

# 石蜡切片和组织化学技术在古生物组织研究中的应用

## Application of Paraffin Section and Histochemistry Technique in Paleohistology of Fossil Samples

吴倩<sup>1,2,3</sup>, Alida M. Bailleul<sup>1,2</sup>, 李志恒<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 北京 100044; <sup>2</sup>中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室, 北京 100044; <sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

\*通讯作者邮箱: [lizhiheng@ivpp.ac.cn](mailto:lizhiheng@ivpp.ac.cn)

**引用格式:** 吴倩, Bailleul, A. M., 李志恒. (2021). 石蜡切片和组织化学技术在古生物组织研究中的应用. *Bio-101* e1010665. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010665.

How to cite: Wu, Q., Bailleul, A. M. and Li, Z. H. (2021). Application of Paraffin Section and Histochemistry Technique in Paleohistology of Fossil Samples. *Bio-101* e1010665. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010665. (in Chinese)

**摘要:** 近年来, 现代生物学和医学中常用的石蜡切片及组织化学技术被引入古生物研究中并取得了良好的效果; 为我们研究古生物的演化、功能和生理特征提供了新的途径, 弥补了传统形态学研究中微观组织结构解析的不足。将古生物组织制成薄片是将石蜡切片技术引入微观组织结构的基础和关键, 石蜡切片与组织化学染色的主要实验步骤包括取样、固定、脱水、透明、透蜡、包埋、切片、染色和封片。与传统岩相学磨片法相比具有切片厚度较薄、样品损失少、染色特异性强等优点, 目前通过不同染色方法与组织中残余的胶原蛋白、多糖类等物质特异性结合, 可以有效区分出中生代非鸟恐龙和鸟类的皮质骨与髓质骨、软骨、肌肉纤维和血管等组织结构, 因而值得在更多类群和更广泛的时间跨度的古生物样品中进行尝试和推广。

**关键词:** 石蜡切片, 组织化学染色, 古组织学, 实验方法, 化石

### 研究背景

#### 1. 微观组织结构研究目的及重要性

生物的微观组织结构能够从不同尺度如分子、细胞、组织等微观层面揭示生物的重要特征, 反映出相应的器官功能、新陈代谢、生理特性, 在现代生物学和医学诊断

中有重要的应用 (Musumeci, 2014; Mescher and Junqueira, 2015)。19 世纪中期, 人们将组织学技术扩展到古生物研究中, 进而发现化石中也可以保存类似的微观组织结构 (Mantell, 1850a and 1850b)。古组织学 (Paleohistology) 自此应运而生, 为我们理解古生物的功能形态演化和生理特征提供了新的途径, 弥补了传统形态学研究的不足 (Padian and Lamm, 2013; Bailleul *et al.*, 2019b)。通过对化石生物微观组织结构的研究, 我们了解到恐龙并不都是行动迟缓的冷血动物, 而有些恐龙可能是具有较快的新陈代谢并行动敏捷的温血动物 (de Ricqlès, 1976 and 1980); 很多雌性恐龙, 早期的古鸟类与现生鸟类一样在产卵期会产生髓质骨, 储存产卵所需的钙质 (Schweitzer, 2005; Schweitzer *et al.*, 2016); 胶原纤维和血管等软组织甚至细胞结构在适当的条件下可以在化石中保存 (Pawlicki *et al.*, 1966; Bailleul *et al.*, 2020b; Bailleul, 2021)。

## 2. 古组织薄片制备以及染色方法发展历史回顾

生物的微观组织结构的观察通常需要借助光学显微镜或电子显微镜, 那就需要将样品制作成可见光或电子束可以穿过的薄片。最早的薄片制备技术是在植物化石中应用的岩相学磨片法 (ground section) (Wieland, 1906; Falcon-Lang and Digrius, 2014), 即将岩石 (包括化石) 切割打磨至 30-100  $\mu\text{m}$  厚的薄片, 使可见光可以透过进行观察研究。目前, 该方法在古组织学中得到了较为广泛的应用 (Chinsamy-Turan, 2005; Padian and Lamm, 2013)。撕片法 (Peel section) 出现于 20 世纪 20 年代, 利用丙酮和醋酸纤维素膜从样品表面取下薄层组织用于显微观察 (Walton, 1928 and 1930), 现在已经是一种较为成熟的制片技术。该技术最早在植物化石中应用, 后来也应用于动物化石中, 例如动物牙齿的齿釉质微结构的研究等 (Fusun *et al.*, 2005)。切片也是获得古生物组织薄片的一种常见方法, 可以比磨片法获得厚度更薄的组织 (Pawlicki, 1977)。切片时样品通常包埋在一定的基质中, 例如环氧树脂、甲基丙烯酸酯、石蜡等材料, 保护样品在切片过程中不发生异常形变 (Luft, 1961; Pawlicki, 1977 and 1978; Garland, 1989)。所获得的切片厚度可达微米至纳米级别, 不仅可以用于光学显微镜观察, 还可以用于透射电镜观察, 从而获得分辨率更高的图像, 探查分子级别的结构特征 (Luft, 1961; Pawlicki, 1977 and 1978)。

对薄片染色是区分不同现生组织的常用手段 (Bancroft, 2008), 以上方法所获得的古生物组织薄片也可以进一步染色 (Davies and Till, 1968; Pawlicki, 1977;

