DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.050

为摸索合适的分离液密度,我们曾试用人淋巴细胞分离液、鼠淋巴细胞分离液和自配的密度为1.083~1.087的Hypaque-Ficoll 400分离液,证明分离鼠疟原虫合子的分离液比重要大于1.083,人淋巴细胞分离液的比重偏低,分离时会造成大量合子的丢失。合子的比重与淋巴细胞相近,因此,合子中有少量淋巴细胞的污染,为进一步提高合子的纯度,可考滤先用纤维素柱过滤的方法去除血中的白细胞[2],然后再经梯度离心法分离可得到纯度更高的疟原虫合子。鸡疟原虫配子体在ES液中10~20 min内即形成雌雄配子并受精[1],本实验证明在22 ℃孵育30 min,约氏疟原虫配子的形成和受精即可完成。

本实验动合子培养结果显示只有不到1%的合子能转化为动合子,这可能与分离所得合子的活力受损有关;另外,未受精的雌配子在形态上与合子不可区分,仅从形态上无法知道分离所得合子中未受精的雌配子所占比例,鸡疟原动合子培养时60%~80%可以转化为动合子[1],因此,约氏疟原虫动合子的体外培养条件还需探讨,进一步研究影响约氏疟原虫合子发育为动合子的因素很有必要。

关键词:约氏疟原虫;合子;分离;动合子培养
中图法分类号:R382.31 文献标识码:B

参考文献:

[1] Kaushal D C, Carter R, Howard R J, *et al*. Characterization of antigens on mosquito midgut stages of Plasmodium gallnaceum Ⅰ zygote surface antigens [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1983, 8(1): 53—69.

[2] Ifediba T, Weiss M M, Vanderberg J P. Infectivity of in vitro-formed Plasmodium berghei ookinetes to mosquitoes[J]. J Parasitology, 1982, 68(2): 333—335.

(编辑 薛国文)

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)12-1488-02

大鼠中枢神经系统全程连续切片显示神经核团的新方法

A new method of demonstrating nerve nucli of rat whole central nervous system in serial sections

陈德英,蔡文琴,刘建军 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 40038)

提 要:目的 摸索一种简便易行的、显示大鼠中枢神经系统(CNS)神经核团的连续切片制作方法,制作神经生物学教学所需的大鼠CNS全程连续切片标本。方法 采用低温速冻、全程连续冰冻切片、0.05%焦油紫(pH 3.0)染色的方法。结果 大鼠CNS神经核团及神经元呈紫蓝色,其它细胞胞核呈淡蓝色。结论 低温速冻、全程连续冰冻切片、低浓度焦油紫(pH 3.0)染色方法适用于显示大鼠CNS神经核团的全程连续切片标本的制作。

显示大鼠中枢神经系统(Central nervous system, CNS)神经核团的连续切片是神经生物学教学中重要的实习标本,也是相关研究工作中的重要参考。目前国内此类标本极为缺乏。传统的CNS连续切片制作方法多为火棉胶切片法[1],其过程相当繁琐,周期长,难以大量制作。目前连续切片制作涉及某一器官如内耳、乳腺癌等的冰冻[2,3]或石蜡连续切片[4],有关大鼠CNS全程连续切片显示神经核团的方法鲜见报道。本研究采用低温速冻、冰冻切片、焦油紫染色方法制作显示大鼠CNS神经核团的全程连续切片,取得满意效果。

1 材料与方法

1.1 动物来源与取材制片

健康成年Wistar大鼠(学校实验动物中心提供)25只,重约250 g,雌雄不拘,分为石蜡切片组、火棉胶切片组、冰冻切片组各5只和低温速冻冰冻切片组10只。

1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后开胸左心室插管,生理盐水灌流冲洗,继以10%Formalin灌流固定。取嗅脑至脊髓腰膨大全程标本10%Formalin后固定4 ℃,2 d。分切为0.5 cm长的小段。按4个分组分别进行固定后处理:常规石蜡包埋切片;常规火棉胶包埋切片;常规冰冻切片组和低温冰箱速冻后冰冻切片组入30%蔗糖,4 ℃,3 d。切片前速冻组将标本于—70 ℃低温冰箱速冻10~15 min恒冷箱连续冰冻切片,片厚30 μm。蛋白甘油处理的洁净载玻片隔张连续贴片。一个大鼠CNS标本做成两套相应的连续切片,自然晾干。

