细胞生物学实验报告：HE染色

顾志炜 2018012426 生82

2021.3.9

一、实验目的

1. 掌握倒置像相差显微镜的基本使用方法，利用显微镜辅助观察和描述细胞

2. 了解HE染色的原理，掌握其实验流程和方法，分析染色效果

二、实验背景

1. 如何观察“透明”的细胞

在普通光学显微镜下观察细胞，必然依赖人眼或CCD对光强度（亮度）或频率（颜色）差异的感知。由于一般细胞尺寸很小，所以它们对光的影响能力也很有限：细胞样品很薄且以水为主，不能充分滤过特定波长的光，因此显微镜成像的频率（颜色）没有显著差异；细胞内部结构厚度差异不大，不能有效形成质厚衬度，因此显微镜成像的衬度（亮度）也没有显著差异，最终使得普通细胞在显微镜下表现为几乎均质的透明物体。

想要观察细胞内部的结构差异，就需要人为增加成像时光强度或频率的差异。设计光路增强衬度，可以使我们观察到有明暗差异的细胞结构；使细胞中的不同结构附着不同染料，增强细胞吸收和反射特定波长光的能力，可以使我们观察到有颜色差异的细胞结构。

2. 苏木精-伊红染色原理：

苏木精-伊红染色（Hematoxylin-Eosin Staining, HE Staining）, 简称HE染色，是观察细胞以及细胞石蜡切片常用的染色手段，在细胞生物学、组织胚胎学等中有广泛的应用。经过HE染色后，细胞核会呈蓝色，染色质染色尤深，而细胞质会呈品红色。

金属苏木精是碱性染料，能够附着在细胞结构上并使其呈蓝色。由于苏木精对细胞中许多组分都有一定吸附能力性，在染色后需要用酸性的盐酸酒精溶液洗脱，使核酸、钙盐等嗜碱性物质上强吸附的染料更显著，这个过程称为“分色”；在酸性条件下苏木精呈红色，为了与接下来的伊红染色相区分，并增强其吸附力，一般再用弱碱性的溶液处理“返蓝”。

伊红是酸性染料，在酸性环境下能够与蛋白质的带正电的氨基结合，从而广泛地为细胞基质染色。

三、实验用品

**1. 实验材料**

贴盖玻片培养HeLa细胞（由实验教学中心提供）

**2. 实验用品**

· XD-202型倒置像差显微镜，配合DC6000采集系统和ScopeImage 9.0，具有20x-40x环状光阑

· 塑料平皿

· 镊子、胶头滴管、废固杯、废液杯等

**3. 试剂（均由实验教学中心提供）**

· 苏木精染液（参考配比：A液：1 g苏木素溶于20 mL无水乙醇；B液：50 g明矾溶于300 mL蒸馏水； AB液混合煮沸后蒸馏水定容至1 L， 加入0.2 g碘酸钠，过滤）

· 伊红B染液 （参考配比： 以85%乙醇溶解伊红粉末，质量/体积（g/mL）为0.5%）

* 0.5%盐酸酒精溶液（参考配比：浓盐酸溶于75%乙醇中，体积比为0.5%）
* Carnoy固定剂
* PBS

· 蒸馏水

四、实验步骤

1. 取实验教学中心提供的细胞培养6孔板置于倒置显微镜下，直接观察活体HeLa细胞的生长状态，并拍照记录。

2. 取一个塑料平皿，加入足量PBS。从培养板中取出一块附着有HeLa细胞的盖玻片，放入装有PBS的平皿中，并使附着有细胞的一面向上。

3. 吸弃PBS，再加入一次PBS漂洗。

4. 吸弃PBS后，在平皿中加入足量Carnoy固定剂，使液面没过盖玻片。盖上平皿盖，固定15 min。

5. 打开平皿，吸弃Carnoy固定剂，加入足量蒸馏水漂洗2次。

6. 在平皿中加入适量苏木精染液，使染液没过细胞。盖上平皿盖，置于倒置显微镜下用20 x物镜观察，确认染色状态并拍照记录。苏木精染色时长12 min。

7. 吸弃苏木精染液，加入足量蒸馏水后，到水池使用流动的自来水洗涤：倾斜盛有水的平皿，使自来水不断流入和流出平皿，且液面在盖玻片表面浮动。

8. 吸弃自来水，在平皿中加入0.5%盐酸酒精溶液，使其没过盖玻片。在桌面上摇晃平皿3次，随后吸弃。加入蒸馏水。

9. 按照（7）中的步骤，再次使用流动的自来水洗涤，并在自来水中静置3 min。然后用蒸馏水漂洗1次，拍照记录。

10. 加入适量伊红染液，使染液没过盖玻片。摇晃2次后加入足量蒸馏水稀释。

11. 蒸馏水漂洗2次，置于倒置显微镜下观察，并拍摄记录。

12. 吸弃蒸馏水，再加入适量伊红染液，摇晃数秒后加入蒸馏水漂洗1次，置于显微镜下观察，并拍摄记录。

五、实验结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **c** | **d** |  |
|  | **f** |  |
|  |  |  |

