



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727463 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710841373.5

(22)申请日 2017.09.18

(71)申请人 南方医科大学珠江医院

地址 510282 广东省广州市海珠区工业大道中253号

(72)发明人 汪艳 郑永见 潘明新 李阳

(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所

11330

代理人 刘延喜 王增鑫

(51)Int.Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

超厚组织切片的制备及细胞水平再现组织三维形态结构的方法

(57)摘要

本发明公开一种超厚组织切片的制备方法,其包括以下步骤:获取待观察的组织材料;制备所述组织材料1~8mm的组织切片并对该组织切片进行透明化;对透明化的所述组织切片进行荧光染色。其次是一种组织切片三维组织形态结构的再现方法,其包括以下步骤:制备厚度为1~8mm的透明化组织切片;利用荧光显微镜获取组织切片的图像数据;重组所述图像数据以形成三维模型数据;基于所述三维模型数据输出三维图像。本发明超厚组织切片的制备方法及三维组织形态结构再现的方法,对组织切片进行除脂达到透明以增加激光穿透肝组织的深度,减少光散射,进而实现组织的深度成像,以更真实的状态反映组织的细胞结构,同时提高了成像的效率和保真度。



1. 一种超厚组织切片的制备方法,其特征在于,其包括以下步骤:
获取待观察的组织材料;
制备所述组织材料1~8mm的组织切片并对该组织切片进行透明化;
对透明化的所述组织切片进行荧光染色。
2. 如权利要求1所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述组织材料在制备组织切片之前进行以下至少一项预处理:
对所述组织材料进行表面清洗;
对所述组织材料进行内部的去血处理;
对所述组织材料进行化学固定。
3. 如权利要求2所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述组织材料来源于肝脏。
4. 如权利要求3所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述肝脏在制备成组织切片之前,采用穿刺灌注法对所述肝脏依次进行去血处理和化学固定处理。
5. 如权利要求4所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述去血处理过程使用肝素化的磷酸缓冲液作为灌注液;所述化学固定处理过程使用4%的多聚甲醛作为灌注液。
6. 如权利要求1所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述组织切片采用冷冻振荡切片法获得。
7. 如权利要求6所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述组织切片在进行透明化之前与水凝胶溶液孵育形成组织-水凝胶复合物。
8. 如权利要求7所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,以质量体积比计算,所述水凝胶溶液包括溶解在磷酸缓冲液中的4%的丙烯酰胺和0.25%引发剂。
9. 如权利要求8所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述引发剂选自二盐酸化物。
10. 如权利要求9所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述引发剂选自偶氮二咪唑啉基丙烷。
11. 如权利要求8所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述与水凝胶孵育的步骤包括:
在4℃的条件下将所述组织切片浸泡在所述水凝胶溶液中孵育2d;
孵育后对水凝胶溶液中的组织切片在13.3kPa的条件下抽真空10~15min;
在37℃的条件下继续以13.3kPa的压强抽真空2~3h,以促进发生组织和水凝胶之间的聚合反应。
12. 如权利要求7所述超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述透明化的过程包括以下步骤:
在37℃的条件下,将组织-水凝胶复合物浸泡在透明液中进行振动洗脱,所述透明液每隔预定的时间更换一次,直至所述组织-水凝胶复合物变透明。
13. 如权利要求12所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述透明液为8%质量体积比的十二烷基硫酸钠溶液。
14. 如权利要求13所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述预定的时间为3d。

15. 如权利要求1所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述荧光染色采用免疫荧光染色法实现。

16. 如权利要求15所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述免疫荧光染色法包括依次用一抗和二抗进行孵育的过程,所述一抗和二抗的孵育时间分别为3~7d。

17. 如权利要求1或15所述的超厚组织切片的制备方法,其特征在于,所述组织切片进行荧光染色之后,在80%体积比的甘油水溶液中保存备用。

18. 一种细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其特征在于,包括以下步骤:

制备厚度为1~8mm的透明化组织切片;

利用荧光显微镜获取组织切片的图像数据;

重组所述图像数据以形成三维模型数据;

基于所述三维模型数据输出三维图像。

19. 如权利要求18所述的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其特征在于,所述透明化组织切片采用如权利要求1~17任意一项所述的超厚组织切片的制备方法获得。

