

大鼠视网膜血管网铺片 PAS 染色

一、染色机制：

PAS 染色又称过碘酸雪夫染色，糖原染色。一般用来显示糖元和其它多糖物质。过碘酸能使细胞内的多糖乙二醇基氧化成二醛，再与 Schiff 氏液的无色品红结合呈现红色，定位于胞浆上。

二、染色应用：

随着医学实验技术的发展，糖原染色应用的范围更加广泛，如用以证明与鉴别细胞内空泡状的性质，心肌病变及其他心血管疾病的诊断，糖原累积病诊断和研究，糖尿病的诊断和研究，用于某些肿瘤的诊断等。而视网膜是由大脑向外延伸的视觉神经末梢组织，其结构复杂，精细，脆弱而代谢旺盛。其血管属于终末血管系统，任何病理性的破坏和血管阻塞等引起的组织缺氧，均能导致组织坏死，使其丧失感受和传导光刺激的功能。因此血管改变是视网膜病变的重要特点。视网膜血管铺片是研究视网膜血管病变的重要技术。

三、试剂配制：

试剂名称	厂家	货号
胰蛋白酶消化液	Wanwu	G4004
PAS 染色液	Wanwu	G1008

四、消化及染色步骤：

1. 取材：取带有视神经的大鼠眼球，4%多聚甲醛固定 12 h 以上。
2. 剥离：从 4%多聚甲醛中用尖头镊子取出眼球，PBS 充分洗涤除去固定液，然后放入装有 PBS 溶液的培养皿(直径 10 cm)中。用尖头镊子夹住眼球的视神经将眼球取出，用拇指和食指轻轻夹住眼球，用细针头沿锯齿缘扎 4-5 下，使房水流出，用眼科剪沿锯齿缘环形（图 1 红色箭头所示位置）剪开虹膜，再用尖头镊子轻轻剥离前眼部分的角膜和晶状体，浸入 PBS 溶液中轻轻漂洗，洗掉玻璃体后，以视神经乳头为中心将杯状眼球壁均匀分成 3-4 份，用尖头镊子轻轻剥离出内壁的视网膜层（图 2），将剥离下来的视网膜在 PBS 溶中浸洗 30 min-12 h，根据实

