# 尘螨连续石蜡切片的制备及染色技术*

张莺莺[1] 刘志刚[2**] 孙 新[1] 包 莹[2] 李 盟[2]

(1. 蚌埠医学院病原生物学教研室 安徽省感染与免疫重点实验室 安徽 蚌埠 233030;
2 深圳大学生命科学学院 广东 深圳 518060)

**Technique of preparation and staining of serial paraffin slices of dust mite.** ZHANG Ying-Ying[1], LIU Zhi-Gang[2**], SUN Xin[1], BAO Ying[2], LI Meng[2] (1. *The department of Microbiology & Parasitology, Bengbu Medical College, Anhui Provincial Key Laboratory of Infection & Immunity*, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. *College of Life Sciences, Shenzhen University*, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

**Abstract** Dust mite was embeded beforehand in agar and then in paraplast. Serial paraffin sections were made and HE staining was processed. The tissues exhibited integrity, exact orientation and different staining. We discussed the amelioration in the process. This technique is valuable in studying the morphology, immunohistochemistry, *in situ* PCR and localization of the allergen.

**Key words** dust mite, agar, paraplast, HE staining

摘 要 研究尘螨连续石蜡切片的制备技术。利用琼脂预包埋后再以塑化石蜡包埋,经切片和HE染色,获得结构完整、定位准确、染色清晰的连续切片。探讨制片过程中一些步骤的改进和注意事项,为尘螨显微结构的形态学研究提供可能,也为免疫组化、原位PCR及过敏性疾病尘螨特异性变应原的定位等研究奠定良好的基础。

关键词 尘螨,琼脂,塑化石蜡,HE染色

尘螨广泛存在于面粉、食品、仓库、及房舍灰尘中[1],研究表明,尘螨是强烈的过敏源,可引发多种过敏性疾病[2,3]。近年来国内外学者对尘螨过敏原的定位研究开展了大量工作[4,5],了解尘螨的内部结构日益重要。电镜技术可在亚细胞水平观察尘螨某组织器官结构,但操作复杂,仪器昂贵,且不利于观察整体构型。石蜡连续切片是简便可行的方法,但影响切片质量的因素是多方面的,要制出高质量的切片,每一个操作步骤都至关重要[6~8]。同时,由于尘螨体表为坚硬的外骨骼,而身体内部组织含水量大,所以传统的处理方法易使组织碎裂,不完整,且容易掉片。作者通过大量试验,总结了一种利用琼脂预包埋后再以塑化石蜡包埋的方法,并对切片、染色的步骤提出一些改进,获得较满意的尘螨连续石蜡切片,现介绍如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)标本来源:粉尘螨由深圳大学生命科学学院变态反应疾病研究室提供,于恒湿(相对湿度75%±1%)、恒温(27±0.5℃)培养箱(日本ESPEC公司,IHL-113)中隔离培养。

(2)主要试剂及仪器:琼脂粉(广东环凯微生物科技公司);塑化石蜡Paraplast,熔点56~57℃(Sigma公司);Poly-L-lysine(Sigma公司);苏木素Hematoxylin(BBI公司);曙红(上海试剂三厂);二甲苯及乙醇为国产常用试剂。

### 1.2 方法

* 国家"863"计划项目(2002AA214011);国家自然科学基金项目(30471505, 30271226);广东省科技重大专项(2003A3080502);深圳市科技计划资助项目(200218)。

** 通讯作者, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期:2006-05-09,修回日期:2006-06-28

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

(1)取材与固定:用小号解剖针挑取一定量本室培养之成螨,雌雄各半,用 PBS 洗去培养物后用擦镜纸包裹,常温浸没于 Bouin 固定液中24 h。

(2)盐酸预处理:固定后的粉尘螨以 PBS 清洗后挑入 4%的盐酸溶液中浸泡半小时。

(3)琼脂预包埋:配置 1.5%琼脂溶液,微波炉中加热至完全溶解,稍冷却后注入自制包埋器。将盐酸处理后的粉尘螨以 PBS 清洗后挑入琼脂溶液中,让其自然凝固。解剖镜下修整琼脂块,形成边长与虫体对称轴相一致的长方体,虫体位于琼脂块中央。

(4)脱水、透明与浸蜡:预包埋的尘螨置于 50%乙醇中 2 h(中间换液 1 次),然后置于 70%乙醇中室温过夜。第 2 d 取出后依次入梯度乙醇脱水及透明:80%乙醇Ⅰ、Ⅱ(各 1 h)→95%乙醇Ⅰ、Ⅱ(各 30 min)→100%乙醇Ⅰ、Ⅱ(各 15 min)→乙醇:二甲苯(1∶1)混合液(10 min)→二甲苯Ⅰ、Ⅱ透明,镜下观察至虫体透明即可终止(共约 15 min)。然后按如下流程浸蜡:二甲苯:塑化石蜡(1∶1)混合液(10 min)→塑化石蜡Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ(各 1 h)。

