

• 论 著 •

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*

XU Benjin, LIU Ling, XUAN Yan, DU Miao

Laboratory Medicine of Department in Fenyang College of Shanxi Medical University, Loliang, Shanxi 032200, China

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 after Feulgen reaction, and the cytoplasm was green. The optimum conditions for the reaction were hydrolysis for 2 min at the room temperature, for 8 min at 60 ℃, re-hydrolysis for 2 min at the room temperature, and re-dyeing for 40 s. After staining with methylgreen-pyronin, the nucleus appeared blue and the cytoplasm was pink. The spinal motor nerve cells were dyed dark blue. **Conclusion** The optimum time of light green re-dyeing in Feulgen reaction was 40 s. Methylgreen-pyronin is capable to simultaneously conduct the localization and qualitative analysis of intracellular DNA and RNA. This study method has a certain theoretical and practical significance for experimental teaching, scientific research and clinical practice.

Key words: Feulgen reaction; methylgreen-pyronin; nucleic acids; bullfrog blood cells; motor nerve cells

核酸的细胞化学染色是利用化学试剂与核酸分子反应生成带颜色的产物,从而达到对细胞内 DNA 和 RNA 定位和定性的目的,是细胞遗传学研究的重要手段。1924 年有研究者发明了 DNA 显色的经典方法——福尔根反应^[1]。该反应还可用于 DNA 的化学计量测定^[2]、区分肿瘤性质和判断病变程度等^[3]。甲基绿-派洛宁染色已被广泛用于细胞内 DNA 和 RNA 的显示^[4]。

牛蛙具有血细胞大^[5-6]、肌肉发达、性情温和等特点,是了解肌肉、呼吸系统、心脏和循环系统^[7]结构特征的良好材料。本研究对牛蛙血细胞中的核酸和脊髓运动神经细胞进行了显色,对实验的注意事项进行了分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料 健康牛蛙数只,染色缸,载玻片,盖玻片,镊子,剪刀,香柏油,擦镜纸。

* 基金项目:山西省高等学校科技创新项目(2020L0749);山西省高等学校大学生创新创业训练计划重点项目(2020777);山西省吕梁市科技计划项目(2020SHFZ29);山西医科大学汾阳学院引进人才启动基金项目(2020A01)。

作者简介:徐本锦,男,讲师,主要从事细胞与分子生物学研究。

本文引用格式:徐本锦,刘玲,宣焱,等.牛蛙血细胞核酸和脊髓运动神经细胞的显色观察[J].国际检验医学杂志,2021,42(2):161-164.

1.2 仪器与试剂 仪器:普通光学显微镜,恒温水箱。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。

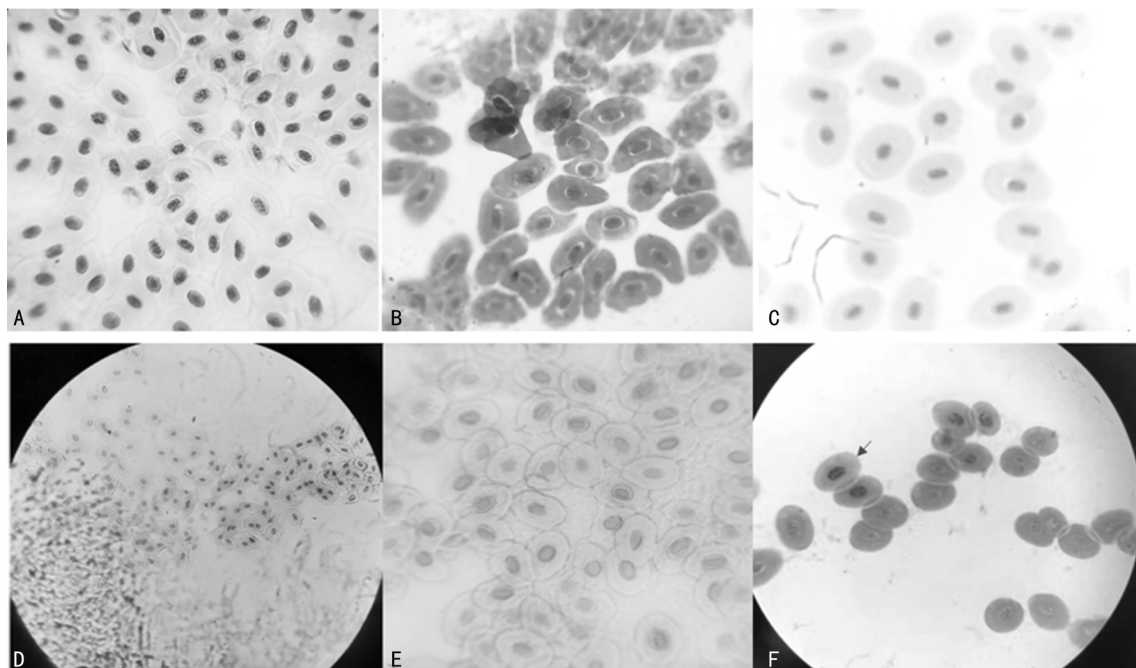
1.3.2 牛蛙血细胞 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁染色 具体实验步骤包括:(1)取材,同上。(2)涂片,同上。(3)固定。在晾干的血涂片上滴加一层 95%乙醇,室温固定 5 min,然后吸去乙醇再放置 5 min。(4)染色。在血涂片表面滴加 1 层(3~4 滴)甲基绿-派洛宁染液,染色 20 min 后用小流量的水冲洗掉多余染

