

1. 一种基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:包括以下步骤:

对组织进行连续切片,分成若干份,对所有的组织切片进行染色标记后,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上;或者:所有的组织切片自带荧光信号无需标记,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上;然后对扫描的组织切片图片根据载玻片编号对组织切片按顺序命名,使所有图片能按切片原始顺序排列,进行校准,对校准好的图片进行3D合成,获得所述基于组织切片的三维模型。

2. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述组织为实心组织或空心组织,所述实心组织为脑、肝、肾、甲状腺、胰腺、睾丸中的至少一种,所述空心组织为心、肺、食管、胃、肠、膀胱中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述若干份为6~96份。

4. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述染色标记为针对组织切片的各种染色标记,具体为免疫组织化学染色、苏木素-伊红染色、尼氏染色、胶原纤维染色、网状纤维染色、FJ染色、tunnel染色、DAPI染色。

5. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述“对所有的组织切片进行染色标记后,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上”包括以下步骤:将所有的组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中;常温下,切片用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.3%的 H_2O_2 孵育30分钟;用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.5%的Triton孵育30分钟;在浓度为3%的BSA中孵育30分钟;在一抗中孵育24小时,温度为4℃;用PBS洗三次,每次五分钟;在生物素化的二抗中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;在AB液中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;在DAB试剂盒中孵育5分钟;用PBS洗三次,每次五分钟;贴片后水化、复染、分化、脱水、透明、封片、保存;

或,将所有的组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中;常温下,切片用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.5%的Triton孵育30分钟;在浓度为3%的BSA中孵育30分钟;在一抗中孵育24小时,温度为4℃;用PBS洗三次,每次五分钟;在荧光二抗中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;贴片、封片、保存;

或,针对石蜡切片组织,首先将石蜡切片贴到载玻片上,常温下向每张切片组织滴加100 μ l的0.3% H_2O_2 孵育30分钟,PBS洗三次,每次5分钟,抗原修复后破膜,PBS洗三次,每次5分钟,然后用蒸馏水洗5分钟,待切片晾干后用免疫组化笔围绕组织画圈,晾2小时,常温下向上述圆圈内滴加100 μ l的3%胎牛血清孵育30分钟,甩掉封闭液,4℃下向圆圈内滴加100 μ l的一抗孵育24小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μ l生物素化的二抗孵育2小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μ l的AB液孵育2小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μ l的DAB染液反应5分钟,PBS洗三次,每次5分钟;将切片浸入自来水中,复染、分化、脱水、透明、封片、保存。

6. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述“所有的组织切片自带荧光信号无需标记,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上”包括以下步骤:将所有的组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中,将所有组织切片清洗后进行贴片,然后封片、保存。

7. 根据权利要求5或6所述的基于组织切片的三维模型的构建方法,其特征在于:所述

贴片包括以下步骤：将细胞培养板每孔中的切片贴到对应的明胶包被好的载玻片上，并将载玻片做好标记，贴片时选用直径为2-5mm的画眉笔，贴好的切片保持其自然形态。

8. 根据权利要求1所述的基于组织切片的三维模型的构建方法，其特征在于：所述校准是以其中一张图片为基准作为基准图片，对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准。

9. 根据权利要求8所述的基于组织切片的三维模型的构建方法，其特征在于：所述对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准是以基准图片为标准校准下一张图片，之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片，按此原则直到所有的图片校准完成。

10. 根据权利要求9所述的基于组织切片的三维模型的构建方法，其特征在于：所述基准图片的选择是以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则。

一种基于组织切片的三维模型的构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域,尤其涉及一种基于组织切片的三维模型的构建方法。

背景技术

[0002] 免疫组织化学(Immunohistochemistry,以下均简称IHC)又称免疫细胞化学,是指带显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应,对相应抗原进行定性、定位、定量测定的一项新技术。它将免疫反应的特异性、组织化学的可见性巧妙地结合起来,借助显微镜(包括荧光显微镜、电子显微镜)的显像和放大作用,在细胞、亚细胞水平检测各种抗原物质(如蛋白质、多肽、酶、激素、病原体和受体等)。

[0003] 随着显微成像技术的进步,近十年陆续出现了如下三种三维(3D)组织形态学技术:1.组织块透明扫描技术(Dodt,et al.,Nat Methods 2007;Becker,et al.,CSH Protocols,2013),2.双光子断层扫描技术(Ragen,et al.,Nat Methods 2012),3.荧光微光学切片断层呈像技术(Li,Gong,Zhang,et al.,Science,2010;Gong,Xu,et al.,Neuroimage,2013)。常规的IHC技术虽能呈现组织抗原清晰的二维形态和分布,但无法展现抗原在组织中的三维形态和分布。现有组织3D技术也存在如下缺点:1.第一种组织块透明扫描技术存在以下缺陷:耗时长(约1-2月)、组织易变形、大组织块透明效果差;2.双光子断层扫描技术和荧光微光学切片断层呈像技术只能针对带有自发荧光标签的组织,不能通过抗体标记组织抗原;3.以上这些3D技术的实现均需要昂贵的实验设备。