际工作情况安排时间。

嘉铖视光

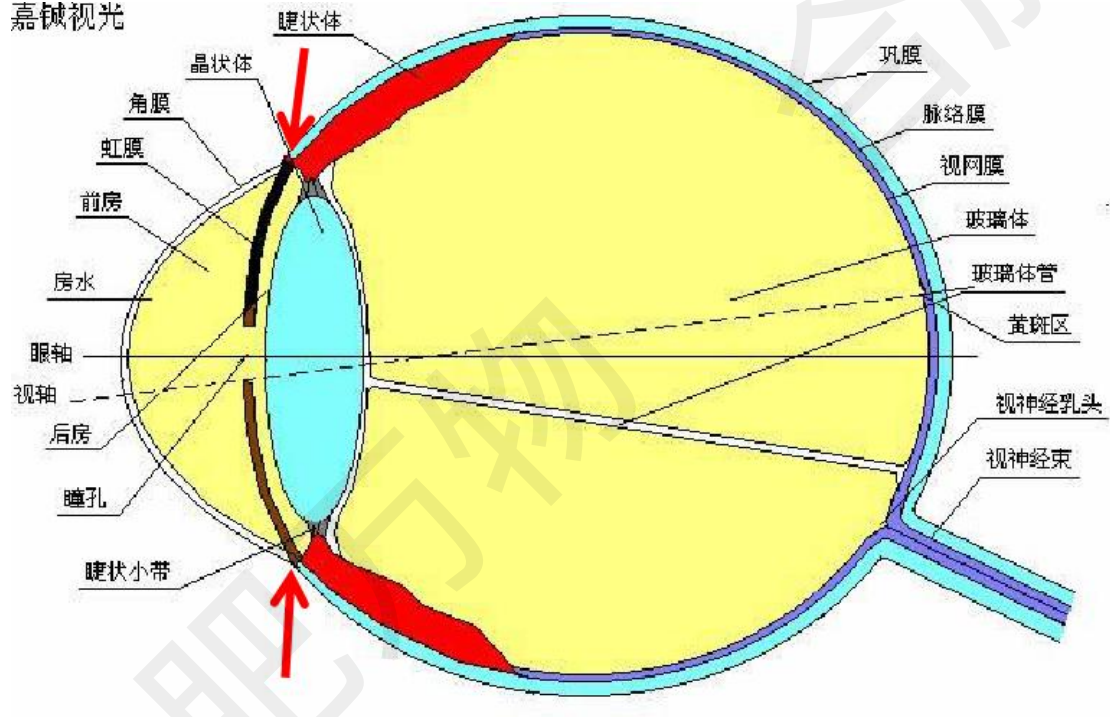


图 1 眼球示意图。

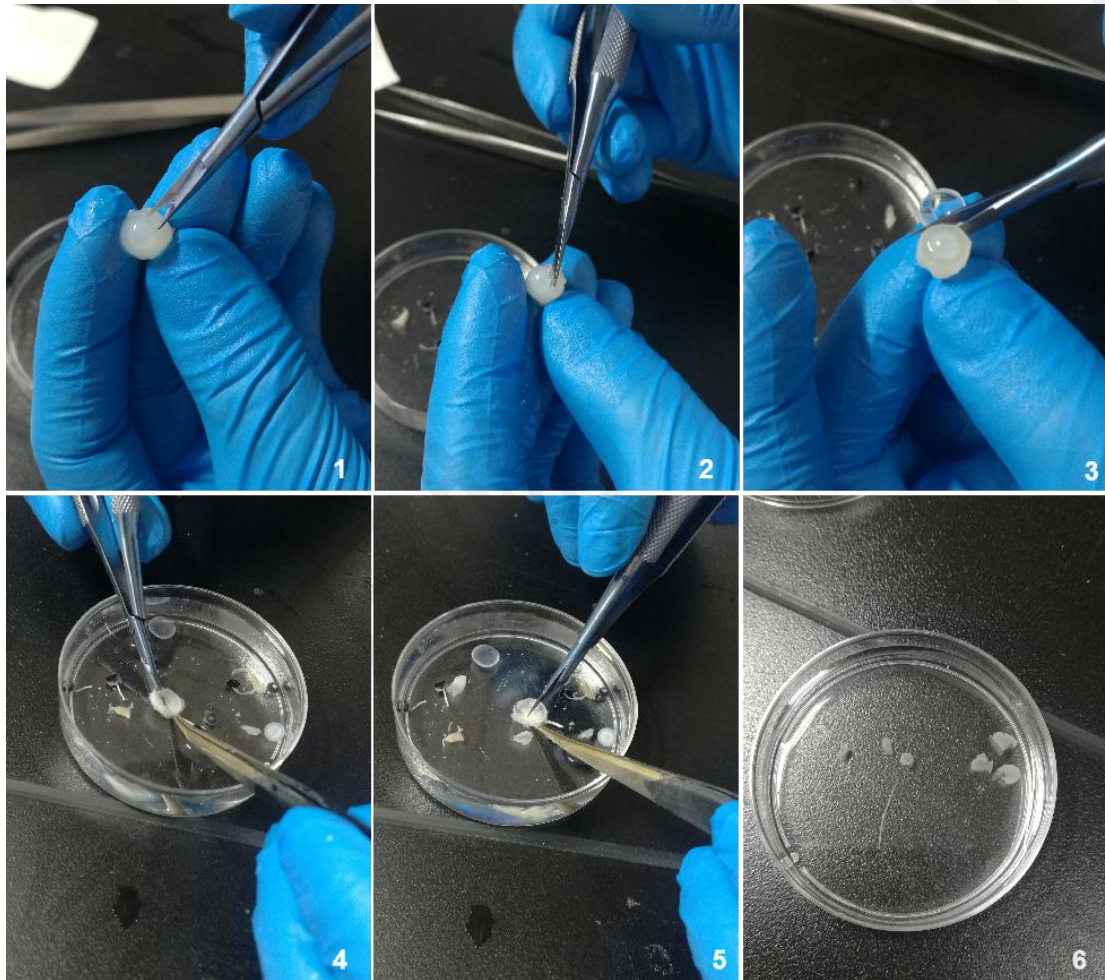


图 2 大鼠视网膜玻璃。

3. 消化：用干净的粗口玻璃吸管吸出视网膜，放入装有 10 mL 胰酶消化液的 15 mL 青霉素玻璃小瓶中(加橡胶塞)，于 37°C 烤箱过夜消化（15-18 h）。小鼠视网膜消化时间一般 22-24 h。