20. 如权利要求18所述的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其特征在于,在进行荧光显微镜观察之前对所述组织切片进行封片,封片的具体步骤为:在载玻片上用蓝丁胶堆叠供所述组织切片置入的孔槽;将所述组织切片置入所述孔槽之后用80%的甘油填充;加盖盖玻片,以备观察。

21. 如权利要求20所述的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其特征在于,所述蓝丁胶的堆叠厚度为组织切片的厚度的1.5倍。

22. 如权利要求18所述的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其特征在于,利用双光子荧光显微镜观察所述组织切片,并获取所述组织切片的图像数据。

超厚组织切片的制备及细胞水平再现组织三维形态结构的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物组织显微观察领域,尤其涉及一种超厚组织切片的制备及细胞水平再现组织三维形态结构的方法。

背景技术

[0002] 在对器官或组织的细胞或亚细胞结构的细节信息分析时,3-10 μ m的2D组织切片是实现该要求的常规方法。通常是将器官/组织固定后经石蜡包埋后切片(或冰冻切片),然后进行相应的染色后在显微镜下观察,该方法可以对器官/组织内的各种细胞类型及其分布进行形态学研究。但这种方法仅局限于某一平面水平并不一定能将器官/组织的整体包含在内,特别在对器官进行病理分析时,以肝脏为例,现有技术不能将肝脏病变部位包含在一个组织切片或若干连续的组织切片内,且许多肝脏疾病,例如肝癌其病灶与周围的结构(血管、神经、淋巴管等)的空间分布有着非常密切的联系,如果能够在保证组织完整的前提下从细胞或亚细胞结构水平观察这些病变,将对肝脏疾病甚至其他疾病的研究有重大贡献。对肝脏及其他器官进行三维结构观察时,CT、MRI以及PET等影像手段拥有出色的组织成像深度,还具备越来越好的细节分辨能力,但这些影像学设备最高的分辨率(0.5-2.0mm)目前无法使成像效果达到细胞水平。

[0003] 为了实现这一目标,现有技术之一,采用连续性切片染色经显微镜观察获取图片后,利用计算机软件对图像进行拼接,实现了细胞水平的肝脏组织三维结构的观察。为了观察肝内胆管的形态结构的动态变化,研究者通过对取材的肝脏进行10 μ m厚度的连续性冰冻切片,胆管上皮细胞表面特异性抗原染色(CK19),然后经激光共聚焦显微镜获取图片后,将42-70张2D图片经计算机软件进行拼接(Z轴接近500 μ m),从而得到了可用于观察和分析的3D结构的肝内胆管树图像。肝组织连续性机械切片结合3D图像重建技术,可以提供肝脏的全部图像,但从严格意义上说,基于这种3D图像重建技术形成的全肝图像是虚拟的,并不能完全代替真实的器官结构,且整个过程需要耗费大量的时间精力进行图像处理。

[0004] 现有技术之二,采用100 μ m的厚组织切片(此厚度为显微镜扫描深度极限)进行相应的、染色显微镜观察后,将获取的图片利用计算机进行分析重建,得到了肝血窦和胆小管的结构分布情况3D结构图像。利用厚组织切片(100 μ m)获取肝脏的3D结构图像,其局限在于受激光穿透深度、抗体的渗透限制,观察厚度 $\leq$ 100 μ m,因此Z轴的成像深度仍然小于单个肝小叶的直径,并不能达到理想的观察深度。

[0005] 如何对各类细胞或亚细胞结构的进行理想深度的三维结构观察是人们现阶段对各种器官尤其是肝脏形态学研究热点。

发明内容

[0006] 本发明的目的是,提供一种可以至少部分解决现有技术缺陷的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,以及适用于该方法的超厚组织切片的制备方法。