(5)塑化石蜡包埋:折叠大小适中的纸盒进行包埋。用镊子轻轻夹取琼脂块,置于纸盒底部。解剖镜下迅速摆正琼脂的位置,以便选取不同的方向进行切片。待蜡块表面稍凝固后,连同纸盒一起沉入水中,使其迅速冷却。

(6)切片与展片:先对蜡块进行修整,使其边与琼脂块的边相平行。使用手摇轮转式切片机,调整切片厚度为 4~6 μm,连续切片。将恒温水浴箱加热至 45 ℃左右,同时将已包被 Poly-L-lysine 的载玻片预热。在载玻片上滴加温水,截取适当长度的蜡带,在载玻片上进行展片。晾干后置于 60 ℃烤箱中烤 2 h,使蜡带贴附牢固。

(7)HE 染色:按常规染色方法进行。但由于尘螨体积微小,在染色过程中容易掉片,而且各组织嗜染性不同,本试验中对各步骤进行了一些调整,获得较满意的效果。流程如下:切片常规脱蜡至水化→Harry's 苏木素染色(20 min)→自来水洗→0.5%盐酸酒精分化(2~4 s)→自来水洗并蓝化(5~10 min)→80%乙醇(5~10 s)→0.5%伊红(1~3 s)→95%乙醇Ⅰ(1 min)→95%乙醇Ⅱ(3~5 s)→100%乙醇Ⅰ、Ⅱ(各 1~2 min)→二甲苯Ⅰ、Ⅱ(各 1~2 min)→中性树胶封固。

## 2　结果

### 2.1　连续切片情况

粉尘螨经上述处理,可得到完整的连续切片。同时,用琼脂预包埋,可以方便地对想要的切面准确定位。镜下可见虫体体壁及内部组织结构完整,基本无皱缩变形,而常规方法处理易使组织碎裂且容易掉片(封底彩插图版Ⅲ:图 1,2)。

### 2.2　染色情况

HE 染色后,基本无掉片。虫体内部各组织器官染色清晰,对比鲜明(封底彩插图版Ⅲ:图 2)。体壁被染成粉红色,背纹清晰可见。中肠上皮细胞呈淡紫色,胞核蓝紫色深染。肌肉、脑呈红色,脑外表面颗粒状物质、雌性生殖腺等为深蓝色,琼脂不着色。

## 3　讨论

关于尘螨的石蜡连续切片技术,目前国内外无人研究。由于尘螨体表为坚硬的外骨骼,一般的水溶性固定液、脱水剂等很难迅速、均匀地渗透。同时,身体内部组织含水量大,加之体腔内血淋巴的存在,如浸蜡不足易使组织碎裂,不完整,且在染色中容易掉片。另外,尘螨体积微小(170~500 μm),不便操作,肉眼下无法清楚地进行定向包埋,给切片的定位带来很大困难。作者通过大量试验摸索,认为利用琼脂预包埋后再以塑化石蜡包埋的方法可很好地解决上述问题。琼脂比石蜡凝固慢,而凝固之后透明度柔韧性均较好,用 1.5%浓度比例恰当,既可以在解剖镜下方便地摆正尘螨的位置,又便于切割,使较小的螨体置于其中并赋以规则的形状。这样可以在石蜡包埋时方便地夹取,也能在修蜡时清楚地观察到微小的螨体,从而准确定位需要的切面。同时,琼脂在 HE 染色后

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

为阴性,不干扰其他组织着色。而塑化石蜡对小节肢动物包埋效果较好[9,10]。

组织的碎裂是制片过程中遇到的最大问题,作者在试验中总结出以下经验,使问题得到较好地解决:(1)盐酸溶液预处理。在预包埋前用4%的盐酸溶液预处理30 min,可以适当软化外骨骼,使各液体均匀渗透,切片不易碎裂。(2)琼脂温度不能过高。要注意预包埋时应待琼脂稍冷却后再放入虫体,以免温度过高引起脆化。(3)脱水要彻底。由于尘螨内部组织本身含水量较大,加之包埋以1.5%的琼脂,故脱水时间需适当延长,但高浓度乙醇中时间不宜过长。(4)尽量减少二甲苯作用时间。二甲苯可明显引起组织脆化,故在透明的过程中要镜下观察,在见到虫体呈透明状态时及时终止,进入下一步骤。(5)浸蜡温度不能过高。温度过高会导致组织收缩,且变硬变脆,应严格控制浸蜡温度。在恒温箱内进行时,温度应比石蜡熔点稍高2~3℃以保持其恰在熔融状态。

