维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2007)05-0515-03

# Lyon's Feulgen 标准化染色方法与传统 Feulgen 法的比较研究

王正义

(重庆医科大学基础研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:Lyon's Feulgen 标准法与传统 Feulgen 法的比较。方法:用相同组织切片经 Lyon's Feulgen 标准法与传统 Feulgen 方法同时染色,观察阳性强度,比较两法的重复性。结果:相同组织切片经 Lyon's Feulgen 标准法染色阳性产物明显强于传统 Feulgen 法,重复性更好。结论:Lyon's Feulgen 标准法优于传统法。

【关键词】Feulgen;标准化染色方法;组织化学;DNA

【中国图书分类法分类号】R446.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-27

# Comparison between the Lyon's Feulgen standardized staining and traditional Feulgen staining

*WANG Zhengyi*

(*Institute for Basic Medical Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare Lyon's Feulgen standardized staining and traditional Feulgen staining. *Methods*: The sections of the same tissue were stained with the above two methods simultaneously. The results and replicability to the two methods were observed. *Results*: The positive products and replicability of Lyon's Feulgen staining were stronger than that of traditional Feulgen staining in the same tissue-sections. *Coclusion*: Lyon's Feulgen standardized staining method is preferable to the traditional Feulgen staining method.

【Key words】Feulgen; Standardized staining method; Histochemistry; DNA

Feulgen 反应是一种证明细胞内脱氧核糖核酸的染色方法,常用于组织学研究,但由于有许多改良法和各个实验室有自己的经验和习惯,造成染色结果不一致,难以进行比较。

2002 年,丹麦、德国、英国和法国的研究者们共同介绍和推出了标准化 Feulgen 染色方法[1],目的是要统一该法染色条件和步骤,避免这一经典方法的不规范性,保证结果具有重复性,以利于各个实验室间的实验结果进行比较。Lyon 等的 Feulgen 方法代表了欧洲当前的标准方法。但该法与传统方法相比优点何在?是否能替代国内常用的传统方法,需做比较研究。本研究采用相同组织切片经 Lyon's Feulgen 标准法与传统方法同时染色。观察两种方法的阳性强度和结果重复性,以确定是否可以用 Lyon's Feulgen 标准法替代常规传统方法。

作者介绍:王正义(1951- ),男,高级实验师,主要研究方向:组织学技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 染色用石蜡切片材料准备 取 5 只正常大鼠,每只取肝、脾组织各两块,分别用 10%中性甲醛和 Carnoy 液固定,常规石蜡包埋,切处 6μm。每个组织块连续切 6 张片子,各取两张分成 A、B、C 组,其中一张用于传统法,另一张用于 Lyon's 标准法染色。A、B、C 组由 3 个不同的人分别完成。

1.1.2 Lyon's Feulgen 标准法中雪夫试剂的配制 称取 0.5g 盐酸副玫瑰苯胺(parafuchsin)溶于 15ml 1.0N Hcl 中,再加入 85ml 0.5%的偏重亚硫酸钾,放置 24h,加入 0.3g 活性碳振摇 2 分钟,过滤,5℃以上密闭贮备。

1.1.3 传统方法中雪夫试剂的配制[2] 称取碱性红(Fuchsin basic)1g 入 200ml 刚煮沸后的蒸水中,摇动数分钟彻底溶化,冷却至 50℃过滤,加入 1N Hcl20ml,再冷至 25℃时,加入偏重亚硫钠 1~1.5g,盖紧摇溶化,于暗处静置 24h,后变成稻草色,加入活性碳 1~1.5g,振摇 1~2min,过滤,置于冰箱避光保存。