- [0007] 为达到以上技术目的,本发明采用的技术方案如下:
- [0008] 首先是一种超厚组织切片的制备方法,其包括以下步骤:
- [0009] 获取待观察的组织材料;
- [0010] 制备所述组织材料1~8mm的组织切片并对该组织切片进行透明化;
- [0011] 对透明化的所述组织切片进行荧光染色。
- [0012] 进一步地,所述组织材料在制备组织切片之前进行以下至少一项预处理:
- [0013] 对所述组织材料进行表面清洗;
- [0014] 对所述组织材料进行内部的去血处理;
- [0015] 对所述组织材料进行化学固定。
- [0016] 一种可能的实施方式中,所述组织材料来源于肝脏。
- [0017] 进一步地,所述肝脏在制备成组织切片之前,采用穿刺灌注法对所述肝脏依次进行去血处理和化学固定处理。
- [0018] 具体地,所述去血处理过程使用肝素化的磷酸缓冲液作为灌注液;所述化学固定处理过程使用4%的多聚甲醛作为灌注液。
- [0019] 优选地,所述组织切片采用冷冻振荡切片法获得。
- [0020] 更优地,所述组织切片在进行透明化之前与水凝胶溶液孵育形成组织-水凝胶复合物。
- [0021] 具体地,以质量体积比计算,所述水凝胶溶液包括溶解在磷酸缓冲液中的4%的丙烯酰胺和0.25%引发剂。
- [0022] 可选择地,所述引发剂选自二盐酸化物。优选地,所述引发剂选自偶氮二咪唑啉基丙烷。
- [0023] 更具体地,所述与水凝胶孵育的步骤包括:
- [0024] 在4℃的条件下将所述组织切片浸泡在所述水凝胶溶液中孵育2d;
- [0025] 孵育后对水凝胶溶液中的组织切片在13.3kPa的条件下抽真空10~15min;
- [0026] 在37℃的条件下继续以13.3kPa的压强抽真空2~3h,以促进发生组织和水凝胶之间的聚合反应。
- [0027] 更进一步地,所述透明化的过程包括以下步骤:
- [0028] 在37℃的条件下,将组织-水凝胶复合物浸泡在透明液中进行振动洗脱,所述透明液每隔预定的时间更换一次,直至所述组织-水凝胶复合物变透明。
- [0029] 较佳地,所述透明液为8%质量体积比的SDS溶液。较佳地,所述预定的时间为3d。
- [0030] 进一步地,所述荧光染色采用免疫荧光染色法实现。
- [0031] 具体地,所述免疫荧光染色法包括依次用一抗和二抗进行孵育的过程,所述一抗和二抗的孵育时间分别为3~7d。
- [0032] 优选地,所述组织切片进行荧光染色之后,在80%体积比的甘油水溶液中保存备用。
- [0033] 其次是一种细胞水平再现组织三维形态结构的方法,其包括以下步骤:
- [0034] 制备厚度为1~8mm的透明化组织切片;
- [0035] 利用荧光显微镜获取组织切片的图像数据;
- [0036] 重组所述图像数据以形成三维模型数据;

[0037] 基于所述三维模型数据输出三维图像。

[0038] 进一步地,所述透明化组织切片采用如前所述的超厚组织切片的制备方法获得。

[0039] 优选地,在进行荧光显微镜观察之前对所述组织切片进行封片,封片的具体步骤为:在载玻片上用蓝丁胶堆叠供所述组织切片置入的孔槽;将所述组织切片置入所述孔槽之后用80%的甘油填充;加盖盖玻片,以备观察。

[0040] 优选地,所述蓝丁胶的堆叠厚度为组织切片的厚度的1.5倍。

[0041] 进一步优选地,利用双光子荧光显微镜观察所述组织切片,并获取所述组织切片的图像数据。

[0042] 与现有技术相比较,本发明具有如下优势:

[0043] (1) 本发明的超厚组织切片的制备方法,能够使组织切片在1~8mm的厚度下进行显微观察,能够直观的观察组织结构免疫荧光染色后的三维立体结构,有效提高观察结构的分辨率水平至细胞或亚细胞结构水平,从而实现真正意义上的肝脏组织三维结构观察。

[0044] (2) 本发明的超厚组织切片的制备方法,在不损伤组织完整性的前提下,对组织结构进行细胞层次的三维重建,可以对病变了解更加充分。例如针对肝脏,可以用于研究肝脏生长发育的过程,或肝脏转移性肿瘤时,三维图像可以展示肿瘤的在转移部位血管的生成。

[0045] (3) 本发明的超厚组织切片的制备方法,利用水凝胶保护组织的骨架性结构,采用温和的方法去除组织内的脂肪以实现组织的透明化,有利于增加荧光激光穿透组织的深度,特别对于肝脏,肝组织排列致密且脂质含量丰富,激光穿行在细胞间的时候会发生极大的光散射,去除肝脏组织的脂肪之后,激光能够突破在肝组织最高仅有100 μ m穿透力的限制。

