



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112014192 A

(43) 申请公布日 2020.12.01

(21) 申请号 202010922634.8

(22) 申请日 2020.09.04

(71) 申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市花溪区贵州大学西校区

(72) 发明人 陈祥 周志楠 张艳 杨沛方  
惠茂茂

(74) 专利代理机构 贵阳贵知知识产权代理事务所(普通合伙) 52115

代理人 曾香兰 蒋琳琳

(51) Int. Cl.

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图7页

(54) 发明名称

一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法,该方法具体步骤包括:脱蜡、水化、苏木素染色、分化与反蓝、伊红染色、梯度脱水、风干与封片、拍照与分析。该方法具有操作简便、快速高效、省时、特异性强、有效解决了脱蜡不干净、标本不着色、染色太深、着色不均、标本有杂质、颗粒等现象,为指导生物科学技术研究应用及其他动物组织卵巢组织石蜡切片提供较高的研究价值。

1. 一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法,其特征在于,包括如下步骤:脱蜡、水化、苏木素染色、分化与反蓝、伊红染色、梯度脱水、风干与封片、拍照与分析。

2. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述脱蜡的具体步骤为:用二甲苯溶液浸泡切片10-15min,更换二甲苯溶液,再浸泡10-15min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡5-10min,取出。

3. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述水化的具体步骤为:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡5-8min,更换无水乙醇溶液,再浸泡3-5min,回收无水乙醇,再依次放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡3-5min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡3-5min,重复3次,再用自来水冲洗1-2min。

4. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述苏木素染色的具体步骤为:将水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液,每个组织滴加100-200 $\mu$ L,染色3-5min,染色后用自来水冲洗切片1min,反复冲洗3次,擦干。

5. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述分化与反蓝的具体步骤为:向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化5-15s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝10-20s,自来水冲洗切片。

6. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述伊红染色的具体步骤为:将分化与反蓝后的切片擦干,向组织中滴加100-200 $\mu$ L伊红染色液染色3-5min,完毕后弃去切片中的伊红染色液。

7. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述梯度脱水的具体步骤为:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡1-3min,回收无水乙醇溶液。

8. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述风干与封片的具体步骤为:将梯度脱水后的切片再次使用二甲苯溶液浸泡1-3min,更换二甲苯溶液,继续浸泡1-3min,弃去二甲苯溶液,擦干切片多余二甲苯,室温放置3-5min,待二甲苯溶液晾干后,向组织中滴加中性树胶,并用盖玻片进行封片。

9. 根据权利要求1所述的HE染色方法,其特征在于:所述拍照与分析的具体步骤为:待中性树胶风干后,将封片置于显微镜下进行拍照,分别用10 $\times$ 、20 $\times$ 、30 $\times$ 、40 $\times$ 各倍镜下选取视野较好的三张图片进行拍照、保存于分析。

10. 根据权利要求1-9任一项所述的HE染色方法,其特征在于:所述HE染色方法还适用于其他动物卵巢组织石蜡切片的染色研究。

## 一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及涉及生物科学技术领域,特别涉及一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法。

### 背景技术

[0002] 我们在显微镜下观察各类细胞时需要把组织或细胞做成切片或者涂片,组织或细胞的厚度一般在5-20微米,在这个厚度的条件下,组织和细胞均会具有较好的透光性,几乎没有颜色,但无色的细胞或组织十分不利于人们的观察,需要给细胞或组织加以染色来更好的判断其形态、结构、大小、分布等情况。科学 researchers 研究出了许多种给细胞或组织上色的方法,其中HE染色是人们最常用的染色方法之一。

[0003] HE染色全称为苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-Eosin staining)是最基本的病理学染色技术,也是石蜡切片中最常用的染色方法之一。它是一种复合的染色方法,使用两种染料,一种是苏木精,其前体成分为苏木素,从洋树木的树干中提取。苏木精染液为碱性,主要使细胞核内的染色质与胞质内的核酸着紫蓝色;伊红是化学合成的物质为酸性染料,主要使细胞质和细胞外基质中的成分着红色。1879年,Cook J在《Anatomy&Physiology》中首次描述了苏木精染色方法和具体的染色流程。现如今HE染色已被广泛用于人类、动植物的科学研究中,广大研究学者在HE染色实验中也取得了十分不错的成绩,这使得HE染色最终成为了组织学、病理学中染色的标准方法。但是HE染色易操作过程中易出现以下问题:(1)易脱落;(2)染色不均匀;(3)染色模糊不清;(4)易褪色;(5)容易出现小水珠杂质;(6)产生气泡;(7)易出现色素样颗粒。

