

王庆容,徐晓舒,夏浪,等.不同温度对 HE 染色效果的影响[J].江苏农业科学,2017,45(22):168-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.046

不同温度对 HE 染色效果的影响

王庆容,徐晓舒,夏浪,杨秀荣

(遵义师范学院生命科学学院/贵州省赤水河流域植物资源保护与应用研究特色重点实验室,贵州遵义 563002)

摘要:取草鱼的肾组织、肝组织、肠组织,选择 25、35、45℃这 3 种不同温度进行 HE 染色,以观察不同温度条件下的染色效果。结果表明,在 35℃温度时所染的装片脱蜡较为彻底,染色效果很明显,细胞核与细胞质以及细胞之间的间隙可以清晰看到;而在 25、45℃温度条件下染色效果则不明显。

关键词:草鱼;HE 染色;组织切片;最适温度;染色效果

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)22-0168-02

HE 染色即苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining),是石蜡切片技术里常用的染色法之一。HE 染色法是组织学、胚胎学、病理学教学与科研中最基本、使用最广泛的技术方法^[1]。苏木精可以将组织的嗜碱性结构(如核糖体、细胞核及细胞质中的核糖核酸等)染成蓝紫色,伊红可以将组织的嗜酸性结构(如细胞内及细胞间的蛋白质,包括路易体、酒精小体以及细胞质的大部分)染成粉红色,使整个细胞组织的形态清晰可见^[2]。组织切片方法是教学、科研、病理检验工作中非常常用的一种试验方法,HE 染色则是在制作切片的过程中最常用的染色方法^[3]。在实际试验操作过程中并不是每一张切片的质量都会出现预期的效果,而各种因素都会对切片的质量产生影响^[4]。因此,制备一张质量好的切片,考虑的因素必须是多方面的,而温度的影响则是不可忽视的因素之一。

本试验选择外观正常、生长状况良好、体表无明显病变的草鱼,处死后取其肾、肝、肠分别进行组织学切片,选择 25、35、45℃等不同的温度处理,观察在不同温度条件下的染色效果,以期找出 HE 染色的最适温度,为组织切片的染色技术提供一定帮助。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 草鱼的肾、肝、肠组织切片。

1.1.2 试剂配制 常用于组织学切片制作的试剂有 Bouin 氏液(苦味酸 75 mL、40% 甲醛 25 mL、冰醋酸 5 mL)、粘合剂(鸡蛋清)、清洗液(重铬酸钾 80 g、水 1 000 mL、粗制浓硫酸 120 mL)、乙醇(分别配制了 70%、80%、90%、95%、100% 5 种浓度)、1/2 二甲苯(乙醇和二甲苯按 1:1 比例配制)、氨水(1%)、酸水(1%)、0.2% 苏木精染色液(苏木精 6 g、无水乙

醇 100 mL、硫酸铝钾 150 g、蒸馏水 2 000 mL、碘酸钠 1.2 g、冰醋酸 120 mL、甘油 900 mL)、0.5%~1.0% 伊红染色液(95% 乙醇配制)等。

1.1.3 试验仪器 本试验所用的仪器主要有精密电子天平(AUY)、电热鼓风干燥箱(101-5 型)、包埋机(徕卡 YB-6LF)、轮转式切片机(徕卡 RM2016)、摊片机(徕卡 HI1210)等。

1.2 试验方法

试验的主要步骤如下:取材、固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、展片、染色、封片、镜检观察,详细步骤参考唐从国等的方法^[5]。

2 结果与分析

2.1 不同温度条件下草鱼肾组织的 HE 染色效果

用显微镜观察 3 种温度条件下进行的 HE 染色,可以明显发现,在 25℃时,由于温度较低,组织之间的蜡块没有完全脱掉,细胞核模模糊糊,不呈蓝色,颜色比较暗沉,不清晰,染色效果不明显(图 1-a);在 35℃时,可以清晰地看到细胞间的界限,细胞核呈蓝色,其他部分呈红色或者粉红色,细胞排列紧密、规则,染色效果很明显(图 1-b);45℃时染色效果比 35℃的差,可以看到细胞界限,但是部分组织或者细胞核破裂,细胞核着色不明显或发灰(图 1-c)。以上结果显示,对于草鱼的肾脏组织,在 35℃左右的温度条件下染色效果较好。