[0046] (4) 本发明的超厚组织切片的制备方法,在组织切片与处理药剂充分接触浸润的情况下,将透明化的时间、抗体孵育的时间延长,能够保证各种药剂渗入超厚组织切片中,保证荧光观察的清晰度。

[0047] (5) 本发明的超厚组织切片的制备方法以及细胞水平再现组织三维形态结构的方法,基本可以实现对真实的细胞水平三维结构的观察以及对其进行图像数据的采集,减少了图像软件处理图像数据的耗时和难度,提高了三维图像的成像效率。

[0048] (6) 本发明的细胞水平再现组织三维形态结构的方法,更真实细微地反映了组织的结构,提高了成像的保真度。

附图说明

[0049] 图1为本发明超厚组织切片的制备方法及细胞水平再现组织三维形态结构的方法的流程框图。

[0050] 图2为本发明超厚组织切片的制备方法中肝叶的组织-水凝胶复合物的实物图。

[0051] 图3为本发明超厚组织切片的制备方法中透明化之后的肝叶的组织-水凝胶复合物的实物图,同时还示出了透明化之前的肝叶的实物图作为对照。

[0052] 图4为本发明细胞水平再现组织三维形态结构的方法中封片后的组织切片的实物图。

[0053] 图5为本发明细胞水平再现组织三维形态结构的方法中在普通荧光显微镜下观察的透明化后核染的组织切片,其中左图为正常光下观察的图像,右图为紫外光激发光下观

察的图像。

[0054] 图6为本发明细胞水平再现组织三维形态结构的方法中在双光子荧光显微镜下观察的透明化后的组织切片,其中左图为蓝色激发光下观察的图像,中图为绿色激发光下观察的图像,右图为左图和中图的重叠的图像。

[0055] 图7为本发明细胞水平再现组织三维形态结构的方法中软件处理后输出的三维图像,示出了肝脏胆管的结构。

具体实施方式

[0056] 以下结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细描述。

[0057] 本实施例利用相关试剂除去肝脏内脂质等一些造成光线无法穿透的物质,实现肝脏的透明化,同时直接将组织块浸润在抗体中进行孵育提高免疫染色的深度。具体地,参考图1,包括以下步骤:

[0058] 一、获取待观察的组织材料。

[0059] 所述组织材料来源于新鲜的器官或组织,通常情况下,这些准备用于制备组织切片的新鲜的器官或组织需要进行以下至少一项的预处理:

[0060] (1) 对所述新鲜的器官或组织进行表面清洗,以去除表面的血污、不属于该器官或组织的其他器官或组织的部分,或者从该器官或组织上脱落的部分;

[0061] (2) 对所述新鲜的器官或组织进行内部的去血处理。对于肝脏,优选采用穿刺灌注法进行去血处理,具体地,使用静脉留置针对肝门静脉进行穿刺灌注,灌注液为肝素化的1×PBS(10U/ml),并且以5ml/min的速度灌注(约灌注20-30ml液体),当肝脏从原先的深红色转变为灰白色时可停止灌注;

[0062] (3) 对所述新鲜的器官或组织进行化学固定。对于肝脏,承接前一步骤的去血处理(采用穿刺灌注法),继续用所述穿刺灌注法对肝脏进行化学固定,具体地,将灌注液更换为4%多聚甲醛(PFA)继续进行灌注(20-30ml液体),灌注结束后肝脏变硬,将肝脏取下放入4%PFA中4℃过夜固定。

[0063] 二、制备所述组织材料1~8mm的组织切片,并对该组织切片进行透明化。

[0064] 所述组织切片的制备对后续的显微观察至为重要,在保证待观察的结构完整性的情况下尽可能地进行透明化的处理,主要通过以下步骤进行所述组织切片的制备:

[0065] (1) 超厚肝脏组织切片的获取;

[0066] 利用徕卡振动型切片机VT-1000S(冷冻切片机)将肝脏切至1mm的组织切片,根据切片机的型号和观察的需要,还可以将组织切片的厚度增加。

[0067] (2) 组织切片与水凝胶的聚合;

