·论　　著·

TO 型生物制片透明剂在石蜡组织块脱蜡转透射电镜标本制备中的应用研究

杨杰顺,叶　云

(重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

摘　要:目的　探讨利用 TO 型生物制片透明剂替代二甲苯在石蜡组织块脱蜡转透射电镜标本制备的可行性。**方法**　将石蜡组织块分为常规脱蜡组和快速脱蜡组,采用 TO 型生物制片透明剂代替二甲苯进行脱蜡后作透射电镜标本制备和观察,并与采用二甲苯按照常规脱蜡步骤进行脱蜡后作透射电镜标本制备的结果进行比较。**结果**　TO 型生物制片透明剂常规脱蜡步骤与二甲苯常规脱蜡后转透射电镜标本的切片与观察效果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　TO 型生物制片透明剂可用于石蜡组织块转透射电镜标本制备时脱蜡,以减少二甲苯对环境和实验者的危害,但其难度略大,标本观察效果略差。

关键词:TO 型生物制片透明剂;　二甲苯;　透射电镜

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.13.021　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2017)13-1903-03

Application of TO-type Biological Transparentizing Agent in specimens preparation using paraffin material for transmission electron microscopy

YANG Jieshun, YE Yun

(*Institute of Life science, Chongqing Medical University, Chongqing* 400016, *China*)

Abstract: Objective　To explore the practicability of T0-type biological transparentizing agent instead of xylene in specimens preparation using paraffin material for transmission electron microscopy. **Methods**　Paraffin-embedded tissue blocks were collected and subdivided into fast dewaxing group and routinely dewaxing group, with the usage of T0-type biological transparentizing agent instead of xylene in specimen preparation and observation using paraffin material for transmission electron microscopy. A comparison was further performed according to results of routinely xylene dewaxing in specimen preparation using paraffin material for transmission electron microscopy. **Results**　Specimens sections and observed effects showed no significant difference in the comparison of using T0-type biological transparentizing agent and xylene in specimen preparation using paraffin material for transmission electron microscopy. In addition, T0-type biological transparentizing agent posed slightly difficulty for slicing after fast dewaxing, and slightly worse observation effect of specimens were also observed subsequently. **Conclusion**　TO-type biological transparentizing agent can be used for specimens' preparation when using paraffin material for transmission electron microscopy to reduce the harm of xylene on the environment and the experimenter, but its difficulty is slightly larger, and the effect of specimen observation is slightly worse.

Key words: TO-type Biological Transparentizing Agent;　xylene;　transmission electron microscope

生物电镜技术在医学科研与病理诊断中发挥重要的作用[1]。近年来越来越多的临床疑难病例借助透射电镜超微病理诊断技术进行诊断,通常由于不能明确诊断且前期并未考虑需借助超微病理诊断协诊,所以多数情况下无多余组织直接用于电镜制样,常采用已制备的石蜡组织块经二甲苯脱蜡等操作进行电镜制样[2]。由于二甲苯对人体的危害,已开始使用 TO 型生物制片透明剂取代二甲苯[3-4]。本实验应用 TO 型生物制片透明剂替代石蜡组织块转电镜制样,并与二甲苯制作的标本进行比较,观察 TO 型生物制片透明剂在石蜡组织块转电镜制样的耗时、切片难度、透射电镜图片等情况,探讨 TO 型生物制片透明剂运用于石蜡组织块脱蜡转透射电镜标本的制备,减少二甲苯的使用,降低对环境和人体的危害。

1　材料与方法

1.1　一般材料　采用二甲苯制备的石蜡组织块,去掉多余石蜡后,将石蜡组织切成 1～2 mm^3 的 3 块小块,分为对照组、实验组Ⅰ、实验组Ⅱ[5-6]。使用 TO 型生物制片透明剂制备的石蜡组织块,去掉多余石蜡后,将每块石蜡组织切成 1～2 mm^3 的 3 块小块,分为实验组Ⅲ、实验组Ⅳ。并另取二甲苯制备的石蜡组织块和 TO 型生物制片透明剂制备的石蜡组织块各 2 块,做重复实验。

