

胎鼠肢芽软骨染色技术的一点改进

夏卉芳^{1,2}

(1. 贵州师范学院, 贵州 贵阳 550018;

2. 贵州特色生物资源开发利用重点实验室, 贵州 贵阳 550018)

【摘要】 目的 改进阿利新蓝单染胎鼠肢芽软骨技术, 尤其是改进后的技术免用对人体有毒或致癌的试剂。方法 将SPF级SD大鼠13~16 d龄的胚鼠前或后肢芽用阿利新蓝染液染色、丙三醇透明, 最后将透明好的肢芽标本用DPX树脂镶嵌在载玻片上待观测。结果 胎鼠前肢芽各部分发育分化的软骨均被染成蓝色, 标本完全符合在体视显微镜下对肢芽软骨是否畸形的观测及前肢芽软骨半定量Neubert 300分评价标准。结论 阿利新蓝单染胎鼠肢芽软骨技术经改进后, 肢芽软骨染色好, 实验步骤简化、时间缩短、节约成本、安全环保。

【关键词】 胚胎; 肢芽; 软骨染色; 阿利新蓝

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)06-0785-02

Some improvements to the staining of limb bud cartilage in fetal mouse. XIA Hui-fang^{1,2}. 1. Guizhou Normal College, Guiyang 550018, Guizhou, CHINA; 2. Key Laboratory of Guizhou Characteristics Biological Resources Development and Utilization, Guiyang 550018, Guizhou, CHINA

【Abstract】 Objective To improve the simple Alcian blue staining of limb bud cartilage in fetal mouse using no toxic or carcinogenic reagents. **Methods** The forelimb buds or hindlimb buds of SPF SD rats (13~16 days old) were stained by Alcian blue and then immersed in glycerol. The transparent specimens were placed onto the slide by DPX resin for observation. **Results** All differential cartilage of forelimb buds were dyed blue. And all the specimens met the criteria of deformity observations under stereo microscope and the semi-quantitative Neubert 300 evaluation criteria of the forelimb buds cartilage. **Conclusion** The improved Alcian blue simple staining technique could help enhance staining effect, simplify experimental procedure, shorten staining time and cut cost, and it was safe and environmental-friendly.

【Key words】 Embryo; Limb bud; Cartilage staining; Alcian blue

在致畸实验中, 胎鼠骨骼的畸形检测是必须的, 而对胎鼠骨骼进行染色评测是首选的检测胎鼠骨骼畸形的方^[1-9]。目前国内、外常用的胎鼠骨骼染色方法有阿利新蓝单染法或阿利新蓝-茜素红双染法, 其中阿利新蓝单染法常用于染胎鼠的软骨, 双染法用于染胎鼠的软骨和骨。阿利新蓝单染胎鼠软骨技术应用于各种因素导致的胚胎骨骼畸形研究和胚胎骨骼形态发育的基础研究领域^[10-13]。

依据胎鼠肢芽软骨染色技术相关文献及多次试验, 现改进成一种专用于染鼠胚胎肢芽软骨的简易染色技术方法, 此方法与原来的方法相比的优点在于: 染好色的标本更加透明容易观测, 染色时间大大缩短至原来时间的1/4, 经过简化实验程序使得几种易爆有毒或致癌化学药品去除, 如二甲苯、Bouin's液(含福尔马林、苦味酸)及含氨水的乙醇等^[14-21]。现将胎鼠肢芽软骨染色技术改进方法介绍如下:

1 材料与方法

1.1 染色液的配制 阿利新蓝染液: 先量取70%乙醇950 ml, 再称取阿利新蓝干粉90 mg, 最后用冰醋酸定容至1 000 ml。

1.2 方法

1.2.1 染色对象 SPF级SD大鼠14~16 d龄胚鼠的前或后肢芽(也可用SPF级昆明种小白鼠13~16 d龄的胚鼠前或后肢芽)。

1.2.2 染色步骤 (1)清洗肢芽: 首先将上述肢芽放入培养皿中用pH6.8磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3遍, 再用70%乙醇清洗肢芽三遍, 6遍合计清洗1 h。(2)染色: 将清洗好的肢芽转入规格为50×30称量瓶中用阿利新蓝染液染色24 h。(3)脱水: 将染好色的肢芽: 分别用70%、80%、95%梯度乙醇各脱水10 min。(4)透明: 将染好色的肢芽转入纯丙三醇中透明2 h^[20]。(5)制片: 最后将透明好的肢芽标本用DPX树脂镶嵌在载玻片上待测。

