

中华稻蝗血细胞染色方法的比较^{*}

王 强 崔智芳 王云丽 申旭燕 张小民^{**}

(山西大学生命科学学院 太原 030006)

摘 要 通过 Giemsa、Wright 和 Giemsa-Wright 混合染色 3 种方法,对中华稻蝗 *Oxya chinensis*(Thunberg) 的血细胞进行了染色和血细胞的形态学观察,其结果是 Giemsa 染液染色时间较长,对细胞核染色效果较好,细胞质界限清晰,但对细胞质中的颗粒染色较差;Wright 染液染色时间较短,对细胞核和细胞质中的颗粒染色效果较好,但细胞质的界限不清;Giemsa-Wright 混合染色具备了 2 种染液的优点,时间介于两者之间,细胞核和细胞质中的颗粒染色效果较好,细胞界限清晰,该法可用于蝗虫血细胞,以及昆虫血细胞的广泛研究。

关键词 中华稻蝗, 血细胞, 染色方法

Comparison among three staining methods to hemocytes of *Oxya chinensis*

WANG Qiang CUI Zhi-Fang WANG Yun-Li SHEN Xu-Yan ZHANG Xiao-Min^{**}

(School of Life Science, Shanxi University 030006, China)

Abstract The staining efficiency of the Giemsa, Wright and Wright-Giemsa staining methods were compared with respect to hemocytes of *Oxya chinensis*(Thunberg). The Giemsa method effectively stained the nucleus; cytoplasm boundaries were clear, but it was relatively time consuming and did not stain cytoplasmic granules very well. The Wright method effectively stained both nucleus and cytoplasmic granules in a relatively short time, but cytoplasm boundaries were not clear. The Wright-Giemsa method had the advantages of both the Giemsa and Wright methods, including shorter staining time, good staining of nucleus and cytoplasmic granules and clear cytoplasm boundaries. This method should be used more widely in studying insect hemocytes.

Key words *Oxya chinensis*, hemocytes, staining method

早在 1845 年人们就将昆虫的血细胞与无脊椎动物和脊椎动物的血细胞进行了比较(Newport, 1845)。由于人血细胞形态学特征是病理检验指标之一,故有专门的国际血液学标准化委员会(ISCH)对血细胞的染色方法进行规范,ICSH(1984)年公布了罗氏(Romanowsky)为标准染色法(称 ICSH 标准),以及 Schenk 和 Stota(1988)公布了 Schenk 标准染色法,目前判断血片染色效果常以 ICSH 标准和 Schenk 标准。对昆虫血细胞的染色使用较多的是 Giemsa、Wright、中性红、曙红(Eosin)、苏木精(Hematoxylin)、甲苯胺蓝、Alcian blue 等等。在昆虫血细胞形态分类上使用最多的是 Giemsa 染色和 Wright 染色。Jones(1977)主要通过 Giemsa 染色、Wright 染色和前人的经验,将昆

虫的血细胞归纳出 7 种明显的血细胞类型,以及 3 种不常见的血细胞类型。

到目前为止对蝗虫血细胞的研究有 Mathur 和 Soni(1937)对沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的血细胞进行了观察;Michel 等(1978)对 9 种昆虫血细胞的超微结构进行了研究其中包括飞蝗 *Locusta migratoria*;Miranpuri 和 Khachatourians(1993)研究了血黑蝗 *Melanoplus sanguinipes* 感染白僵菌后血细胞表面的变化;Jeremy 等(2000)研究了沙漠蝗血细胞的免疫反应;王世贵等(2007)对红褐斑腿蝗 *Catantops pinguis* 的血细胞进行了观察。

本文比较 Giemsa、Wright 和 Giemsa-Wright 3 种染色方法对中华稻蝗 *Oxya chinensis*(Thunberg)血细胞的染色效果,其目的是找到一

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(30770239)、山西省自然科学基金(2009011048)。

