

牛蛙血细胞核酸和脊髓运动神经细胞的显色观察*

徐本锦, 刘 玲, 宣 焱, 杜 淼

山西医科大学汾阳学院医学检验系, 山西吕梁 032200

摘 要:目的 建立牛蛙血细胞核酸及脊髓运动神经细胞显色方法,更好地服务教学和临床。方法 制备临时装片,用福尔根反应和甲基绿-派洛宁对细胞内的核酸进行显色,用甲苯胺蓝染液对脊髓运动神经细胞进行染色。结果 福尔根反应后,细胞核呈紫红色,细胞质呈绿色。该反应的最适条件为室温水解 2 min,60 ℃水解 8 min,再室温水解 2 min,复染 40 s。甲基绿-派洛宁染色后,细胞核呈蓝色,细胞质呈粉红色。甲苯胺蓝染色后,脊髓运动神经细胞被染成深蓝色。结论 福尔根反应中亮绿复染的最适时间为 40 s。甲基绿-派洛宁能够对细胞内的 DNA 和 RNA 同时进行定位、定性分析。该研究方法对实验教学、科学研究和临床实践具有一定的理论和实际意义。

关键词:福尔根反应; 甲基绿-派洛宁; 核酸; 牛蛙血细胞; 运动神经细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.02.008 **中图法分类号:**Q2-33

文章编号:1673-4130(2021)02-0161-05 **文献标志码:**A

Coloration observation of blood cell nucleic acids and spinal motor nerve cells in bullfrog*

21 H5 4) . / 01 / 3 = , 21 C & , -) , * 1 L 3 9
/ - K 9 - 7 9 . L 5 M 2 5 9 * 5 6 " 7 8 5 7 3 B 5 . -) = # 9 < 5 5 9 A -) D 3 L 5 M 2 <
1) 3 5 > 3 7 . / 0 3) = . A -) D 3 0 3 2 2 0 0 , # , 3 -

Abstract: Objective To establish the coloration methods of blood cell nucleic acid and spinal motor nerve cells in bullfrog in order to better serve the teaching and clinic. **Methods** The temporary slides of bullfrog blood cells were prepared and the coloration of intracellular nucleic acid was performed by using the Feulgen reaction and methylgreen-pyronin. The bullfrog spinal motor nerve cells were stained by using toluidine blue. **Results** The nucleus was purple red aft ft ft ft ft ft ft ft ft ft f

2 仪器与试剂 仪器:普通光学显微镜,恒温水浴箱。主要试剂:甲基绿-派洛宁混合液,95%乙醇,1%亮绿染液,1 mol/L HCl, Schiff 试剂,1%甲苯胺蓝染液。

1.3 方法

1.3.1 牛蛙血细胞 DNA 的福尔根反应显色 具体实验步骤包括:(1)取材。麻醉牛蛙,将其置于一白瓷盘中,腹面朝上,沿着尾部向头部方向依次剪开皮肤和肌肉,找到心脏。剪开心包膜,使心脏完全显露出来,然后在心脏上剪一小口。(2)涂片。取一张干净的载玻片,轻轻蘸取心脏血,以 45° 夹角在另一张干净的载玻片上轻轻向前推,即可做成血涂片,自然晾干。(3)水解。将血涂片置于室温下的 1 mol/L HCl 中水解 2 min,然后置于 60 °C 的 1 mol/L HCl 中水解 8 min,再在室温下的 1 mol/L HCl 中水解 2 min。(4)染色。将血涂片用小流量的水冲洗,除去多余的 HCl,然后在血涂片上滴加一层 Schiff 试剂,染色 30 min,再用小流量的水冲洗,然后放入 1% 的亮绿染液中复染 30~60 s,小流量的水冲洗后晾干。(5)镜检。先在低倍镜下找到符合预期实验结果的区域,然后在高倍镜下观察。(6)拍照。拍照记录不同放大倍数的实验结果。

