

# 蟾蜍血细胞内 DNA 显示的孚尔根反应

侯艳香, 任来峰

(山西医科大学汾阳学院检验系, 山西 汾阳 032200)

**摘要:**目的 熟悉并掌握孚尔根反应的原理及实验操作方法, 观察 DNA 细胞的形态和结构。方法 取蟾蜍血细胞涂片, 60℃ 1NHCL 水解后, 用 Schiff 试剂染细胞核, 亮绿复染细胞质。结果 显微镜下观察到细胞核被染成紫红色, 细胞质为绿色。结论 DNA 细胞的核质红绿染色鲜明且清晰美观, 让学生对生物学研究有了初步的认识。

**关键词:** DNA; 蟾蜍血细胞涂片; 孚尔根反应

中图分类号: R394-33; Q954.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2639(2015)04-0009-02

## Feulgen reaction represented within the DNA in blood cells of toads

HOU Yan-xiang, REN Lai-feng

(Department of Medical Inspection, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang, 032200, China)

**Abstract: Objective** To be familiar with and master the principle and operation method of Feulgen reaction, meanwhile the morphology and structure of DNA were observed. **Methods** Take the toad blood cell smear, and hydrolyzing them with 60℃ 1NHCL. Staining cell nuclei with Schiff reagent and counterstaining the cytoplasm with light green. **Results** Under the microscope, it can be observed that cells nucleus has been stained into purple red and cytoplasm turned into green. **Conclusion** The nucleus and cytoplasm of cells are represented clearly and distinctively into red and green respectively, which can bring a preliminary acquaintance on biological research to students.

**Key words:** DNA; Toad blood cells smear; Feulgen reaction

DNA(脱氧核糖核酸)是生物遗传的物质基础,主要存在于细胞核中。DNA的分子结构中带有醛基-CHO,在60℃ 1NHCL水解作用下,糖苷键断裂,在脱氧核糖的C<sup>1</sup>位置形成游离的醛基,醛基和Schiff试剂结合,形成紫红色的复合物,这是DNA特有的显色反应,为孚尔根反应(Feulgen)<sup>[1]</sup>。蟾蜍的红细胞较大,具有细胞核,是一种显示细胞核内DNA的较理想材料。亮绿复染后细胞质呈绿色,核质红绿对比染色,便于学生认识、区分、观察和研究生物细胞。<sup>[2]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

活蟾蜍、麻醉缸、剪刀、玻片、水浴箱、解剖盘、镊子、酒精灯、乙醚、1NHCL、Schiff试剂、1%亮绿染液、

显微镜、擦镜纸、吸水纸等。

### 1.2 方法

1.2.1 取材 用乙醚将蟾蜍麻醉后置于解剖盘中,腹面向上,用镊子夹起腹面后部中央的皮肤,用剪刀剪一丁字口,自后向前将皮肤剪开。用同样的方法,将肌肉从后往前剪至剑胸骨处,用手分开左右肩带部分,露出心脏,再用剪刀将心包膜剪开,在心室部分剪一裂口,用玻片的一边蘸取少量血液,进行涂片。

1.2.2 涂片 将蘸血的玻片以30°~45°角置于另一玻片边缘上,轻轻向前推进,制成薄而均匀的舌状血膜,将血涂片在酒精灯上微烘干燥。

1.2.3 水解 将已干燥的血涂片放入小染色缸中,注意在血涂片的正面做好标记,切忌正反搞错。加入1NHCL在室温中水解2min,然后再换到60℃的

1 NHCL 中继续水解 8 ~ 12 min, 再放回到原来的 HCL 中, 室温下再水解 2 min。取出后用细水冲洗去除涂片上的 HCL。同时另取 1 张血涂片, 不进行水解, 作为对照观察。<sup>[3]</sup>

1.2.4 染色 将水解后的血涂片和对照片一起置入 Schiff 试剂染色缸中, 染色 30 min, 再用细水冲洗后, 甩去水珠, 放入 1% 亮绿染液中复染 1 min, 细水冲洗后用吸水纸吸干, 置于显微镜下观察标本。<sup>[4]</sup>

## 2 结果

取制备好的标本先用低倍镜观察, 选择染色良好、细胞分散均匀、无重叠的区域, 转换油镜下仔细观察分析。镜下可见, 蟾蜍血细胞的细胞核被染成紫红色, 说明 DNA 存在于核中; 细胞质被染成绿色, 核质红绿染色鲜明而清晰美观(见图 1)。<sup>[5]</sup> 对照组血涂片细胞核无色, 说明血涂片不经 1 NHCL 水解, 不会出现游离的醛基(-CHO), 故不发生孚尔根反应。

