

文章编号:1000-7423(2012)-02-0164-02

## 旋毛虫肌幼虫囊包标本的复染制作方法

李丹<sup>1</sup>, 杨丁<sup>1</sup>, 皮本伟<sup>1</sup>, 牛利娜<sup>1</sup>, 张莹<sup>1</sup>, 王国英<sup>2\*</sup>

**【提要】** 本研究采用单染和复染两种方法对旋毛虫肌幼虫囊包标本进行染色。单染方法: 制片经甲醛、乙醇和冰醋酸溶液固定, 用乙醇硼砂卡红染色液(4%硼砂水溶液 100 ml, 卡红 1 g, 70%乙醇 100 ml)染色。复染方法: 制片经甲醛、乙醇和冰醋酸溶液固定, 用乙醇硼砂卡红染色液和固绿染色液(固绿 0.1 g, 95%乙醇 100 ml)染色。结果显示, 单染标本, 囊包与周围肌细胞着色无明显差别, 结构不清晰, 不易观察, 囊内幼虫可辨认。复染标本, 囊包结构清晰; 囊内幼虫、囊包和肌细胞呈不同的颜色, 囊包梭形显著, 囊内幼虫特征典型。与单染标本相比, 复染标本着色适度, 染色效果好, 易于观察。

**【关键词】** 旋毛虫; 肌幼虫囊包; 染色

中图分类号: R383.15 文献标识码: B

## A Duplicate Staining Method for Permanent Specimen of *Trichinella spiralis* Encapsulated Larvae

LI Dan<sup>1</sup>, YANG Ding<sup>1</sup>, PI Ben-wei<sup>1</sup>, NIU Li-na<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, WANG Guo-ying<sup>2\*</sup>

(1 *Sophomore Year Student, Medical College, Henan University, Kaifeng 475004, China*; 2 *Immunology Institute of Medical College, Henan University, Kaifeng 475004, China*)

**【Abstract】** With single staining method, *Trichinella spiralis* encapsulated larvae specimens were fixed with formaldehyde alcohol acetic acid fixative solution, and stained with alcohol borax-carmin staining solution (4% borax solution 100 ml, carmine 1 g, and 70% alcohol 100 ml). With duplicate staining, the encapsulated larvae specimens were fixed with formaldehyde alcohol acetic acid fixative solution, and double stained with alcohol borax carmine staining solution and fast green staining solution (fast green 0.1 g, 95% alcohol 100 ml). The results showed that with single staining, it was not clear-cut between the cyst and muscle cells although the larva was differentiable, while with duplicate staining, the larva, cyst and muscle cells were distinguished more clearly.

**【Key words】** *Trichinella spiralis*; Encapsulated larva; Staining

Supported by the Henan University Students Innovative Experiment Project (No.2010-10NB032)

\* Corresponding author, E-mail: medwgy@163.com

在实验教学中, 通常采用染色法制作旋毛虫肌幼虫囊包标本, 目的是使观察者能够较容易地发现囊包, 将其与周围组织区分, 进而观察囊包的典型特征和其中蜷曲的幼虫。常规染色一般为单染, 但染色后的标本, 一般仅幼虫可辨认; 囊包与周围组织着色相近, 轮廓不清, 不易观察。本研究使用卡红、固绿复染法, 制作旋毛虫肌幼虫囊包标本, 以期得到更好的染色效果。

### 1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器 固定液: 甲醛 6 ml、95%乙醇 20 ml、冰醋酸 1 ml 和蒸馏水 40 ml, 混合均匀(甲醛、乙醇和冰醋酸均购自天津市福晨化学试剂厂)。乙醇硼砂卡红染色液<sup>[1]</sup>: 硼砂购自上海晶纯实业有限公司。将卡红(国药集团化学试剂有限公司产品) 1 g 加入 4%硼砂水溶液内, 煮沸约 5 min, 使之

