DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.032

关键词 电泳,聚丙酰凝胶
中图法分类号 R446.112

参考文献

1 周本正.SDS特殊电泳分离技术.实用卫生检测技术大全.北京:科学出版社,1992:94～119
2 郭尧君.SDS电泳技术的实验考虑及最新进展.生物化学与生物物理进展,1991;18(1):32
3 李 磊,王正国,张玉纯等.创伤家兔血清免疫抑制物的初步分离.中华创伤杂志,1994;10(6):252

(收稿:1995-09-04;修回:1996-01-09)
(编辑 优玉福)

固定剂对染色效果影响的研究

Study on the effects of fixatives on staining

古德全 闫国和 栗永萍 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室)重庆,630038

固定对染色效果的影响,直接关系到组织化学染色的成败和质量的高低。为此,我们观察研究了7种固定剂对13种不同染色效果的影响,并简要阐述了有关固定的作用机理与染色效果的相关性和出现染色差别的主要原因。为准确选择适当的固定剂和染色方法,提供了可靠依据。

1 材料和方法

雄性健康小鼠,体重25 g左右,使颈椎脱位活杀,取十二指肠,剪成若干段,分别放入10%中性缓冲福尔马林(NBF)固定24 h、酒精-甲醛(AF)3 h、甲醛钙(Fca)24 h、Carnoy氏液3 h、Bouin氏液24 h、Karnorsky氏液4℃ 12 h、Helly氏液12 h;固定条件及冲洗步骤均按各固定剂的要求。固定后同时按常规脱水、透明和浸蜡,并将各固定剂固定的组织块依次包埋在一个蜡块上。连续切片数十张,其厚度均为4 μm。分别用ABC免疫组化法,以抗Ⅳ型胶原单克隆抗体(重庆医科大学病理生理教研室提供)为一抗显示基底膜;用SP法,以兔抗第Ⅷ因子相关抗原(迈新公司出售)和羊抗鼠IgA(sigma)为一抗分别显示血管内皮第Ⅷ因子和固有层内浆细胞;用PAS法和六胺银法分别显示粘多糖;AB法显示酸性粘多糖;Feulgen-AB法显示DNA和酸性粘多糖;Feulgen改良法显示DNA;Schiff-亚甲兰法显示DNA和RNA、天青Ⅰ伊红法显示浆细胞;Weigert氏间苯二酚品红法显示弹力纤维(EF);V.G法显示胶原纤维。光镜对比观察,并按染色的优劣和组织细胞结构的破坏程度评估分值,极好91～100分,好81～90分,较好71～80分,一般61～70,较差51～60,差41～50分,极差21～40分,阴性或阳性移位为0分。

2 结果

ABC法显示基底膜,以NBF固定最好,尤其对小肠绒毛上皮细胞基底膜显示很清楚;其次是Fca(图1);AF和Bouin氏液固定除粘膜下及隐窝周围略显弥漫性阳性外,其余部位均阴性(图2);Carnoy、karnorsky和Helly氏全为阴性。SP法显示血管内皮第Ⅷ因子,以Fca固定最佳,在粘膜下层固有层的血管内皮及毛细血管中有较多的均匀的棕黄色颗粒,背景清晰,对比度很好;NBF固定的同Fca相差不多,只是清晰度略次;Bouin氏液固定的亦可,只是反应强度不如NBF;AF固定的血管内皮细胞只有少量的阳性颗粒,清晰度也差,尤其组织和细胞结构严重破坏;Carnoy和Helly氏液固定的基本相同,均只在粘膜下血管内皮有少量阳性颗粒,而固有层毛细血管全为阴性;Karnorsky氏液固定的各部血管全阴性。SP法显示浆细胞,以Carnoy氏液和Bouin氏液固定的最好,固有层内有大量阳性细胞,背景清晰,对比度十分好(图3);NBF、Fca、Helly氏和AF固定的阳性反应差不多,均强度差,清晰度不够,尤其AF固定的非特异性着色较强;Karnorsky氏液固定的全阴性。天青Ⅰ伊红法显示浆细胞,以AF固定最好,色彩鲜艳、清晰,但组织和细胞收缩明显;其次是NBF和Fca;Carnoy氏液固定的细胞核着色浅;Karnorsky氏液固定的细胞着色深,但细胞界线模糊不清;Bouin和Helly氏液固定的胞核均几乎不着色(图4)。PAS法显示粘多糖,以Carnoy氏液固定的最好,绒毛上皮细胞游离缘和杯状细胞强阳性,基底膜也有轻度到中度阳性反应;AF、Fca、NBF、Bouin氏液固定的,只胞核着色不同程度的不如Carnoy氏;Karnorsky氏液固定的阳性反应弥漫,对比度十分差。六胺银法显示粘多糖,以Bouin氏液固定的最好,杯状细胞和上皮细胞游离缘以及基底膜均强阳性,对比清楚;NBF、Fca、AF和Carnoy氏液固定的,只基底膜显示较差,其余部位的阳性反应和Bouin氏液基本相同;Karnorsky氏液固定的阳性反应弱,对比度差;Helly氏液固定的,除杯状细胞有阳性反应外,其余部位均阴性。AB法显示酸性粘多糖,7种固定剂固定的均有阳性反应,而且部位相同;但从清晰度看,Carnoy氏液最好;Karnorsky氏液最差。Feulgen-AB法显示DNA和酸性粘多糖及用改良Feulgen法显示DNA,均以Carnoy氏液固定最好;Bouin氏液最差;其余几种固定亦可。Schiff-亚甲兰法显示