Garland, 1989; Füsün *et al.*, 2005; Schweitzer *et al.*, 2016; Bailleul *et al.*, 2020b)。但是，由岩相学磨片法所获得薄片较厚（通常在 50-100  $\mu\text{m}$ ），常规染色方法染料难以渗透而无法获得较好的染色效果（Gould, 1971; Bailleul *et al.*, 2019b），为获得较好的染色效果，需要对染色方法进行一些改进（Pawlicki, 1978）。在对切片进行染色时，通过组织化学染色、特异性荧光染色以及免疫组化等多种方法，染料物质与特定组织或细胞结构结合，使得目标组织更加清晰可见，与现生组织染色结果可对比分析，并能够利用特异性确认某些特定物质的存在（Pawlicki, 1977; Bancroft, 2008; Bailleul *et al.*, 2019b）。例如，用 PAS（过碘酸-雪夫）染色识别出恐龙骨骼化石中的黏多糖（Pawlicki, 1977），免疫化学染色在晚白垩纪的霸王龙骨骼中发现胶原蛋白（Schweitzer *et al.*, 2007），组织化学和免疫学证据在白垩纪鸭嘴龙中识别出遗存的细胞核与核 DNA（Bailleul *et al.*, 2020b）（表 1）。

### 3. 石蜡切片和染色技术在化石中的应用回顾

石蜡切片是在现代生物学、医学和病理学检验中应用非常广泛的一种薄片制备技术，通过将处理后的生物组织用石蜡包埋后进行切片。其优点相较于前述方法在于组织保存良好，能切连续薄片，结构清晰，抗原定位准确，适用于多种染色方法。切片厚度在 2-7  $\mu\text{m}$ ，不影响抗体的穿透性，染色均匀一致，免疫组化可获得较好的效果。包埋好的蜡块和切片均可长时间室温保存，便于后期回顾，在病理和回顾性研究中有较大的应用价值（Bancroft, 2008）。

尽管在现代生物学和医学中应用广泛，石蜡切片和组化染色技术在古生物学中仍然是一个较新的技术。Garland (1989) 将现生生物学中对硬组织进行石蜡切片的处理方式应用于考古所发掘的骨骼标本中，呈现了骨骼中的哈佛氏系统、骨陷窝、神经血管通道等结构。随着越来越多的组织化学技术在古生物研究中的应用，石蜡切片和染色技术也开始应用在了动物和植物化石中（Schweitzer *et al.*, 2016; Wang, 2016）。尽管非破坏性的 X-射线计算机断层扫描（CT）技术近年来飞速发展，分辨率也日益提高，但其所呈现的图像在不同组织之间的对比度仍然不及组织切片，密度相似的细胞和分子结构难以辨认，也无法进行染色或组织化学实验以对胶原纤维和 DNA 分子等进行特异性识别（Bailleul *et al.*, 2019a）。而通过特异性组织化学技术，则可以清晰有效地识别出特定组织和分子等微观结构，与 CT 技术相比在这一方面具有明显的优势。2016 年，Schweitzer *et al.* 最早将现生组织的石蜡切片和组

织化学技术应用于中生代晚期恐龙骨骼化石的研究当中，通过染料与不同骨骼组织所残留的化学成分的差异性结合，帮助识别骨骼中的髓质骨 (Schweitzer *et al.*, 2016); 随后, Bailleul *et al.*用类似的方法和原理, 识别出中生代鸟类和非鸟恐龙化石中保留的软骨组织 (Bailleul *et al.*, 2019a and 2020b)。除了硬组织以外, 类似方法也可以应用于寻找化石中可能存在的软组织, 同样呈现出了比常规磨片更为清晰的结果 (Bailleul *et al.*, 2020a)。在白垩纪中期植物化石中, 也尝试应用了石蜡切片技术, 显示了标本中的细胞壁和细胞内容物等微结构 (Wang, 2016)。尽管石蜡切片在古生物研究中应用历史较短, 但相关研究都呈现了较好的结果, 值得进一步推广应用。

表 1. 古生物化石组织染色方法应用实例

地质时代	物种/类群	染色方法	染色对象	文献来源
渐新世 早期	<i>Metasequoia</i>	Feulgen reaction	细胞核和染色体	(Ozerov <i>et al.</i> , 2021)
始新世	<i>Cypress</i>	Safranine B, methylene blue stain	细胞壁和细胞核	(Koller <i>et al.</i> , 2005)
始新世	<i>Paramyrtacarpus plurilocularis, Paramyrtaciphyllum agapovii</i>	Feulgen reaction, DAPI stain	细胞核	(Ozerov <i>et al.</i> , 2006)
始新世	<i>Metasequoia nathorstii</i>	Feulgen stain, alcian blue and Ehrlich's hematoxylin stain, DAPI stain	细胞核, 细胞壁 及细胞间质	(Ozerov <i>et al.</i> , 2020)
晚白垩 世	<i>Tarbosaurus bataar</i>	Acid-psouido-Schiff reaction, toluidine blue, Astra blue and Alcian blue stain	糖类, 血管壁和 骨细胞临近区域	(Pawlicki, 1977)
晚白垩 世	<i>Tarbosaurus bataar</i>	Feulgen's method, ethidium bromide	DNA,	(Pawlicki, 1995)

		stain		
晚白垩世	<i>Tyrannosaurus rex</i>	Alcian blue, high iron diamine (HID) stain, 免疫组化染色	硫酸化糖胺聚糖	(Schweitzer <i>et al.</i> , 2016)
晚白垩世	<i>Hypacrosaurus stebingeri</i> nestling	Alcian blue staining, DAPI/PI Staining, 免疫组化染色	软骨, DNA	(Bailleul <i>et al.</i> , 2020b)
晚白垩世	<i>Tyrannosaurus rex</i>	DNA 特异性荧光染色	DNA	(Schweitzer <i>et al.</i> , 1997)
晚白垩世	<i>Tyrannosaurus rex</i>	免疫化学染色	胶原蛋白和骨钙蛋白 (osteocalcin)	(Schweitzer <i>et al.</i> , 2007)
晚白垩世	<i>Tyrannosaurus rex</i> , <i>Brachylophosaurus canadensis</i>	DAPI/PI stain, 免疫组化染色	DNA, 蛋白质	(Schweitzer <i>et al.</i> , 2013)
早白垩世	<i>Yanornis</i>	Alcian blue stain	软骨	(Bailleul <i>et al.</i> , 2019a)
早白垩世	Enantiornithines index.	Masson's trichrome stain	平滑肌纤维, 胶原纤维	(Bailleul <i>et al.</i> , 2020a)
侏罗纪	Sauropodomorpha	Toluidine blue stain	蛋白质等有机质	(Zylberberg and Laurin, 2011)
三叠纪晚期	Cycad	Toluidene Blue, Azure Blue stain	细胞核, 细胞壁	(Gould, 1971)
泥盆纪到三叠纪	Temnospondyli, amniote and sauropodomorph dinosaur	Toluidine blue stain	蛋白质等有机质	(Zylberberg and Laurin, 2011)