[0004] 申请号CN201911130826.9,一种组织切片的HE染色方法,其特征在于包括分为组织切片的制备和切片染色两部分。其中切片染色步骤包括(1)脱蜡:将组织切片放入二甲苯中脱蜡四次,每次脱蜡时间为3-7min;(2)洗脱二甲苯:脱蜡后将切片放入无水乙醇洗脱二甲苯三次,每次1-3min;(3)组织入水:洗脱二甲苯后用高浓度到低浓度梯度的酒精依次进行组织进水过程,在每个浓度的酒精内浸泡1-3min,然后水洗;(4)细胞核染色:水洗后将组织切片放入一缸苏木精染色液中染色5-20min,然后依次进行水洗、分化、水洗,在显微镜下观察染色是否深浅合适,再用自来水冲洗蓝化5-10min;(5)细胞质染色:用自来水蓝化后,将组织切片放入一缸伊红染色液中染色20s-60s,然后采用低浓度到高浓度梯度的酒精依次进行清洗,每次清洗1-3min,再用无水乙醇洗涤三次,每次洗涤1-3min;(6)组织透明:染色完成后,将组织切片分四次放在二甲苯或环保透明剂中进行透明,每次浸泡1-3min;然后用中性树胶封固组织切片。

[0005] 申请号CN201911130826.9存在的技术问题:脱蜡时间较短,脱蜡不充分,导致着色慢,染色不均匀,易褪色等现象。

[0006] 申请号CN201910746962.4,一种组织学切片染色方法,其特征在于包括(1)将生物组织切片、烘干、脱蜡,梯度酒精水化至水;(2)采用天青石蓝溶液浸泡;(3)采用苏木素染液染色;(4)水流冲洗至蓝化;(5)梯度酒精脱水;(6)采用伊红染液染色;(7)采用二甲苯透明;

(8)封片。本发明苏木素染液体系中添加了乙酸,且苏木素染色经蓝化后,直接进行脱水步骤,至100%酒精后进行伊红染色,50%的醇溶液中滴加适量乙酸。切片HE染色方法,其特征在于,脱蜡为采用二甲苯浸泡两次,每次6分钟,后用50.%二甲苯与50%酒精等体积混合后浸泡3分钟。水化的为依次采用体积浓度为100%、100%、90%、80%、70%、50%的酒精梯度处理;脱水为依次采用体积浓度为50%、70%、80%、90%、100%、100%的酒精梯度处理,所述50%酒精中加入浓度为6%的乙酸。

[0007] 申请号CN201910746962.4,存在的技术问题:易出现染色不均匀,容易出现小水珠杂质和易出现色素样颗粒。

[0008] 为了有效解决HE染色中出现的问题,发明人通过对黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色进行了大量的实验,摸索出黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法,该方法具有操作简便、快速高效、省时、特异性强、有效解决了脱蜡不干净、标本不着色、染色太深、着色不均、标本有杂质、标本有颗粒状等现象。

### 发明内容

[0009] 本发明的目的提供一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法。

[0010] 本发明所述的一种用于黔北麻羊卵巢组织石蜡切片的HE染色方法具体步骤为:脱蜡、水化、苏木素染色、分化与反蓝、伊红染色、梯度脱水、风干与封片、拍照与分析。

[0011] 所述脱蜡的具体步骤为:用二甲苯溶液浸泡切片10-15min,更换二甲苯溶液,再浸泡10-15min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡5-10min,取出。

[0012] 所述水化的具体步骤为:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡5-8min,更换无水乙醇溶液,再浸泡3-5min,回收无水乙醇,再依次放入90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡3-5min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡3-5min,重复3次,再用自来水冲洗1-2min。

[0013] 所述水化的具体步骤为:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡5-8min,更换无水乙醇溶液,再浸泡3-5min,回收无水乙醇,再依次放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡3-5min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡3-5min,重复3次,再用自来水冲洗1-2min。

[0014] 所述苏木素染色的具体步骤为:将水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液,每个组织滴加100-200 $\mu$ L,染色3-5min,染色后用自来水冲洗切片1min,反复冲洗3次,擦干。

[0015] 所述分化与反蓝的具体步骤为:向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化5-15s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝10-20s,自来水冲洗切片。

[0016] 所述伊红染色的具体步骤为:将分化与反蓝后的切片擦干,向组织中滴加100-200 $\mu$ L伊红染色液染色3-5min,完毕后弃去切片中的伊红染色液。

[0017] 所述梯度脱水的具体步骤为:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡1-3min,回收无水乙醇溶液。

[0018] 所述梯度脱水的具体步骤为:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡1-3min,回收无水乙醇溶液。

[0019] 所述风干与封片的具体步骤为:将梯度脱水后的切片再次使用二甲苯溶液浸泡1-3min,更换二甲苯溶液,继续浸泡1-3min,弃去二甲苯溶液,擦干切片多余二甲苯,室温放置3-5min,待二甲苯溶液晾干后,向组织中滴加中性树胶,并用盖玻片进行封片。

[0020] 所述拍照与分析的具体步骤为:待中性树胶风干后,将封片置于显微镜下进行拍照,分别用10×、20×、30×、40×各倍镜下选取视野较好的三张图片进行拍照、保存于分析。

[0021] 所述HE染色方法还适用于其他动物卵巢组织石蜡切片的染色研究。

[0022] 本发明的有益效果

[0023] 1、本发明的HE染色方法在步骤脱蜡过程中二甲苯溶液浸泡切片10-15min,更换二甲苯溶液,再浸泡10-15min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡5-10min,浸泡时间比现有技术中3-7min增加到10-15min,现有技术中1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡5-10min增加到5-10min。脱蜡彻底,脱蜡时间要充分,有效解决了脱蜡不干净的技术问题。

