**冰冻切片组织的制备:**

**固定**

将组织置于4%多聚甲醛固定液中，4℃摇床过夜。

**漂洗**

将固定后的标本用1X PBS漂洗三次，每次15分钟。

**脱水**

将组织置于30%蔗糖溶液中，4℃摇床过夜。第二天观察是否脱水完全，判断的标准是，当管竖直时，组织是否沉到蔗糖溶液的底部，若组织已完全沉降到蔗糖溶液的底部，平放或震荡后仍能沉降，则可判断组织已脱水完全。

**包埋**

将组织倒入培养皿中，用眼科刀将脑和脊髓根据切片切面的需要在不同的部位切开，并做好头尾端的标记。之后将组织置于包埋盒中，用滤纸吸干组织周围多余的蔗糖溶液，滴加OCT（optimal cutting temperature compound）到包埋盒中，用移液枪头小心的将组织周围的O.C.T混匀，切忌起气泡，静止10分钟，以防切片时脱片。重新取一个包埋盒，将组织移入到包埋盒中，倒入OCT，再次用移液枪头将组织与O.C.T混匀，将组织按切片需要方向摆放于包埋盒的底部，迅速置于干冰与酒精的混合物中。在包埋盒上做好标记，用保鲜膜和锡纸包好后放入-80℃冰箱贮藏待切。

**切片：**

切片前先将切片机的箱体温度及刀头温度均设为-20℃，把包埋盒从-80℃冰箱取出置于切片机中平衡半小时左右。之后将包埋块用O.C.T固定在样品托上，然后将样品托固定在样品头上，调整合适的位置，以使样品与刀头处于平行位置。手动切片。用细毛笔将切片均匀整齐地平铺在明胶包被的载玻片上，室温下晾片30min-1h后进行免疫组化染色。

**冰冻切片的快速染色法**

　　冰冻切片附贴于载玻片后，立即放入恒冷箱中的固定液固定1分钟后即可染色。以往，为了防止切片脱落，当切片附贴于载玻片后，即用电吹风吹干后再固定。根据实验对比认为这种做法欠妥未经固定的切片，强热作用后，蛋白发生变性，核内含有的物质由于热的作用融合在一起，染色后镜下分辨不出核内的各种物质。冰冻切片附贴于载玻片后，立即放入恒冷箱中的固定液固定，这样可以使切片中细胞内各种物质都在没有任何变化的情况下被固定起来，核染色质清晰，核仁明显，其他物质都完好保存。

　　方法：

* + 1. 切片固定1分钟。
    2. 水洗（肉眼观察，洗净即可）。
    3. 染苏木素5分钟。
    4. 1%盐酸酒精分化。
    5. 于碱水中返蓝10秒。
    6. 伊红染色10秒。
    7. 脱水，透明，中性树胶封固。

　　冰冻组织1－2分钟，切片1分钟，固定1分钟，染色共五分钟。总共在10分钟内完成快速制片过程，结果与[石蜡切片](http://baike.baidu.com/view/346553.htm" \t "_blank)不相上下。

　　冰冻切片的方法还有很多种，如甲醇循环的半导体冰冻切片法，二氧化碳冰冻切片法，半导体冰冻切片法和氯乙烷冰冻切片法等，这些方法在目前来说已很少使用，因此在这里不作阐述。

**冰冻切片免疫组织化学染色：**

**晾片** 将贴有组织的载玻片在空气中晾干，约30min-1h；

②**漂洗** 在1X PBS中漂洗3次，每次15 min。 PHT室温下孵育30 min；

③**一抗孵育** 将切片放在湿盒内，用滤纸吸干玻片上多余的水分，滴加200μl一抗工作液，盖好封口膜，4℃孵育过夜，约18h-24h；

④**漂洗** 在1X PBS中漂洗3次，每次15min；

⑤**二抗孵育** 用滤纸吸干玻片上多余的水分，滴加200μl二抗工作液，盖好封口膜，4℃孵育过夜；

⑥**漂洗** 在1X PBS中避光漂洗3次，每次15min；

⑦**封片** 滴加Vectashield 防荧光淬灭封片剂在盖玻片上，反转盖玻片，倾斜45°角轻轻放下盖玻片，待封片剂均匀地填充在盖玻片和载玻片之间后用指甲油封固盖玻片四周，指甲油晾干后在荧光显微镜下观察结果。封好的片子在4℃避光保存。或者可先在荧光显微镜下观察结果，再用指甲油封片。