此外还要注意下面步骤防止染色中掉片:(1)所有器皿均要洁净,载波片要用酸浸泡清洗后,以Poly-L-lysine包被。(2)切片后要先晾干水分再放入60℃烤箱中烤2 h,使蜡带贴附牢固。(3)尽量减少染色中各试剂的梯度及染色时间,冲洗及换液时动作要轻柔。

本方法方便易行,可以较好地解决尘螨石蜡连续切片中的诸多问题,多能获得满意结果。为尘螨显微结构的形态学研究、免疫组化、原位PCR及特异性变应原的定位等研究奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献


1 孙新,李朝品,张进顺主编,实用医学寄生虫学. 北京:人民卫生出版社,2005. 514~521.
2 Mueller G. A., Smith A. M., Chapman M. D., Rule G. S., Benjamin D. C. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**(3): 9 359~9 365.
3 Loan R., Siebers R., Fitzharris P., Crane J. *Indoor Air*, 2003, **13**(3): 232~236.
4 刘志刚,李盟,包莹,付仁龙,苏东明. 昆虫学报, 2005, **48**(6): 833~836.
5 付仁龙,刘志刚,邢苗,李荔,邹泽红. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, **22**(4): 243~245.
6 王泊云,李玉松等编著,病理学技术. 北京:人民卫生出版社, 2001. 76~94.
7 杨广英,张穗,孙丽,李军. 诊断病理学杂志, 2002, **9**(6): 372.
8 郑兴峰. 生物学杂志, 2003, **20**(4): 43.
9 Faran M. E., Romoser W. S., Routier R. G., Bailey C. L. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 1986, **35**(5): 1 061~1 067.
10 谢超,赵彤言,杨发青,董言德,陆宝麟. 昆虫知识, 2000, **37**(5): 306~308.


# 《昆虫知识》2007年第44卷第3期要目预告


科技前沿

昆虫与植物的协同进化:铃夜蛾与寄主的互作机制 …… 王琛柱
昆虫蜕皮的分子机理及应用 …… 赵小凡

综述和进展

杀虫剂对甜菜夜蛾大发生的诱导作用 …… 林珠凤等
杀蚊苏云金芽孢杆菌及其晶体蛋白研究进展 …… 赵新民等
白蚁的防治技术 …… 曹 莉等

研究论文

高温及水稻类型对灰飞虱种群的影响 …… 刘向东等
农田及周围野花地甲虫群落物种多样性 …… 艾尼瓦尔等
寄主植物对荔枝蒂蛀虫产卵的引诱作用 …… 彭海辉等
柑橘大实蝇对三种寄主植物的偏好比较 …… 张小亚等
马尾松枝条挥发性组分的鉴定及对松墨天牛的触角电生理反应 …… 李水清等
淡色库蚊对几种化学物质的嗅觉反应 …… 丁思悦等
双斑恩蚜小蜂的生殖方式及其在烟粉虱体内的发育 …… 钱明惠等
管氏肿腿蜂的胚胎发育观察 …… 代平礼等
双斑蟋若虫后足的再生 …… 李 华等

技术与方法

一种适合美洲斑潜蝇实验研究的新型纱虫笼及吸虫器 …… 许三军等
中华稻蝗脂肪提取方法初探 …… 郭崇友等

研究简报

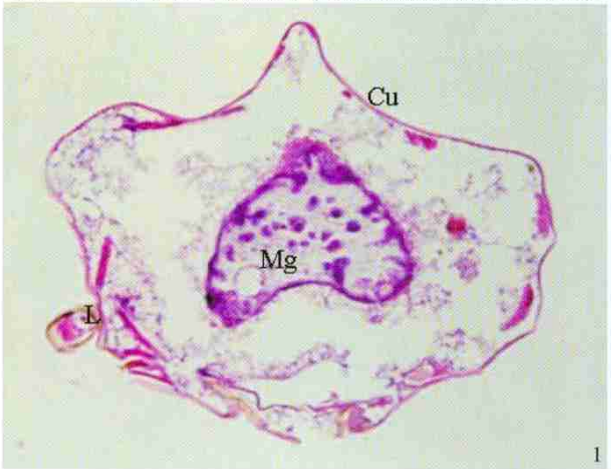
柳蚕的生物学特性与饲育 …… 孙孝龙等
衢州地区日本长白蚧的生物学特性及其防治 …… 甘建斌等
菜用短梗五加常见虫害种类及综合防治技术 …… 杨 坡等