2.2 不同温度条件下草鱼肝组织的 HE 染色效果

用显微镜观察不同温度条件下肝组织的切片,可以发现,在 25℃时,肝组织中有很多蜡块没有脱掉,细胞核模糊,但形态依稀可见,细胞界限不清晰,细胞核能被染成蓝色,但是染色效果不明显(图 2-a);在 35℃时,可以很清晰地看到肝细胞呈卵圆形,细胞核大而圆,且被染成蓝色,周围的组织也被染成粉红色或者红色,细胞界限清晰,染色效果较好(图 2-b);在 45℃时,可以发现细胞之间的界限比较模糊,隐约可以看到细胞核被染成淡蓝色,少数组织染色不均,染色效果较 35℃时稍差(图 2-c)。以上结果显示,对于草鱼的肝脏组织,在 35℃左右的温度条件下染色效果较好。

2.3 不同温度条件下草鱼肠组织的 HE 染色效果

用显微镜观察不同温度条件下的草鱼肠组织切片,可以发现,在 25℃时,跟肾组织和肝组织切片一样,组织块之间的蜡没脱完全,可以隐约看到肠绒毛,细胞界限不清晰,细胞核

收稿日期:2016-03-17

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合 NZ[2013]3027 号);贵州省教育厅“125 计划”重大科技专项(编号:黔教合重大专项字[2013]025 号);贵州省科技厅联合基金(编号:黔科合 J 字 LKZS[2012]17 号)。

作者简介:王庆容(1972—),女,贵州务川人,硕士,教授,主要从事动物分子生物学及疾病防治研究。E-mail:610194977@qq.com。

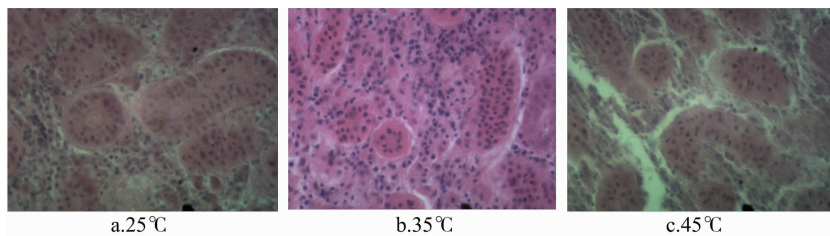


图1 不同温度条件下草鱼肾组织的HE染色效果(10×40)

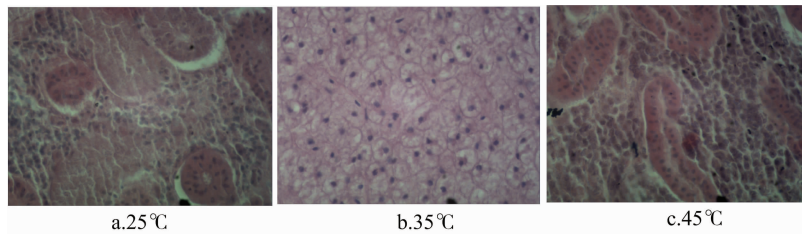


图2 不同温度条件下草鱼肝组织的 HE 染色效果(10×40)

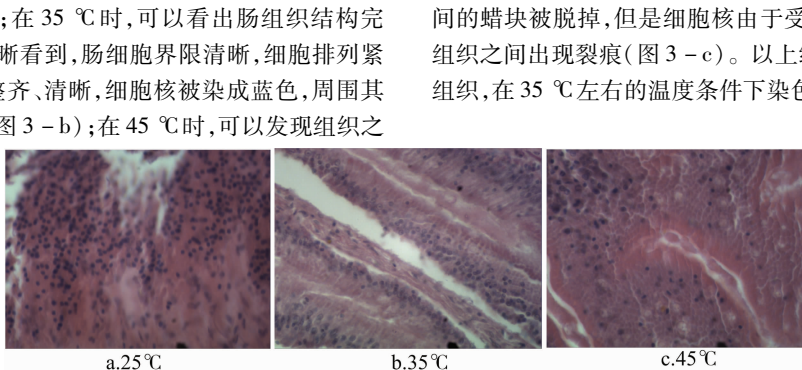


图3 肠不同温度条件下 HE 染色效果(10×40)

染色较明显(图3-a);在35℃时,可以看出肠组织结构完整,肠壁肌肉层均可清晰看到,肠细胞界限清晰,细胞排列紧密、规则,肠绒毛排列整齐、清晰,细胞核被染成蓝色,周围其他组织被染成粉红色(图3-b);在45℃时,可以发现组织之

