

阿利新蓝-茜素红双染实验报告

一、实验原理

该染色项目是对骨和软骨进行染色以观察脊椎动物骨骼在生理和病理状态下的改变，阿利新蓝是一种含铜离子的苯二甲蓝染料，一种阳离子染料，与硫酸根和糖蛋白结合强烈，可将黏多糖染成蓝色，在骨染色中把软骨染成蓝色。茜素红是阴离子染料能与钙结合形成红色沉淀，在骨骼染色中可将钙化的骨基质染成红色。

二、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
显微镜	NIKON	ECLIPSEE100
数显恒温水浴锅	上海助蓝仪器科技有限公司	DK-60
移液枪	Dragon	KE003608

2. 主要实验试剂

试剂	厂家	货号
阿利新蓝 8GX	MACKLIN	A801642
茜素红	MACKLIN	A6053
无水乙醇	杭州宏达化工仪器有限公司	SJ003614
冰乙酸	MACKLIN	A801295
甘油	MACKLIN	G8120575
KOH	MACKLIN	P816404



三、实验准备

1. 胚胎染色剂：

1.1 软骨染色液：每升软骨染色液中包括阿利新蓝 0.15g、无水乙醇 700ml、冰醋酸 50mL 和水 250mL。

1.2 硬骨染色液：每升硬骨染色液中包括茜素红 0.05g、无水乙醇 700mL 和水 300mL。

2. 胎鼠染色剂：

2.1 软骨染色液：取 0.15%~0.3%阿利新蓝酒精(70%)溶液及冰醋酸各 1 份，溶于 18 份的 70%酒精内，混合均匀。

2.2 硬骨染色液：1 份 0.1%茜素红-S 酒精(95%)溶液加 19 份 70%酒精。

四、实验步骤

1. **样本处死**：将胎鼠浸入无水乙醇 20 分钟，观察至呼吸停止未见挣扎，取出。

2. **剥皮**：将标本浸入 70 摄氏度热水中水浴加热 25 秒，观察至标本肿胀皮肤变白后，立即取出，浸入冷水或酒精，剥皮去内脏。

3. **标本固定**：把去皮后的标本整理好姿势，（若标本脂肪过多，浸入 3%重铬酸钾溶液中几天，除去材料表面的脏物和脂肪粒块。当溶液变浑浊时即更换 C 新液，观察至溶液不浑浊为止，取出用清水冲洗），再浸入 95%乙醇中继续固定 2-3 天，观察至标本脱水硬化。

4. **软骨染色**：将标本浸泡于软骨染色液中，观察至肋骨、脊柱、尾骨处软骨呈现蓝色，取出，使用 70%酒精溶液反复进行清洗，直至冲洗液颜色无色，梯度酒精复水。

5. **消化加预透明**：标本放入消化液中，使肌肉颜色变浅，时间控制在一小时以内，以防过度脱色软化，放入 1%KOH 中进行预透明，观察至肌肉变软透明，呈果冻状，取出。

6. 硬骨染色: 将标本浸泡于硬骨染色液中, 每十五分钟观察一次, 观察至颅骨, 脚趾部, 脊柱处硬骨呈现深红色, 取出。

7. 脱色: 将染色后的标本浸泡于 2% 的 KOH 溶液中 8-12 小时, 再浸泡于 1.5% 的 KOH 溶液中 12-24 小时, 最后浸泡于 1% 的 KOH 溶液中 2-3 天, 观察至肌肉颜色变为无色呈果冻状, 骨组织变为红色, 取出。

8. 梯度透明: 将标本依次浸泡于 1% 的 KOH 溶液与丙三醇所形成的梯度溶液, 配比比例分别为: 1: 4、2: 3、3: 2、4: 1, 标本在梯度溶液中浸泡的时间为 1-2 天。每次均以标本沉入梯度溶液底部为准, 最后置于纯甘油中进行密封保存。

五、结果判读

标本无多余肌肉且肌肉透明无色, 骨骼完整, 硬软骨染色区分明显。

六、注意事项

1. 剥离皮肤时保证骨骼完整性, 尤其是腕、踝部;
2. 采用试管进行梯度透明, 更方便观察透明程度。
3. 标本较多时防止染色液浓度变小, 需定时对染色液进行替换。

七、示例图