[0004] 有鉴于此,有必要提供一种利用常规实验仪器设备能进行的基于免疫组织化学切片的三维模型的构建方法。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的缺陷,本发明的目的是提供一种基于组织切片的三维模型的构建方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 本发明的一个方面提供了一种基于组织切片的三维模型的构建方法,包括以下步骤:

[0008] 对组织进行连续切片,分成若干份,对所有的组织切片进行染色标记后,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上;或者:所有的组织切片自带荧光信号无需标记,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上;然后对扫描的组织切片图片根据载玻片编号对组织切片按顺序命名,使所有图片能按切片原始顺序排列,进行校准,对校准好的图片进行3D合成,获得所述基于组织切片的三维模型。

[0009] 所述组织为实心组织或空心组织,所述实心组织为如脑、肝、肾、甲状腺、胰腺、睾丸等中的至少一种,均可用冰冻切片的方法直接进行3D重构;所述空心组织为心、肺、食管、

胃、肠、膀胱等中的至少一种,均可用石蜡切片的方法直接进行3D重构。

[0010] 所述切片的厚度为4-30 μm 。

[0011] 所述若干份为6~96份,优选24份。

[0012] 所述染色标记为针对组织切片的各种染色标记(如免疫组织化学染色(IHC)、苏木素-伊红染色(HE)、尼氏染色、胶原纤维染色、网状纤维染色、FJ染色、tunnel染色、DAPI染色等),及通过转基因或病毒注射等手段使组织细胞表达自发荧光蛋白而无需进行后续标记。

[0013] 所述“对所有的组织切片进行染色标记后,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上”包括以下步骤:将所有的组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中;常温下,切片用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.3%的 H_2O_2 孵育30分钟;用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.5%的Triton孵育30分钟;在浓度为3%的BSA中孵育30分钟;在一抗中孵育24小时,温度为4 $^{\circ}\text{C}$;用PBS洗三次,每次五分钟;在生物素化的二抗中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;在AB液中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;在DAB试剂盒中孵育5分钟;用PBS洗三次,每次五分钟;贴片后水化、复染、分化、脱水、透明、封片、保存;

[0014] 或,将所有的组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中;常温下,切片用PBS洗三次,每次五分钟;用浓度为0.5%的Triton孵育30分钟;在浓度为3%的BSA中孵育30分钟;在一抗中孵育24小时,温度为4 $^{\circ}\text{C}$;用PBS洗三次,每次五分钟;在荧光二抗中孵育2小时;用PBS洗三次,每次五分钟;贴片、封片、保存;

[0015] 或,针对石蜡切片组织,首先将石蜡切片贴到载玻片上,常温下向每张切片组织滴加100 μl 的0.3% H_2O_2 孵育30分钟,PBS洗三次,每次5分钟,抗原修复后破膜,PBS洗三次,每次5分钟,然后用蒸馏水洗5分钟,待切片晾干后用免疫组化笔围绕组织画圈,晾2小时,常温下向上述圆圈内滴加100 μl 的3%胎牛血清孵育30分钟,甩掉封闭液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下向圆圈内滴加100 μl 的一抗孵育24小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μl 生物素化的二抗孵育2小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μl 的AB液孵育2小时,PBS洗三次,每次5分钟;常温下向圆圈内滴加100 μl 的DAB染液反应5分钟,PBS洗三次,每次5分钟;将切片浸入自来水中,复染、分化、脱水、透明、封片、保存。

[0016] 所述“所有的组织切片自带荧光信号无需标记,将所有组织切片完整贴到对应的载玻片上”包括以下步骤:将所有组织切片分别转入对应的细胞培养板的小孔中,将所有组织切片清洗后进行贴片,然后封片、保存。

[0017] 所述贴片包括以下步骤:将细胞培养板每孔中的切片贴到对应的明胶包被好的载玻片上,并将载玻片做好标记,贴片时选用直径为2-5mm的画眉笔,贴好的切片保持其自然形态。

[0018] 所述校准是以其中一张图片为基准作为基准图片,对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准。

[0019] 所述对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准是以基准图片为标准校准下一张图片,之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片,按此原则直到所有的图片校准完成。

[0020] 所述基准图片的选择是以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则。

[0021] 由于采用上述技术方案,本发明具有以下优点和有益效果:

[0022] 本发明的基于组织切片的三维模型的构建方法不仅能实现常规IHC技术的灵活标

记(如明场、荧光;单标、双标或多标等),而且还能作为一种常规技术来应用,即常规IHC能实现的抗原标记,3D-IHC均可实现,并且应用门槛比现有技术中3D重构技术低很多。

[0023] 本发明的基于组织切片的三维模型的构建方法利用常规IHC能进行抗体标记的特点,在此基础上开发出了应用面更广的3D形态学技术,即:基于免疫组织化学的三维形态学技术(以下均简称3D-IHC),利用常规实验仪器设备能进行大部分组织抗原(主要依赖于抗体的供应)的3D标记,其不仅升华了常规的IHC技术,而且拓展了组织3D技术的应用面。

