盖玻片, 尽量避免产生气泡。如果有气泡, 用镊子小心推盖玻片, 赶走气泡。待在通风橱中吹 15 min, 再平铺在摊片盒上, 37-40 °C 恒温箱中过夜烘干。

16. 切片在显微镜下观察拍照, 或存于切片盒中长期保存。

注意事项

1. 50% FAA 适用于幼穗、SAM 等幼嫩组织的固定, 70% FAA 适用于根、茎秆、叶片等成熟组织的固定。配制好的固定液若长期保存应保存在 4 °C。
2. FAA 固定液长时间保存样品会使组织变性, 不超过 2 天, 70%酒精可保存数月, 更高浓度酒精会使材料收缩。

3. 在取水稻叶片固定时，由于叶片表皮蜡质层疏水叶片不易下沉，可在上面塞些纱布使叶片沉在液面以下，抽完真空叶片沉下后再弃纱布。
4. 番红是碱性染料，番红是细胞学和动植物组织学生常用的染料，能染细胞核、染色体和植物蛋白质，也可以染孢子囊。固绿是酸性染料，就维管束来说木质部染红色、韧皮部染绿色，导管可以被番红染色，筛管可以被固绿染色。子房、花药等建议用甲苯胺蓝或苏木精染色，爱氏苏木精整体染色法参见[附录 1](#)。
5. 较硬组织如成熟的水稻茎秆、节、种子可用 15%氢氟酸抽真空、浸泡过夜，组织较软后再用 FAA 固定。
6. 幼嫩材料用 FAA (50%酒精) 代替 FAA (70%酒精)，可防止材料收缩，还可加入 5 ml 甘油以防蒸发和材料变硬。

溶液配方

1. 50% FAA 固定液 (100 ml)
 - 无水乙醇 50 ml
 - 37%甲醛溶液 10 ml
 - 冰乙酸 5 ml
 - 补充双蒸水定容至100 ml
2. 70% FAA 固定液 (100 ml)
 - 无水乙醇 70 ml
 - 37%甲醛溶液 10 ml
 - 冰乙酸 5 ml
 - 补充双蒸水定容至100 ml
3. 1%番红
 - 1 g 番红溶解在 100 ml 双蒸水中
4. 1%固绿
 - 1 g 固绿溶解在 100 ml 95%乙醇中
5. 0.5%甲苯胺蓝
 - 0.5 g 甲苯胺蓝溶解在 100 ml 双蒸水中