[0024] 2、本发明的HE染色方法在苏木素染色和伊红染色步骤中均向每个切片组织中滴加100-200μL染色液,染色3-5min,保证了两种染色液充分覆盖组织,使组织充分着色。

[0025] 3、本发明的HE染色方法在述分化与反蓝步骤中,向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化5-15s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝10-20s,自来水冲洗切片。弱酸的醇溶液环境可去除胞浆或核浆中的染料,而使核酸复合物保持完整,其次,弱酸性环境可减缓后续分化过程,使分化过程可控性增强。通过该步骤的优化创新,将伊红染色调整到脱水步骤之后,保证脱水的梯度酒精无污染,使梯度酒精循环使用次数显著增加,大大降低了实验成本。并且调整后伊红染液的染色时间短,缩短染色周期,简化实验步骤,HE染色效果显著提升。

[0026] 4、本发明所述的制备方法,由于采用低浓度到高浓度梯度的乙醇溶液进行四次梯度脱水,避免组织收缩,有利于使组织完全脱水,标本易着色、着色均匀等优点。

[0027] 5、本发明经过系列的实验对比,得出了该方法具有操作简便、快速高效、省时、特异性强、有效解决了脱蜡不干净、标本不着色、染色太深、着色不均、标本有杂质、标本有颗粒状等现象。

[0028] 说明书附图

[0029] 图1苏木素染色1min的切片组织图

[0030] 图2苏木素染色2min的切片组织图

[0031] 图3苏木素染色3min的切片组织图

[0032] 图4苏木素染色4min的切片组织图

[0033] 图5苏木素染色5min的切片组织图

[0034] 图6二甲苯浸泡一次的切片组织图

[0035] 图7二甲苯浸泡二次的切片组织图

[0036] 图8切片厚度10um的切片组织图

[0037] 图9切片厚度5um的切片组织图

[0038] 图10梯度酒精浸泡2min的切片组织图

[0039] 图11梯度酒精浸泡3min的切片组织图

- [0040] 图12梯度酒精浸泡5min的切片组织图  
[0041] 图13氨水反蓝30s的切片组织图  
[0042] 图14氨水反蓝10s的切片组织图  
[0043] 图15氨水反蓝20s的切片组织图

### 具体实施方式

[0044] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0045] 实施例1:

[0046] (1) 卵巢组织切片脱蜡:用二甲苯溶液浸泡切片10min,更换二甲苯溶液,再浸泡10min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡5min,取出。

[0047] (2) 卵巢组织切片水化:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡5min,更换无水乙醇溶液,再浸泡3min,回收无水乙醇,再依次放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡3min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡3min,重复3次,再用自来水冲洗1min。

[0048] (3) 卵巢组织切片苏木素染色:将水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液,每个组织滴加100 $\mu$ L,染色3min,染色后用自来水冲洗切片1min,反复冲洗3次,擦干。

[0049] (4) 卵巢组织切片分化与反蓝:向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化5s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝10s,自来水冲洗切片。

[0050] (5) 卵巢组织切片伊红染色:将分化与反蓝后的切片擦干,向组织中滴加100 $\mu$ L伊红染色液染色3min,完毕后弃去切片中的伊红染色液。

[0051] (6) 卵巢组织切片梯度脱水:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡1min,回收无水乙醇溶液。

[0052] (7) 卵巢组织切片风干与封片:将梯度脱水后的切片再次使用二甲苯溶液浸泡1min,更换二甲苯溶液,继续浸泡1min,弃去二甲苯溶液,擦干切片多余二甲苯,室温放置3min,待二甲苯溶液晾干后,向组织中滴加中性树胶,并用盖玻片进行封片。

[0053] (8) 卵巢组织切片拍照与分析:待中性树胶风干后,将封片置于显微镜下进行拍照,分别用10 $\times$ 、20 $\times$ 、30 $\times$ 、40 $\times$ 各倍镜下选取视野较好的三张图片进行拍照、保存于分析。

[0054] 实施例2:

[0055] (1) 卵巢组织切片脱蜡:用二甲苯溶液浸泡切片12min,更换二甲苯溶液,再浸泡12min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡8min,取出。

[0056] (2) 卵巢组织切片水化:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡6min,更换无水乙醇溶液,再浸泡4min,回收无水乙醇,再依次放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡4min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡4min,重复3次,再用自来水冲洗2min。

[0057] (3) 卵巢组织切片苏木素染色:将水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液,每个组织滴加150 $\mu$ L,染色4min,染色后用自来水冲洗切片1min,反复

冲洗3次,擦干。

[0058] (4) 卵巢组织切片分化与反蓝:向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化10s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝15s,自来水冲洗切片。

[0059] (5) 卵巢组织切片伊红染色:将分化与反蓝后的切片擦干,向组织中滴加150 $\mu$ L伊红染色液染色4min,完毕后弃去切片中的伊红染色液。

[0060] (6) 卵巢组织切片梯度脱水:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡2min,回收无水乙醇溶液。