附图说明

[0024] 图1是本发明实施例对动物组织块进行连续切片的结构示意图。

[0025] 图2是本发明实施例对所有的切片进行免疫组织化学染色后,将其完整贴到对应的载玻片上的结构示意图。

[0026] 图3是本发明实施例对扫描的组织切片图片校准后的效果图。

[0027] 图4是本发明实施例对校准好的图片进行3D合成后的3D效果示意图。

[0028] 图5是本发明实施例对动物组织切片的IHC染色操作流程示意图。

具体实施方式

[0029] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例对本发明做进一步的说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0030] 实施例1

[0031] 本实施例以小鼠脑组织中胆碱能神经元的明场3D重构为例进行说明。

[0032] 第一步,首先用冰冻切片机对小鼠脑组织进行连续切片,切片厚度为16微米,并分成24等份,具体步骤如下(如图1所示,图1是本发明实施例对动物组织块进行连续切片的结构示意图):

[0033] 1、设置好冰冻切片机(莱卡,德国)参数(固定底座温度为16℃,机箱温度为20℃,切片厚度为16微米),并装上全新的刀片(莱卡,德国),然后等待1小时;

[0034] 2、将切片机座子表面涂满冰冻切片包埋剂(樱花,日本),约1毫米厚,等其凝固后用切片机将其表面削平;

[0035] 3、沿小鼠脑组织矢状中线将其切成两等份,然后垂直右脑(也可用左脑)切面在脑组织上戳两个小洞(为了方便后续的脑片校准工作);

[0036] 4、在右脑切面涂抹少许冰冻切片包埋剂,将其快速贴合到削平的切片机座子表面;

[0037] 5、将右脑组织表面涂抹一层冰冻切片包埋剂后,将其放入切片机冰冻20分钟;

[0038] 6、连续切24片脑组织,分别放入装有磷酸盐缓冲液(PBS)的24个储样杯(普瑞美斯,武汉)中,在切片机上按标记顺序摆放好24个装有半杯PBS的储样杯,然后重新再切24片脑组织并分别放入这24个储样杯中;重复该步骤直到切完脑组织;该步骤是为了便于脑片的准确排序。

[0039] 第二步,对所有的切片进行免疫组织化学染色后,将其完整贴到对应的载玻片上,具体步骤如下(如图2和图5所示,图2是本发明实施例对所有的切片进行免疫组织化学染色

后,将其完整贴到对应的载玻片上的结构示意图;图5是本发明实施例对动物组织切片的IHC染色操作流程示意图。):

[0040] 1、将第一步24个储样杯中的切片分别转入对应的24孔细胞培养板(康宁,美国)的小孔中;

[0041] 2、常温(RT)下,脑片用PBS洗三次,每次五分钟;以下如无特殊说明,均为RT;

[0042] 3、用浓度为0.3%的H₂O₂(国药,中国;溶于PBS)孵育30分钟;

[0043] 4、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0044] 5、用浓度为0.5%的曲拉酮(Triton)(国药,中国;溶于PBS)孵育30分钟;

[0045] 6、在浓度为3%的胎牛血清(BSA)(普瑞美斯,武汉;溶于PBS)中孵育30分钟;

[0046] 7、在一抗 Goat-anti-ChAT, Millipore, 美国; 1:100 (100倍稀释), 溶于浓度为3%的BSA中孵育24小时,温度为4℃,为节省抗体,孔板摆放角度与水平呈10~15度。

[0047] 8、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0048] 9、在生物素化的二抗(biotinylated-anti-Goat, Vector, 美国; 1:300 (300倍稀释), 溶于浓度为3%的BSA)中孵育2小时;

[0049] 10、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0050] 11、在AB液(Vector, 美国; 1:1:300 (300倍稀释), 溶于3%BSA)中孵育2小时;

[0051] 12、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0052] 13、在DAB试剂盒(普瑞美斯;武汉)中孵育5分钟;

[0053] 14、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0054] 15、贴片:将每孔中的脑片贴到对应的明胶包被好的载玻片(普瑞美斯,武汉)上,并将载玻片做好标记;贴片时选用直径为2-5mm的画眉笔,贴好的脑片要保持其自然形态;

[0055] 16、水化:待脑片完全晾干后,将载玻片浸入自来水中;

[0056] 17、复染:取出载玻片并将水滴快速甩干(约20秒,时间不宜过长),然后将载玻片上的脑片浸入苏木素染液(南京建成,南京)3分钟后流水冲洗;

[0057] 18、分化:将载玻片上的脑片浸入浓度为1%的盐酸-酒精(国药,中国;1份浓盐酸溶于99份浓度为75%的酒精)1分钟后,快速用流水冲洗;