1.2　分组

1.2.1　对照组　制样时采用二甲苯制备的石蜡组织块,采用二甲苯常规脱蜡途径转电镜制样[7-8]:将标本放入二甲苯的青霉素小瓶中,瓶盖反盖,置 45 ℃的恒温箱加热 2 h,振荡以溶解组织中的石蜡(组织透明为准)[9-10]。取出标本放入无水乙醇和二甲苯 1∶1 混合液的青霉素瓶,室温 10 min;室温下再将青霉素瓶中的液体依次置换为无水乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、50%乙醇,各 10 min;蒸馏水 3 次,每次 1 min;0.1 mol/L PBS 3 次,每次 10 min。最后置入含 4%戊二醛的电镜固定液中保存。按透射电镜常规标本制备方法进行脱水、渗

作者简介:杨顺杰,男,助理实验师,主要从事超微结构研究。

透、包埋、聚合。

1.2.2　实验组Ⅰ　制样时采用二甲苯制备的石蜡组织块，TO 型生物制片透明剂替代二甲苯常规脱蜡途径转电镜制样：将标本放入 TO 型生物制片透明剂的青霉素小瓶中，瓶盖反盖，30 ℃恒温箱加热 3 h 溶解组织中的石蜡（组织透明为准），其余操作步骤同对照组。

1.2.3　实验组Ⅱ　制样时采用二甲苯制备的石蜡组织块，TO 型生物制片透明剂替代二甲苯快速脱蜡途径转电镜制样[11-12]：将标本放入装有 TO 型生物制片透明剂的青霉素小瓶中，瓶盖反盖，30 ℃恒温箱加热 3 h 溶解组织中的石蜡（组织透明为准），取出标本放入含 1％锇酸的 TO 型生物制片透明剂的青霉素瓶中，瓶盖反盖，35 ℃恒温箱 90 min，室温下再将青霉素瓶中的试剂依次置换成环氧丙烷 10 min，再于 35 ℃恒温箱中依次置换为环氧丙烷和包含环氧树脂 812 的包埋剂 1∶1 混合液，纯环氧树脂包埋剂各 45 min。之后按照透射电镜常规标本包埋方法进行包埋、聚合。

1.2.4　实验组Ⅲ　制样时采用 TO 型生物制片透明剂制备的石蜡组织块，TO 型生物制片透明剂替代二甲苯常规脱蜡途径转电镜制样，操作步骤同实验组Ⅰ。

1.2.5　实验组Ⅳ　制样时采用 TO 型生物制片透明剂制备的石蜡组织块，TO 型生物制片透明剂替代二甲苯快速脱蜡途径转电镜制样，操作步骤同实验组Ⅱ。

1.3　透射电子显微镜观察　取环氧树脂组织块在 Leica EM TRIM2 修块机对组织块进行修整后，在 Leica EM UC7 切片机上制备 0.5 μm 厚度半薄切片光镜定位至所需部位，再制备 60 nm 厚度超薄切片，醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色后，于日本电子 JEM-1400PLUS 型透射电镜下进行观察。并对制样耗时、切片难度和观察效果进行评分。

2　结　　果

2.1　各组制片方法的制作和效果比较　TO 型生物制片透明剂制备的石蜡组织块、TO 型生物制片透明剂常规脱蜡途径转电镜制样效果和二甲苯制备的石蜡组织块、二甲苯常规脱蜡途径转电镜制样的效果比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；其他项目比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　各组制作的耗时、切片难度及观察效果比较（分）

组别	制样耗时	切片难度	观察效果
对照组	3	3	3
实验组Ⅰ	2	2	2
实验组Ⅱ	5	1	1
实验组Ⅲ	2	3	3
实验组Ⅳ	5	2	2

注：以对照组为基准分 3 分；1 分表示耗时最长，5 分表示耗时最短；1 分表示切片困难，5 分表示切片容易；1 分表示观察效果较差，5 分表示观察效果好

2.2　各组制片在透射电镜下的效果比较　石蜡组织块转透射电镜的标本超微结构保存均较电镜专用固定液差，但可用于临床超微病理诊断。各组超微结构保存情况比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 1。