溶解, 再加入 70%乙醇 100 ml。2~4 h 后过滤, 备用。固绿染色液: 固绿(购自北京索莱宝科技有限公司) 0.1 g, 溶于 95%乙醇 100 ml。电子天平(EL303 型)为梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品, 光学显微镜(BH-2 型)为日本 Olympus 公司产品。1.2 标本采集与制片 旋毛虫(*Trichinella spiralis*)引自河南省疾病预防控制中心。15 只昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 雌性, 购自郑州大学实验动物中心。每鼠感染 200 条肌幼虫, 感染 30 d 后引颈处死, 取膈肌、前肢肌和后肢肌, 压片、镜检。用生理盐水清洗含幼虫的肌肉, 置于 4℃冰箱 2 h, 膈肌剪成约 0.5 cm×0.5 cm, 其他部位肌肉剪成小碎块, 夹在两张载玻片之间, 轻轻加压、用细线捆扎, 制成制片。

### 1.3 制片染色

1.3.1 卡红染色方法 1 将制片置于固定液中 24 h, 解线后再固定 1 h, 蒸馏水冲洗 5 min, 间隔 5 min, 再冲洗 5 min。将固定后的制片置于乙醇硼砂卡红染色液中 24 h, 取出后蒸馏水冲洗 1~2 min 去浮色, 然后依次置入 50%、70%、80%、95%和 100%乙醇中脱水, 各 30 min; 无水乙醇与二甲苯(1:1)混合液

基金项目: 河南大学大学生创新性实验资助课题(No. 2010-10NB032)

作者单位: 1 河南大学医学院临床医学 2009 级, 开封 475004;

2 河南大学医学院免疫学研究所, 开封 475004

\* 通讯作者, E-mail: medwgy@163.com

中透明 30 min; 纯二甲苯 30 s。在载玻片上滴 2 滴中性树胶, 将制片放入, 加盖玻片, 平置于标本盒内, 室温阴干。

1.3.2 卡红染色方法 2 制片固定 36 h, 乙醇硼砂卡红染色 36 h, 其他操作步骤同卡红染色方法 1。

1.3.3 卡红、固绿复染方法 1 将制片置于固定液中 24 h, 解线后再固定 1 h, 蒸馏水冲洗 5 min, 间隔 5 min, 再冲洗 5 min。将固定后的制片置于乙醇硼砂卡红染色液中 24 h, 取出后蒸馏水冲洗 1~2 min 去浮色, 然后依次放入 50%、70% 和 80% 乙醇中脱水, 各 30 min, 再复染, 即固绿染色 1 s。复染后的制片依次放入 95% 和 100% 乙醇中脱水, 各 30 min; 100% 乙醇与二甲苯(1:1)混合液中透明 30 min, 纯二甲苯 30 s。在载玻片上滴两滴中性树胶, 将标本放入, 加盖玻片, 平置于标本盒内, 室温阴干。

1.3.4 卡红、固绿复染方法 2 制片固定 36 h, 乙醇硼砂卡红染色 36 h, 固绿染色 1 s; 其他操作步骤同卡红、固绿复染方法 1。

## 2 结果

2.1 卡红染色方法 卡红染色方法 1 制作的标本光镜下观察, 囊包与肌细胞均为色泽较暗的粉红色, 着色无差别, 囊包结构模糊, 与周围界限不易区分; 囊内幼虫淡染, 呈淡粉色, 可辨认(图 1A)。卡红染色方法 2 制作的标本光镜下观察, 梭形囊包呈深粉红色, 但不够清晰, 与周围呈淡粉红色的肌细胞着色有差别; 囊内幼虫淡染, 呈淡粉色, 能较清晰地辨认(图 1B)。

2.3 卡红、固绿复染方法 卡红、固绿复染方法 1 制作的标本光镜下观察, 囊包结构较清晰, 囊内呈淡紫色, 但着色不均匀; 肌细胞呈青色, 着色也不均匀; 两者颜色有明显差别, 较易区分; 囊内幼虫淡染, 呈淡青色, 能清晰地辨认(图 1C)。卡红、固绿复染方法 2 制作的标本光镜下观察, 囊包结构清晰, 梭形显著, 特征典型, 立体感强, 囊内呈着色均匀的淡紫