## 古生物化石标本石蜡切片应用进展

目前, 石蜡切片及染色技术已经应用于中生代非鸟恐龙和鸟类化石标本, 这些标本来自于不同沉积的类型, 时间跨度从早白垩世到晚白垩世。在具体操作中, 石蜡切片和组织化学技术通常结合岩相学磨片、CT、SEM 等技术, 对化石样品的组织结构和成分进行综合分析, 进而帮助研究者辨别出组织中的皮质骨和髓质骨等硬组织, 以及软骨、肌肉

纤维、血管和胶原纤维等软组织。

对于化石骨骼样品，通过磨片方法通常就可以显示骨细胞陷窝、细胞外基质、神经血管通道、骨单位、生长线等微观组织结构 (图 1)，根据这些组织结构的形态，可以进行初步的辨别。例如，髓质骨和皮质骨在组织结构、颜色、神经血管通道等方面均存在差异 (Schweitzer *et al.*, 2016)，软骨和骨骼在细胞陷窝形态、细胞外基质的光学特征等方面也不同 (Bailleul *et al.*, 2020b)。另外，目标组织中若未保留较为清晰的可辨认结构，尤其是针对特定情况下可能残留的软组织的判别上 (图 2)，则需要借助组化染色进一步确认目标组织的存在 (Bailleul *et al.*, 2020a)。

根据不同组织中的分子类型及含量存在差异，可以选用相应的染色方法使组织呈现不同的染色结果，也体现了石蜡切片后期应用较为灵活的一面。例如，在软骨和髓质骨中存在较大量的硫酸化糖胺聚糖 (Sulfated glycosaminoglycan)，而在皮质骨中则基本不存在。利用能够与硫酸化糖胺聚糖特异性结合的染料 (如阿尔新蓝 (Alcian blue) 和高铁二胺等 (High iron diamine))，就可以有效地将髓质骨与皮质骨、软骨与骨骼相区分，为磨片观察的结果提供进一步支持 (图 1)。Schweitzer *et al.* (2016) 在对晚白垩纪北美的霸王龙 (*Tyrannosaurus rex*, MOR 1125) 股骨石蜡切片进一步利用阿尔新蓝和高铁二胺染色，结果显示皮质骨组织中的纤维基质和髓质骨着色差异。Bailleul *et al.* (2019a) 在对早白垩世基干今鸟型类马氏燕鸟 (*Yanornis martini*) 的前齿骨和下颌切片中应用了阿尔新蓝染色法区分出透明状的骨骼和蓝色的软骨细胞。利用同一方法在晚白垩世鸭嘴龙 (*Hypacrosaurus stebingeri*) 幼体头骨标本中有效区分了软骨与骨骼，并利用免疫荧光和免疫组化实验进一步确认了化石中的胶原蛋白的特异保存 (Bailleul *et al.* 2020b)。

其他常用的生物染色方法如马松三色法，同样可以和石蜡切片结合运用，并区分胶原蛋白纤维、平滑肌纤维组织等 (图 2)。Bailleul *et al.* (2020a) 对早白垩世反鸟标本 (STM10-12) 中保存的疑似“卵泡”结构取样进行石蜡切片和马松三色染色后，其中纤维结构显示与现生鸟类标本类似的染色模式，多数纤维染成粉红色，少数细小纤维呈绿色，并呈现胶原纤维独有的波状形态。

目前在古生物研究中，石蜡切片和染色技术主要用在中生代白垩纪陆相沉积中的化石，既包括硬组织 (骨组织)，也包括一例软组织。具体实验操作可参照现生生物硬组织石蜡切片，对古生物材料取样后，经过固定、脱钙、脱水、包埋等一系列步骤，获得包埋有样品的蜡块，再经切片、染色，获得可供对比观察的组织显微结构。对于化石材

料的处理上，由于组织较为破碎，脱钙前一般先用琼脂进行包埋，并选用较为温和的脱钙剂 (如 EDTA)，具体的实验方法将在下一部分进行详细介绍。染色时，通常根据需要确认的分子和组织结构选用相应的特异性染色方法。用于区分不同组织的染色方式与在现生动物中的常规染色方法一致，进行具体研究时常选用相应现生动物组织进行染色对比分析。由于化石组织经过长时间的埋藏矿化过程，组织中残留的有机成分较现生组织少，因此染色结果通常较为暗淡，但依然具有较好的区分度。通过与磨片、CT、SEM、免疫组化等多种方法结合，并对比相应现生组织，进行综合分析，得出更具有确定性的结论。在处理微小样品方面，石蜡切片与磨片法相比有明显优势，可以减少对样品的损耗(Bailleul *et al.*, 2019a)。在需要慎重考虑有损实验操作的古生物研究中，不失为一种更容易被接受的方法。