### 1.2 方法

1.2.1 Lyon's Feulgen 标准染色法

维普资讯 http://www.cqvip.com



1.2.1.1 切片在二甲苯中脱蜡 5min，无水乙醇和 50%乙醇各 2min。

1.2.1.2 在重蒸水中水化切片 2min。

1.2.1.3 入 5mol/L 盐酸液中在 22℃水解 60min。

1.2.1.4 在重蒸水中漂洗 2 次，每次 2min。

1.2.1.5 入雪夫试剂在 22℃水溶中染色 60min,盖严。

1.2.1.6 入漂洗液(0.5g 偏重亚硫酸钾入 85ml 重蒸水中，加入 15ml 1.0mol Hcl，该液 12h 内使用)3 次，5min/次，盖严。

1.2.1.7 重蒸水漂洗 2 次，每次 2min。

1.2.1.8 脱水、透明、封片。

1.2.2 传统 Feulgen 染色法

1.2.2.1 切片脱蜡至水。

1.2.2.2 在室温中 1N 盐酸稍洗。

1.2.2.3 予热至 60℃的 1N 盐酸中水解 6~8min。

1.2.2.4 室温中的 1N 盐酸稍洗。

1.2.2.5 重蒸水稍洗。

1.2.2.6 入雪夫试剂，于室温下暗处作用 60~90min。

1.2.2.7 入 0.5%偏重亚硫酸钠水溶液漂洗 2 次，每次 1min。

1.2.2.8 流水冲洗 5min。

1.2.2.9 脱水、透明、封片。

1.2.3 染色结果评定评定方法　为了得到更为直观的印象，以“+”多少来表示阳性的强弱，判定“+”多少的标准是根据各个切片经 Motic 数码显微系统（麦克奥迪公司制造）并用 Motic Digitab2.0 软件测量所得的平均光密度值（在 10 倍物镜下，每张切片测量 3 个视野，被选视野中细胞全复盖，无腔隙，得到的是整个视野的光密度值，3 个视野的光密度值相加然后除以 3)。经测量染色最深，平均光密度值最高的为 0.25，最浅的，最低的平均光密度值为 0.10。因此，我们把平均光密度值 0.10~0.13 的定为 “+”；0.14~0.17 的定为 “++”；0.18~0.21 的定为“+++”；0.22~0.25 的定为“++++”。

## 2 结　果

从表 1，2 中可以清楚地看出，同一组织切片用 Lyon's 标准法染色的阳性强度都大于传统方法“++”。从表 3，4 中看出，3 个人用 Lyon's 标准方法做出的结果相同，而用传统方法 3 个人做出的结果基本都有“+”的差异。

表 1　鼠脾切片两种染色法平均阳性强度比较

| 动物(只) | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 固定 | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy |
| 标准法 | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |
| 传统法 | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ |

表 2　鼠肝切片两种染色法平均阳性强度比较

| 动物(只) | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 固定 | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy |
| 标准法 | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |
| 传统法 | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ |

表 3　脾切片经 3 人分别用传统方法染色所得阳性强度

| 动物(只) | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 固定 | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy |
| A | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| B | + | + | ++ | ++ | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| C | + | ++ | + | + | + | + | + | +++ | + | ++ |

表 4　脾切片经 3 人分别用 Lyon's 标准法染色所得阳性强度

| 动物(只) | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 固定 | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy | 甲醛 | carnoy |
| A | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |
| B | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |
| C | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |

维普资讯 http://www.cqvip.com



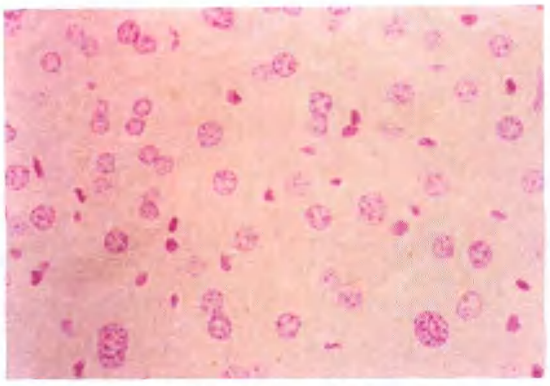


图 1 肝传统法染色,Carnoy 固定,40×

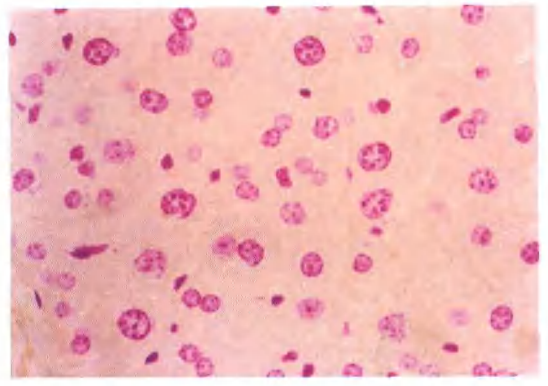


图 2 肝 Lyon's 方法染色,Carnoy 固定,40×

## 3 讨 论

本实验结果说明 Lyon's Feulgen 标准化方法对脱氧核糖核酸的显示比传统方法更明显,染色更强(图 1~2),其原因可能是组织切片在 Lyon's 标准法中水解更恰当,或雪夫试剂配制效果更好。Lyon's 法更稳定,重复性好,是由于步骤中都有严格的时间和温度规定,而传统法中如盐酸水解 6~8min(室温)及在雪夫试剂中 60~90min(室温)都存在一定范围,所以各个人做出的结果肯定不会完全一致,Lyon's 氏法还对各个试剂有严格的质量要求,我们认为这不太符合实际工作情况,只要做到用分析纯就足以了,本研究全部用的是 A.R 级试剂已足以说明标准化染色方法的优点,我们认为以 Lyon's 方法替代传统方法作为常规 Feulgen 方法更好。

## 参 考 文 献

[1] Lyon H,Schulte E,Bare M,et al.Standardized staining Methods: Feulgen-Rossenbeck reaction for desoxyribonucleic and periodic acid Schiff(PAS)Procedure[J].Biotechnic & Histochemistry,2002;77(3):121-125.

[2] 凌启波,主编.实用病理特殊染色和组化技术[M].广东:广东高等教育出版社,1989.190-192.

(上接第 505 页)

和活性,抑制膀胱肿瘤细胞侵袭转移能力。研究结果提示 PLCεsiRNA 可能通过使 PLCε 介导的 Ras 信号通路下游信号分子 PKC 失活的途径而达到抑制膀胱癌细胞侵袭转移能力。

PLCε 基因是与肿瘤发生、发展密切相关的一种基因,将其 siRNA 导入到该基因表达高的膀胱癌细胞系中,可明显抑制肿瘤细胞的侵袭力。这一发现为肿瘤的基因治疗提供了新的思路和理论依据。然而对于 PLCε 基因的研究,还有许多问题需要阐明,如 PLCεsiRNA 的具体作用途径及其相互关系;肿瘤中 PLCε 功能失活的基础、表达的调控等,因此 PLCε 的研究前景广阔。

(通讯作者:罗春丽,Tel:023-68485223,E-mail:luochunli79@hotmail.com)

## 参 考 文 献

[1] 张 睿,张建军,何祖根,等.膀胱癌相关基因研究进展[J].癌症,2003;22(1):104-107.

[2] Chunhua S,Chang-Deng H,Misa M,et al.Regulation of a Novel Human Phospholipase C, PLCe, through Membrane Targeting by Ras[J].The Journal Of Biological Chemistry,2001;276(4):2752-2757.

[3] Knowles MA.The genetics of transitional cell carcinoma:progress and potential clinical application[J].BJU Int,1999;84(4):412-427.

[4] Cordon-cardo C.Molecular alteration in bladder cancer[J].Cancer Sury,1998;32:115-131.

[5] 陈 宏,陈宇英,张振书,等.大肠癌细胞侵袭转移的 PKC 调节机制研究[J].实用癌症杂志,2004;19(4):361-364.

[6] Koivunen J,Aaltonen V,Koskela S,et al.Protein kinase C alpha/beta inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells[J].Cancer Res,2004;64(16):5693-5701.

[7] Foda HD,George S,Conner C,et al.Activation of human umbilical vein endothelial cell progelatinase A by phorbol myristate acetate:a protein kinase C dependent mech-anism involving a membrane-type matrix metalloproteinase[J].Lab Invest,1996;74(2):538.

[8] Uhm JH,Dooley NP,Villemure JG.Ghoma invasion in vitro:regulation by matrix metaloprotease-2 and protein kinase C[J].Clin Exp Metastasis,1996;14(5):421.