间的蜡块被脱掉,但是细胞核由于受到高温,着色不明显,且组织之间出现裂痕(图3-c)。以上结果显示,对于草鱼的肠组织,在35℃左右的温度条件下染色效果较好。

3 讨论与结论

影响组织切片 HE 染色效果的因素很多,温度是较敏感的因素之一。要做好一张 HE 组织切片,须注意许多细节问题。取材时要注意整个组织的形态特点,组织块大小适宜、厚薄均匀、形状规则,一般大小为3~5 mm,夹取组织时不能用力挤压,避免机械损伤^[6]。在制作组织切片的过程中,温度对染色效果的影响比较明显,温度过高或过低都会对结果产生直接影响。当温度过低时,二甲苯的脱蜡达不到预期的效果,组织内蜡太厚,不仅不利于细胞核以及胞浆着色,而且还不利于观察。当温度过高时,脱蜡或许能达到目的,但是高温也会对装片产生很多影响,如着色不明显、发灰等。在制作切片的过程中,低温时需要在脱蜡这一环节延长时间,这样就不能在有效的时间内制作出一张令人满意的装片,不仅浪费时间,而且还浪费试验材料。因此,本研究采用恒温箱,选取3种不同温度进行试验,验证了35℃左右为较合适的染色温度,在一定程度上节约了时间和试验材料。

当然,温度并不是影响组织切片染色的唯一因素,染色前期的很多试验步骤对染色的影响也很大,包括取材、固定、浸蜡、烤片等步骤。如果固定不及时、不充分会造成细胞着色差或者发灰、组织结构模糊不清等。浸蜡、烤片这方面的因素容易被忽视,很多情况下细胞核发灰都与其相关,如果浸蜡、烤片温度过高,就会造成组织收缩变脆、细胞核染色不明显或发

灰等。一些试剂(苏木精、伊红等)在染色过程也会对试验结果产生影响。

在25℃温度条件下,装片的细胞核、细胞质着色不明显,细胞核模糊不清,细胞界限不清晰,是因为组织块脱蜡不彻底。组织块在二甲苯中脱蜡需要合适的温度,温度过低,将导致脱蜡不彻底。在35℃温度条件下,装片的细胞核、细胞质着色很明显,细胞核被染成蓝紫色或蓝色,细胞质呈红色或者粉红色,细胞界限清晰,脱蜡较为彻底,能达到试验的目的。在45℃温度条件下,装片的细胞核、细胞质着色也比较明显,细胞核呈淡蓝色,细胞质呈红色或者粉红色,细胞界限可以大致看到模糊的轮廓。温度过高,会导致组织块出现裂痕,部分细胞核、细胞质破裂。

综上所述,在组织切片时,夏天温度高,在常温下染色可以达到目的,但是冬季温度低,应该在恒温箱内染色,且最理想的 HE 染色的温度应该控制在32~37℃之间。温度低了,组织块之间脱蜡就不完全,引起细胞核模糊不清,染色着色不明显,并且细胞之间的界限也不清晰;温度高了又使得细胞破裂,组织结构之间出现裂痕,细胞核着色不明显或发灰。

参考文献:

- [1] 田玉旺,李琳,朱红艳,等. 常规 HE 染色易出现的问题、原因及解决方法[J]. 诊断病理学杂志,2008,15(6):500-502.

陈倩, 苏胜彦, 刘思辰, 等. 不同放养规格和放养密度下吉富罗非鱼体长生长模型研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22): 170–175.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.047

不同放养规格和放养密度下吉富罗非鱼体长生长模型研究

陈倩^{1,2}, 苏胜彦², 刘思辰¹, 叶伟^{1,2}, 朱伟凡¹, 袁新华^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081; 2. 中国水产科学院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要:为研究不同放养规格和养殖密度下吉富罗非鱼的体长生长规律, 采用 von Bertalanffy、Gompertz、Logistic、Brody 4 种生长模型对吉富罗非鱼体长的生长进行拟合, 使用 R-Studio 软件自行编程求出模型中各生长参数, 以 AIC 统计量作为确定吉富罗非鱼体长最优生长模型的准则。结果表明, 4 种模型均能很好地模拟吉富罗非鱼生长曲线, 其中平均体长为 0.8 cm (SL1) 的试验组以 Gompertz 模型为最佳, 平均体长为 (2.8 ± 0.14) cm (SL2) 的试验组以 Logistic 模型为最佳。体长生长瞬时生长速度曲线均呈先上升再下降的趋势, SL2 试验组比 SL1 试验组更具养殖优势, 养殖密度为 15 尾/m² (D1) 的个体生长状况优于养殖密度为 30 尾/m² (D2) 和 60 尾/m² (D3) 的个体生长状况。研究结果可为吉富罗非鱼的育种研究、规模化养殖及养殖管理模式优化提供理论依据。