**图1. HE染色各阶段时的HeLa细胞**

**b**

**a**

**e**

**a)** 尚未固定的HeLa细胞（20x，带环状光阑），细胞大多呈多边形贴壁生长，少数（箭头处）分裂细胞贴壁性弱；**b)** 苏木精染色6 min时的HeLa细胞（20x，无环状光阑，具20x标尺），可以看到此时染料为红色；**c)** 自来水静置返蓝后的HeLa细胞（20x，带环状光阑）；**d)** 自来水静置返蓝后的HeLa细胞（20x，无环状光阑）**；e)** 第一次伊红染色后的HeLa细胞（40x，无环状光阑，具40x标尺），染色较浅，细胞脱落较多；**f)** 第二次伊红染色后的HeLa细胞（40x，无环状光阑，具40x标尺），染色深

1. 图、图名、标注、图解（对图的进一步说明：包括处理条件等内容）应在同一页中；

2. 手绘图需在图的下方注明放大倍数（目镜放大倍数 X 物镜放大倍数），照片可以注明拍照时所用物镜的放大倍数；

3. 照片应裁切后使用，需加标尺，明视野照片标尺可用黑色线条表示、荧光视野可用白色线条表示，标尺长度标注在图解中；

4. 同一材料的同一视野范围的几张不同染色效果的照片摆放在同一行（或同一列），用文字标明每张照片的染色方法等（也可用编号，并在图解中进行说明）；

5. 有多张小图（或“图组”）的，分别以英文字母编号。

**三线表**

六、分析讨论

1. 相差显微与普通光学显微效果的差异

从图1-a、图1-c和图1-d的对比中，我们可以发现相差显微镜确实能提高衬度，形成普通光学纤维无法观察到的灰度边界，也使图像更具有立体感。我们知道这实际上是在光路设计中创造干涉，将透射光的相位差转化为振幅差，使得不同厚度和折射率的部位有更显著的衬度表现。然而，这种光学变换也多少导致了一些“副作用”。例如，光阑的杂散光会产生混叠，尤其是在数字化图像采集时会引入难以处理的新噪音（如图1-c中，空白背景出的明暗变化），对设备的采样频率有相当的要求；此外，相差处理也会增强色差的影响（对比图1-c和图1-d），对于染色样品来说，会使得样品颜色饱和度下降，且因色差产生噪音。

2．一些染色现象的解释

1） pH 对苏木精染色的影响：苏木精染色过程中（图1-b）, 虽然染料溶液呈紫色，但镜检结果显示此时的苏木精呈红色。文献表明，苏木精颜色随pH升高而变化，从鲜红色、蓝紫色最后到暗紫色。红色苏木精应与乙醇、明矾溶液的微酸性相符。文献也认为，中低pH能产生好的着色效果，pH过高反而容易引发染料沉积等。在经过自来水静置处理以后（图1-d）可以看到苏木精更偏蓝紫色，尽管实验中并没有测定自来水的pH。

2）不同部位的染色差异：碱性染料苏木精对于核酸具有较强亲和力，因此图1-b、图1-d和图1-f中均可以看到细胞核有更明显的苏木精染色，其中又可以看到细胞核中染色加深的部位，推测为凝集的异染色质。值得注意的是图1-b中部分细胞核（箭头标注）染色尤深。这些细胞截面积小，呈圆形，在图1-a, 图1-c中均可以看到类似形态的细胞，判断为正在分裂的细胞，由于无核膜所以染色深。在图1-e，图1-f中可以看到HE染色的最终效果：细胞核呈蓝紫色，异染色质染色深，核膜无色透亮，细胞质呈品红色。

七、实验体会（小结）

本次实验的染色操作存在一些问题，包括：

1. 苏木精染色时间偏短，或盐酸酒精洗脱时间较长，导致最终染色不够深。实验中感觉难以察觉染色程度是否足够。
2. 自来水冲洗操作猛烈，肉眼可见部分样品被冲脱。镜检时发现许多细胞核细胞核丢失。
3. 伊红染色时间不足，过早加入蒸馏水稀释。而第二次染色镜检时实际漂洗不充分。

显微镜观察和染色都是细胞生物学研究的基础技术，生物实验有很大的不确定性，想要做好这些基础实验，不仅需要扎实的理论知识，也需要对实验材料、试剂、实验操作和时间的熟练把控。

参 考 文 献

[1]王力,杨举伦,赵稳兴,陈玥,宋蜀伶,李涛. Ehrlich苏木精染液pH值变化对组织染色的影响[J].解放军医药杂志,2011,23(03):24-26+111.

[2]王宏英，李鹏、吴逸，常智杰. 细胞生物学实验指导（第三版）, 2017, 61-62.