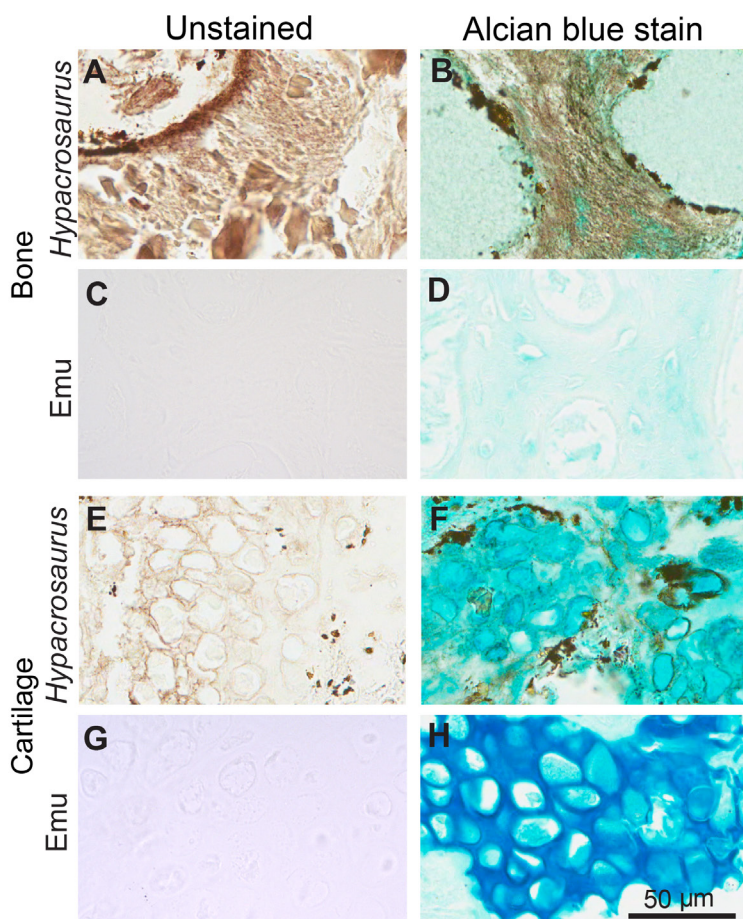
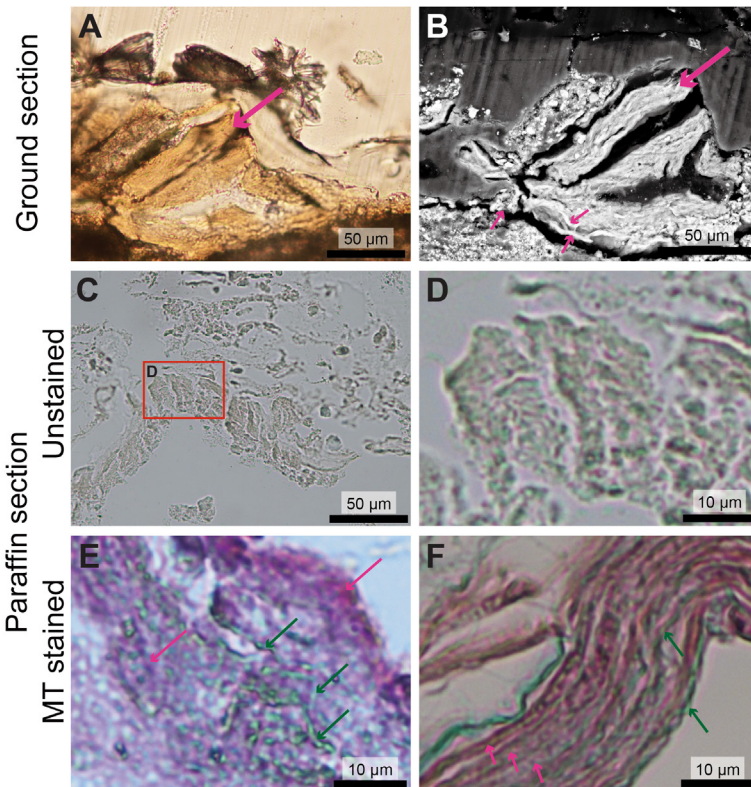


图 1. 恐龙化石 (*Hypacrosaurus*) 和现生鸟类 (*Emu*) 骨骼与软骨组织石蜡切片染色前后对比，并显示骨骼与钙化软骨之间由于糖胺聚糖差异而出现的不同染色模式 与未染色切片 (A, C, E, G) 相比，经阿尔新兰染色后的切片均显示对比更为明显图像，并可

见特定组织与染料的特异性结合。不论是在化石还是现生动物中，钙化软骨都比骨骼组织显示出与染料更强烈的结合，二者之间呈现出很好的区分，并表明虽然经过长时间的埋藏与成岩过程，软骨组织中的糖胺聚糖仍然存留至今。（原图发表于 Bailleul *et al.*, 2020b)



**图 2.** 化石和现生动物软组织磨片、石蜡切片与染色对比 雌性反鸟标本 (STM10-12) 卵泡组织岩相学磨片分别在光镜 (A) 和扫描电镜 (B) 下图像，标本石蜡切片未染色 (C,D) 和马松三色染色 (E) 图，以及现生鸟类 (家鸡) 卵泡组织切片染色 (F)。电镜观察显示出一些常规光镜观察未见到的纤维状结构 (B)。染色后的石蜡切片比未染色的切片显示出更为清晰的结构，并可以见到与现生动物相同的染色模式，指示定向排列的平滑肌纤维 (粉色箭头) 和胶原纤维 (绿色箭头) 存在。（原图发表于 Bailleul *et al.*, 2020a)。

## 材料与试剂

1. 防脱载玻片 (Superfrost Plus, Fisher Scientific)
2. 盖玻片 (Fisher Scientific)



3. 无水酒精 (分析纯)
4. 超纯水或去离子水
5. 二甲苯 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 383940050)
6. 组织固定液 (中性缓冲福尔马林固定液 4% NBF, pH 7.2-7.4; 江苏世泰实验器材有限公司)
7. 琼脂
8. 石蜡 (Paraplast Plus EMS, catalog number: 19216)
9. 防脱片液 (Tissue-Grip, StatLab)
10. 中性树脂 (长沙康柏恩医疗科技有限公司)