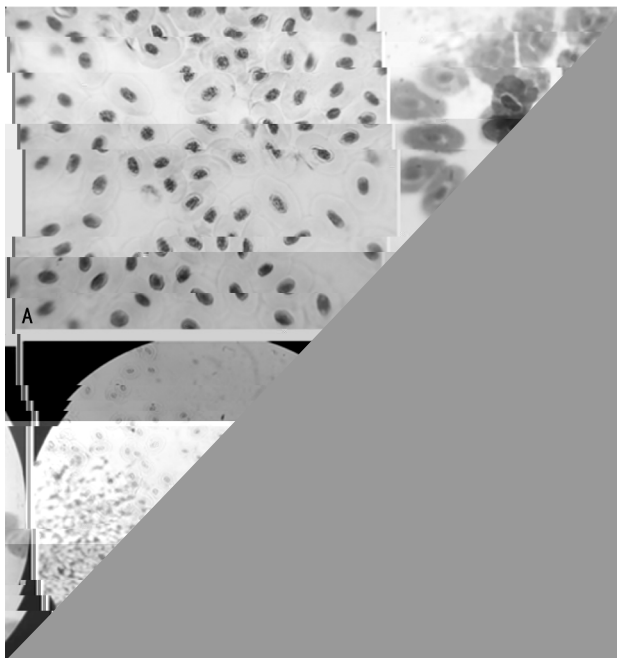
1.3.2 牛蛙血细胞 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁染色 具体实验步骤包括:(1)取材,同上。(2)涂片,同上。(3)固定。在晾干的血涂片上滴加一层 95%乙醇,室温固定 5 min,然后吸去乙醇再放置 5 min。(4)染色。在血涂片表面滴加 1 层(3~4 滴)甲基绿-派洛宁染液,染色 20 min 后用小流量的水冲洗掉多余染

液,再用吸水纸吸去多余水分。(5)镜检。先在低倍镜下找到符合预期结果的区域,然后在高倍镜下仔细观察细胞核与细胞质的颜色。(6)拍照。拍照记录不同放大倍数的显色结果。

1.3.3 牛蛙脊髓运动神经细胞的甲苯胺蓝染色 具体实验步骤包括:(1)取材。取小段高位脊髓,置于载玻片上用镊子或牙签将其捣碎。(2)染色。滴加数滴甲苯胺蓝染液,染色 5 min 左右,然后用小流量的水洗去多余染液。(3)压片。盖上盖玻片,用拇指挤压使脊髓压为一薄层。(4)镜检。先在低倍镜下找到符合预期结果的区域,然后在高倍镜下仔细观察细胞形态特征。(5)拍照。拍照记录不同放大倍数的染色结果。

2 结 果

2.1 血细胞 DNA 的福尔根反应显色 结果显示福尔根反应后细胞核呈紫红色,细胞质呈绿色(图 1A)。随着复染时间的延长(50~60 s),细胞质呈浅绿色(图 1B)。当复染时间为 30 s 或更短时,细胞质呈浅蓝色(图 1C)。在显微镜下,还经常可以看到细胞核是红色的,有些细胞核颜色很淡(图 1D~E)。这是由于局部水解不完全造成的。另外,当复染时间大于 60 s 时,细胞质颜色变为浅海绿色,且浅海绿色程度覆盖了(图 1F 中)。图 1 为福尔根反应显色血细胞 DNA 的显微照片。图 1A 为 60 °C 水解 8 min 后,复染 30 min,亮绿



注
(×)

NA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁染色后!可以看到细胞核呈深紫色!细胞质呈深蓝色!图 2A#或深紫色!图 2B#或深蓝色!图 2C#或深紫色!图 2D#或深蓝色!图 2E#或深紫色!图 2F#或深蓝色!图 2G#或深紫色!图 2H#或深蓝色!图 2I#或深紫色!图 2J#或深蓝色!图 2K#或深紫色!图 2L#或深蓝色!图 2M#或深紫色!图 2N#或深蓝色!图 2O#或深紫色!图 2P#或深蓝色!图 2Q#或深紫色!图 2R#或深蓝色!图 2S#或深紫色!图 2T#或深蓝色!图 2U#或深紫色!图 2V#或深蓝色!图 2W#或深紫色!图 2X#或深蓝色!图 2Y#或深紫色!图 2Z#或深蓝色!