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),细胞质呈暗绿色(图 1B)。当复染时间为 30 s 或更短时,细胞质变为浅绿色(图 1C)。在显微镜下,还经常可以看到有些细胞核是红色的,有些细胞核颜色很浅或几乎没有红色(图 1D~E)。这是由于局部水解不充分或不完全造成的。另外,当复染时间大于 60 s 时,可以看到部分细胞质颜色变为浅海绿色,细胞核的紫红色也被一定程度覆盖了(图 1F 中的黑色箭头)。因此,福尔根反应显色血细胞 DNA 的最佳条件为室温水解 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。



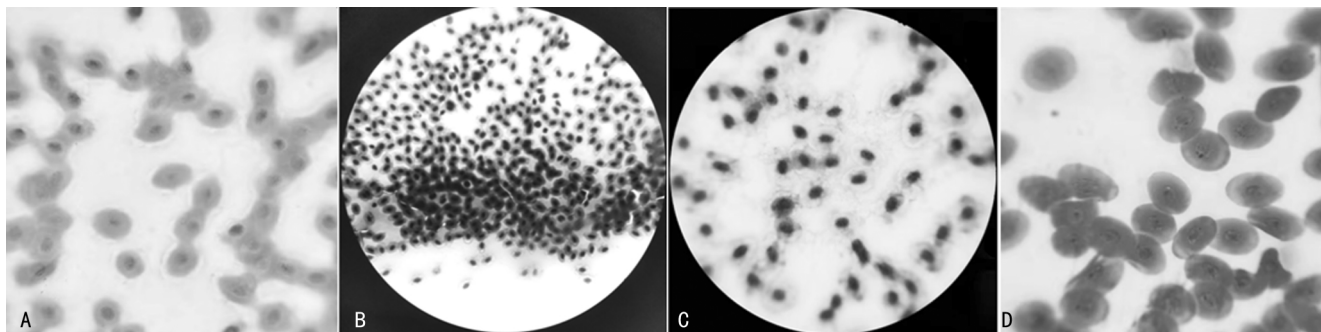
注:A 为亮绿复染约 40 s($\times 400$);B 为亮绿复染 50~60 s($\times 400$);C 为亮绿复染约 30 s($\times 400$);D 为亮绿复染约 30 s,并且部分水解不充分($\times 100$);E 为水解不充分($\times 400$);F 为亮绿复染 60 s 或更长时间($\times 400$)。

图 1 牛蛙血细胞 DNA 的福尔根反应显色结果

2.2 血细胞 DNA 和 RNA 同时显色 血细胞中的 DNA 和 RNA 经甲基绿-派洛宁染色后,可以看到细胞核变成了蓝色,细胞质变为粉红色(图 2A)或深紫色(图 2B~D)。