## 仪器设备

1. 切片机 (Leica Biosystems RM2265)
2. 水浴锅 (Leica HI1210)
3. 烤片机 (Leica HI1220)
4. 烘箱 (Thermo PR305220G)

## 实验步骤

1. 石蜡包埋及切片操作流程及方法 (图 3)

针对性取样：从需要进行分析的化石部位取下适当大小的样品。目前石蜡包埋模具大小通常不超过 24 mm × 37 mm × 9 mm, 样品需在琼脂包埋后能够放入包埋盒中, 并涵盖所要研究的部位与结构。

琼脂包埋以及初步固定：将样品包埋在 3% 的琼脂中, 保持样品在后续脱钙等步骤中的完整性。

缓释液脱钙：将琼脂包埋的样品置于 EDTA (pH 8.0) 中进行脱钙, 时长 2 周, 期间每天更换新鲜的 EDTA 溶液。根据样品大小和硬度, 脱钙时长可做相应调整。

梯度脱水：脱钙后的琼脂包埋样品置于梯度酒精中脱水。依次置于 70%, 80%, 90%, 95% 和 100% 酒精中, 每种溶液浸泡时间均为 1 h。最后两次置于 100% 纯酒精中, 每次 1 h, 保证完全脱水。

透明：将彻底脱水后的琼脂包埋样品置于二甲苯中, 3 次, 每次 0.5 h。

浸蜡：将透明后的琼脂包埋样品置于融化的石蜡中，3次，每次0.5 h。

包埋：将经过浸蜡的琼脂包埋样品按照预设方位置于模具中，倒入完全熔融石蜡将样品浸没包埋。待石蜡完全硬化后脱模，并标记好样品名称。

半薄切片：使用石蜡切片机将上述蜡块切成薄片，厚度通常为5 μm。水浴槽中加入适量纯净水和防脱片剂，切好的薄片于温水浴中展开，使用粘附玻片将切片捞出于其上，在玻片空白位置写好标签。室温过夜晾干或置于60 °C烘箱中1 h，收纳于玻片标本盒中保存备用。

注：融蜡和水浴温度视具体所用石蜡种类、品牌而定。以 *Bailleul et al. (2019a)* 中所使用 *Paraplast Plus EMS catalog number: 19216* 为例，融蜡温度约64 °C，水浴温度为42 °C。

## 2. 石蜡切片染色操作步骤 (图 4)

目前古组织学研究中应用到的石蜡切片染色方法介绍如下：

2.1 阿尔新蓝 (Alcian blue) 染色，阿尔新蓝染料可以与组织中的硫酸化糖胺聚糖特异性结合，可用于区分硫酸化糖胺聚糖含量高的软骨和髓质骨与含量少的皮质骨，实验步骤参考 *Bailleul et al. (2019a)*：

- 1) 将附有切片的载玻片置于二甲苯中，每次5 min，共2次。
- 2) 将玻片依次置于100%、90%、80%、70%酒精溶液中，每次1 min。
- 3) 1% H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> 溶液，10 min。
- 4) 流水冲洗。
- 5) 阿尔新蓝 8GX (1% 阿尔新蓝溶解于3% 乙酸溶液中) 染色，30 min。
- 6) 流水冲洗。
- 7) 梯度酒精中脱水。
- 8) 二甲苯中透明，数次。

2.2 马松三色 (Masson's trichrome) 染色，可用于区分骨骼、软骨和肌肉纤维，实验步骤参考 *Bailleul et al. (2020a)*：

- 1) 将附有切片的载玻片置于二甲苯中，每次5 min，共2次。
- 2) 将玻片依次置于100%、90%、80%、70%、50%酒精溶液中，每次1 min。
- 3) Mayer's 苏木精染液 (Mayer's acid hematoxylin) 染色，10 min。
- 4) 纯水漂洗，1 min。

- 5) 丽春红 (Xylidine Ponceau)/酸性品红 (Acid Fuschin) 溶液染色, 2 min。  
溶液配制方法: 0.5%丽春红 2R【Xylidine Ponceau 2R, 颜色指数 (CI no.): 16150】溶解于 1%乙酸 (acetic acid), 0.5%酸性品红【Acid Fuschin, 颜色指数 (CI no.): 42685】溶解于 1%乙酸, 等量混合均匀。
- 6) 去离子水漂洗, 10 s。
- 7) 1% 磷钼酸 (phosphomolybdic acid) 溶液, 4 min。
- 8) 去离子水漂洗, 10 s。
- 9) 亮绿 (light green) 溶液染色, 90 s。  
溶液配制方法: 2%亮绿【颜色指数 (CI no.): 42095】溶解于 2% 柠檬酸 (citric acid) 溶液, 使用前用去离子水以 1:10 稀释。
- 10) 去离子水漂洗。
- 11) 100% 酒精脱水, 每次 10 s, 共两次。
- 12) 二甲苯中透明, 每次 1 min, 共 4 次。

### 2.3 高铁二胺-阿尔新蓝染色 (HID/Alcian blue stain), 可用于区分髓质骨与皮质骨, 实验步骤参考 Schweitzer *et al.* (2016):

- 1) 将附有切片的载玻片置于二甲苯中, 每次 5 min, 共 2 次。
- 2) 将玻片依次置于 100%、90%、80%、70%酒精溶液中, 每次 1 min。
- 3) 1%  $H_5IO_6$  (过碘酸 periodic acid) 溶液氧化, 10 min。
- 4) 流水漂洗。
- 5) 新鲜制备的高铁二胺 (high iron diamide/HID) 溶液染色, 18 h。  
(溶液制备方法: 120 mg 间苯二胺 (meta diamine) 和 20 mg 对苯二胺溶于 50 ml 水, 然后加入盛有 1.4 ml 的 10% 氯化铁 (ferric chloride ( $FeCl_3$ )) 溶液的烧杯中 (等同于 62% (质量体积百分比) 的  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 溶液。
- 6) 纯水冲洗。
- 7) 阿尔新蓝 8GX (1% 阿尔新蓝溶解于 3% 乙酸溶液中) 染色, 30 min。
- 8) 纯水冲洗。
- 9) 梯度酒精脱水。
- 10) 二甲苯透明。