图 3B 左下角的黑色实线箭头#或多极形"图 3A!以及图 3C~D 的黑色实线箭头#分枝且具有神经纤维的形态较大的运动神经细胞"深蓝色#\$还可以观察到呈圆形%数目较多%形态较小的细胞!为神经胶质细胞"图 3A%#以及图 3B~D%中的黑色虚线箭头#\$此外!在运动神经细胞中还能看到染色很深的核仁"图 3B~D#\$

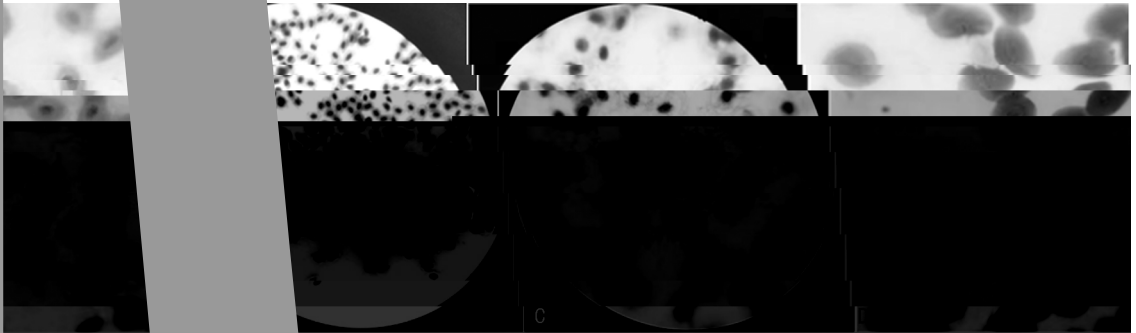


图 2 牛蛙心脏血细胞 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁染色结果



图 3 牛蛙心脏运动神经细胞的甲苯胺蓝染色结果

研究细胞内化学成分!特别是遗传学研究的细胞!在肿瘤侵袭性方面发挥可...病理分级和临床分期提供细胞...不...研究细胞的功能...情况下血细胞化!各种...血液

及发病机制的探讨均有重要意义\$ 福尔根反应是一种经典的 DNA 显色方法!是 DNA 的特异性反应!核染色质和染色体能够被显色!而含有核糖核酸的核仁和细胞质福尔根反应为阴性\$本研究首先利用福尔根反应的原理对牛蛙心脏血细胞中的 DNA 进行了显色分析\$结果显示!血细胞核呈紫红色!亮绿复染后细胞质呈绿色"图 1A#或暗绿色"图 1B#或浅绿色"图 1C#\$通过对亮绿复染时间的优化!确定了牛蛙心脏血细胞

解 2 min, 60 °C 水解 8 min, 再室温水解 2 min, Schiff 试剂染色 30 min, 亮绿复染 40 s。多年来, 关于福尔根反应的影响因素, 虽然已有多个报道, 但笔者根据自身经验, 提出了 4 点注意事项: (1) 血涂片的制作。以 45° 夹角在另一张干净的载玻片上轻轻向前推, 夹角过大或过小, 都会影响血细胞在玻片上的分布、数量和形态。切勿来回多次推片, 防止玻片之间的切割作用造成血细胞破裂, 影响后续实验。(2) HCl 水解的时间。福尔根反应的一个关键步骤是 DNA 经弱酸水解, 释放出游离的醛基。如果水解不充分, 嘌呤碱与脱氧核糖之间的糖苷键未断裂或断裂不完全, 导致形成的游离醛基变少, 进而反应变弱(图 1D~E)。另外, 如果水解时间过长, 则可能使 DNA 和组蛋白过度降解, 也会导致反应变弱, 甚至出现阴性结果。(3) Schiff 试剂的质量。Schiff 试剂的质量直接影响着 DNA 的呈色反应, 应选用质量好的碱性品红来配制 Schiff 试剂, 并注意避光保存, 防止因氧化变红而失效。(4) 复染时间。亮绿复染的最适时间为 40 s(图 1A)。若复染时间太短, 则亮绿着色太浅, 导致细胞质呈现浅绿色(图 1C)。如果复染时间太长, 细胞质的颜色就会变成浅海绿色, 细胞核的紫红色也会被一定程度覆盖(图 1F)。福尔根反应有助于人们理解 DNA 在生物学和遗传学中的作用。此外, Schiff 试剂在组织化学研究中被引入, 为其他醛基染色剂的开发打下了基础。