[0058] 19、脱水:分别在浓度为50%的酒精、浓度为70%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为90%的酒精、浓度为95%的酒精中浸泡5分钟,然后在浓度为100%的酒精I和浓度为100%的酒精II中分别浸泡10分钟;

[0059] 20、透明:将脑片在二甲苯(国药,中国)I和二甲苯II中分别浸泡10分钟(时间可稍长,但不宜超过3小时);

[0060] 21、封片:用巴氏吸管(普瑞美斯,武汉)向载玻片的脑片区滴加2滴中性树胶(国药,中国),然后缓慢盖上盖玻片(普瑞美斯,武汉);

[0061] 22、晾干:封好的载玻片在通风厨中吹24小时后,放入载玻片盒收好。

[0062] 第三步,对扫描的组织切片图片进行重新命名,使所有图片能按切片原始顺序排列,然后以其中一张图片为基准,对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准,具体步骤如下(图3是本发明实施例对扫描的组织切片图片校准后的效果图。):

[0063] 1、用全自动扫描显微镜(VS120, Olympus, 日本)对所有脑片进行全图拍摄(20倍物镜),并根据载玻片编号对脑片按顺序命名,使其最终都能按原始顺序排列;如第一张载玻

片的第一张脑片命名为1-1,之后再改为1;第一张载玻片的第二张脑片命名为1-2,之后再改为25(原理为 $1+24$);第五张载玻片的第三张脑片命名为5-3,之后再改为53(原理为 $5+2*24$);其余类推。

[0064] 2、选取一张图片作为基准图片,以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则,根据组织原始尺寸,选一张尺寸最大(长宽均最大)的组织切片作为基准,然后以此为标准校准下一张图片,之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片,按此原则直到所有的图片校准完成。

[0065] 第四步,对第三步校准好的图片进行3D合成,具体步骤如下(图4是本发明实施例对校准好的图片进行3D合成后的3D效果示意图):

[0066] 1、将第三步校准后的所有图片都经适当同等倍数的压缩(可通过MATLAB软件(MathWorks,美国)自动完成;

[0067] 2、将所有压缩后的图片用ImageJ软件(National Institutes of Health,美国)整体打包为一个图片文件;

[0068] 3、用Imaris软件(Bitplane,英国)打开上述打包图片,然后根据需要导出3D透视图片。

[0069] 本发明在小鼠脑组织中胆碱能神经元的明场3D重构图像中,不仅首次完整看到了全部胆碱能神经元在脑组织中的分布情况,而且能够对各脑区的胆碱能神经元进行准确计数;不仅为研究和教学工作提供了有力帮助,而且用于疾病模型(如阿尔茨海默病)中时,能方便研究人员更加全面深入的开展研究工作。

[0070] 实施例2

[0071] 本实施例以小鼠脑组织中生长抑素阳性神经元的荧光3D重构为例进行说明。

[0072] 第一步,首先用冰冻切片机对小鼠脑组织进行连续切片,切片厚度为16微米,并分成24等份,具体步骤如下:

[0073] 1、设置好冰冻切片机(莱卡,德国)参数(固定底座温度为 16°C ,机箱温度为 20°C ,切片厚度为16微米),并装上全新的刀片(莱卡,德国),然后等待1小时;

[0074] 2、将切片机座子表面涂满组织包埋剂(樱花,日本),约1毫米厚,等其凝固后用切片机将其表面削平;

[0075] 3、沿小鼠脑组织矢状中线将其切成两等份,然后垂直右脑(也可用左脑)切面在脑组织上戳两个小洞(为了方便后续的脑片校准工作);

[0076] 4、在右脑切面涂抹少许冰冻切片包埋剂,将其快速贴合到削平的切片机座子表面;

[0077] 5、将右脑组织表面涂抹一层OCT后,将其放入切片机冰冻20分钟;

[0078] 6、连续切24片脑组织,分别放入装有磷酸盐缓冲液(PBS)的24个储样杯(普瑞美斯,武汉)中,在切片机上按标记顺序摆放好24个装有半杯PBS的储样杯,然后重新再切24片脑组织并分别放入这24个储样杯中;重复该步骤直到切完脑组织;该步骤是为了便于脑片的准确排序。

[0079] 第二步,对所有的切片进行免疫组织化学染色后,将其完整贴到对应的载玻片上,具体步骤如下:

[0080] 1、将第一步24个储样杯中的切片分别转入对应的24孔细胞培养板(康宁,美国)的

小孔中；

[0081] 2、常温 (RT) 下,脑片用PBS洗三次,每次五分钟;以下如无特殊说明,均为RT;

[0082] 3、用浓度为0.5%的Triton (国药,中国;溶于PBS) 孵育30分钟;

[0083] 4、在浓度为3%的BSA (普瑞美斯,武汉;溶于PBS) 中孵育30分钟;

[0084] 5、在一抗 (Rabbit-anti-SST, Millipore, 美国; 1:500 (500倍稀释), 溶于浓度为3%的BSA) 中孵育24小时, 温度为4℃;