[0061] (7) 卵巢组织切片风干与封片:将梯度脱水后的切片再次使用二甲苯溶液浸泡2min,更换二甲苯溶液,继续浸泡2min,弃去二甲苯溶液,擦干切片多余二甲苯,室温放置4min,待二甲苯溶液晾干后,向组织中滴加中性树胶,并用盖玻片进行封片。

[0062] (8) 卵巢组织切片拍照与分析:待中性树胶风干后,将封片置于显微镜下进行拍照,分别用10 $\times$ 、20 $\times$ 、30 $\times$ 、40 $\times$ 各倍镜下选取视野较好的三张图片进行拍照、保存于分析。

[0063] 实施例3

[0064] (1) 卵巢组织切片脱蜡:用二甲苯溶液浸泡切片15min,更换二甲苯溶液,再浸泡15min,再把切片放入体积比为1:1的二甲苯-无水乙醇溶液中浸泡10min,取出。

[0065] (2) 卵巢组织切片水化:将脱蜡处理后的切片放入新的无水乙醇溶液中浸泡8min,更换无水乙醇溶液,再浸泡5min,回收无水乙醇,再依次放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中分别浸泡5min,分别回收各浓度的无水乙醇,将切片置于蒸馏水中浸泡5min,重复3次,再用自来水冲洗1-2min。

[0066] (3) 卵巢组织切片苏木素染色:将水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液,每个组织滴加200 $\mu$ L,染5min,染色后用自来水冲洗切片1min,反复冲洗3次,擦干。

[0067] (4) 卵巢组织切片分化与反蓝:向苏木素染色的切片组织上滴加1%的盐酸乙醇分化

[0068] 15s,并使用自来水冲洗,直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止,再次向组织滴加0.6%氨水反蓝20s,自来水冲洗切片。

[0069] (5) 卵巢组织切片伊红染色:将分化与反蓝后的切片擦干,向组织中滴加200 $\mu$ L伊红染色液染色5min,完毕后弃去切片中的伊红染色液。

[0070] (6) 卵巢组织切片梯度脱水:分别将伊红染色后的切片依次放入70%、80%、90%、100%的无水乙醇溶液中浸泡3min,回收无水乙醇溶液。

[0071] (7) 卵巢组织切片风干与封片:将梯度脱水后的切片再次使用二甲苯溶液浸泡3min,更换二甲苯溶液,继续浸泡3min,弃去二甲苯溶液,擦干切片多余二甲苯,室温放置5min,待二甲苯溶液晾干后,向组织中滴加中性树胶,并用盖玻片进行封片。

[0072] (8) 卵巢组织切片拍照与分析:待中性树胶风干后,将封片置于显微镜下进行拍照,分别用10 $\times$ 、20 $\times$ 、30 $\times$ 、40 $\times$ 各倍镜下选取视野较好的三张图片进行拍照、保存于分析。

[0073] 实验例:为进一步说明本发明的科学性与合理性,进行了以下方法学实验研究:

## [0074] 一、仪器与试剂

## [0075] 1、仪器：

|        | 仪器名称（型号）                        | 主产地                 |
|--------|---------------------------------|---------------------|
|        | 100-1000 $\mu$ L 移液枪（Eppendorf） | 德国艾本德公司             |
|        | 高温高压灭菌锅（HRLM-80）                | 美国 Thermo Fisher 公司 |
|        | 通风橱（SW-CJ-2D）                   | 美国密理博公司             |
|        | 漩涡混匀器（VORTEX 3）                 | 美国 Thermo Fisher 公司 |
|        | 磁力搅拌机（IKAC-MAG HS 4）            | 德国艾卡集团              |
|        | 微波炉（P70D20P-TD（W0））             | 德国艾卡集团              |
| [0076] | 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱（HZQ-F160） | 中国格兰仕集团             |
|        | 变温烘箱（Heratherm 通用型）             | 美国 Thermo Fisher 公司 |
|        | 1000 mL 烧杯                      | 北京六一仪器厂             |
|        | 4 $^{\circ}$ C 冰箱（HYC-390）      | 青岛海尔集团              |
|        | 石蜡切片机（ARM-2216）                 | 湖北安立信医疗实业有限责任公司     |
|        | 恒温水浴锅（HHS-11-4）                 | 上海博讯实业有限公司医疗设备厂     |
|        | 水平脱色摇床（TY80TY80AS）              | 上海沪粤明科学仪器有限公司       |

## [0077] 2、试剂：

[0078] 二甲苯、无水乙醇、1% 盐酸乙醇购自贵州罗德宏信生物有限公司；中性树胶、苏木素染色液、伊红染色液购自北京索莱宝科技有限公司；蒸馏水、氨水为实验室自备。

## [0079] 3、样品：山羊卵巢组织切片

## [0080] 二、HE染色对比试验

## [0081] 1、苏木素染色时间筛选：

[0082] 取水化后的切片置于切片槽中并向有组织的切片上滴加苏木素染色液，每个组织滴加100-200 $\mu$ L，分别按1min、2min、3min、4min、5min进行染色，染色后分别用自来水冲洗切片1min，反复冲洗3次。