2 结果

使用改进染色方法染色的胎鼠前肢芽各部分发育分化的软骨均被染成蓝色, 且各软骨形态清晰可见且界限非常明确, 皮肤及其他组织呈现透明无色。用改进胎鼠软骨染色技术染色的标本完全符合体视显微镜下对肢芽软骨是否畸形的观测及前肢芽软骨半定量Neubert 300分评价标准。结果见图1和图2。

基金项目: 教育部生物资源科学专业综合改革试点项目(编号: 2012287); 贵州省重点支持学科建设(编号: 2011231); 贵州省应用化学特色重点学科(编号: 黔教科研发(2012)442号)

通讯作者: 夏卉芳。E-mail: xiahuifanggy@163.com

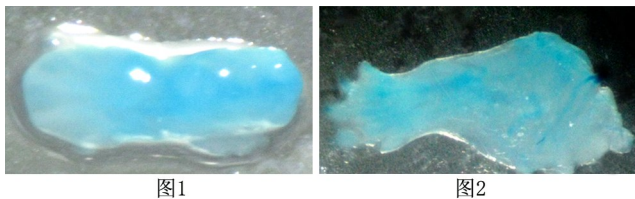


图1 E14前肢芽(阿利新蓝染色,×10倍);图2 E15前肢芽(阿利新蓝染色且树脂镶嵌,×10倍)

3 讨论

在致畸实验中,胎鼠骨骼染色技术是直接关系到骨骼畸形的判断,如果染色不够清晰,常可被误认为某个骨骼的缺失或骨发育延迟。尤其是对及其细小柔软的鼠胚胎肢芽软骨进行染色,一定要对标本的各个部位:肩胛骨、肱骨、尺骨、桡骨、腕骨和第1~5掌指骨都要染到。

3.1 鼠肢芽软骨染色改进前的缺点 既往对鼠肢芽软骨染色经历的程序:PBS冲洗、Bouin's液固定过夜、含0.05%氨水的70%乙醇脱色2 h以上(经常脱色不全,造成下一步的阿利新蓝染液染色分界不清)、阿利新蓝染液染色48 h、脱色液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)脱色2 d、70%乙醇清洗1 h、95%乙醇脱水4 h、二甲苯透明2~6 h、70%乙醇清洗1 h、松木油保存。其程序繁琐、染色时间长,尤其重要的是还要用到对人体有一定毒性或强烈致癌的化学药Bouin's液(Bouin's液=苦味酸饱和液15份:福尔马林5份:冰醋酸1份)固定、含0.05%氨水的70%乙醇脱色多次、二甲苯透明及其松木油保存。此法染色特点是时间所用时间长达109 h以上、要用到有害健康和环境及危险药品。其中所用的试剂药品福尔马林具有强烈致癌作用;苦味酸属于可产生红血球损伤、肾炎、昏迷等人体危害易爆危险化学药品;氨水是对呼吸道和皮肤有刺激作用并能损伤中枢神经系统形成对人体健康危害的低毒类化学药品;松木油的价格非常昂贵。

3.2 鼠肢芽软骨染色改进后的优点 改进完善后的胎鼠肢芽软骨染色技术方法不仅染色程序简单、染色时间短、安全无毒,而且染色效果好。染色时间仅仅为27 h,大概为原来时间染色时间的1/4。由原来10个步骤109 h左右简略到现在4个步骤27 h。安全无害:改进后的染色技术中减掉3种有害健康化学试剂:分别为、福尔马林、苦味酸、氨水。染色中使用的材料非常简单廉价:价格非常昂贵的松木油用低廉的丙三醇替代。从而大大节约了实验成本及胎鼠肢芽软骨的染色时间、更加重要的是整个染骨过程中无须用到有毒有害的化学药品,保证了科研人员的身体健康安全。