### 操作方法及步骤

　　①取材，未能固定的组织取材，不能太大太厚，厚者冰冻费时，大者难以切完整，最好为24×24×2mm。

　　②取出组织支承器，放平摆好组织，周边滴上包埋剂，速放于冷冻台上，冰冻。小组织的应先取一支承器，滴上包埋剂让其冷冻，形成一个小台后，再放上细小组织，滴上包埋剂。

　　③将冷冻好的组织块，夹紧于切片机持承器上，启动粗进退键，转动旋钮，将组织修平。

　　④调好欲切的厚度，根据不同的组织而定，原则上是细胞密集的薄切，纤维多细胞稀的可稍为厚切，一般在5～10um间。

　　⑤调好防卷板。制作冰冻切片，关键在于防卷板的调节上，这就要求操作者要细心，准确地将其调较好，调校至适当的位置。切片时，切出的切片能在第一时间顺利地通过刀防卷板间的通道，平整地躺在持刀器的铁板上。这时便可掀起防卷板，取一载玻片，将其附贴上即可。

　　⑥应视不同的组织选择不同的冷冻度。冷冻箱中冷冻度的高低，主要根据不同的组织而定，不能一概而论。如：切未经固定的脑组织，肝组织和淋巴结时，冷冻箱中的温度不能调太低，在-10- -15℃左右，切甲状腺、脾、肾、肌肉等组织时，可调在-15～20℃左右，切带脂肪的组织时，应调至-25℃左右，切含大量的脂肪时，应调至-30℃。

### 冰冻切片时的注意事项

　　①防卷板及切片刀和持刀架上的板块应保持干净，需经常用毛笔挑除切片残余和用柔软的纸张擦。有时需要每切完一张切片后就用纸擦一次。因为这个地方是切片通过和附贴的地方，如果有残余的包埋剂粘于刀或板上，将会破坏甚至撕裂切片，便切片不能完整切出。

　　②多例多块组织同时需做冰冻切片时，可各自放于不同的支承器上，于冷冻台上冻起来，然后依据不同的编号，依序切片，这样做既不费时也不会乱。

　　③放置组织冰冻前，应视组织的形状及走势来放置，所谓“砍柴看柴势”，切片也是如此，如果胡乱放置，就不能收到很好的效果。

　　④组织块不须经各种固定液固定，尤其是含水的固定液，在未达到固定前，更不能使用。临床快速冰冻切片，不须要预先固定，一是为了争取时间，二是固定了的组织，反而增加了切片的难度。如果使用未完全固定的组织做冰冻切片，就会出现冰晶。这是因为含水的固定液在组织未经固定前，其中的水份也可渗入到组织中去，当冰冻发生时，这些水份就存留于组织中，形成了冰晶。

　　⑤当切片时，如果发现冰冻过度时，可将冰冻的组织连同支承器取出来，在室温停留片刻，再行切片，或者用口中哈气，或者用大拇指按压组织块，以此来软化组织，再行切片。另者，调高冰冻点。

　　⑥用于附贴切片的载玻片，不能存放于冷冻处，于室温存放即可。因为当附贴切片时，从室温中取出的载玻片与冷冻箱中的切片有一种温度差，当温度较高的载玻片附贴上温度较低的切片时，由于两种物质间温度的差别，当它们碰撞在一起时，分子彼此间发生转移而产生了一种吸附力，使切片与载玻片牢固地附贴在一起。如果使用冷藏的载玻片来附贴切片，由于温度相同，没有发生上述的现象。