色; 肌细胞着色均匀, 呈青色, 囊包与周围肌细胞颜色对比非常显著, 易于区分; 囊内幼虫淡染, 呈淡青色, 蜷曲的幼虫呈螺旋状, 能清晰的辨认(图 1D)。

## 3 讨论

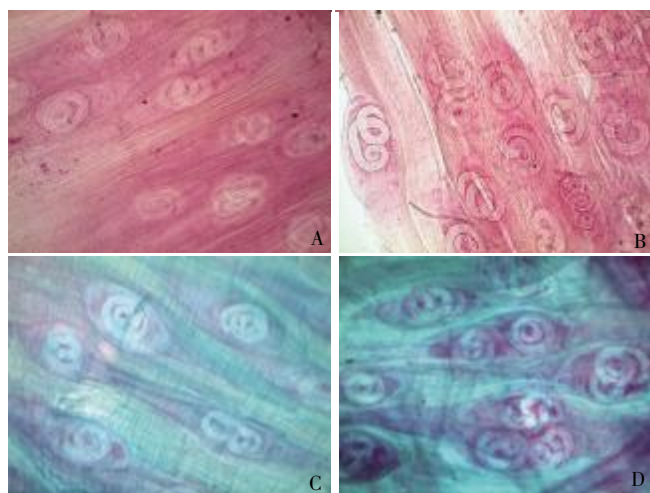
寄生虫成虫和幼虫的标本制作, 通常采用压片法, 常规染色为单染法<sup>[2-5]</sup>, 多采用卡红或苏木素类染液染色<sup>[5]</sup>。本研究结果显示, 卡红染色标本, 囊包与周围肌细胞染色相同, 能够观察到的区别只是在着色的深浅方面有轻微差别, 染色时间对囊包的着色深浅有影响; 根据颜色的深浅来观察囊包的形态结构, 很难取得好的观察效果<sup>[6]</sup>。

本研究采用两种染料制作的旋毛虫肌幼虫囊包标本, 囊内幼虫、囊包和肌细胞呈现出不同的颜色, 囊包结构清晰, 特征典型。制作的标本颜色鲜艳、结构清晰, 着色适度, 便于观察。

旋毛虫肌幼虫囊包标本的制片需注意以下几点: ①刚处死的小鼠, 不要立即做压片, 因为此时肌肉含水量较多、松软, 压片时易使虫体和囊包变形; 将肌肉冷却、稍有收缩, 效果较好。②染色效果不仅与时间有关, 与染色时周围环境温度也有关。③脱水需要根据制片的厚薄及大小经预试后确定。透明时间不易过长。特别是经纯二甲苯时, 如果透明时间超过 30 s, 制片会发生干缩卷曲, 不利于封片。

## 参 考 文 献

- [1] Chen PH, Kong DF, Li HZ, *et al.* Experiment Technique of Human Parasitology [M]. Beijing: Science Press, 1988: 15. (in Chinese)  
(陈佩惠, 孔德芳, 李惠珠, 等. 人体寄生虫学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 15.)
- [2] Qiu SS, Deng X. Improved staining method for permanent specimen of *Fasciolopsis buski* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(3): 239-240. (in Chinese)  
(邱莎莎, 邓晓. 长期保存姜片虫标本固定及染色方法的改进 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(3): 239-240.)
- [3] Chen SX, Wu L, Xu HJ, *et al.* Exploration on permanent staining preparation of tapeworm [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(Suppl): S58-S61. (in Chinese)  
(陈盛霞, 吴亮, 徐会娟, 等. 绦虫永久染色标本的制作技术 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(增刊): S58-S61.)
- [4] Chen Y, Yang XY, Zheng HQ, *et al.* A comparative study of three staining methods on *Trichinella spiralis* muscle larvae [J]. J Trop Med, 2010, 10(1): 9-10. (in Chinese)  
(陈莹, 杨晓燕, 郑焕钦, 等. 三种旋毛虫肌肉期幼虫染色方法的比较研究 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(1): 9-10.)
- [5] Wang Q, Ji WH. Making the malachite green stained specimen of *Trichinella spiralis* [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(6): 337. (in Chinese)  
(王琼, 纪伟华. 旋毛虫孔雀绿染色标本制作 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(6): 337.)
- [6] Ji WH, Guo JL. Research on making the specimens of the gravid proglottid of tape worm [J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(4): 73-74. (in Chinese)  
(纪伟华, 郭冀玲. 带绦虫妊娠节片标本制作方法的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(4): 73-74.)



A: 卡红染色方法 1; B: 卡红染色方法 2; C: 卡红、固绿复染方法 1; D: 卡红、固绿复染方法 2。

图 1 旋毛虫肌幼虫囊包标本 (×100)

(收稿日期: 2011-06-15 编辑: 高石, 衣凤芸)