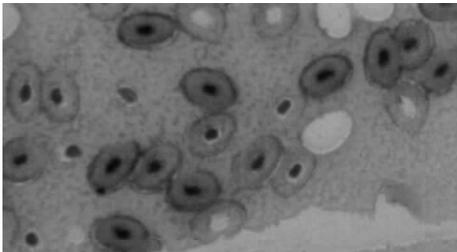


图 1 蟾蜍血细胞形态结构

## 3 讨论

(1) 实验的成功与否, 每个步骤都很关键, 必须认真严谨。首先取材非常重要, 应选择好动健康的蟾蜍, 确保心室血液充盈, 血细胞形态饱满, 颜色鲜艳, 能提供满足学生的实验需求。乙醚麻醉蟾蜍时用量要适宜, 麻醉过深心脏会停止跳动, 血液凝固, 无法推片; 麻醉过浅, 操作中蟾蜍会动, 影响学生的动手操作技能和实验教学效果。

(2) 涂片过程中, 动作要快稳准。剪开蟾蜍心室, 蘸取血液推片时要快, 尽量多推几张血片, 充分利用资源, 防止血液流失和凝固。推片时力度、角度、速度要协调配合, 推出的血片厚薄均匀适度, 细胞不重叠, 易于观察细胞结构和形态。酒精灯烤片时要掌握好温度和时间, 血涂片干透后方可水解, 否则血细胞尚未牢固地吸附在玻片上, 水解过程中容易脱落。

(3) 用 HCL 水解时, 要注意 HCL 的浓度、水浴

箱的温度和水解的时间, 以保证血细胞充分水解。1NHCL 要新鲜配制(因 HCL 挥发性强, 在 60℃ 的水浴箱中挥发更快), 水浴箱温度要保持在 60℃ 以上, 保证充分水解, 染液才能够正常着色。适当的水解时间一般为 8 ~ 12 min, 不宜太长或过短, 如水解时间不够, 反应就会变弱; 如水解时间过长, 或水解得过于剧烈, 则脱氧核糖也易掉下来, 反应也会减弱。

(4) 染色时, 试剂的质量要严格把关, 染液的浓度和染色的时间要控制到位。Schiff 试剂是染色成败的关键因素, 需密闭放入 -4℃ 冰箱保存。<sup>[6]</sup> 在使用前应提前拿出冰箱接近室温再染, 温度过低会造成氧化不全, 影响染色效果。最好用 1:600 甲醛的溶液验证一下是否失效, 若试剂变浅红色则失效, 可以加亚硫酸氢钠复活后再染片。新配制与作用过的试剂不同, 新配制的作用短, 以后逐渐延长, 试剂可反复使用, 每次用后须放回冰箱保存。倘若受热或见光或露置于空气中过久, 试剂中的二氧化硫易失, 就会造成试剂显色而失效。此外, 亮绿复染的时间不能太长, 宜保持在 1 min 以内, 以避免细胞核也被染成绿色, 影响区分细胞核和细胞质。

(5) 显微镜下观察细胞时, 先低倍镜下选则细胞分布均匀, 不重叠, 染色鲜艳的区域, 再滴香柏油换高倍镜观察分析。细胞核中的 DNA 呈鲜亮的紫红色反应, 不但可以反应出 DNA 存在的部位及其分布情况, 而且还可从颜色反应的深浅, 来判断 DNA 的相对含量。<sup>[7]</sup>

### 参考文献:

- [1] 扬建一. 医学细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 192 - 196.
- [2] 傅松滨. 医学遗传学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 15 - 27.
- [3] 查向东, 余凤安. 对孚尔根染色法的改进及讨论[J]. 生物学杂志, 1997, 14(77): 37 - 38.
- [4] 李桂萍, 李瑞, 杜雪玲. 植物 DNA 的 Feulgen 染色法研究[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(13): 44 - 46.
- [5] 焦红丽, 冶亚平, 夏潮涌. 两种染色方法在细胞核 DNA 含量检测中的应用及比较[J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(3): 180 - 181.
- [6] 陈小辉, 胡乐, 马宁, 等. 洋葱内表皮细胞中 DNA 和 RNA 染色方法的改进[J]. 山西医科大学学报, 2015, 07: 702 - 703.
- [7] 赵惠玲. 孚尔根整体染色法在动物组织学研究中的应用[J]. 晋中学院学报, 2005, 06: 56 - 57.

[收稿日期 2015 - 10 - 15; 责任编辑 徐文梅]