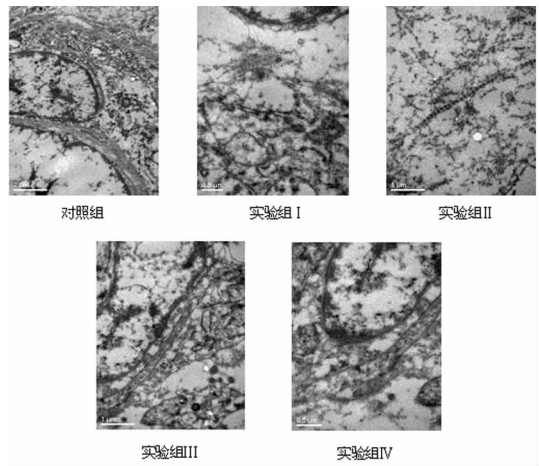

图 1　各实验组透射电镜下的形态

3　讨　　论

石蜡组织块转电镜制样的目的是通过组织的超微结构的改变进行协助诊断，因此，组织超微结构保存的好坏是转电镜制样能否成功的基础。目前，临床上多用甲醛对活检组织固定，甲醛固定迅速，穿透力强，能较好地固定蛋白质和糖原，对酶活性保存较好。与戊二醛比较，甲醛在细胞的超微结构方面要差些，但对于协助诊断影响不大。尤其是肾穿刺组织在石蜡切片中已定位肾小球，所以优于新鲜组织直接电镜检测[13]，就组织固定而言，确保所用试剂符合要求，固定时间足够，保存时间不要太长即可。

TO 型生物制片透明剂对石蜡的溶解度和溶解速度比二甲苯要差一些，因此，利用 TO 型生物制片透明剂替代二甲苯脱蜡时，可根据情况采取相应措施：脱蜡时间可适当延长；脱蜡温度可适当调高，但不超过 30 ℃，以免组织损伤和变硬；取材时组织尽可能小一些；脱蜡中途摇晃装标本的青霉素瓶，让标本块与试剂充分接触[10]；采用微波炉替代恒温箱，让标本受热均匀更好地脱蜡[14]。

由 TO 型生物制片透明剂制作的石蜡组织块采用 TO 型生物制片透明剂常规脱蜡时由于相容性最好，因此切片难度和观察效果与以往全部采用二甲苯的标本无明显差别。由二甲苯制作的石蜡包埋块采用 TO 型生物制片透明剂脱蜡时，由于试剂的不同，对切片和观察效果稍有影响，但差异不大，完全用 TO 型生物制片透明剂替代二甲苯以减少对环境和实验者的危害[15]。快速脱蜡方法虽然对切片难度和观察效果有一定影响，但在可接受范围内，且节约了实验者大量的时间，也不失为一种良好的标本制备方法。

完成的电镜制样组织块，应当软硬适宜，方便切片。所使用的环氧树脂 812 的比例，应根据实验室实际温度和湿度进行适当调整。配制环氧树脂 812 时根据实际情况，考虑是否需要进行除潮。聚合时，应加热聚合至组织块硬度适宜以确保组织块符合制样要求。

对电镜制样组织块进行修块时，应当在尽可能不去修掉所要观察面的组织的同时，将周围多余环氧树脂修掉。进行半薄切片定位时，用新制备的玻璃刀，将组织块表面打磨光滑后，切半薄切片用甲苯胺蓝染色（染色深度适宜，不要过深或过浅），根据光镜所见，选取所需区域保留，将多余组织修掉。进行超

薄切片时,应在尽可能少切组织块表面的情况下,切出符合要求的超薄切片,以免切出的超薄切片不是需要观察的部分。

综上所述,不管是二甲苯还是 TO 型生物制片透明剂进行制样的石蜡包埋块,采用 TO 型生物制片透明剂替代二甲苯常规脱蜡途径转电镜制样,各组效果差异不大。使用 TO 型生物制片透明剂替代二甲苯快速脱蜡途径转电镜制样,对效果有一定影响,但仍可为快速超微诊断提供参考。TO 型生物制片透明剂可用于超微病理诊断中石蜡组织块转电镜制样时脱蜡。

参考文献

[1] 范京川,王红,徐晨,等. 离心速度及时间对培养细胞透射电镜样品制备的影响[J]. 重庆医科大学学报,2009,12(8):1008-1010.