4. 吹打：用粗口玻璃吸管从胰酶消化液中吸出 1 瓣视网膜，轻轻放入装满纯水的 6 cm 培养皿中，轻轻吹打视网膜 5 次，用粗口玻璃吸管吸出视网膜，转入装有热水（80°C 左右）的 6 cm 培养皿中，用细口玻璃吸管反复吹打视网膜，去除粘附在视网膜血管网上的细胞，直至视网膜血管网呈现透明状（如图 3 所示）。小鼠视网膜较小，吹打过度会使组织碎成很小的片状，找不到完整的视网膜血管网。

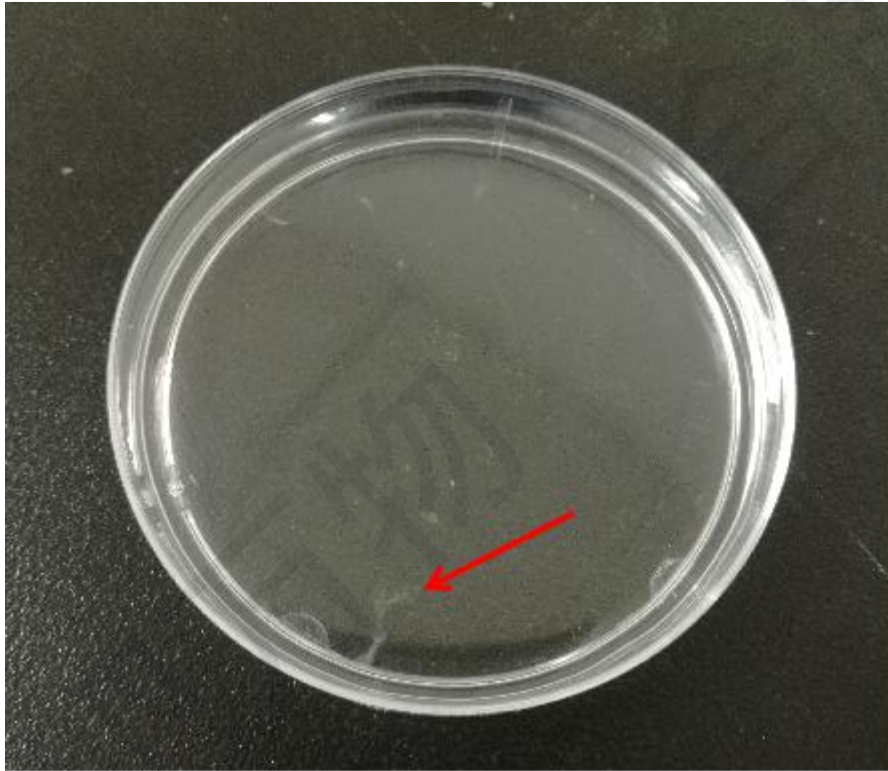


图 3 消化彻底的视网膜血管网。

5. 铺片：用玻璃吸管小心吸取透明的视网膜血管网，放在写好编号的石蜡防脱玻片上，轻轻晃动载玻片，用 100 μL 移液枪沿水滴边缘缓慢吸取，利用水流的作用，使血管网完全展开，不要将水完全洗干净，否则会导致血管网蜷缩在一起。留少许水且保证血管网完全展开，自然晾干。

5、PAS 染色：

- (1) 晾干的血管网铺片浸入自来水中 5 min；
- (2) 取出切片，稍甩干多余的水分，切片入 0.5%高碘酸浸染 15 min，切片入纯水浸洗 3 次，每次 10s；3、稍甩干切片多余的水分，切片浸入已经提前恢复常温的雪弗溶液中于暗处浸染 20 min
- (3) 取出切片，浸入装有自来水的塑料盆中流水冲洗 5min，稍甩干切片多余的水分，入苏木素染液染色 5min，自来水洗，盐酸水溶液分化 2s，自来水洗，氨水水溶液返蓝 5s，自来水洗；
- (4) 切片入无水乙醇 3 缸脱水，各 5min，二甲苯透明 5min，中性树胶封片；

五、染色结果：



合肥万物生物科技有限公司

Hefei WANWU technology CO.,LTD

视网膜毛细血管呈红色，细胞核呈蓝色。