

改良 Schiff 试剂热配法的应用和体会

臧志伟, 吴佺 (山东医学高等专科学校, 山东济南 250002)

摘要: 目的: 探讨用改良 Schiff 试剂在科研和临床病理检验技术中得到的应用价值。方法: 采用跟传统经典方法对比, 跟踪之后再验证的方法。结果: 以改良后染色效果明显, 糖原染色阳性物质为紫红色等实际操作染色片例为佐证染色后效果明显优于传统的方法。结论: 改良后 Schiff 试剂热配法配制简单简洁, 方便, 值得推广。

关键词: 改良; Schiff 试剂; 偏重亚硫酸钠; 36%~38% 的浓盐酸

高碘酸能使细胞内多糖含有的 1,2- 乙二醇氧化, 产生二醛, 此二醛基进而与 Schiff 液作用形成红色化合物。定位于胞浆中其强度与糖原含量成正比, 但传统方法配制 Schiff 试剂步骤繁琐, 不易掌握且配制后保存时间短, 不易推广。实验者经多年实践总结改良热法快速配制 schiff 试剂不仅方法简便、成功率高, 而且染色效果比改进前更加艳丽, 染色色彩更加锐利鲜明。

1 材料与方法

1.1 实验材料

① 研磨成粉状的碱性品红; ② 偏重亚硫酸钠; ③ 36%~38% 的浓盐酸; ④ 蒸馏水; ⑤ 活性炭粉。

1.2 传统 Schiff 试剂配制

将 1 g 碱性品红加入煮沸的 200 ml 蒸馏水中, 再煮 1 min, 使碱性品红完全溶解。冷却至 50℃ 时过滤, 加入 1 mol/L 浓盐酸 20 ml, 再冷却至 35℃ 时, 加入偏重亚硫酸钠 2 g, 盖紧并轻轻摇动使其溶解, 于暗处静置 24 h, 溶液变成稻草色或淡红色, 加入活性炭 1 g, 塞瓶口轻摇 1~2 min, 静置 1~2 h 后过滤, 置于 4℃ 冰箱内保存。

1.3 改进后的 Schiff 试剂配制方法

用 500 ml 的三角烧瓶加入 260 ml 蒸馏水在电炉加热至沸腾, 取 1.5 g 碱性品红置于 260 ml 沸水中, 先用玻璃棒搅拌均匀再继续摇动烧瓶 5 min 使之溶解, 移入量筒。冷却至 25℃ 时, 加 29.5 g 偏重亚硫酸钠, 用玻璃棒搅拌均匀, 使之完全溶解, 滴加 36%~38% 的浓盐酸 3 ml 添加蒸馏水至 300 ml 充分混合振荡 10 min。使该溶液颜色褪至淡黄色, 若呈红色则不能使用, 加活性炭粉 5 g 颠倒混匀。取滤纸放入漏斗过滤至棕色瓶, 此时溶液呈无色透明状, 置 4℃ 冰箱备用 (可保存 1.5 年以上)。

1.4 染色方法

① 干燥的新鲜血膜片或病理组织切片 [脱水脱蜡 (略)] 于 95% 乙醇中固定 10 min, 流水冲洗; ② 0.5% 高碘酸水溶液氧化 5~10 min; ③ 蒸馏水充分水洗; ④ 放入无色品红溶液玻璃染缸中反应 30 min, 流动自来水冲洗 10 min; ⑤ HE 染色用苏木素染核 (血膜片可用 1% 甲基绿染核 3 min) 水洗、返蓝、镜检, 如核颜色深用盐酸乙醇分化, 再水洗显蓝; ⑥ 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。

2 染色结果

Schiff 试剂 (PAS 法) 阳性物质呈紫红色或红色。见图 1。

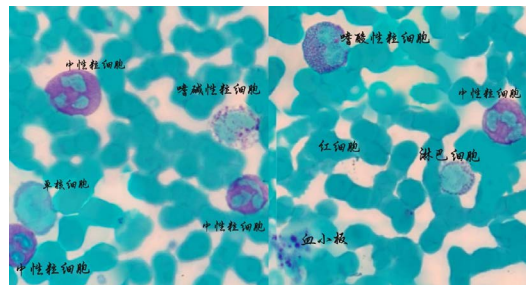


图 1 血膜片 Schiff 试剂染色反应
(注: 细胞核呈绿色, 糖类物质紫红色)

3 讨论

作者将反应物 (偏重亚硫酸钠 29.5 g) 浓度增加以避免无色品红的氧化, 也避免了背景及非糖类物质的物理着色, 清晰地显示含醛基的糖类物质。以浓度 36%~38% 的浓盐酸 (3 ml) 滴入法取代 1 mol/L 盐酸, 加速了对染色剂色素的破坏速度, 缩短了配制时间, 提高了工作效率。增加盐酸和偏重亚硫酸钠浓度, 提高了配制 Schiff 试剂生成速度加速了对色素的破坏。但为了能使 Schiff 液染色力保证发挥最佳效果, 最好采用浸泡染色。Schiff 染色反应成功与否、染色附着力好与否、反应快慢则取决于染色时间, 氧化时间长短与 (高碘酸浓度) 氧化剂的优劣和氧化液 (避免污染) 新鲜等因素有关。

Schiff 液制配法有很多, 有冷配法及热配法。都以 1:200 碱性品红溶液为最基本配方, 都是热配法 (将碱性品红加热煮沸是通过热效应来加速分子运动, 使染料溶解与脱色)。冷配法的报导也不少, 但无定性推广。我们通过多年教学实验应用实践观察, 取得了改进 Schiff 液与传统热配法一致的满意效果。改良后 schiff 试剂优点是 Schiff 液可以长期保存使用而不影响试剂质量和染色结果。改进后的 Schiff 液配液时间大大缩短 (原为 24 h, 现为 50 min), 配液步骤简化, 易于掌握, 高效实用。而传统方法配 Schiff 试剂步骤繁琐, 配制过程稍有不慎极易失败, 不易掌握, 且 Schiff 试剂贮存时间较短。改良法制备 Schiff 试剂中增加浓盐酸和偏重亚硫酸钠的浓度, 加快 Schiff 试剂生成速度, 可大量配制 (笔者有时配制多达 1 000 ml, 放置冰箱 1 年以上效果仍良好), 具有高成功率、效果理想、便于储存等特点。改良后 schiff 试剂能使师生与科研工作者较快达到实验目的, 提高实验积极性, 极大提高了实验的效率, 满足教学科研的需要而且试剂新鲜还可在冰箱可保存多年。染色结果与改进前相比更加鲜艳, 染色色彩更加锐利鲜明。

参考文献

[1] 丁伟, 王德田. 简明病理检验技术 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2014: 70.