1.2 染色方法

石蜡切片与火棉胶切片按常规分别进行硫堇、焦油紫染色。

冰冻切片入蒸馏水,从70%酒精开始上行至无水酒精脱脂,再下行返回各级酒精20 min,入蒸馏水30 min,2次;分别进行硫堇和0.05%焦油紫醋酸水溶液(pH 3.0)染色;70%酒精分色数秒,镜检至神经元尼氏体清晰,蒸馏水速洗;室温自然干燥,无水酒精脱水,二甲苯透明,DPX封片。

2 结果

石蜡切片组未取得30 μm厚连续切片;火棉胶切片组也未取得满意切片;常规冰冻切片组神经核团结构显示不好;低温速冻冰冻切片组共制作大鼠CNS全程连续切片标本6套,每套标本约1 000片,裱于约100张载玻片上。

基金项目:世行贷款资助"21世纪初高等教育教学改革项目"(B1303)
作者简介:陈德英(1964—),女,重庆市人,实验师,主要从事组织学与神经生物学常规技术方面的研究。电话:(023)68752229
收稿日期:2001-04-12;修回日期:2001-06-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

硫堇染色组尼氏体呈灰蓝色, 背景灰色; 0.05%焦油紫醋酸水溶液(pH3.0)染色组神经核团和神经元轮廓清楚, 尼氏体呈紫蓝色, 神经元胞核为淡染区, 其它细胞胞核呈淡紫蓝色, 背景浅紫色或浅蓝色, 见图 1。