综上所述,改进后的肢芽染色技术不但有利于科研人员身体健康、生命安全,缩短实验周期、改善环

境,而且具有技术路线成熟可靠、染色效果清晰、染色与非染色区分界明显、实验结果明确等优点。改进后的肢芽染色技术同时兼有实验效果好、省时、省钱、步骤简单、生命安全性好等优点,是一种可靠并值得推广的新技术方法。

参考文献

- [1] 夏卉芳,王毓.应用骨骼染色评价胎鼠骨发育的3种方法[J].现代医药卫生,2013,6(29):788-880.
- [2] 李勇,王维林,袁正伟,等.一种简捷可靠的胎鼠骨和软骨双重染色技术[J].中国医科大学学报,2004,2(33):189-190.
- [3] 李勇,张天宝.发育毒理学研究方法和实验技术[M].北京:北京医科大学出版社,2000:84-89.
- [4] 许立芹,王东,蔡恒,等.隔致胎鼠骨骼发育异常的形态学观察[J].滨州医学院学报,2008,1(31):11-15.
- [5] 李梓民,何爱桃,吴成秋,等.苯致小鼠胚胎肢芽发育毒作用[J].中国公共卫生,2008,24(4):458-459.
- [6] 涂国平,罗洁,李云.金雀异黄素对体外小鼠肢芽软骨发育的影响[J].卫生研究,2002,31(4):304-305.
- [7] 张勇,李云,曾令福.锌与金雀异黄素对小鼠胚胎肢芽的影响[J].现代预防医学,2007,34(1):1-4.
- [8] 李梓民,何爱桃,吴成秋,等.苯对体外培养小鼠肢芽软骨发育的毒性研究[J].南华大学学报医学版,2007,35(2):158-160.
- [9] Nakane Y. Development of the skeleton on Japanese quail embryos [J]. Dev Growth Differ, 1999, 41(5): 523-524.
- [10] Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage [J]. Teratology, 2001, 64(3): 125-133.
- [11] Young AD, Phipps DE, Astroff AB. Large scale double staining of rat fetal skeletons using Alizarin Red and Alcian Blue [J]. Teratology, 2000, 61(4): 273-276.
- [12] 张桂林,谭炳海,商好敏,等.小鼠软骨发育的形态学观察[J].中国畜牧兽医,2010,37(5):54-56.
- [13] 元瑛,张本忠.应用小鼠胚胎肢芽培养方法评价氟的致畸性及其对肢芽软骨细胞胶原合成的影响[J].甘肃科技纵横,2008,37(4):188-189.
- [14] 杨小龙,王志超,何顶正,等.胎儿骨骼染色透明标本的设计与制造[J].河南科技大学学报(医学版),2011,29(2):91-96.
- [15] 陈彬,王跃招.介绍一种透明骨骼标本染色法[J].生物学通报,2002,37(4):57.
- [16] 袁群芳,谢瑶,赵爽,等.对比制作乳鼠骨骼染色透明标本体会[J].解剖学研究,2009,5(31):387-389.
- [17] 于胜波,张成鸿,唐炜,等.陈旧动物胚胎骨骼透明染色方法[J].中国临床解剖学杂志,2009,4(27):5-6.
- [18] 高秉琴,陈彦文.特殊骨标本制作方法的研究与改进[J].甘肃医学院学报,2001,3(18):15-17.
- [19] 洪虹,张本斯,唐洗敏,等.甘油制作胚胎骨骼染色透明标本的体会[J].局部手术学杂志,2007,3(16):191.
- [20] 郭连军,刘文庆,郑辉.胚胎骨骼染色透明标本的制作[J].齐齐哈尔医学院学报,2003,3(24):342-343.
- [21] 钟永盛,贾艳丽,陈斌,等.先天性马蹄内翻足动物模型胚胎后肢(芽)评分系统的建立[J].中华小儿外科杂志,2009,6(30):397-400.

(收稿日期:2014-09-30)