[0068] 将所述组织切片放入A4P0水凝胶溶液,所述A4P0水凝胶溶液包括4%(wt/vol)丙烯酰胺和0.25%(wt/vol)偶氮二咪唑啉基丙烷(thermoinitiator;2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochloride,二盐酸化合物)上述成分溶于1×PBS中形成所述水凝胶溶液。所述偶氮二咪唑啉基丙烷作为水凝胶聚合反应的热引发剂,根据水凝胶成分的不同,应当合理选择对应的引发剂,这是本领域技术人员可以通过公知技术或试验获知。

[0069] 进一步地,所述组织切片与水凝胶孵育的步骤具体如下:在4℃孵育2d,然后将组

组织切片放入装有30-40ml A4P0溶液的50ml离心管中,将试管放入真空干燥器中Thermo (Scientific Heraeus,Hanau,Germany)抽真空至13.3kPa,维持10-15min。下一步,将温度调至37℃,让组织切片与水凝胶溶液在37℃13.3kPa条件下发生聚合,此过程一般经历2-3h。参考图2,聚合反应发生完毕,所述组织切片和水凝胶形成了组织-水凝胶复合物。所述水凝胶内替代组织中的脂类,为组织构建一个稳定的细胞骨架,并且能够完整保留蛋白质和核酸在细胞内的定位信息,有利于组织切片的后续处理和显微观察。

[0070] (3) 组织-水凝胶复合物的透明化;

[0071] 利用十二烷基硫酸钠(SDS)对肝组织内的脂质进行洗脱,具体地,使用无绒布去除表面多余水凝胶,将所述组织-水凝胶复合物放入充足的8% (wt/vol) SDS溶液的50ml离心管中,将试管放入37℃振动型水浴锅中进行洗脱。洗脱溶液每3天更换一次,直至组织变至透明。参考图3,肝脏的组织切片在进行洗脱之后几乎完全无色透明。

[0072] 三、对透明化的所述组织切片进行荧光染色。

[0073] 本实施例所采用的方法是直接将透明后的组织切片放入EP管中进行免疫荧光染色:

[0074] (1) 透明后组织切片放入50ml离心管中,加入40ml的1×PBS中彻底冲洗(5次/24h)以去除组织内残余的SDS。

[0075] (2) 在1.5ml EP管中加入500μm封闭液试剂A(3%的胎牛血清,0.2%TritonX-100,0.02%叠氮化钠稀释于1×PBS中),将5~10块肝组织放入管中,室温(RT)下置于摇床之上,孵育30min。

[0076] (3) 将一抗稀释于试剂A中置于摇床之上,RT,孵育3-7d;所述一抗的稀释比例一般按照1:200进行稀释,具体浓度需根据实验得出。

[0077] (4) 1×PBS彻底冲洗(更换PBS的频率为3~5次/24h),去除未结合的一抗,然后加入与一抗相对应的二抗,其孵育过程同一抗。可以将核染料DAPI加入到二抗稀释液中,同时进行染色。

[0078] (5) 彻底洗去未结合的二抗之后,将组织放入到80% (v/v) 甘油水溶液中,避光,4℃保存,直至组织完全透明。

[0079] 以上步骤有助于实现肝脏毫米级的成像效果,其中关键性的步骤包括:(i) 利用除脂剂使肝脏达到透明化,增加激光穿透深度并减少光线的散射;(ii) 将厚组织切片放置于EP管中进行浸润孵育,增加免疫荧光染色的深度。

[0080] 四、利用荧光显微镜获取透明化之后的组织切片的图像数据。

[0081] 由于所述组织切片较一般的切片厚数十倍到数百倍,所以在利用荧光显微镜观察之前的封片需要进行相应的改进。具体如下:

[0082] 使用蓝丁胶在载玻片上,堆叠以产生组织切片1.5倍厚度的孔槽,然后将样品放在孔槽内,用稍微过量的80%甘油填充剩余间隙,并将盖玻片放在垫片的顶部,轻轻按压盖玻片,用吸水纸去除溢出的80%甘油。封片结构如图4所示。

[0083] 在进行精细观察之前可以先用普通的荧光显微镜对所述组织切片的制作质量进行初步的检查,参考图5,光镜下,肝脏组织排列整齐有序,细胞轮廓相对均一,边界清晰;蓝色激发(DAPI染色)光下,细胞核大小均匀,边界清楚。表明组织切片能较好地保持核酸成分的完整。