封片: 适量中性树脂滴于玻片附有样品切片一面, 用盖玻片从一侧逐渐落下盖

于标本切片上，注意不要有气泡。水平静置 1 周左右，待树脂完全晾干，即可收纳于玻片盒中，可长期保存。

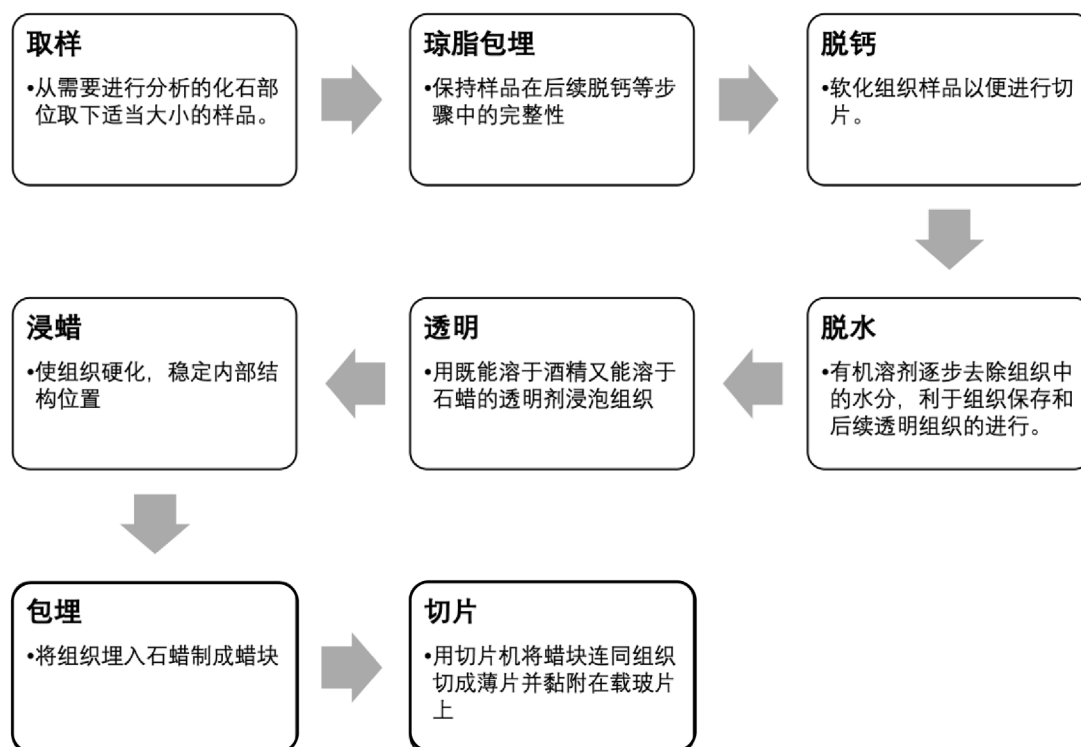


图 3. 石蜡包埋及切片流程图 完成该流程大概时间总长为 2-3 周

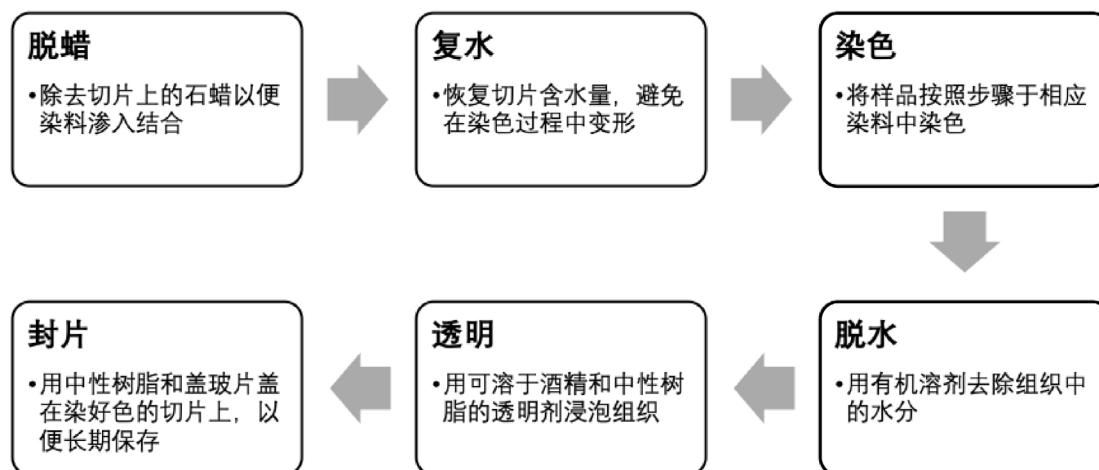


图 4. 石蜡切片染色流程图 完成该流程大概时间总长为 1 天，具体时间视染色方法而定。

### 注意事项

1. 操作人员应带好手套、口罩等防护用品。
2. 避免组织污染：同时涉及古组织和现生组织的实验，二者不可共用容器、切片刀具等任何可能接触到标本的器具，以免造成样品污染，导致结果假阳性。
3. 石蜡包埋时，熔融石蜡温度较高，请小心操作以免烫伤。
4. 切片、捞片和封片过程需要一定操作经验，经过练习后可熟练掌握。
5. 流水冲洗时应轻柔，避免标本从玻片上脱离滑落。
6. 封片时若盖玻片下产生气泡，可将玻片放回二甲苯中浸泡，待中性树脂溶解，盖玻片即从玻片上脱离，可重新进行封片。不可暴力揭开盖玻片，以免损伤标本，或导致盖玻片破碎造成操作人员受伤。
7. 封片完成后即可进行观察，但此时树脂尚未硬化，盖玻片易滑动，注意小心操作以免损伤样品。建议待树脂硬化完全后再进行观察。
8. 二甲苯具微毒性，所有包埋和染色步骤中涉及二甲苯的部分，务必在通风橱内进行。