[0085] 6、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0086] 7、在荧光二抗 (AlexaFluor®546-anti-Rabbit, Invitrogen, 美国; 1:300 (300倍稀释), 溶于浓度为3%的BSA) 中孵育2小时, 从此步开始后续步骤中的切片均避光操作;

[0087] 8、用PBS洗三次,每次五分钟;

[0088] 9、贴片:将每孔中的脑片贴到对应的明胶包被好的载玻片 (普瑞美斯,武汉) 上,并将载玻片做好标记,贴片时选用直径为2-5mm的画眉笔,贴好的脑片要保持其自然形态;

[0089] 10、封片:用移液枪 (eppendorf, 德国) 向载玻片的脑片区滴加40微升的荧光切片封片剂 (普瑞美斯,武汉), 然后缓慢盖上盖玻片 (普瑞美斯,武汉);

[0090] 11、保存:封好的载玻片放入暗盒 (普瑞美斯,武汉) 保存。

[0091] 第三步,对扫描的组织切片图片进行重新命名,使所有图片能按切片原始顺序排列,然后以其中一张图片为基准,对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准,具体步骤如下:

[0092] 1、用全自动扫描显微镜 (VS120, Olympus, 日本) 对所有脑片进行全图拍摄 (20倍物镜), 并根据载玻片编号对脑片按顺序命名,使其最终都能按原始顺序排列;如第一张载玻片的第一张脑片命名为1-1,之后再改为1;第一张载玻片的第二张脑片命名为1-2,之后再改为25 (原理为1+24);第五张载玻片的第三张脑片命名为5-3,之后再改为53 (原理为5+2*24);其余类推。

[0093] 2、选取一张图片作为基准图片,以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则,根据组织原始尺寸,选一张尺寸最大 (长宽均最大) 的组织切片作为基准,然后以此为标准校准下一张图片,之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片,按此原则直到所有的图片校准完成。

[0094] 第四步,对第三步校准好的图片进行3D合成,具体步骤如下:

[0095] 1、将第三步校准后的所有图片都经适当同等倍数的压缩 (可通过MATLAB软件 (MathWorks, 美国) 自动完成;

[0096] 2、将所有压缩后的图片用ImageJ软件 (National Institutes of Health, 美国) 整体打包为一个图片文件;

[0097] 3、用Imaris软件 (Bitplane, 英国) 打开上述打包图片,然后根据需要导出3D透视图片。

[0098] 实施例3

[0099] 本实施例以转基因小鼠脑组织中兴奋性神经元的荧光3D重构为例进行说明。

[0100] 第一步,首先用冰冻切片机对小鼠脑组织进行连续切片,切片厚度为16微米,并分成24等份,具体步骤如下:

[0101] 1、设置好冰冻切片机 (莱卡,德国) 参数 (固定底座温度为16℃,机箱温度为20℃,

切片厚度为16微米),并装上全新的刀片(莱卡,德国),然后等待1小时;

[0102] 2、将切片机座子表面涂满组织包埋剂(樱花,日本),约1毫米厚,等其凝固后用切片机将其表面削平;

[0103] 3、沿小鼠脑组织矢状中线将其切成两等份,然后垂直右脑(也可用左脑)切面在脑组织上戳两个小洞(为了方便后续的脑片校准工作);

[0104] 4、在右脑切面涂抹少许冰冻切片包埋剂,将其快速贴合到削平的切片机座子表面;

[0105] 5、将右脑组织表面涂抹一层OCT后,将其放入切片机冰冻20分钟;

[0106] 6、连续切24片脑组织,分别放入装有磷酸盐缓冲液(PBS)的24个储样杯(普瑞美斯,武汉)中,在切片机上按标记顺序摆放好24个装有半杯PBS的储样杯,然后重新再切24片脑组织并分别放入这24个储样杯中;重复该步骤直到切完脑组织;该步骤是为了便于脑片的准确排序。

[0107] 第二步,将所有切片完整贴到对应的载玻片上,因兴奋性神经元自带红色荧光蛋白,所以无需抗体标记,具体步骤如下:

[0108] 1、将第一步24个储样杯中的切片分别转入对应的24孔细胞培养板(康宁,美国)的小孔中;

[0109] 2、脑片用PBS洗三次,每次五分钟;

[0110] 3、贴片:将每孔中的脑片贴到对应的明胶包被好的载玻片(普瑞美斯,武汉)上,并将载玻片做好标记,贴片时选用直径2-5mm的画眉笔,贴好的脑片要保持其自然形态;

[0111] 4、封片:用移液枪(eppendorf,德国)向载玻片的脑片区滴加40微升的荧光切片封片剂(普瑞美斯,武汉),然后缓慢盖上盖玻片(普瑞美斯,武汉);

[0112] 5、保存:封好的载玻片放入暗盒(普瑞美斯,武汉)保存。

[0113] 第三步,对扫描的组织切片图片进行重新命名,使所有图片能按切片原始顺序排列,然后以其中一张图片为基准,对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准,具体步骤如下:

[0114] 1、用全自动扫描显微镜(VS120,Olympus,日本)对所有脑片进行全图拍摄(20倍物镜),并根据载玻片编号对脑片按顺序命名,使其最终都能按原始顺序排列;如第一张载玻片的第一张脑片命名为1-1,之后再改为1;第一张载玻片的第二张脑片命名为1-2,之后再改为25(原理为1+24);第五张载玻片的第三张脑片命名为5-3,之后再改为53(原理为5+2*24);其余类推。

[0115] 2、选取一张图片作为基准图片,以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则,根据组织原始尺寸,选一张尺寸最大(长宽均最大)的组织切片作为基准,然后以此为标准校准下一张图片,之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片,按此原则直到所有的图片校准完成。

[0116] 第四步,对第三步校准好的图片进行3D合成,具体步骤如下:

[0117] 1、将第三步校准后的所有图片都经适当同等倍数的压缩(可通过MATLAB软件(MathWorks,美国)自动完成;

[0118] 2、将所有压缩后的图片用ImageJ软件(National Institutes of Health,美国)整体打包为一个图片文件;

[0119] 3、用Imaris软件(Bitplane,英国)打开上述打包图片,然后根据需要导出3D透视图片。

[0120] 实施例4

[0121] 本实施例以小鼠食管组织的c-fos(一种反应细胞活性的指标)染色3D重构为例进行说明。(因食管为空腔组织,故此处采用石蜡切片的方式)

[0122] 第一步,首先用石蜡切片机对包埋了食管的石蜡块进行连续切片,切片厚度为4 μ m,切一张贴一张,具体步骤如下:

[0123] 1、削好石蜡块,将其固定到石蜡切片机(Leica,德国)上;

[0124] 2、固定好刀片(Leica,德国),将参数设置为4 μ m;

[0125] 3、连续切片:当切到食管组织时每切一张,就立即将其贴到载玻片上,然后不断重复该步骤,直到切完所有组织;(此处贴上组织的载玻片应当水平放置,组织面朝上)

[0126] 4、60℃烤箱烤片2小时;

[0127] 5、脱蜡复水:石蜡切片经二甲苯I、二甲苯II脱蜡各15min,然后再放入浓度分别为100%、100%、95%、90%、85%、75%、50%各级乙醇溶液中各5min,再放入蒸馏水中5min;

[0128] 第二步,对石蜡切片进行免疫组织化学染色,具体步骤如下:

[0129] 1、向切片组织滴加100 μ l的0.3% H_2O_2 (国药,中国;溶于PBS缓冲液)孵育30分钟,常温;

[0130] 2、PBS洗三次,每次5分钟;

[0131] 3、抗原修复:在微波炉里加热0.01M枸橼酸钠缓冲溶液(pH为6.0)至沸腾后断电,将切片放入10分钟,间隔10分钟后再重复一次;

[0132] 4、破膜:向切片滴加100 μ l的0.5%曲拉酮(溶于PBS)孵育30分钟,常温;

[0133] 5、PBS洗三次,每次5分钟,然后用蒸馏水洗5分钟;

[0134] 6、待切片晾干后用免疫组化笔(Sigma,德国)围绕组织画圈,晾2小时;

[0135] 7、封闭:向上述圆圈内滴加100 μ l的3%胎牛血清(普美克,武汉;溶于PBS)孵育30分钟,常温;

[0136] 8、一抗:甩掉封闭液,向圆圈内滴加100 μ l的一抗(mouse-anti-c-fos,millipore,美国;1:500,溶于PBS)孵育24小时,温度为4℃;

[0137] 9、PBS洗三次,每次5分钟;

[0138] 10、二抗:向圆圈内滴加100 μ l生物素化的二抗(biotinylated-anti-mouse, Vector,美国;1:300,溶于PBS)孵育2小时,常温;

[0139] 11、PBS洗三次,每次5分钟;

[0140] 12、三抗:向圆圈内滴加100 μ l的AB液(Vector,美国;1:1:300,溶于PBS)孵育2小时,常温;

[0141] 13、PBS洗三次,每次5分钟;

[0142] 14、DAB显示:向圆圈内滴加100 μ l的DAB染液反应5分钟,常温;

[0143] 15、PBS洗三次,每次5分钟;

[0144] 16、水化:将切片浸入自来水中;

[0145] 17、复染:取出载玻片并将水滴快速甩干(约20秒,时间不宜过长),然后将载玻片上的切片浸入苏木素染液(南京建成,南京)3分钟后流水冲洗;

[0146] 18、分化：将载玻片上的切片浸入浓度为1%的盐酸-酒精(国药，中国；1份浓盐酸溶于99份浓度为75%的酒精)1分钟后，快速用流水冲洗；

[0147] 19、脱水：分别在浓度为50%的酒精、浓度为70%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为90%的酒精、浓度为95%的酒精中浸泡5分钟，然后在浓度为100%的酒精I和浓度为100%的酒精II中分别浸泡10分钟；

