

肺HE染色

1.脱蜡 与水化

1.切片60°C烘烤30 min，二甲苯I/II中各浸泡10 min；梯度乙醇（100%→95%→85%→70%）各5 min，蒸馏水浸洗2 min



2.苏木 精染色

2. 苏木精染液浸染1-5 min（室温），流水冲洗浮色



3.分化 与返蓝

3. 1%盐酸乙醇分化3-5 s（显微镜下控制至细胞核清晰、背景无色）；流水冲洗15 min，0.5%氨水返蓝30 s，流水冲洗5 min



4.伊红 染色

4.1%伊红Y染液浸染1-2 min，流水冲洗至无红色溢出



5.脱水 与透明

5. 梯度乙醇（70%→85%→95%→100%）各1 min；二甲苯I/II中各5 min



6.封片

6. 中性树脂滴加，盖玻片覆盖（避免气泡），60°C烘干24 h

常见问题解析

1. 原代细胞提取容易污染怎么办？

①操作前确保操作环境，包括超净台已经灭菌消毒且通风，保持实验环境的清洁和无菌状态；②在细胞分离和培养的过程中，严格遵守无菌操作规范，全程戴口罩+帽子；③定期用水盘监测培养箱污染，如果发现污染，应及时丢弃污染的培养物并及时进行培养箱清洗和消毒；④原代细胞分开培养，避免交叉污染；⑤心态不能崩，污染使每个科研人的必修课。

2. 原代细胞生长缓慢怎么办？

①首先确保使用正确的培养基，已添加细胞生长所需的生长因子，并且是按照厂家的指导和推荐使用方法进行操作，在此基础上若仍生长缓慢，可使用更高质量的血清或培养基，可以适当添加一些生长因子或细胞因子来促进细胞生长；②保持稳定的细胞培养环境，如培养箱的温度、湿度和CO₂浓度，也有助于细胞生长。避免频繁挪动细胞和频繁换液；③原代细胞一般传代次数有限，随着细胞代数增多，增值速度也会相应变慢，形态开始变化，到最后完全不增殖，可以已经开始分化或老化；④细胞密度过高或过低都会影响细胞的生长速度，要根据细胞类型和需求控制细胞密度，建议进行预实验确定合适的接种密度以及传代时机。

参考文献

- 1 Sobczak M, Dargatz J, Chrzanowska-Wodnicka M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice [J]. J Vis Exp. 2010, (46):2316.