

显示 DNA 的改良染色在图象分析系统中的应用

龚志锦 阮 静 詹鏊洲 郑唯强

(第二军区大学病理解剖学教研室 上海 200433)

摘要 在人体和动物组织中的核酸染色技术应用较为深入,通过图象分析系统对 DNA 含量测定,而提供了可靠的依据。为了能够使 DNA 组化染色技术,更好的适应图象分析系统的定量研究需要,因此我们对显示 DNA 的染色方法进行了实验对照研究。选用在室温下的高浓度盐酸对细胞水解充足作用,而得到较好效果。改进了 Schiff's 染色液配制,减少染色时间和程序,结果证明了染色稳定可靠,色彩对比度较强,适用于图象分析系统的应用。

关键词 细胞图象分析系统, DNA 染色技术

显示脱氧核糖核酸(Deoxybonucleic acid-DNA)的染色技术应用研究已有许多报道,但是对于稳定可靠的快速显示 DNA 成分的系统改进染色技术,在目前未见报道,多年来为了使 DNA 染色适应图象分析系统的定量研究需要。因此我们对染色法进行反复实验性研究,总结了改进染色液配制方法,提高盐酸浓度对组织细胞的水解作用,在室温下可任意选用对应的染色时间,就能可靠的快速得到较好的 DNA 染色结果。

1 材料与方法

1.1 材料选用 取各种的动物、人体组织,分别进行印片、冰冻切片、培养细胞和经中性甲醛固定的石蜡切片。

1.2 DNA 改良染色液配制和染色程序

1.2.1 Schiff's 工作液配制: 碱性复红 1.5 g, 1M盐酸 20 ml,重亚硫酸钠 2 g,蒸馏水 200ml。先将蒸馏水煮沸,小火焰后加入碱性复红,再煮沸 1 分钟,冷却 50℃ 后盛入棕色试剂瓶中,加入盐酸,待 35℃ 时加入 2 g 重亚硫酸钠,置冰箱内备用。

1.2.2 DNA 染色程序

1.2.2.1 石蜡切片 4 微米,脱蜡至水,冰冻切片和印片等按常规处理至水。

1.2.2.2 入 M 盐酸水解(详见 DNA-M HCl 水解和工作液染色时间参考表 1)。

1.2.2.3 蒸馏水洗二次。

1.2.2.4 入 Schiff's 工作液中(详见表 1)。

表 1 DNA-M HCl 水解和工作液染色时间参考表

项目	盐酸水解		Schiff's 工作液	
	HCl(M)	时间 (min)	时间 (min)	效果 (+ -)
加温 (60℃) 室温 (15—25℃)	1	15	90	+
	2	60	90	-
	3	50	90	-
	4	40	80	+
	5	30	70	+
	6	20	50	++
	7	15	30	+++
	8	10	20	+++
	9	10	15	++
	10	5	10	+

1.2.2.5 直接浸入自来水中洗 2 分钟后,转入温水中 5 分钟。

- 1.2.2.6 95%、无水酒精(二节)浸1分钟。
- 1.2.2.7 入二甲苯-石碳酸(4:1)浸洗二次。
- 1.2.2.8 二甲苯透明(二节),中性树胶封固。

2 结果

脱氧核糖核酸(DNA)呈紫红色,胞质及其它组织无色或复染色(图1,2见封3下和表1)。

3 讨论

关于核酸染色技术应用方面,在目前较为广泛,特别用于图象分析系统的研究中,对显示DNA染色质量要求更高,这样才能为DNA含量测定而提供可靠的数据。但是常规的Feulgen's原染色法,其配制试剂复杂,水解不稳定,染色时间长和程序较复杂,所显示DNA染色效果较差,已不利于细胞图象分析系统的数字处理,为了使实验动物组织模型的DNA能完全正确反映可靠的统计学数据,因此我们对DNA染色技术进行了反复实验。

根据DNA的染色机理,通常在染色反应中的水解是非常重要的。DNA经过水解后,将脱氧戊糖和嘌呤之间断开,而戊糖的一端形

成醛基,醛基易与Schiff's试剂结合而生成紫红色^[2]。按原法Feulgen's 1M盐酸加温进行水解是很不稳定,其染色效果较差。因此我们在室温下选用不同的盐酸浓度对DNA的水解作用,实验结果发现7M、8M盐酸,使组织水解充足后,而对此Schiff's染色液着色时间快和增强色度的作用。经过反复的对照实验结果证明,选择这样的高浓度盐酸水解,不受条件的限制,在任何的室温下都可进行,对组织细胞中的DNA结构成分无影响作用,此法明显优于原染色法的效果。还必须指出,经过水解水后组织切片是不能直接进入Schiff's试剂中进行染色,因为含有带酸性切片,会容易降低染色液pH值,而影响染色结果。本文所改进的DNA染色方法,其配制试剂简单,染色时间快和程序较少,稳定可靠,色彩对比清晰。完全适用于图象分析系统的应用。

参 考 文 献

- 1 上海第一医学院病理解剖教研室. 病理检验技术, 上海: 上海科学技术出版社, 第1版, 1978. 349—350.
- 2 凌启波编著. 实用病理特殊染色和组化技术. 广东: 广东高等教育出版社, 第1版, 1989. 190—191.