[0148] 20、透明：将切片在二甲苯(国药，中国)I和二甲苯II中分别浸泡10分钟(时间可稍长，但不宜超过3小时)；

[0149] 21、封片：用巴氏吸管(普瑞美斯，武汉)向载玻片的切片区滴加2滴中性树胶(国药，中国)，然后缓慢盖上盖玻片(普瑞美斯，武汉)；

[0150] 22、晾干：封好的载玻片在通风厨中吹24小时后，放入载玻片盒收好。

[0151] 第三步，对扫描的组织切片图片进行重新命名，使所有图片能按切片原始顺序排列，然后以其中一张图片为基准，对所有相邻的切片图片进行位置/角度的校准，具体步骤如下：

[0152] 1、用全自动扫描显微镜(VS120, Olympus, 日本)对所有切片进行全图拍摄(20倍物镜)，并根据载玻片编号对切片按顺序命名，使其最终都能按原始顺序排列；如第一张载玻片的第一张切片命名为1-1，之后再改为1；第一张载玻片的第二张切片命名为1-2，之后再改为25(原理为1+24)；第五张载玻片的第三张切片命名为5-3，之后再改为53(原理为5+2*24)；其余类推。

[0153] 2、选取一张图片作为基准图片，以保证基准图片大小能容纳所有图片为原则，根据组织原始尺寸，选一张尺寸最大(长宽均最大)的组织切片作为基准，然后以此为标准校准下一张图片，之后再以下一张图片为标准校准相邻的下一张图片，按此原则直到所有的图片校准完成。

[0154] 第四步，对第三步校准好的图片进行3D合成，具体步骤如下：

[0155] 1、将第三步校准后的所有图片都经适当同等倍数的压缩(可通过MATLAB软件(MathWorks, 美国)自动完成；

[0156] 2、将所有压缩后的图片用ImageJ软件(National Institutes of Health, 美国)整体打包为一个图片文件；

[0157] 3、用Imaris软件(Bitplane, 英国)打开上述打包图片，然后根据需要导出3D透视图片。

[0158] 显然，本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例，而并非是对本发明的实施方式的限定，对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动，这里无法对所有的实施方式予以穷举，凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