核酸的定量检测在研究细胞生长、肿瘤生物学和系统发育关系等方面具有重要意义。甲基绿是一种单组分的核染料, 其染色机制涉及静电作用和非离子相互作用^[9]。这种非离子反应可能是由于染料嵌入了 DNA 的嘌呤和嘧啶碱之间造成的^[10]。由于具有阳离子性质, 甲基绿被认为可与带负电荷的 DNA 结合, 能够实现对组织或细胞内 DNA 含量的可靠评估。派洛宁 Y 是一种阴离子染料, 不仅能够染色 RNA、弹性纤维和肥大细胞颗粒, 还能对硫酸黏蛋白进行染色^[11]。本研究通过甲基绿-派洛宁染色, 对牛蛙血细胞中的 DNA、RNA 进行了定位分析。结果显示, 细胞核呈蓝色, 细胞质被染成粉红色(图 2A)或深紫色(图 2B~D)。本实验有 3 个需要注意的地方: (1) 固定时间。一般情况下用 95% 的乙醇固定 10 min。实际操作时, 先固定 5 min, 然后吸掉乙醇, 再等待 5 min。(2) 染色时间以 20 min 为宜。(3) 多余染料的清洗。多余的染料要用小流量的水冲洗, 水流速度不宜过快, 否则细胞质的颜色会变浅(图 2C)。甲基绿-派洛宁染色法还可用于评估癌前和癌变过程中细胞核和核仁的变化^[12]。此外, 也可作为常规苏木素-伊红(HE)染色的辅助手段来诊断恶性肿瘤^[9, 13]和检测细胞凋亡^[14-15]。

甲苯胺蓝染色显示脊髓运动神经细胞具有特异性强, 无背景着色, 结果稳定的特点^[16]。本研究用甲

苯胺蓝染液对牛蛙的脊髓运动神经细胞进行显色观察, 在视野中可见许多染色较深的呈单极形、双极形和多极形分枝的运动神经细胞(图 3A~D)。这些细胞个体较大, 细胞中央较膨大, 称为胞体。此外, 运动神经细胞还具有细长的纤维状结构, 能够接收和传导刺 生物学和遗传学中 Tj 13 1 Tf 0 Tr 9.703505 0 0 9.703505 0 -

- [9] PIERCE V M, SIMNER P J, LONSWAY D R, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(8):2321-2333.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. The performance stands for antimicrobial susceptibility testing: M100-S28[S]. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- [11] YAO B, XIAO X Y, WANG F, et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 37(1):107-112.
- [12] CUBERO M, GRAU I, TUBAU F, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013)[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(2):154-160.
- [13] LUO Y, WANG Y, YE L, et al. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(11):818-824.
- [14] CATALÁN-NÁJERA C J, GARZA-RAMOS U, BARRIOS-CAMACHO H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes[J]. *Virulence*, 2017, 8(7):1111-1123.
- [15] YANG X, CHAN E W C, ZHANG R, et al. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Nature Microbiol*, 2019, 4(12):2039-2043.
- [16] CHOBY J E, HOWARD-ANDERSON J, WEISS D S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: clinical and molecular perspectives[J]. *J Intern Med*, 2020, 287(3):283-300.
- [17] LIU P, LI P, JIANG X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(7):1841-1842.
- [18] HENNEQUIN C, ROBIN F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(3):333-341.
- [19] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7(1):483.
- [20] ARENA F, DE ANGELIS L H, D'ANDREA M M, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: a case re-