[2] 盛金良,刘升学,杨江华. 一种石蜡组织块转制透射电镜标本的方法[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2002,20(3):195-197.

[3] 韩俊平,高长. TO 型生物制片透明剂的应用[J]. 医学信息,2009,11(1):262-263.

[4] 张美玉,李连达. 一种新型环保透明剂替代二甲苯制片的探讨[J]. 中药药理与临床,2011,9(5):105-107.

[5] 宋颖,屈建国,洪涛,等. 基于石蜡切片定位的超薄切片技术的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2016,17(22):3193-3195.

[6] 王萍,任力. 常规石蜡包埋组织的电镜制样及结果观察[J]. 诊断病理学杂志,2009,10(6):475.

[7] 曲淑贤,吕广艳,高船舟,等. 石蜡半薄切片制作透射电镜的方法[J]. 大连医科大学学报,2009,31(4):355-356.

[8] 肖莎,肖军,余力. 福尔马林固定及石蜡包埋组织透射电镜样品制备[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1999,12(4):475.

[9] 孙榆,应希,马千里,等. 石蜡包埋标本用于制作树脂半薄大切片的方法[J]. 第三军医大学学报,2003,25(16):1488-1489.

[10] 陆晓云,何松,杨书云,等. 石蜡组织转制电镜标本的优化技术[J]. 交通医学,2010,9(1):87-88.

[11] 王晶,朱晓滨,孙开华,等. 快速脱蜡超薄切片用于超微病理诊断[J]. 临床与实验病理学杂志,1995,18(3):244-245.

[12] 陆月良,颜永碧. 石蜡组织块改制超薄切片的方法[J]. 电子显微学报,1999,18(3):386-388.

[13] 魏志敏,马瑞霞,刘丽秋. 糖尿病肾病病理分型和肾组织内血管紧张素 2 表达的相关性分析[J]. 临床肾脏病杂志,2016,21(8):466-470.

[14] 夏勤,刘禄,杨娜,等. 新型环保生物组织透明剂在病理技术中的应用[J]. 临床医药实践,2014,10(1):35-36.

[15] 柴利,张翠薇,张旭. TO 型生物制片透明剂与二甲苯在病理制片中的应用比较[J]. 现代医药卫生,2012,22(12):1808-1809.

(收稿日期:2017-01-21　修回日期:2017-03-19)

(上接第 1902 页)

好的相关性和一致性,结果有可比性,能为临床提供稳定且准确的检测结果。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02:医学实验室质量和能力认可准则[EB-OL]. 2013-11-22.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedurecomparison and bias estimation using patient samples; ApprovedGuideline-Third Edition[S]. CLSI EP9-A3,2013.

[3] 徐建华,刘冬冬,戴永辉,等. CLSI EP9-A3 在临床生化方法学比对中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(5):346-348.

[4] 林莉,戴永辉,刘冬冬,等. 三种不同方法测定糖化血红蛋白的结果比对和偏移评估分析[J]. 中华医学杂志,2016,96(8):650-654.

[5] 徐建华,刘冬冬,黄宪章,等. 新指南 CLSI EP9-A3 在方法学比对及偏移评估中的应用[J]. 中华医学杂志,2015,95(12):894-897.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison andbias estimation usingpatient samples, Approved Guideline-Second e-dition[S]. CLSI EP9-A2, 2002.

[7] 石文,戴永辉,邱峰,等. CLSI EP9-A3 在血液分析仪比对中的应用[J]. 临床检验杂志,2016,34(1):67-69.

[8] Araújo PA, Thomas D, Sadeghieh T, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals to Beckman Coulter DxC biochemical assays[J]. Clin Biochem,2015,48(13/14):870-880.

[9] 胡丽涛,王治国. 血凝分析仪的性能评估方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):975-977.

[10] 张磊,任晓艳,何超,等. 应用 CLSI EP9-A2 文件对不同血细胞分析仪进行比对[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(14):1988-1990.

(收稿日期:2017-01-22　修回日期:2017-03-20)