大鼠 CNS 全程连续切片中选取 4 个具有代表性的切面示神经核团和神经元, 见图 1~4。

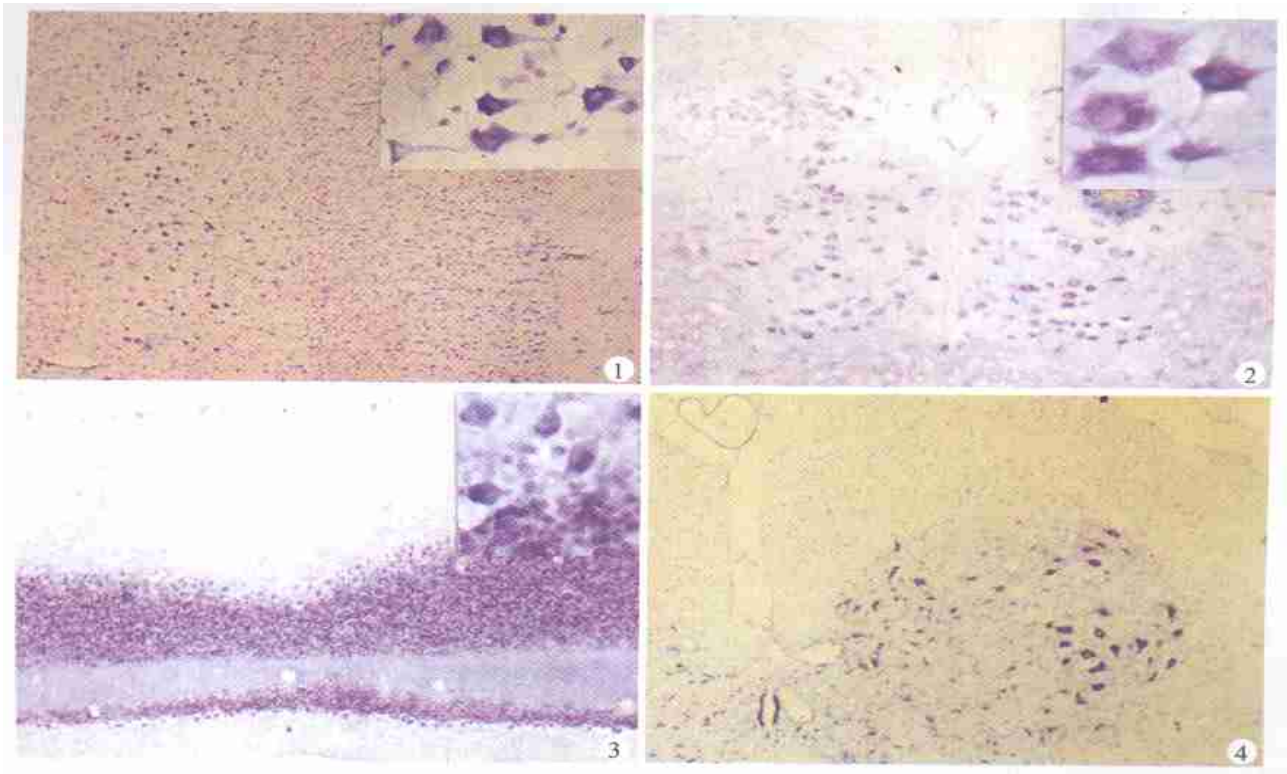


图 1　大脑经胼胝体嘴平面顶皮质 1 区(焦油紫染色×40)　右上角示大脑锥体细胞　(焦油紫染色×200)
图 2　脑干经延髓开敞部平面(焦油紫染色×40)　右上角示下橄榄核　(焦油紫染色×200)
图 3　小脑经后脑平面 示小脑皮质分子层、梨状细胞层和粒层(焦油紫染色×40)　右上角示小脑蒲肯野细胞　(焦油紫染色×200)
图 4　脊髓腰膨大前角内、外侧核　(焦油紫染色×40)

3　讨论

在神经生物学教学和科研工作中, 常常会遇到大鼠 CNS 神经核团定位的问题, 尤其是在研究生教学中迫切需要通过显示神经核团的大鼠 CNS 全程连续切片的观察与讲解, 才能让学员真正建立 CNS 神经核团的完整构象。由于近年来没有大鼠 CNS 全程连续切片显示神经核团的国内外文献报道, 因此我们借鉴其他器官的连续切片方法[2,3], 摸索出大鼠 CNS 全程连续切片、焦油紫醋酸水溶液染色显示神经核团的方法, 制作出较为满意的标本。

在连续切片制作方法方面, 我们分 4 组分别进行石蜡切片、火棉胶切片、常规冰冻切片和低温速冻后冰冻切片。由于全程连续切片要求 30~40 μm, 石蜡切片无法进行[1,4]; 火棉胶切片法周期长, 过程繁琐, 难以大量制作[1]; 常规冰冻切片组织裂隙很大, 结构保存不好; 液氮速冻时间不易掌握。因此我们采用低温冰箱速冻后连续冰冻切片的方法, 防止了冰晶形成, 减少了组织间裂隙, CNS 神经核团显示较好, 且能批量制作。

染色方法方面, 我们分别选用硫堇、焦油紫染尼氏体, 由于硫堇和常规焦油紫染厚片背景易上色, 因此我们采用低浓度焦油紫醋酸水溶液染色, 尼氏体呈紫蓝色, 其它细胞胞核为淡紫蓝色, 背景对比较好。

本实验方法简单, 操作容易, 结果稳定, 重复性好。本课题制作的大鼠 CNS 全程连续切片标本, 解决了教学与科研工作中神经核团的定位问题。需要注意的问题: 载玻片应洁净, 需用蛋白甘油新鲜处理; 冰冻切片应于室温自然干燥 3 d 左右; 冰冻切片染色前需经逐级酒精脱脂; 焦油紫醋酸水溶液的 pH 应为 3 左右; 70% 酒精分色时间应适当, 不宜过长。

关键词: 中枢神经系统; 神经核团; 冰冻连续切片
中图法分类号: R329-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 胡登琨, 杨　森, 刘志勋, 等. 组织学特殊染色技术实践[M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 1989. 164—166, 194—196.
[2] Leong A S. The prognostic dilemma of nodal micrometastases in breast carcinoma[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2000, 27(Suppl 2): 315—320.
[3] 陈一心, 黄振先, 林淑冰, 等. 豚鼠麻疹病毒性迷路炎的病理学观察及地米松的治疗作用[J]. 广州医学院学报, 1997, 25(4): 20—24.
[4] Lockett M A. Efficacy of reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening for micrometastic disease in axillary lymph nodes of breast cancer patients[J]. Am Surg, 1998, 64(6): 539—543.

(编辑　潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net