[0083] 结果：苏木素染色时间为1min和2min的，出现组织不着色或着色过浅以及不充分的现象，见图1、图2；苏木素染色时间为3min、4min、5min的，组织易着色，见图3、图4、图5；故苏木素染色的优选时间“3-5min”。

## [0084] 2、脱蜡方法筛选：

[0085] 取脱水后的切片分别按以下方法处理：方法一，用二甲苯溶液浸泡1-3min，弃去二甲苯溶液，室温放置3-5min，待二甲苯溶液晾干后，向组织中滴加中性树胶，并用盖玻片进行封片；方法二，用二甲苯溶液浸泡1-3min，更换二甲苯溶液，继续浸泡1-3min，弃去二甲苯溶液，擦干切片多余二甲苯，室温放置3-5min，待二甲苯溶液晾干后，向组织中滴加中性树胶，并用盖玻片进行封片。



[0086] 结果：“方法一”切片组织图模糊，见图6；“方法二”切片图组织图清晰，见图7。故脱蜡方法优选为“用二甲苯溶液浸泡1-3min，更换二甲苯溶液，继续浸泡1-3min，弃去二甲苯溶液，擦干切片多余二甲苯，室温放置3-5min，待二甲苯溶液晾干后，向组织中滴加中性树脂，并用盖玻片进行封片”。

[0087] 3、切片厚度及处理方法考察

[0088] 用切片机对包埋后的蜡块进行切片，切片厚度分为5um和10um，脱蜡完毕后将切片取出放入新的无水乙醇溶液中浸泡5-8min，更换无水乙醇溶液再次将切片放置其中浸泡3-5min，回收无水乙醇，依次将卵巢组织切片分别放入梯度浓度为90%、80%、70%的无水乙醇溶液中各自浸泡，浸泡时间分为2min、3min、5min，分别回收各浓度的无水乙醇，将切片分别置于蒸馏水中浸泡3-5min，重复3次，再使用自来水冲洗1-2min。

[0089] 结果：切片厚度为10um，切片脱水不彻底，染色不均匀，见图8；切片厚度为5um，切片脱水彻底，染色均匀，见图9；故切片厚度“5um”为优选；经梯度浓度90%、80%、70%的无水乙醇浸泡2min的切片，组织图模糊，染色不均匀，见图10；浸泡时间3min和5min的切片组织图模糊清晰，见图11、图12；故浸泡时间优选为“3-5min”。

[0090] 4、氨水反蓝时间考察

[0091] 取苏木素染色后的切片，向切片组织上分别滴加1%的盐酸乙醇分化5s、15s、30s，并使用自来水冲洗，直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止，再次向组织分别滴加0.6%氨水反蓝10s、20s、30s，自来水冲洗切片。

[0092] 结果：盐酸乙醇分化30s，氨水反蓝时间30s的切片出现切片整体过蓝，苏木素无法着色的现象，见图13；盐酸乙醇分化5s或15s，氨水反蓝时间10s或20s的切片苏木素易着色，见图14、图15，故氨水反蓝时间优选方法为“取苏木素染色后的切片，向切片组织上分别滴加1%的盐酸乙醇分化5-15s，并使用自来水冲洗，直至冲掉1%盐酸乙醇溶液为止，再次向组织分别滴加0.6%氨水反蓝10-20s，自来水冲洗切片”。

[0093] 虽然，上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验，对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作出一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范畴。