## 总结与展望

石蜡切片具有样品损耗量小、组织结构清晰、适用于多种染色方法、染色均匀一致、能长期保存等优点。目前，虽然石蜡切片在古生物组织研究中的应用尚不广泛，但已经帮助我们有效地识别出不同的骨骼、软骨、血管和肌肉等组织，在解释动物化石的性别、生殖系统演化、关节的形态功能等方面提供了诸多有用的信息。

考虑到目前该方法的应用仅仅局限于中生代白垩纪陆相地层中保存的恐龙和鸟类化石样品，仍需要选取其他时代的不同类群的样品进行实践应用。全世界新生代地层中有许多保存良好的动植物化石，其中有染色体等细胞结构残留 (Ozerov *et al.*, 2005, 2020 and 2021; Koller *et al.*, 2005); 从泥盆纪到侏罗纪等更早时代地层的化石中也已经报道保存有蛋白质等残存生物来源有机物 (Zylberberg and Laurin, 2011; Gould, 1971)。另外，在翼龙、恐龙、其他早期四足动物、鱼类等化石的骨骼等硬组织或翼膜、角质层等软组织化石中，都可能残留相应的蛋白质等有机物质，然而仅靠传统岩相学磨片方法通常难以确定有机质成分，尤其是在矿化的软组织样品中。而利用石蜡切片和组织化学技术，可以弥补传统岩相学磨片技术的不足，特异性地区分不同组织和有机质成分。

因此，在今后的研究中，期望能将这项技术应用于更广泛的地质时代中的生物类群，

帮助分析这些地质时代中的生物有机物质保存潜力，探索相关物种的微观组织结构和功能特征，有助于我们更深入地理解生物结构功能的演化和分子层面的保存机制等。

## 致谢

本研究得到了国家自然科学基金面上项目（编号：41772013），中国科学院战略性先导科技专项（编号：XDA 9050102, XDA 20070203, XDB26000000）的资助。

## 竞争性利益声明

作者声明没有利益冲突

## 参考文献

1. Bailleul, A. M. (2021). [Fossilized cell nuclei are not that rare: Review of the histological evidence in the Phanerozoic](#). *Earth-Sci Rev* 216: 103599.
2. Bailleul, A. M., Hall, B. K. and Horner, J. R. (2012). [First evidence of dinosaurian secondary cartilage in the post-hatching skull of \*Hypacrosaurus stebingeri\* \(Dinosauria, Ornithischia\)](#). *PLoS One* 7: e36112.
3. Bailleul, A. M., Li, Z., O'Connor, J. K. and Zhou, Z. (2019a). [Origin of the avian predeontary and evidence of a unique form of cranial kinesis in Cretaceous ornithuromorphs](#). *Proc Natl Acad Sci* 116: 24696-24706.
4. Bailleul, A. M., O'Connor, J. K. and Schweitzer, M. H. (2019b). [Dinosaur paleohistology: Review, trends and new avenues of investigation](#). *PeerJ* 7(3): e7764.
5. Bailleul, A. M., O'Connor, J., Li, Z., Wu, Q., Zhao, T., Martinez Monleon, M. A. and Zheng, X. (2020a). [Confirmation of ovarian follicles in an enantiornithine \(Aves\) from the Jehol biota using soft tissue analyses](#). *Commun Biol* 3: 1-8.
6. Bailleul, A. M., Zheng, W., Horner, J. R., Hall, B. K., Holliday, C. M. and Schweitzer, M. H. (2020b). [Evidence of proteins, chromosomes and chemical markers of DNA in exceptionally preserved dinosaur cartilage](#). *Natl Sci Rev* 7: 815-822.
7. Bancroft, J. D. (2008). [Theory and practice of histological techniques](#). Elsevier Health Sciences. ISBN: 9780702042263.
8. Chinsamy-Turan, A. (2005). [The microstructure of dinosaur bone: deciphering biology with fine-scale techniques](#). John Wiley & Sons.