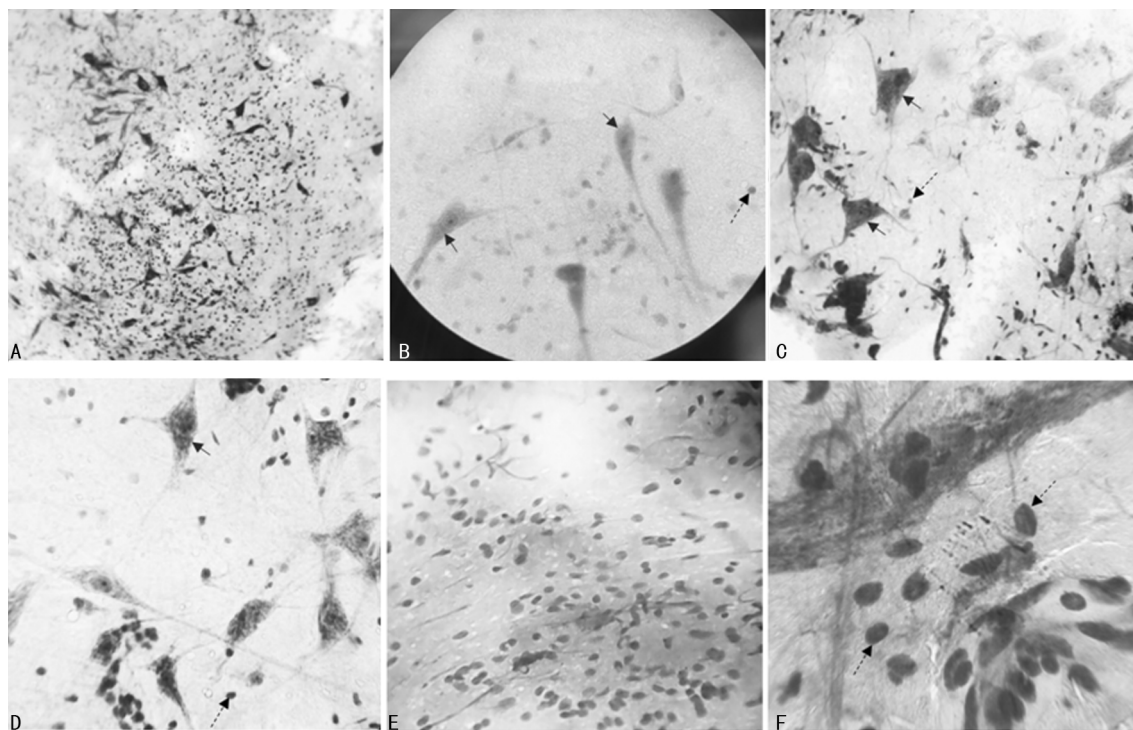
2.3 脊髓运动神经细胞的染色观察 牛蛙的高位脊髓经甲苯胺蓝染色后,可以看到单极形(图 3A,以及图 3B 左上角的黑色实线箭头)、双极形(图 3A,以及

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、E,以及图 3B~D、F 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)。



注:A、C、D 为×400 放大倍数下的视野;B 为×100 放大倍数下的视野。

图 2 血细胞 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁染色结果



注:A 为×100 放大倍数下的视野;B~E 为×400 放大倍数下的视野;F 为×1 000 放大倍数下的视野。

图 3 牛蛙脊髓运动神经细胞的甲苯胺蓝染色结果

3 讨 论

细胞化学是研究细胞内化学成分及其在细胞活动中的变化和定位的学科。核酸定位和细胞化学染色是生命科学,特别是遗传学研究的重要手段。DNA 细胞技术在评估肿瘤侵袭性方面发挥着重要作用^[8],可以为肿瘤病理分级和临床分期提供有价值的信息。细胞化学染色不仅有助于研究细胞的代谢活动、生理功能,而且对生理和病理情况下血细胞化学成分的变化,各种类型血细胞的鉴别,某些血液病的诊断、治疗

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)、暗绿色(图 1B)或浅绿色(图 1C)。通过对亮绿复染时间的优化,确定了牛蛙血细胞 DNA 显色的最佳条件:室温水

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, 能够接收和传导刺激, 称为神经纤维。运动神经细胞中也可见深蓝色的核仁(图 3B~D)。还可以看到许多染色较深的小细胞, 即神经胶质细胞。本实验有两个需要注意的地方: (1) 取材。取牛蛙高位脊髓, 因为高位脊髓中的运动神经细胞数目较多, 而低位脊髓中几乎看不到运动神经细胞, 只能看到数量较多的神经胶质细胞。(2) 压片。一定要确保脊髓被捣碎, 然后压为一薄层, 否则, 只能看到很少的细胞或者几乎看不到细胞。