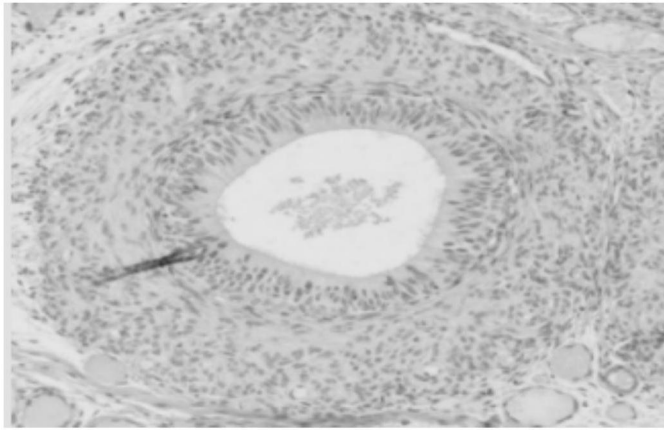


图1

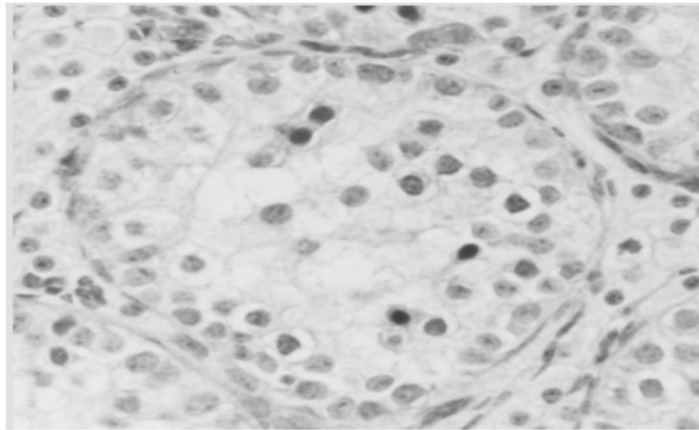


图2

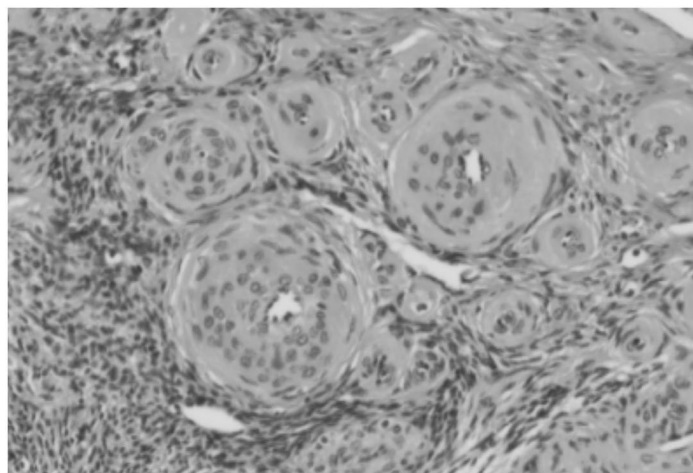


图3

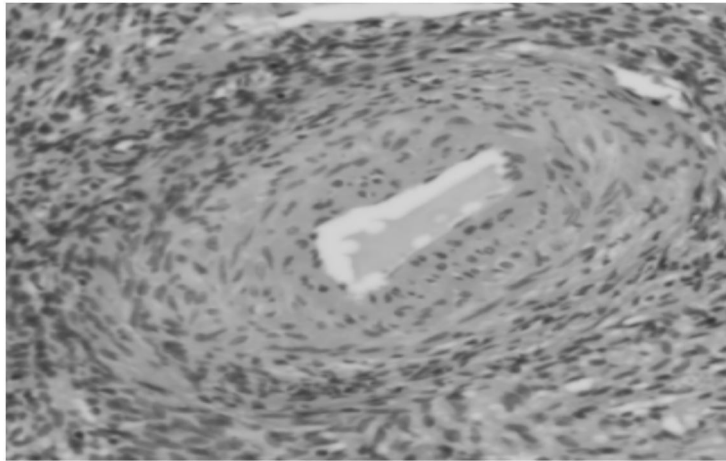


图4

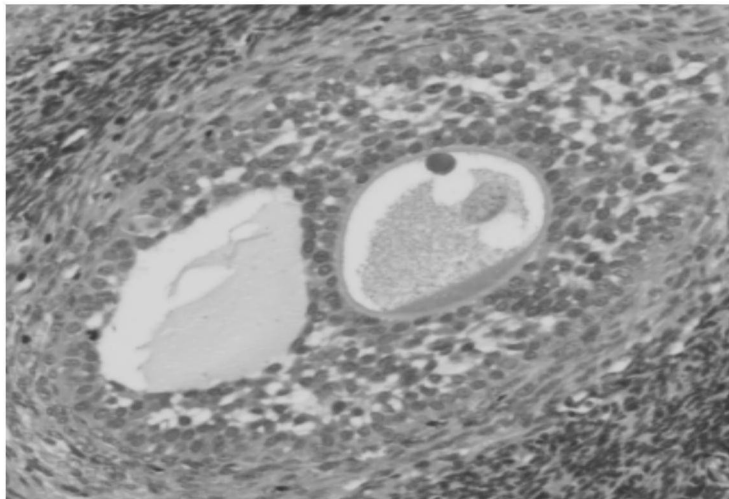


图5