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

	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	基因[illegible]	90	50	40	S-[illegible]	85
	基因[illegible]	70	98	75	S-[illegible]	98
-伊红	基因[illegible]	80	70	50	天[illegible]	50
	脂多[illegible]	90	98	80	PAS	90
	脂多[illegible]	85	84	10	大[illegible]	[illegible]
	酸性粘多[illegible]	80	85	80	ABO	75
B	中性和酸性脂多[illegible]	90			PAS	96
n+AB	DNA和酸性黏多[illegible]	80			Fe[illegible]	[illegible]
ulgen	DNA	85	90	95	85	改[illegible]
亚甲兰	DNA和 RNA	90	85	80	S-[illegible]	[illegible]
's	嗜[illegible]颗	95	99	98	W[illegible]	[illegible]
	肠[illegible]颗	70	80	60	V[illegible]	60

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

3 讨论

结果表明，用同一染色方法显示不同固定剂固定的同一成分，其染色效果不一样；而不同染色方法显示同一固定剂的同一成分也可出现差异。分析其原因，从我们的制片和染色过程看，都是同步进行，故由动物个体差异、细胞的周期变化以及制片和染色条件方面引起的误差可以排除。而主要是由于固定剂和染色方法的改变，使固定和染色特性发生了变化。普遍认为固定剂和染色液的pH、总离子强度、特殊离子成分、电介质常数、渗透性以及固定和染色时间、温度和方法都可使固定和染色特性发生变化，进而导致结果的不同。

甲醛能与蛋白质的许多功能基结合，可较广泛地用于多种组化染色。甲醛固定时，特别涉及到的蛋白质基团有氨基、肽、胍基、羟基、羧基、SH和芳香环，可在相邻蛋白质链之间形成桥键($R-CH_2-R$)，使蛋白质保持稳定。然而，组织细胞内蛋白质与甲醛的许多结合，可因水解而破裂，经简单的水洗后，能使多数反应基团与所用的试剂或染料起反应。但Donald L. Weaver等(1992)提出：随甲醛交链蛋白质的增加，使细胞浆基质能变成凝胶，故在以后的免疫反应中，使抗体移动受到抑制，若交链发生在特殊抗原的抗体反应位置，抗体结合可被扰乱或阻断；在某些例子中，用蛋白水解酶，如胰蛋白酶作组织消化处理，可打开凝胶基质，使免疫反应增强[1]。Chan ASY等(1994)试用了10种固定剂和NBF不同固定时间对结肠组织内巨噬细胞的KPI(D68抗原)免疫组化显示的影响，结果认为B_5固定剂最好。NBF固定4 h，经胰蛋白酶作用，也可得到满意结果，但NBF固定20 h，染色强度显著减弱，固定2 d后，全为阴性反应[2]。在我们的实验中，用ABC法显示基底膜，NBF和Fca固定的都很好，而用SP法显示浆细胞，NBF固定的却不如Carnoy和Bouin氏液好。

上述资料提示甲醛可较广泛地用于多种组化(包括免疫组化)和特殊染色。但不能认为对所有染色都是一种可选择的优良固定剂。

酒精固定可引起严重的形态结构上的扰乱。酒精是一种蛋白沉淀剂，能使酶的反应基处于原位，故多用于酶组织化学。但由于固定过程中使组织和细胞收缩变形，甚至使某些物质(如糖原)移位，故很少单独使用[3]。Donald L. Weaver等(1992)提出用碱性酒精固定，能很好保存抗原和改善形态上的扰乱，因此认为对免疫细胞化学优于福尔马林。然而，我们用AF固定的小肠，进行13种不同染色的结果表明，都次于或相当于NBF固定的。尤其对组织和细胞都有明显的收缩效应。

含铬、汞固定剂的主要优点是保存细胞核极好。铬盐具有与水形成Cr-O-Cr型络合物的性能，这种络合物和相邻蛋白链上的反应基结合而产生束缚效应。汞对巯基和二硫基有选择性亲和力，将蛋白质交链，使其凝结或沉淀。含铬、汞固定剂(如Helly氏液)的主要优点是保存细胞核极好。有人认为汞也能较好地保存抗原的反应性和敏感性，但我们用Helly氏液固定，所作的几种免疫组化，都未得到好的结果；这可能与所反应的抗原类型有关，有待进一步研究。

总之，要想得到良好的染色效果，必须根据被观察物、固定剂和染色方法的特性及其相互关系选择适当的固定剂和染色方法；尤其为免疫组化和原位核酸分子杂交技术更应严格掌握。

参考文献

1 Weaver DL, Mitchell J, Leslie KC. Effects of four primary fixatives on the sensitivity of immunocytochemical staining. J histotechnol, 1992; 15(1): 27

2 Chan ASY, Cheung KN, Chiu KY. KPI Immunohistochemical demonstration of macrophages in colorectal tissues: Effects of different fixatives and different fixation times. J histotechnol, 1994; 17(4): 329

3 MacDonald G. Carbohydrate retention in routinely processed paraffin sections: Comparative study of stat fix, neutral buffered formalin, and Gendre fluid. J Histotechnol, 1992; 15(2): 123

(收稿：1995-06-28；修回：1996-01-23)

(编辑 仇玉福)

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