^{**} 通讯作者, E-mail: zhangxm@sxu.edu.cn

收稿日期:2011-05-09,接受日期:2011-05-20

种蝗虫血细胞的最佳染色方法。

1 材料与方法

1.1 材料

中华稻蝗采自山西省太原市晋源区。

1.2 方法

取中华稻蝗成虫(♀♂)各30头,将后足基部先用清水擦洗,再用75%的乙醇清洗。用解剖针将后足基部刺破,用移液枪取少量的血液,滴在载玻片上涂成血膜,待用。

1.2.1 Giemsa 染色 染色液的配置:取 Giemsa 粉 0.8 g,放入研钵中,再加入 50 mL 甘油,研磨后,溶入 50 mL 甲醇中。该染液放置数月后使用,或置于 37~40℃ 的温箱中,使用时按 1:10 磷酸缓冲液稀释。

缓冲液的配置:取磷酸二氢钾 1 g,磷酸氢二钠 1 g,溶入 100 mL 蒸馏水中,调至 pH 6.8。

染色方法:待涂片干燥后,将涂片放入湿盒,加 4~6 滴 Giemsa 染色液覆盖血膜,染色 35 min,然后加 8~12 滴磷酸缓冲液染色 25 min,自来水冲洗,晾干,封藏。

1.2.2 Wright 染色 染色液的配置:取 Wright 粉 0.1 g,溶入 60 mL 甲醇。

染色方法:待血膜干燥后,将涂片放入湿盒,加数滴 Wright 染色液,使染液将血膜完全覆盖,染色 2 min,然后加等量的磷酸缓冲液(同 1.2.1, pH 7.2),静置 3 min,自来水冲洗,晾干,封藏。

1.2.3 Giemsa-Wright 染色 染色液的配置:取 Wright 粉和 Giemsa 粉各 1 g,放入研钵中,再加入 10 mL 甘油,研磨后,溶入 500 mL 甲醇。

染色方法:待血膜干燥后,滴加 Giemsa-Wright 染色液 4~5 滴,染色 3 min,然后加磷酸缓冲液(同 1.2.1, pH 7.2) 2~3 倍,混匀,染色 15 min,自来水冲洗,晾干,封藏。

2 结果与分析

2.1 Giemsa 染色

Giemsa 滴染时,用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液配制工作液,共染色 60 min,并使用该磷酸盐缓冲液进行分色和冲洗,其结果是粒细胞的细胞核和细胞本身的界限分明(图版 I:G1~G4),但细胞质中的颗粒染色较差,分辨的不是十分清晰。

2.2 Wright 染色

Wright 滴染时,总共染色 5 min,用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液进行分色和冲洗,其他结果与 Giemsa 滴染相似,粒细胞细胞质中的颗粒着色较好,但细胞核不如 Giemsa 滴染时清晰(图版 I:W1~W4),细胞质界限不是十分清晰,有时看不到细胞质界限。

2.3 Giemsa-Wright 染色

Giemsa-Wright 滴染时,染色时间总共 18 min,介于 Giemsa 和 Wright 染色之间,其结果是粒细胞(granulocyte)的细胞核和细胞质分均着色较好,细胞质中的颗粒成分和细胞界限均清洗可见(图版 I:W-G1~W-G4)。

3 讨论

本研究参照前人对各种昆虫血细胞的染色方法,以及 Jones(1977)归纳前人通过 Giemsa 和 Wright 染色对多种蝗虫血细胞染色的研究,再结合目前对人血细胞所使用的 Giemsa-Wright 混色的标准(ICSH, 1984),故选用 Giemsa 滴染法、Wright 滴染法和 Giemsa-Wright 混合滴染法对中华稻蝗的血细胞进行了染色。

蝗虫血细胞有多种类型,选用不同的染料可能对蝗虫血细胞的类型确定有所差别,但不论使用哪种染料,是否能染出粒细胞,以及确定粒细胞的类型,对任何一种染料来说是非常重要的限定因素之一。粒细胞是昆虫血液中最常见和数量最多的一种血细胞类型,因此选用粒细胞作为比较对象,来进一步判断 3 种染色方法的优缺点。