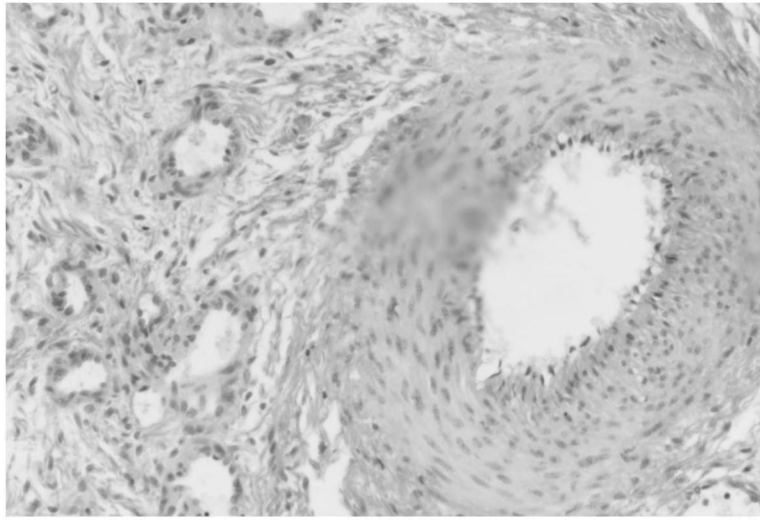


图6

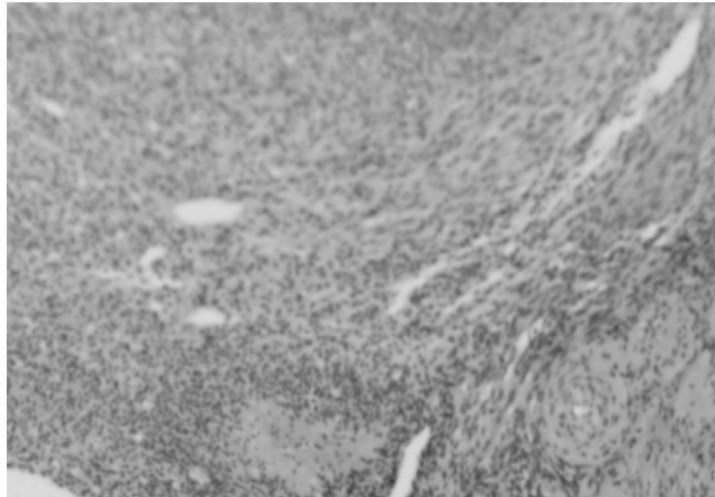


图7

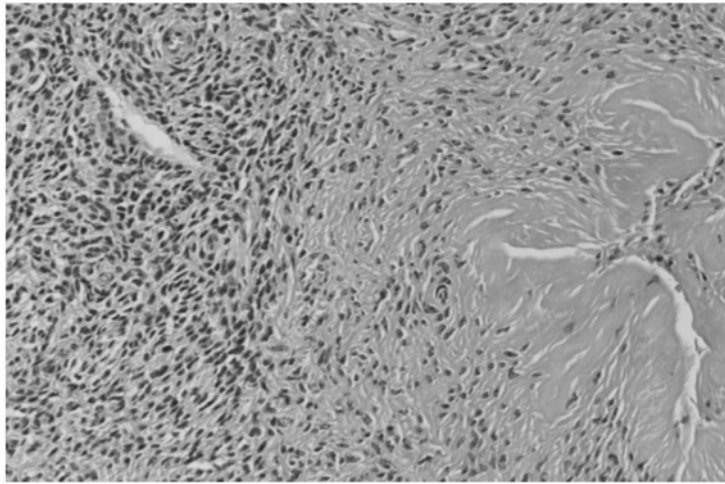


图8

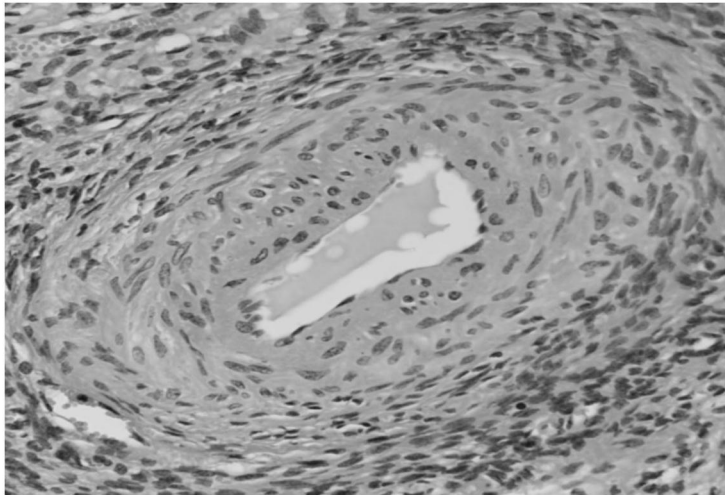


图9

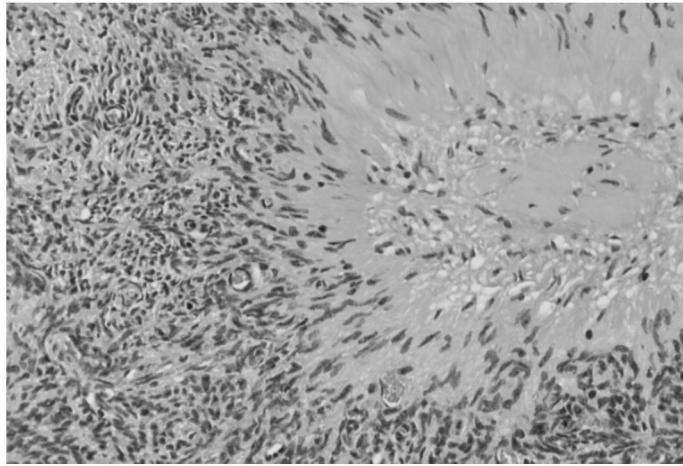


图10