[0084] 进一步地,将所述组织切片置于双光子荧光显微镜下,进行观察。参考图6,挑选组织切片在200~300 μm 厚度处,中心静脉附近肝组织结构进行观察,可见肝细胞规则条索状分布,细胞排列整齐,大小相对均一,表明组织结构未发生改变。

[0085] 五、重组所述图像数据以形成三维模型数据,并且基于所述三维模型数据输出三维图像。

[0086] 更进一步地,利用所述双光子荧光显微镜获取所述组织切片在不同焦距、不同区域下的实现范围内的图像数据。所述图像数据通过IMARS软件进行处理分析,重组之后形成三维模型数据,在用户界面下输出三维图像(如图7所示的胆管结构),并且可供科研人员进行进一步的测量、观察、渲染和调整,最终获得对所述组织切片的分析结果。

[0087] 综上所述,本发明超厚组织切片的制备及细胞水平再现组织三维形态结构的方法,对组织切片进行除脂达到透明以增加激光穿透肝组织的深度,减少光散射,进而实现组织的深度成像,以更真实细致的反映组织的形态结构,同时提高了成像的效率和保真度。

[0088] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但并不意味着受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,均包含在本发明的保护范围之内。

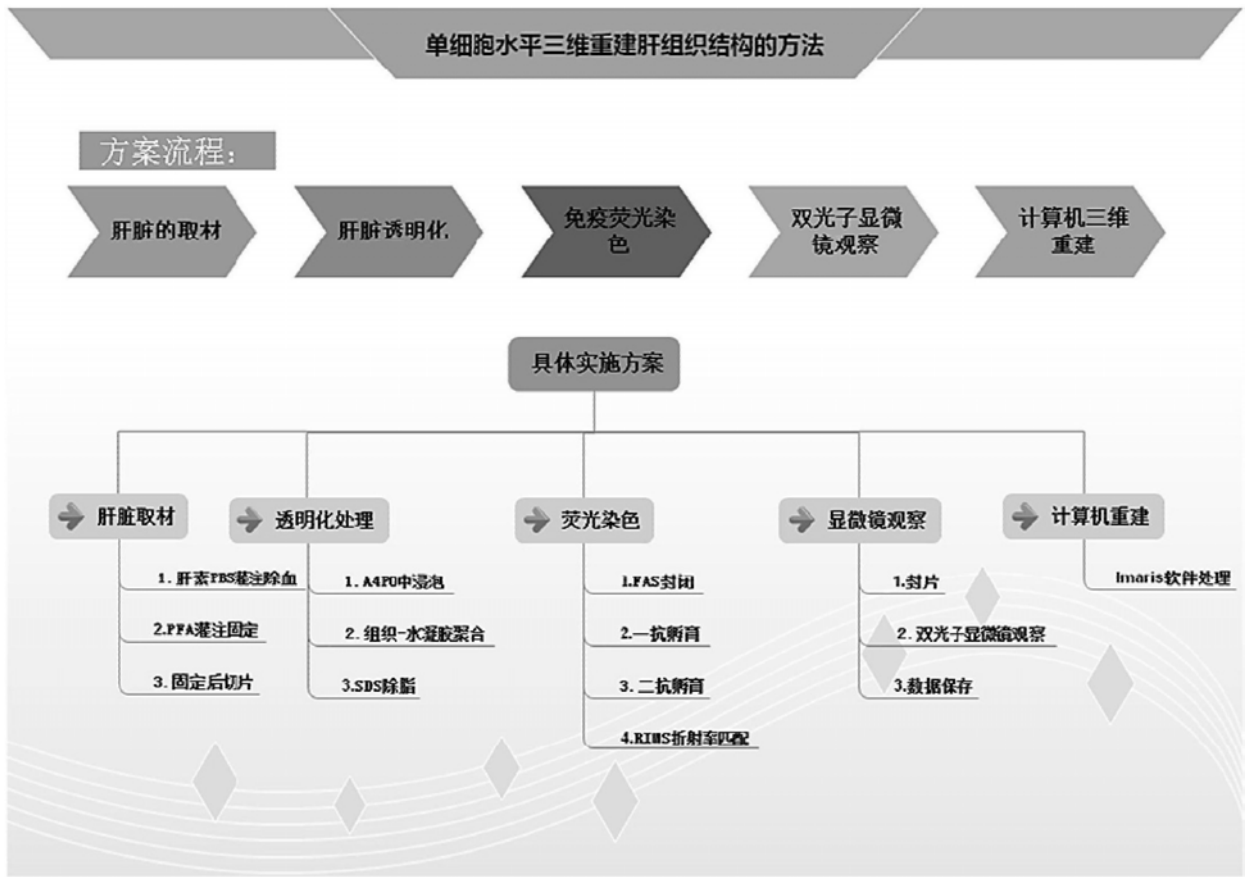


图1



图2

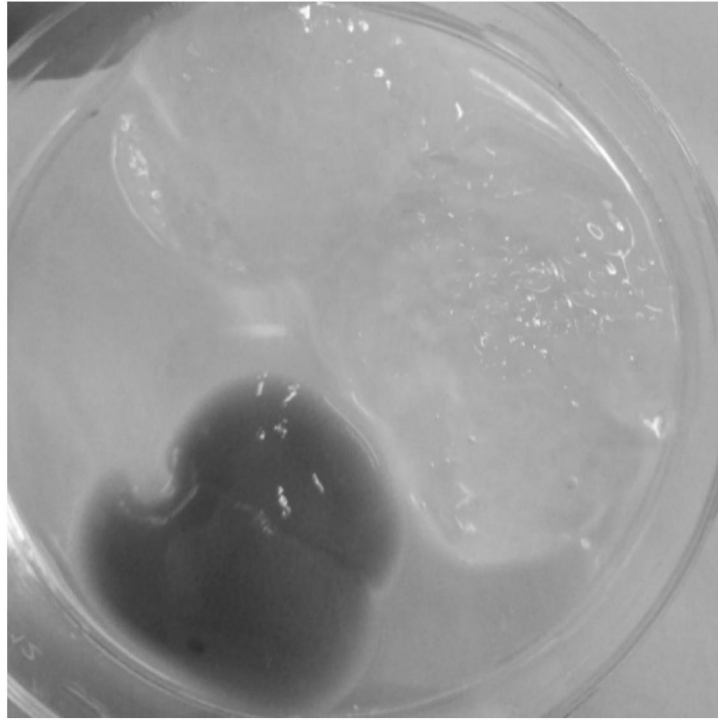


图3

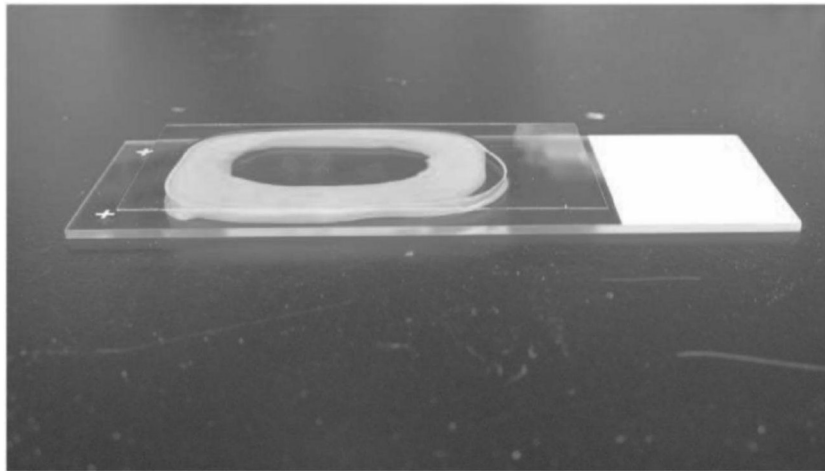


图4

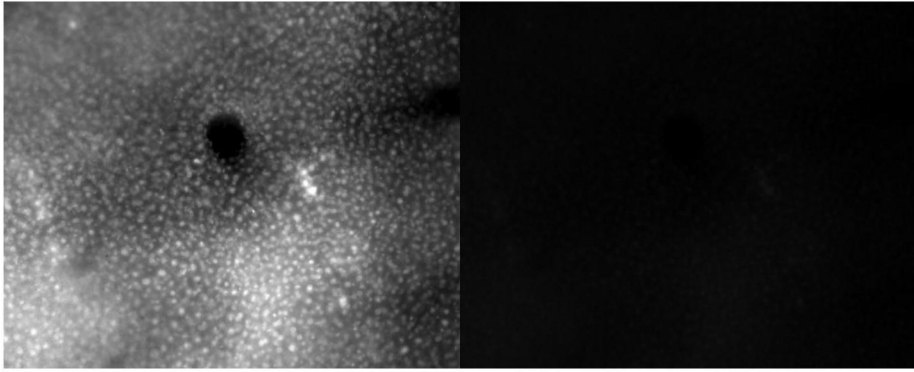


图5

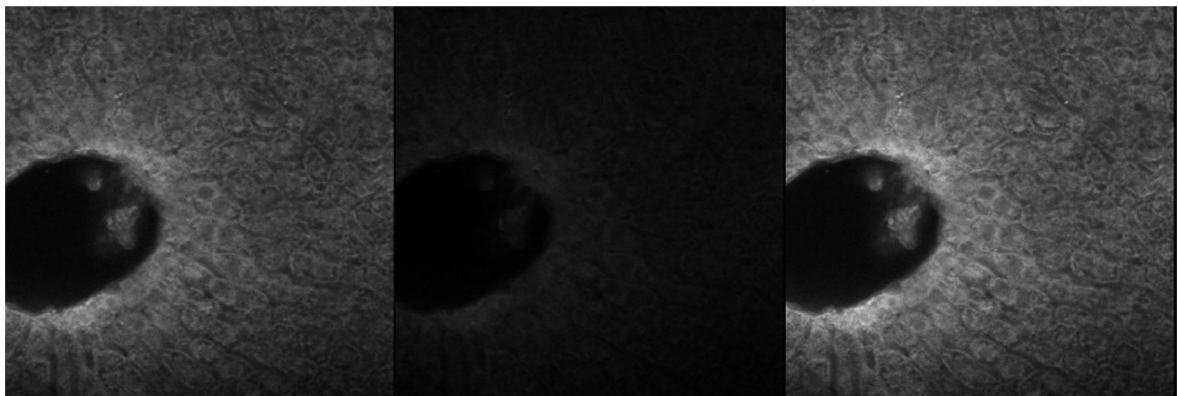


图6

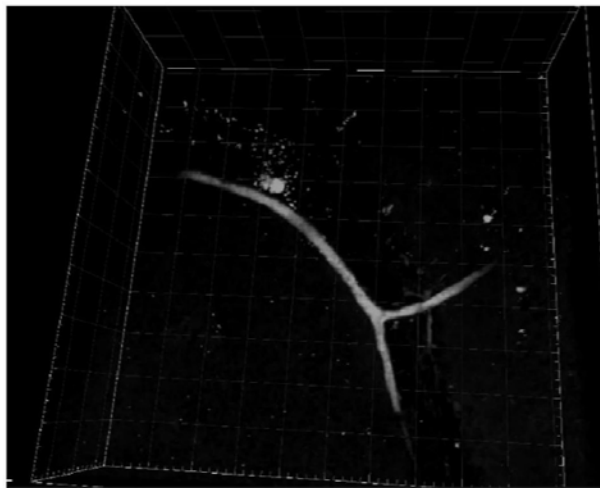


图7

专利名称(译)	超厚组织切片的制备及细胞水平再现组织三维形态结构的方法		
公开(公告)号	CN107727463A	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN2017110841373.5	申请日	2017-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
[标]发明人	汪艳 郑永见 潘明新 李阳		
发明人	汪艳 郑永见 潘明新 李阳		
IPC分类号	G01N1/28 G01N1/30 G01N1/34 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N1/28 G01N1/286 G01N1/30 G01N1/34 G01N21/6402 G01N21/6458 G01N21/6486 G01N33/533 G01N2001/2873 G01N2001/305		
代理人(译)	王增鑫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种超厚组织切片的制备方法，其包括以下步骤：获取待观察的组织材料；制备所述组织材料1~8mm的组织切片并对该组织切片进行透明化；对透明化的所述组织切片进行荧光染色。其次是一种组织切片三维组织形态结构的再现方法，其包括以下步骤：制备厚度为1~8mm的透明化组织切片；利用荧光显微镜获取组织切片的图像数据；重组所述图像数据以形成三维模型数据；基于所述三维模型数据输出三维图像。本发明超厚组织切片的制备方法及其三维组织形态结构再现的方法，对组织切片进行除脂达到透明以增加激光穿透肝组织的深度，减少光散射，进而实现组织的深度成像，以更真实的状态反映组织的细胞结构，同时提高了成像的效率和保真度。