关键词:吉富品系尼罗罗非鱼; 生长模型; AIC 准则; 体长; 规格; 密度

中图分类号: S965.125 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0170-06

罗非鱼 (*Tilapia*) 属慈鲷科非鲫属, 外形类似鲫鱼, 鳍条多刺, 原产于非洲的坦噶尼喀湖, 俗称非洲鲫鱼、非洲仔等。联合国粮农组织 (FAO) 在 1976 年向世界推广养殖罗非鱼, 其作为物美价廉的经济鱼类, 快速获得世界各国的认可与养殖, 也是中国主要的养殖鱼类之一。吉富罗非鱼具有生长速度快、养殖周期短、食性杂、抗病力强等优点, 在广东省、海南省、福建省、云南省和广西壮族自治区这 5 个主产区实现了大规模养殖。范立民等在研究养殖密度对吉富罗非鱼的生长性状的影响时发现, 放养密度为 27 000 尾/hm² 时, 吉富罗非鱼的体长和体质量要小于放养密度为 18 000 尾/hm² 和 22 500 尾/hm² 时, 高密度会对罗非鱼的生长产生负影响^[1]。朱佳杰等研究发现, 吉富罗非鱼放养规格为 2.5~2.7 cm 的试验组比 0.8~1.0 cm 和 1.2~1.5 cm 的试验组的亩产量、成鱼规格、成活率高^[2]。因此, 研究不同放养规格和养殖密度下吉富罗非鱼的生长情况, 以量化模型研究其生长发育规律, 对吉富罗非鱼的养殖发展具有重要意义。

生长模型可以反映生物个体生长发育的规律性变

化^[3-4], 鱼类的生长曲线研究有助于掌握鱼类的生长规律^[5]。国内对吉富罗非鱼的生长模型研究仅限于同种规格和密度的研究, 如唐章生等用 4 种生长模型对网箱单养吉富罗非鱼的生长进行了拟合, 得出 VB-GF 生长模型对体质量生长的拟合效果最好, 而 Gompertz GF 生长模型对吉富罗非鱼体长生长的拟合效果最好^[6]; 肖俊等对尼罗罗非鱼生长相关参数进行生长模型构建, 对尼罗罗非鱼的生长发育规律进行了研究, 得出 Logistic、Gompertz、Bertalanffy 这 3 种模型均能很好地模拟尼罗罗非鱼生长曲线, 其中以 Logistic 模型的拟合度最高^[7]。而对于罗非鱼在不同密度和放养规格的情况下的生长模型研究尚未见报道。本研究采用 4 种常用的生长模型拟合吉富罗非鱼在 2 种放养规格和 3 种放养密度下的生长, 揭示其体长生长规律, 旨在为吉富罗非鱼育种研究、养殖模式选择和养殖生产经济性性状预测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用鱼 供试吉富罗非鱼由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心岷亭科研实验基地提供。设置 2 种放养规格, 每种分别为 4 200 尾, 试验鱼体长均值为 0.8、(2.8 ± 0.14) cm, 用 SL1、SL2 表示。

1.1.2 试验池塘 试验地点设于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心岷亭科研实验基地, 试验池塘为 12 个长方形水泥池 (长 × 宽 × 高为 10.0 m × 2.0 m × 1.5 m)。养殖用水为

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-49);
FAO 资助项目“罗非鱼经济调查研究”。

作者简介: 陈倩 (1990—), 女, 江苏兴化人, 硕士研究生, 主要从事渔业经济管理研究。E-mail: chenq@ffrc.cn。

通信作者: 袁新华, 博士, 研究员, 主要从事渔业经济管理研究。
E-mail: yuanxh@ffrc.cn。

[2] 郭群, 张品南. HE 染色切片质量欠佳的原因及处理[J]. 中华今日医学杂志, 2003(24): 52-53.

[3] 王华, 周孝琼. 病理组织切片中常见问题及解决方法[J]. 实验科学与技术, 2010, 8(5): 38-40.

[4] 郑玉琴, 李丽, 王毅训, 等. 制作微小组织切片的技术探讨[J].

农垦医学, 2008, 30(2): 154-155.

[5] 唐从国, 郭周庆. 如何做好一张 HE 染色切片[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(4): 428-429

[6] 范小莉, 胥维勇, 杨群. HE 染色不良的分析与应对方法[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(7): 805-807.