维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)05-0663-03

Lyon's PAS 标准化染色方法与传统 PAS 法的比较研究

王正义 , 汪维伟

(重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:Lyon's PAS 标准法与传统 PAS 法的比较。方法:用相同组织切片经 Lyon's PAS 标准法和传统 PAS 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 PAS 法染色阳性产物明显强于传统法,重复性更好。结论:Lyon's PAS 标准法优于传统法。

【关键词】PAS 法;标准化染色方法;组织化学

【中国图书分类法分类号】R446.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-05-16

Comparison between the Lyon's PAS standardized staining and traditional PAS staining

WANG Zhengyi , et al

(*Department of Histology and Embryology , College of Basic Medicine , Chongqing Medical University*)

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

【Key words】PAS staining; Standardized staining method; Histochemistry

PAS(Periodic acid-Schiff)法是一种检测组织细胞内糖类物质的组织化学方法,大量用于组织学研究,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 PAS 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 PAS 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 PAS 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 PAS 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、肾组织各两块,分别用 10%甲醛和 Carnoy 液固定,常规石蜡包埋,切片 6μm。每个组织块的相邻切片中随机取两张进入 A、B、C 组,A、B、C 组各有 20 个组织块的 40 张切片,相同切片中的一张用于传统法,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 PAS 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 2min,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]

称取碱性品红(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 HCl 20ml,再冷至 25℃时,加入偏重亚硫酸钠 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

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 Lyon's PAS 标准染色法：

1.2.1.1 切片脱蜡至水。

1.2.1.2 在 44mmol/L 过碘酸(H_5IO_6)水溶液中，22℃ 水浴中氧化 60min。

1.2.1.3 重蒸水漂洗 2 次，每次 2min。

1.2.1.4 入雪夫试剂，盖紧，22℃ 水浴中处理 60min。

1.2.1.5 入 0.5% 偏重亚硫酸钾液漂洗 3 次，每次 5min。

1.2.1.6 重蒸水漂洗 2 次每次 5min。

1.2.1.7 用常规苏木精淡染，脱水，透明，封片。

1.2.2 传统 PAS 染色法

1.2.2.1 切片脱蜡至水。

1.2.2.2 入 0.5% 过碘酸氧化 5～8min(室温)。

1.2.2.3 流水冲洗 2min，重蒸水洗 1 次。

1.2.2.4 入雪夫试剂，加盖，室温避光处理 10～20min。

1.2.2.5 0.5% 偏重亚硫酸钠滴洗 2 次，每次约 1min。

1.2.2.6 流水冲洗 2min。

1.2.2.7 苏木精淡染，脱水，透明，封片

1.2.3 染色结果评定方法

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 Digitab 2.0 软件测量所得的平均光密度值。经测量染色最深，平均光密度值最高的为 0.29；最浅的，最低的平均光密度值为 0.14。因此，我们把平均光密度值 0.14～0.17 的定为"+"；0.18～0.21 的定为"++"；0.22～0.25 的定为"+++"；0.26～0.29 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"++"(图 1～6)。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。

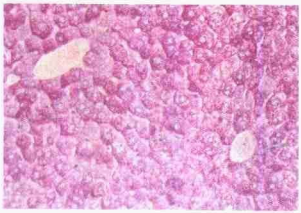


图 1 肝，传统法染色、甲醛固定。20×



图 2 肝，Lyon's 方法染色，甲醛固定。20×



图 3 肝，传统法染色，Carnoy 固定。20×



图 4 肝，Lyon's 方法染色，Carnoy 固定。20×

维普资讯 http://www.cqvip.com

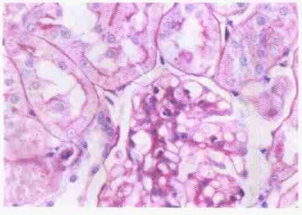


图 5 肾,传统法染色,甲醛固定,20×

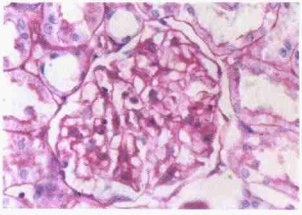


图 6 肾,Lyon's 方法染色,用醛固定,20×

表 1 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	carboy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	Carnoy
标准法	+++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++
传统法	+	+++	++	++	+	++	+	++	+	++

表 2 鼠胃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	carboy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	Carnoy
标准法	+++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
传统法	+	++	++	++	+	++	+	++	+	++

表 3 肝切片经 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	carboy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	Carnoy
A	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++
B	++	+	+	++	+	++	+	++	++	++
C	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+++

表 4 肝切片经三人分别用 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	carboy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	carnoy	甲醛	Carnoy
A	+++	++++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+++	++++
B	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
C	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++++

3 讨 论

本实验结果说明 Lyon's PAS 标准化方法对检测糖类物质比传统方法更敏感,其原因在于组织在过碘酸中氧化彻底,在雪夫试剂中反应也充分。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。而传统法中如高碘酸氧化 5—8min(室温)及在雪夫试剂中 10—20min(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 PAS 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 acid 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]. 广东高等教育出版社, 1989: 201—205.