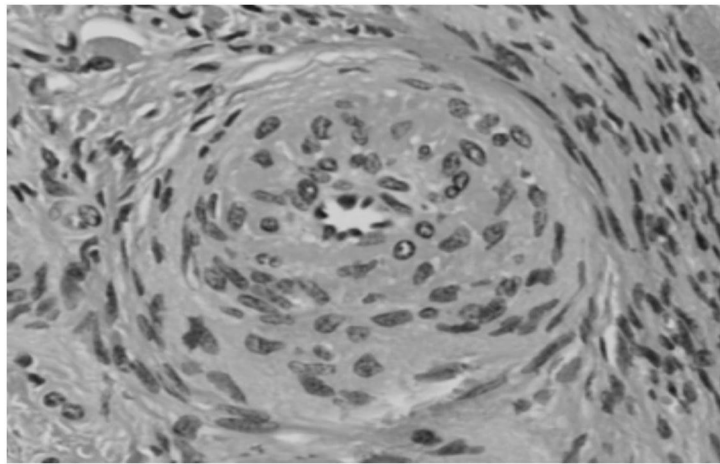


图11

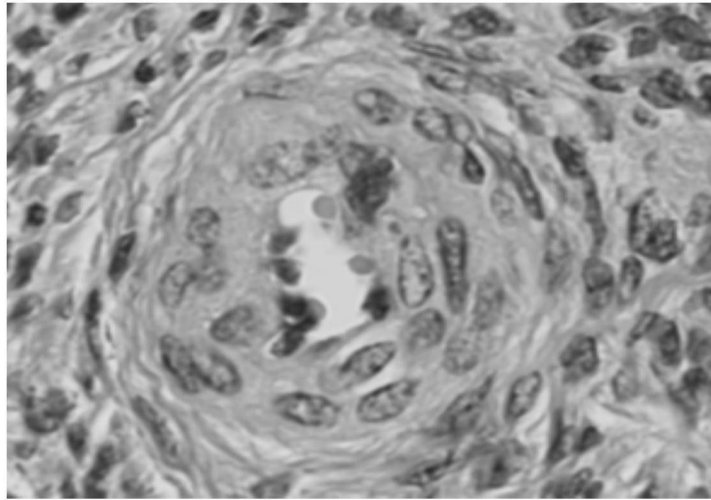


图12

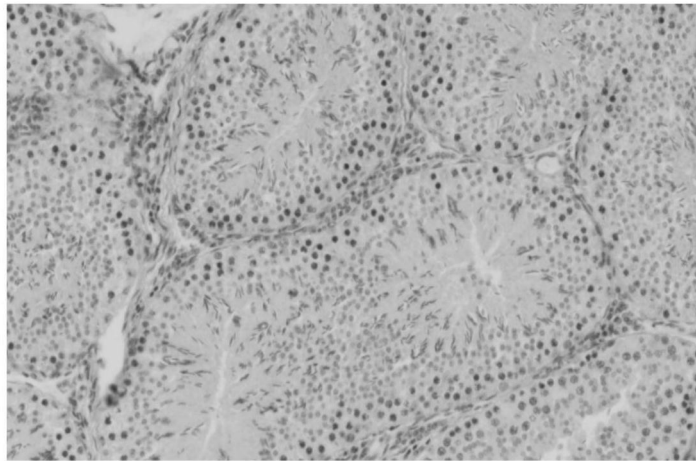


图13

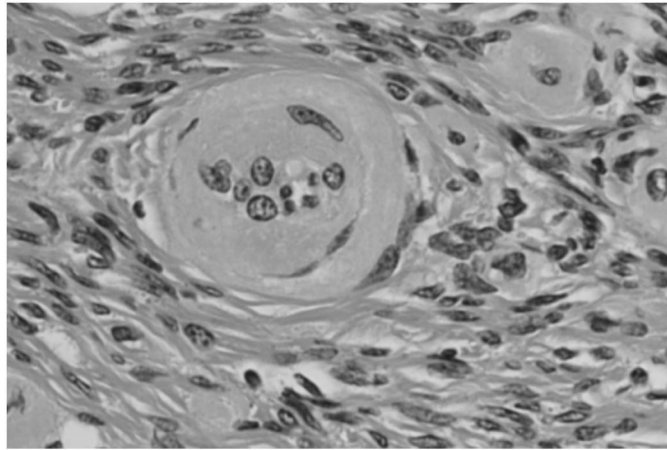


图14

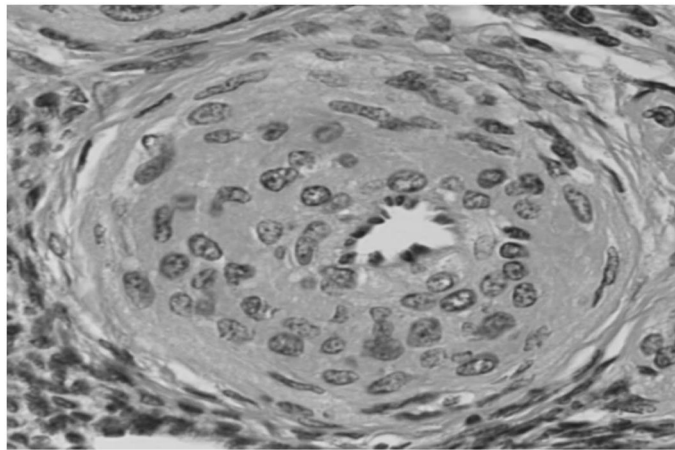


图15