综上所述, 牛蛙是研究核酸在血细胞中的定位和显示神经系统特性的良好材料。在福尔根反应中引入亮绿复染并优化染色时间是一种较好的方法, 提高了细胞核与细胞质颜色的对比度, 有利于进行后续的核酸定量分析。甲基绿-派洛宁染色能同时对 DNA 和 RNA 进行定位和定性分析。1% 的甲苯胺蓝染色能很好地显示牛蛙高位脊髓中运动神经细胞的形态。本文系统地分析和讨论了这 3 个实验的影响因素, 对实验过程中可能出现显示不佳的结果也进行了呈现和说明, 并提出了操作过程中的注意事项。本研究结果可靠, 可重复性好, 对实验教学、科学研究以及临床应用都具有一定的理论和实践意义。

参考文献

- [1] MELLO M L S, VIDAL B D C. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives[J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(6): 603-609.
- [2] MAZZINI G, DANOVA M. Fluorochromes for DNA staining and quantitation[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1560: 239-259.
- [3] 黄荣祥, 余岚岚, 朱晨雁, 等. Feulgen-EA 双重染色固定液应用评价[J]. *检验医学*, 2017, 32(8): 704-708.
- [4] 陈小辉, 胡乐, 柯志勇, 等. 洋葱内表皮细胞中 DNA 和 RNA 染色方法的改进[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(7): 702-704.
- [5] 龚小玲, 王米雪, 汪德海, 等. 牛蛙外周血细胞的形态学特点[J]. *动物学杂志*, 2015, 50(4): 591-599.
- [6] 金星星, 张耀光, 陈幕飞, 等. 4 种两栖爬行动物血细胞的显微结构及细胞化学特征观察[J]. *四川动物*, 2015, 34(2): 223-228.
- [7] 叶春芳, 南旭阳, 项君露, 等. 稻草必克对牛蛙心脏功能和红细胞的影响[J]. *毒理学杂志*, 2015, 29(5): 347-351.
- [8] YANG X, XIAO X, WU W, et al. Cytological study of DNA content and nuclear morphometric analysis for aid in the diagnosis of high-grade dysplasia within oral leukoplakia[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017, 124(3): 280-285.
- [9] METGUD R, GUPTA K, PRASAD U, et al. Cytomorphometric analysis of oral submucous (下转第 170 页)

- [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 report and literature review [J]. Virulence, 2017, 8(8): 1900-1908.
- [21] SHON A S, BAJWA R P S, RUSSO A T. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. Virulence, 2013, 4(2): 107-118.
- [22] LIU Z, GU Y, LI X, et al. Identification and characterization of NDM-1-producing hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Ann Lab Med, 2019, 39(2): 167-175.

(收稿日期: 2020-07-19 修回日期: 2020-10-26)

(上接第 164 页)

- fibrosis and leukoplakia using methyl green-pyronin Y, Feulgen staining and exfoliative brush cytology[J]. Biotech Histochem, 2015, 90(1): 8-13.
- [10] LI B, WU Y, GAO X M. Pyronin Y as a fluorescent stain for paraffin sections[J]. Histochem J, 2002, 34(6/7): 299-303.
- [11] MEYERHOLZ D K, RODGERS J, CASTILOW E M, et al. Alcian blue and pyronin Y histochemical stains permit assessment of multiple parameters in pulmonary disease models[J]. Vet Pathol, 2009, 46(2): 325-328.
- [12] MOHTASHAM N, MAHDAVI-SHAHRI N, SALEHINE-JAD J, et al. Detection of nucleoproteins in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity by methyl green-pyronin staining[J]. J Oral Sci, 2010, 52(2): 239-243.
- [13] RAMAN R K, KAMBOJ M, NARWAL A. The diagnostic role of methyl green-pyronin Y staining in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an exfoliative cytology-based cytomorphometric analysis[J]. Acta Cytol, 2019, 63(5): 401-410.
- [14] SUMEDHA S, KOTRASHETTI V S, SOMANNAVAR P, et al. A histochemical comparison of methyl green-pyronin, and hematoxylin and eosin for detecting apoptotic cells in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, oral submucous fibrosis and normal oral mucosa[J]. Biotech Histochem, 2015, 90(4): 264-269.
- [15] NAYAK A, RAIKAR A, KOTRASHETTI V, et al. Histochemical detection and comparison of apoptotic cells in the gingival epithelium using hematoxylin and eosin and methyl green-pyronin: a pilot study[J]. J Indian Soc Periodontol, 2016, 20(3): 294-298.
- [16] 刘同慎, 李冰, 罗慧琼, 等. 尼氏体的甲苯胺蓝组织块染色法[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(4): 474-476.

(收稿日期: 2020-06-12 修回日期: 2020-10-20)