

# 硬骨-软骨双染色技术

杨安峰

(北京大学生物系)

一般制作动物的透明骨骼标本,只是用单染色技术,即将标本的肌肉腐蚀掉,而用染料将硬骨染紫红色。作者在美国伯克莱加州大学脊椎动物学博物馆曾使用该馆根据 Wassersug<sup>[1]</sup>和 Dingerkus 加以改进的硬骨-软骨双染色技术制作有尾两栖类透明骨骼标本。制出的标本硬骨染紫红色,软骨染蓝色,效果很好。这种硬骨、软骨分别染不同颜色的方法在动物学教学和科研上应用价值很大,特介绍如下:

1. 将标本浸在 10% 福尔马林中固定,至少 2 天。

2. 剥除标本的皮肤并去除内脏。对于小型动物,如剥皮有困难,也可用刀在皮肤上划痕,使染料容易进入体内;对于两栖类幼体则不需要剥皮或皮肤划痕。

3. 用自来水冲洗干净后,放入蒸馏水中浸泡数小时直 2 天,中间要换新蒸馏水数次,浸泡时间视标本大小而异。

4. 取出标本,用吸水纸吸干后,置于下述染料制剂中: 20 毫克阿辛蓝 (alcian blue 8GX) (polysciences, Inc., Warrington, PA 18976), 溶于 70 毫升纯乙醇和 30 毫升冰醋酸中。标本在染液中置放 8—48 小时。时间多少视标本大小而异,需观察标本染色的情况灵活掌握,可检查标本的腕部、胸部软骨或颌下等处,软骨染上鲜明蓝色即可。注意不要时间过长。如适量多加些阿辛蓝,则染色时间可相应缩短些。

5. 取出标本,用吸水纸吸干,再将标本置于纯乙醇中 1—3 天,根据标本大小决定时间长短。中间至少换一次纯乙醇。

6. 将标本由纯乙醇中取出,换入 95% 乙

醇,2—3 小时后再换入依次递减浓度的乙醇中(由 95% 至 75%、40%、15%),最后置于蒸馏水中,至少 2 小时。对于较大标本,以上每一步骤各需 2—3 小时;较小型标本可直接在纯乙醇中加等量的蒸馏水作为中间过渡,最后再换入蒸馏水中;对于很小的标本,可不经中间过渡直接由纯乙醇移入蒸馏水中即可。

7. 将标本移至下列制剂中: 30 毫升饱和硼酸钠(硼砂)水溶液,70 毫升蒸馏水和 1 克胰蛋白酶 (trypsin) 相混合。标本浸泡 2 天左右需更换新制剂。如发现药液变得发蓝,则需提前更换新制剂。直至标本在药液中完全软化为止,这时标本已基本透明,透过残余组织可看清骨骼。注意不要浸泡时间过长,以免标本被胰蛋白酶过度“消化”而完全解体。这一过程如进行太缓慢,一方面可通过勤换新药液或适当多加些胰蛋白酶,另一方面也可将浸在药液中的标本移置台灯光照下加温(但不要使药液超过 37℃),以促进胰蛋白酶对组织的“消化”过程。

8. 将已充分软化的标本移入下列制剂中(这时标本容易脱节或折断,需特别轻拿轻放): 0.5% 氢氧化钾,加入足够的茜素红液 (alizerin red solution) (茜素红粉末溶于蒸馏水或 70% 乙醇中,使呈饱和溶液),直至染液呈深紫色为止。标本在染液中放置 1 至数日,直至硬骨染紫红色为止。

9. 将已染好色的标本移至 0.5% 氢氧化钾-甘油合剂中。此合剂中氢氧化钾和甘油的比例由 3:1 依次改变为 1:1、1:3,最后转移到 100% 甘油中保存。以上每一步骤至少需 24 小时。如动物的皮肤上或内部系膜上仍遗留有,

色素,则可在上述第一、二阶段时,在每 100 毫升合剂中加入数滴 3% 过氧化氢。这种去残留色素的漂白过程可持续数日。

10. 最后在浸泡标本的纯甘油中加几粒麝香草酚 (thymol) 或石炭酸 (phenol), 用以抑制细菌或霉菌的滋生。

### 参 考 文 献

- [1] Hildebrand, M. 1968 Anatomical Preparations. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- [2] Wassersug, R. J. 1976 A procedure for differential staining of cartilage and bones in whole formalin-fixed vertebrates. Stain Technology **51** (2): 131-136.