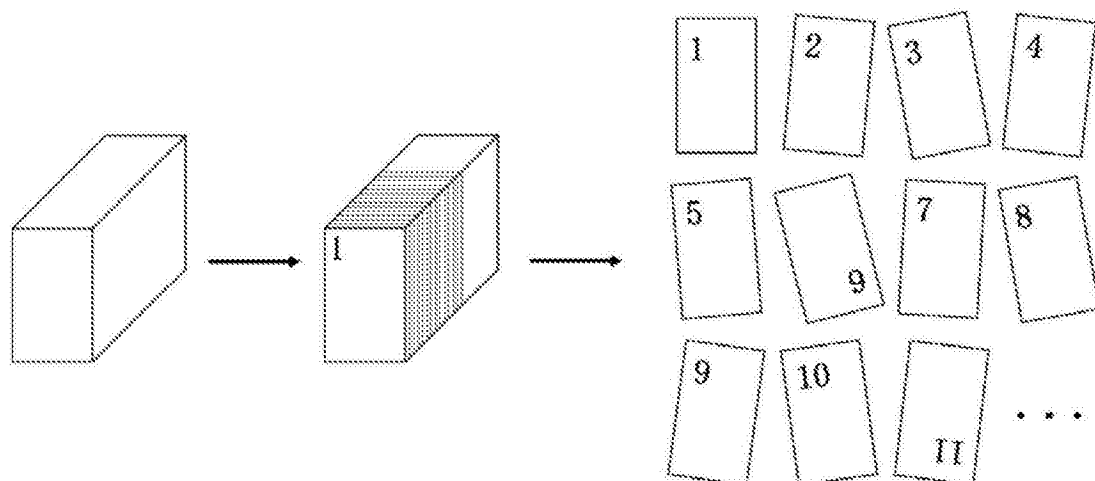


图1

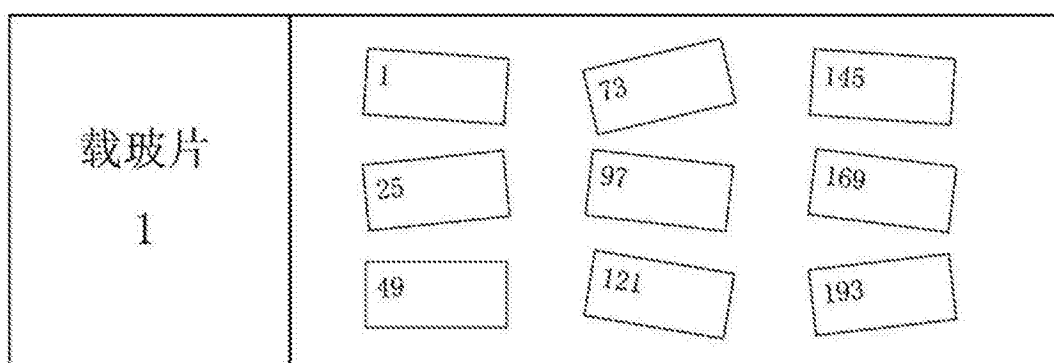


图2

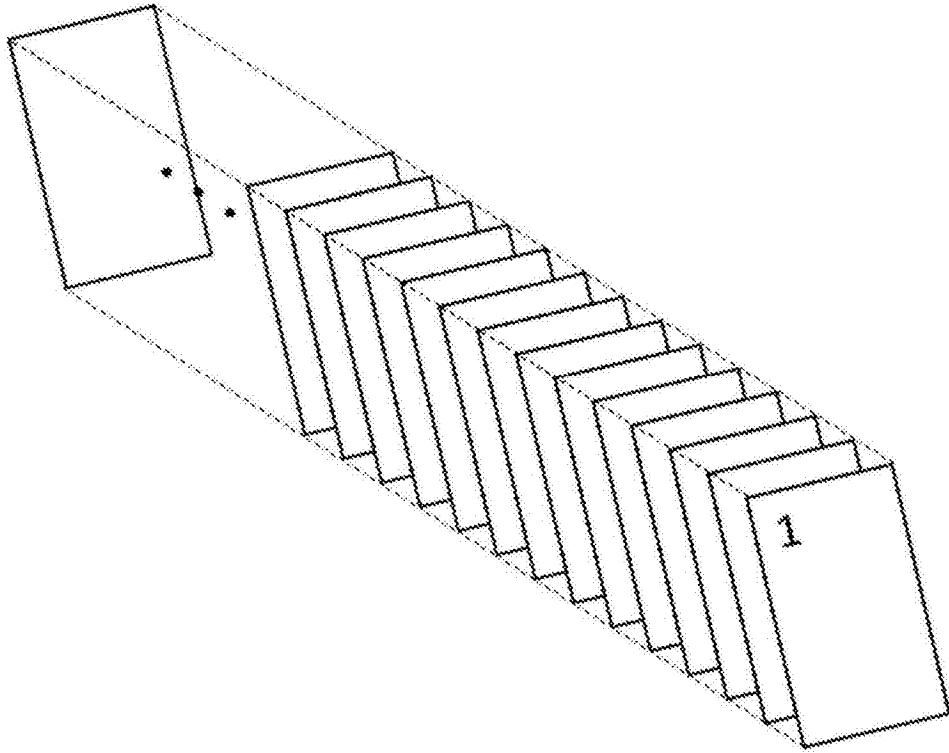


图3

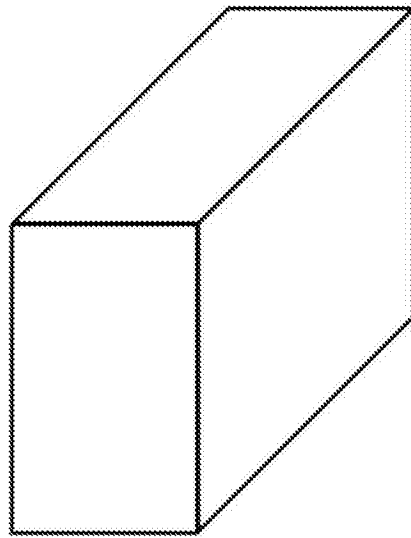


图4

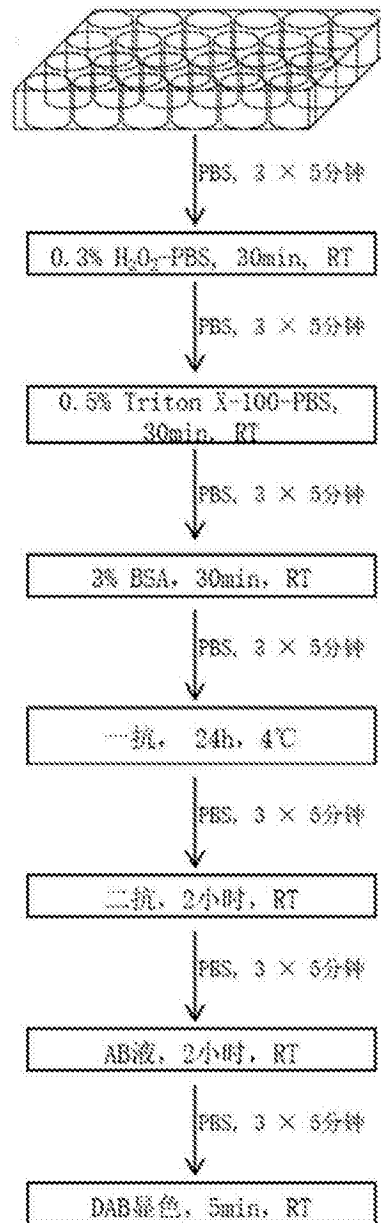


图5