Giemsa 氏染色法:优点,从对中华稻蝗的染色结果可以看到,细胞核染色清晰,细胞界限分明。由于 Giemsa 氏原液是用 1:10 的缓冲液稀释的,故染液在染色过程中不会挥发,血涂片在染色过程中不易污染,染色过程易控制,染色效果对染液 pH 值要求高,对中华稻蝗血细胞的染色以 pH 6.8 染色效果最好;缺点,从结果可以看到, Giemsa 氏染色法对粒细胞细胞质中的颗粒成分的染色不是十分清晰,染色时间长。由于本实验也使用了以蒸馏水冲洗后,短暂地浸入加进几滴的碳酸锂的蒸馏水中,以辨别染成红色的结构;而以用水冲洗后,短暂地浸入加进几滴稀盐酸的蒸馏水中,以辨别染成蓝色的结构,但 Giemsa 氏染色法对中华稻

蝗粒细胞中的颗粒显示仍然不是十分理想,故在蝗虫血涂片染色时不建议使用。

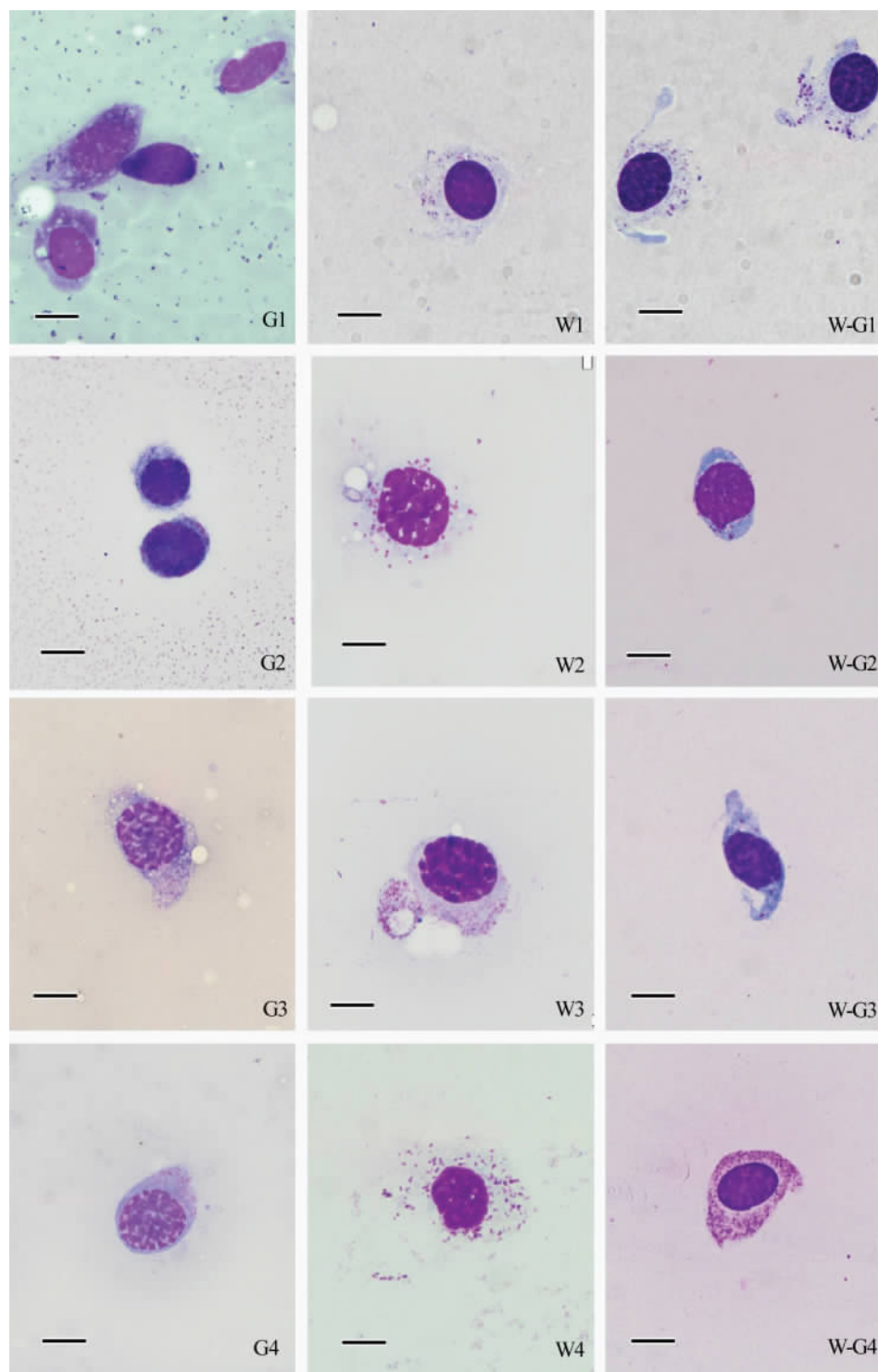
Wright 氏染色法: 优点, 从对中华稻蝗的染色结果可以看到, 对中华稻蝗的粒细胞质中的颗粒成分染色十分清晰, 染色时间短, 结果出现的快; 缺点, 对细胞核的染色不如 Giemsa 氏染色法染的清晰, 细胞界限不清, 再之, Wright 染色液中由于没有加入甘油, 则易使染液挥发而造成血涂片的污染, 从而使其染色过程不易掌握。由于该方法所使用的试剂配制简单, 染色时间短等特点, 可以用于蝗虫血细胞的染色和血细胞类型的辨别, 尤其可以在实验教学中, 用于血细胞的辨别。