9. Davies, P. J. and Till, R. (1968). [Stained dry cellulose peels of ancient and Recent impregnated carbonate sediments](#). *J Sediment Res* 38: 234-237.
10. de Ricqlès, A. (1976). On the histology of fossil and living reptiles, with comments on its functional and evolutionary significance. In: Underwood, G. (Ed.). In: [Morphology and biology of reptiles linnean society symposium series](#). Linnean Society of London, 123-149.
11. de Ricqlès, A. (1980). Tissue structures of dinosaur bone - functional significance and possible relation to dinosaur physiology. In: Thomas, R. D. K. and Olson, E. C. (Eds.). In: [A cold look at the warm blooded dinosaurs](#). American Association for the Advancement of Science, 103-139.
12. Falcon-Lang, H. J. and Digrius, D. M. (2014). [Palaeobotany under the microscope: history of the invention and widespread adoption of the petrographic thin section technique](#). *Quekett J Microsc* 42: 253-289.
13. Füsün, A., Füsün, Ö., Sema, B. and Solen, K. (2005). [Acetate peel technique: a rapid way of preparing sequential surface replicas of dental hard tissues for microscopic examination](#). *Arch Oral Biol* 50: 837-842.
14. Garland, A. N. (1989). [Microscopical analysis of fossil bone](#). *Appl Geochem* 4: 215-229.
15. Gould, R. E. (1971). [Lyssoxylon grigsbyi, a cycad trunk from the upper triassic of arizona and new mexico](#). *Am J Bot* 58: 239-248.
16. Koller, B., Schmitt, J. M. and Tischendorf, G. (2005). [Cellular fine structures and histochemical reactions in the tissue of a cypress twig preserved in Baltic amber](#). *Proc Biol Sci* 272: 121-126.
17. Luft, J. H. (1961). [Improvements in epoxy resin embedding methods](#). *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414.
18. Mantell, G. A. (1850a). [On a dorsal dermal spine of the Hylæosaurus, recently discovered in the strata of Tilgate Forest](#). *Philos Trans R Soc Lond* 140: 391-392.
19. Mantell, G. A. (1850b). [On the pelorosaurus; an undescribed gigantic terrestrial reptile whose remains are associated with those of the iguanodon and other saurians in the strata of Tilgate Forest, in Sussex](#). *Philos Trans R Soc Lond* 140: 379-390.
20. Mayr, G. and Manegold, A. (2013). [Can ovarian follicles fossilize?](#) *Nature* 499: E1.
21. Mescher, A. L. and Junqueira, L. C. U. (2015). [Junqueira's Basic Histology: Text](#)

- [and Atlas](#). McGraw-Hill Medical.
22. Musumeci, G. (2014). [Past, present and future: overview on histology and histopathology](#). *J Histol Histopathol* 1: 5.
  23. Ozerov, I. A., Zhinkina, N. A., Efimov, A. M., Machs, E. M. and Rodionov, A. V. (2006). [Feulgen-positive staining of the cell nuclei in fossilized leaf and fruit tissues of the lower eocene myrtaceae](#). *Bot J Linn Soc* 150: 315-321.
  24. Ozerov, I. A., Zhinkina, N. A., Torshilova, A. A., Machs, E. M., Myakoshina, Y. A. and Rodionov, A. V. (2020). [Use of DNA-specific stains as indicators of nuclei and extranuclear substances in leaf cells of the middle eocene \*Metasequoia\* from arctic Canada](#). *Rev Palaeobot Palynol* 279: 104211.
  25. Ozerov, I. A., Zhinkina, N. A., Torshilova, A. A., Machs, E. M. and Rodionov, A. V. (2021). [Chromosomes of fossilized \*Metasequoia\* from early Oligocene of Siberia](#). *Rev Palaeobot Palynol* 287: 104365.
  26. Padian, K. and Lamm, E. T. (2013). [Bone histology of fossil tetrapods: advancing methods, analysis, and interpretation](#). Univ of California Press. California. ISBN: 9780520273528.
  27. Pawlicki, R. (1977). [Histochemical reactions for mucopolysaccharides in the dinosaur bone studies on Epon- and methacrylate-embedded semithin sections as well as on isolated osteocytes and ground sections of bone](#). *Acta Histochem* 58: 75-78.
  28. Pawlicki, R. (1978). [Methods of preparation of fossil bone samples for light and transmission electron microscopy](#). *Stain Technol* 53: 95-102.
  29. Pawlicki, R. (1995). [Histochemical demonstration of DNA in osteocytes from dinosaur bones](#). *Folia Histochem Cytobiol* 33: 183-186.
  30. Pawlicki, R., Dkorbel, A. and Kubiak, H. (1966). [Cells, collagen fibrils and vessels in dinosaur bone](#). *Nature* 211: 655-657.
  31. Schweitzer, M. H. (2005). [Gender-specific reproductive tissue in ratites and \*Tyrannosaurus rex\*](#). *Science* 308: 1456-1460.
  32. Schweitzer, M. H., Johnson, C., Zocco, T. G., Horner, J. R. and Starkey, J. R. (1997). [Preservation of biomolecules in cancellous bone of \*Tyrannosaurus rex\*](#). *J Vertebr Paleontol* 17: 349-359.
  33. Schweitzer, M. H., Suo, Z., Avci, R., Asara, J. M., Allen, M. A., Arce, F. T. and Horner, J. R. (2007). [Analyses of soft tissue from \*Tyrannosaurus rex\* suggest the](#)



- [presence of protein](#). *Science* 316: 277-280.
34. Schweitzer, M. H., Zheng, W., Cleland, T. P. and Bern, M. (2013). [Molecular analyses of dinosaur osteocytes support the presence of endogenous molecules](#). *Bone* 52: 414-423.
  35. Schweitzer, M. H., Zheng, W., Zanno, L., Werning, S. and Sugiyama, T. (2016). [Chemistry supports the identification of gender-specific reproductive tissue in \*Tyrannosaurus rex\*](#). *Sci Rep* 6: 23099.
  36. Walton, J. (1928). [A method of preparing sections of fossil plants contained in coal balls or in other types of petrification](#). *Nature* 122: 571-571.
  37. Walton, J. (1930). [Improvements in the peel-method of preparing sections of fossil plants](#). *Nature* 125: 413-414.
  38. Wang, X. (2016). [On the interpretation of fossil nuclei](#). *Nat Sci* 08: 216.
  39. Wieland, G. R. (1906). *American fossil cycads*. University of Michigan Library.
  40. Zheng, X., O'Connor, J. K., Huchzermeyer, F., Wang, X., Wang, Y., Wang, M. and Zhou, Z. (2013). [Preservation of ovarian follicles reveals early evolution of avian reproductive behaviour](#). *Nature* 495: 507-511.
  41. Zylberberg, L. and Laurin, M. (2011). [Analysis of fossil bone organic matrix by transmission electron microscopy Analyse de la matrice organique d'os fossiles par microscopie électronique à transmission](#). *Comptes Rendus Palevol* 10: 357-366.