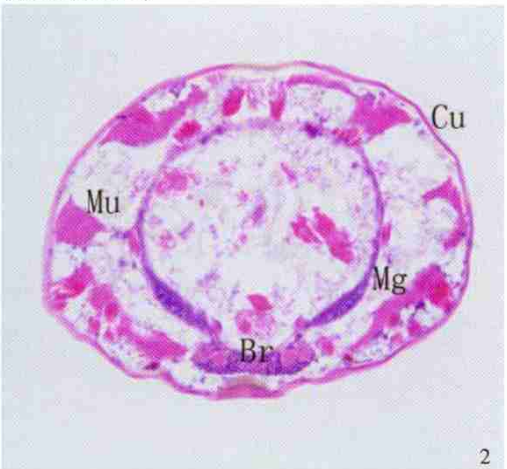
基础知识

土壤重金属向节肢动物的传递及对其的影响 …… 朱春香等


?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

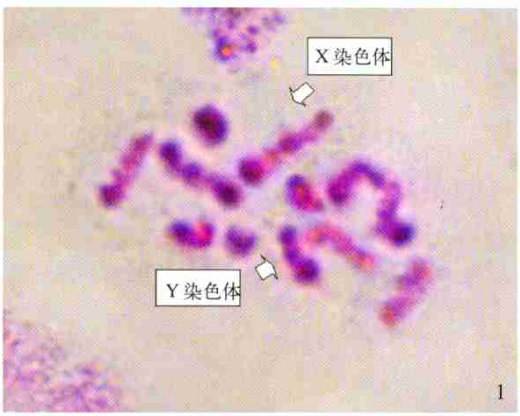
图版Ⅲ 张莺莺等：尘螨连续石蜡切片的制备及染色技术（正文见P294）

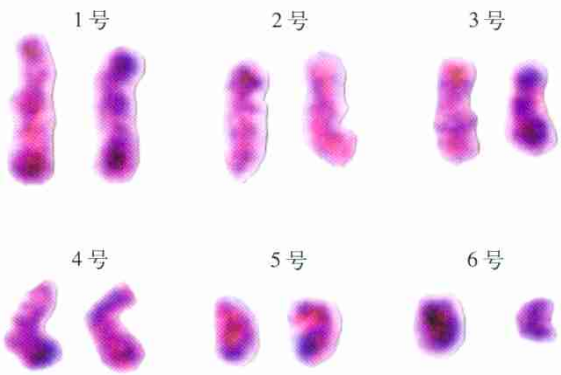


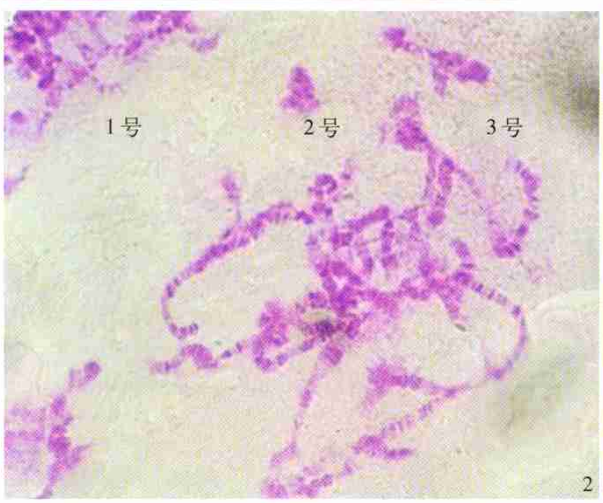



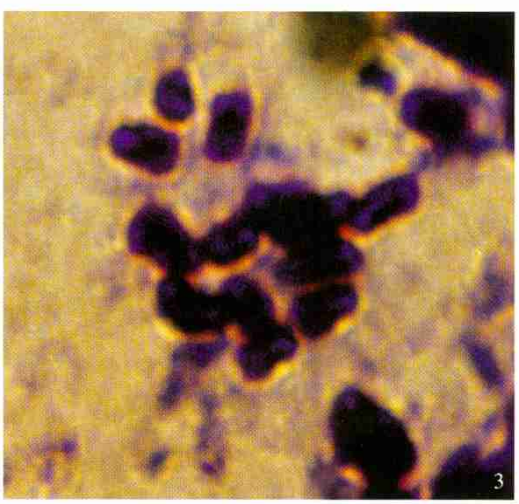

1．粉尘螨常规方法切片　2．粉尘螨改进方法切片（HE染色(×60) Cu 体壁；Mg 中肠；L 足；Mu 肌肉；Br 脑）

图版Ⅳ 方颖等：橘小实蝇染色体研究与相关技术探讨（正文见P290）




1．橘小实蝇的染色体组型（放大1 000倍）　2．橘小实蝇唾液腺染色体（放大200倍）
3．橘小实蝇性腺细胞染色体（放大1 000倍）

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n