Wright-Giemsa 混合法: 优点, 从对中华稻蝗血细胞的染色结果可以看到, Wright-Giemsa 混合法不仅对粒细胞的细胞核和细胞质中的颗粒成分着色清晰, 同时细胞界限也较为分明, 该方法起到了 2 种染液互补的作用; 缺点, 染液易挥发和变性快, 易污染, 为了避免该缺点, 使用 Wright-Giemsa 氏染液时, 第一, 要在湿盒中进行; 第二, 在滴染时要多加入几滴染液; 第三, 在血涂片染色结束后, 要尽快用水冲洗, 用自来水冲洗要比用蒸馏水或缓冲液冲洗更方便和彻底, 可通过调节自来水的水压, 及时冲去结合尚未牢固的染料沉渣, 以减少污染。该法不仅可以广泛用于蝗虫血细胞的染色和血细胞的类型识别, 同时也可以在实验教学中广泛使用, 也是广泛研究昆虫血细胞的一个较好的染色方法。

参考文献(References)

- ICSH, 1984. Referen method for staining of blood and bone marrow films by Azure B and eosin(romanowsky) stain. *Br. J. Haematol.*, 57(4): 707—710.
- Jeremy GP, Burnett C, Charnley AK, 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Insect Physiol.*, 46: 429—437.
- Jones JC, 1977. The Circulatory System of Insects. Charles C & Thomas Publisher. 144—194.
- Mathur CB, Soni BN, 1937. Studies on *Schistocerca gregaria* Forsk. IX. Some observations on the histology of the blood of the desert locust. *Ind. J. Agric. Res.*, 7: 317—325.
- Michel B, Daniel Z, Hoffmann JA, 1978. A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tiss. Res.*, 195: 45—57.
- Miranpuri GS, Khachatourians GG, 1993. Hemocyte surface changes in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* in response to wounding and infection with *Beauveria bassiana*. *Entomol. Exp. Appl.*, 68: 157—164.
- Newport G, 1845. On the structure and development of the blood. First series. The development of the blood—corpuscles in insects and other invertebrata, and its comparison with that of man and the vertebrata. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 15: 281—284.
- Schenk EA, Stota EH, 1988. Note from the biological stain commossion: revision of Azure B assay protocol. *Stain Technol.*, 63(1): 65—69.
- 王世贵, 周志军, 郑哲民, 2007. 红褐斑腿蝗血细胞的形态和分类. *昆虫知识*, 44(2): 241—244.

图版 I 中华稻蝗血细胞染色方法的比较

Plate I Comparison of the staining methods of *Oxya chinensis* hemocytes

G1,G2,G3,G4: 不同形态的粒细胞 plasmatocytes of different forms, Giemsa 染色 Giemsa staining; W1,W2,W3,W4: 不同形态的粒细胞的粒细胞 plasmatocytes of different forms, Wright 染色 Wright staining; W - G1, W - G2, W - G3, W - G4: 不同形态的粒细胞的粒细胞 plasmatocytes of different forms, W-G 染色 Wright-Giemsa' staining. Bar = 10 μm .