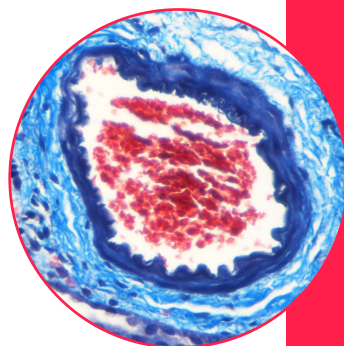
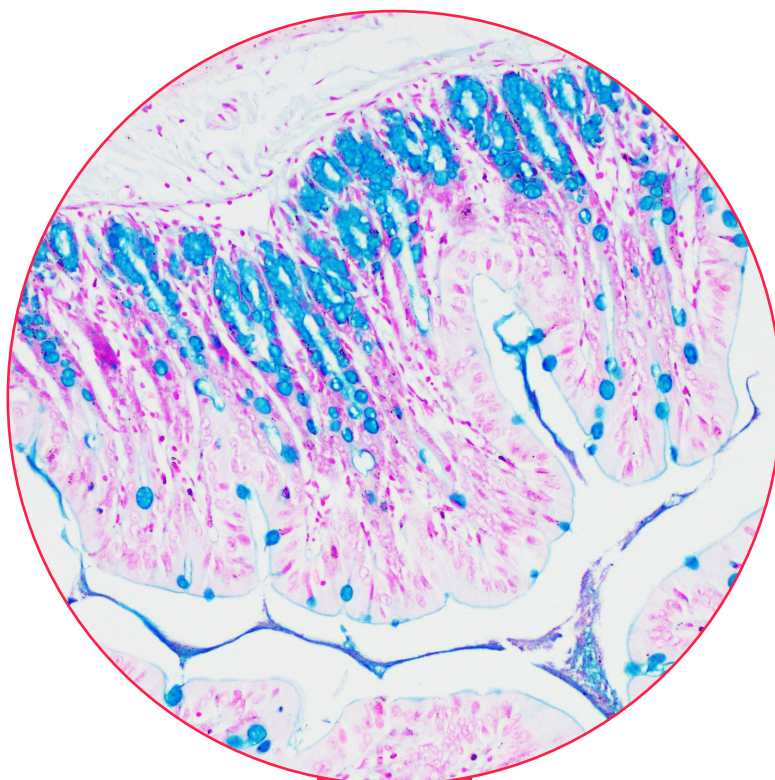




病理染色液 技术手册

全场景染色解决方案 · 让每一次染色, 都清晰可辨



目录

01 技术背景

02 病理染色技术概述

1. HE染色技术
2. Masson三色染色技术
3. 阿利新蓝染色技术
4. 尼氏染色技术
5. 改良油红O染色技术
6. 瑞氏-吉姆萨染色技术
7. 普鲁士蓝染色技术

03 常见问题解答 (FAQ)

04 参考文献

一. 技术背景

病理染色技术是组织学与病理形态学诊断的核心手段，其本质是利用染料分子与组织内不同生物大分子（核酸、蛋白质、多糖、脂质等）之间的理化相互作用（如静电结合、氢键、疏水作用及金属媒染）实现选择性显色，从而在镜下凸显细胞与组织的细微结构。从生物学机制看，染料的化学结构（发色团与助色团的类型、电荷性质、分子大小与亲疏水性）决定了其与靶标大分子结合的亲和力与特异性，进而影响染色选择性、色度及对比度。

经典HE染色中，苏木素作为碱性染料与细胞核内带负电的核酸磷酸基团结合，而伊红作为酸性染料与胞质中带正电的碱性氨基酸残基结合，从而基于电荷互补原理实现核质对比。特殊染色则利用组织化学显色反应，如过碘酸-希夫反应（PAS）通过氧化糖原产生醛基与品红结合，特异性显示糖蛋白与糖脂分布。免疫组织化学（IHC）与免疫荧光（IF）技术基于抗原-抗体特异性识别原理，通过酶促显色或荧光标记实现蛋白质的原位半定量分析。原位杂交（ISH）及荧光原位杂交（FISH）则利用核酸互补配对原则，在染色体或组织切片水平定位特定DNA/RNA序列。

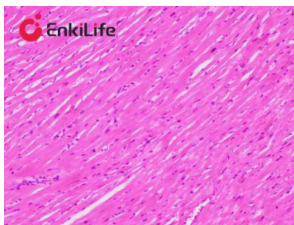
现代多重免疫荧光、质谱成像及数字病理技术的融合，使病理染色从单一形态学观察迈向多组学空间分辨分析，为肿瘤微环境解析、分子分型及精准诊疗提供了关键技术支撑。



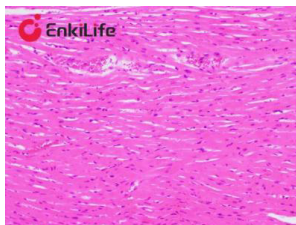
二. 病理染色技术概述

1: HE染色技术

HE染色(苏木素-伊红染色)是解剖病理学中使用最广泛的组织学染色方法,也是大多数病理实验室最首要、最基础的染色技术。该染色通过两种染料分别显示细胞核与细胞质,使组织在显微镜下获得清晰的形态学对比,是病理诊断和组织学研究的"金标准"方法。



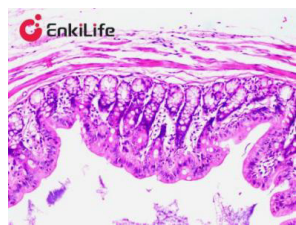
HE水溶-1



HE水溶-2



HE醇溶-1



HE醇溶-2

1.1 技术原理

HE染色由两种染料协同作用完成:

苏木素染细胞核——苏木素是从原产于中美洲的苏木树的木材中提取的天然染料,容易被氧化转化为苏木因。苏木因与铝等媒染剂金属形成配位化合物(色淀),该色淀通过离子键与细胞核中带负电的脱氧核糖核酸(DNA)结合,从而将细胞核染成深蓝色至紫色。

伊红染细胞质——伊红是一种酸性染料,带负电荷,与细胞质中带正电的蛋白质结合,将细胞质、结缔组织纤维和细胞外基质染成深浅不同的粉红色至红色。

两种染色形成鲜明对比:细胞核呈深蓝紫色,细胞质呈浅粉红色,使组织结构一目了然。

1.2 水溶/醇溶配方区分

水溶HE:不经过高浓度乙醇可直接水洗,适合冰冻切片、细胞涂片;

醇溶HE:染色后乙醇脱水不易脱色,石蜡切片首选。

1.3 实验步骤

• 石蜡切片染色

1.切片脱蜡至水

- ①二甲苯或浸蜡脱蜡透明液作用 2 次,每次 5~10 min。 ②(可选) 无水乙醇作用 2 次,每次 3~5 min。 ③95% 乙醇:3~5 min。 ④90% 乙醇:3~5 min。 ⑤80% 乙醇:3~5 min。
⑥自来水或蒸馏水(亦可用 30~40 °C温水) 冲洗:1~3 min。

2.染色

- ①苏木素染色液染色:3~8 min。 ②自来水或蒸馏水冲洗:5~10 s。 ③(可选) 盐酸乙醇分化:2~5 s。 ④自来水冲洗:20~30 s。 ⑤蓝化液或温水返蓝:20~40 s。 ⑥自来水冲洗:30~60 s。 ⑦伊红染色液(水溶) 染色:20~120 s。 ⑧自来水冲洗:30~60 s。

3.脱水、透明、封固

- ①80% 乙醇:10~20 s。 ②90% 乙醇:10~20 s。 ③95% 乙醇作用 2 次,每次 1~2 min。
- ④无水乙醇作用 2 次,每次 2~3 min。 ⑤二甲苯或浸蜡脱蜡透明液透明 3 次,每次 2~3 min。
- ⑥中性树胶封片。

• 冰冻切片染色

- 1.乙醚-乙醇混合固定液:5~10 s。
- 2.自来水冲洗:2~5 s。
- 3.苏木素染色液滴染 1~5 min (可加热至 50 °C)。
- 4.自来水冲洗:2~5 s。
- 5.(可选) 盐酸乙醇分化:2~5 s。
- 6.自来水冲洗:2~5 s。
- 7.蓝化液或温水返蓝:2~5 s。
- 8.自来水冲洗:5~10 s。
- 9.伊红染色液 (水溶) 染色:2~20 s。
- 10.自来水冲洗:5~10 s。
- 11.80% 乙醇:1~2 s。
- 12.95% 乙醇:1~2 s。
- 13.无水乙醇:2~5 s。
- 14.苯酚二甲苯 (1:3):2~5 s。
- 15.二甲苯或浸蜡脱蜡透明液透明 3 次,每次 2~5 s。
- 16.中性树胶封片。

• 细胞染色

- 1.4% 多聚甲醛固定 10~20 min。
- 2.自来水冲洗 2 次,每次 2 min。
- 3.蒸馏水冲洗 2 次,每次 2 min。
4. 染色、脱蜡、透明、封固步骤同石蜡切片的染色步骤,作用时间应相应缩短。

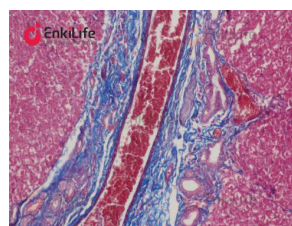
1.4 注意事项

- (1)组织固定:组织切取后应及时用10%中性甲醛固定,固定不足或过度都会影响染色质量。
- (2)切片厚度:石蜡切片一般以3~5 μm为宜,过厚会导致细胞重叠、染色不均匀。
- (3)分化控制:分化时间需精确掌控——分化不足则核染色过深、背景不清;分化过度则核着色过浅,难以辨认核形态。
- (4)蓝化充分:蓝化不充分会使细胞核呈红褐色而非蓝色,影响判读。
- (5)伊红时间:伊红染色时间需根据染液浓度和批号灵活调整,过久则细胞质过红、核质对比度下降。

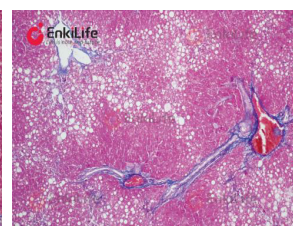
- (6)试剂更新:苏木素染液和分化液应定期更换,氧化过度或pH变化会导致染色不稳定。
- (7)水质:染液配制及漂洗用水宜用蒸馏水或去离子水,避免自来水中的杂质和矿物质干扰染色反应。
- (8)封片气泡:用中性树胶封片时应避免气泡产生,否则影响显微镜观察和长期保存。

2: Masson三色染色技术

结缔组织狭义上是指其含有的三种纤维:胶原纤维、网状纤维、弹力纤维,而胶原纤维是分布最广、含量最多的一种纤维。Masson三色染色又称马松染色,由法国病理学家Pierre Masson于20世纪初创立,是结缔组织染色中最经典的一种方法,是胶原纤维染色权威而经典的技术方法。



Masson染色
结果图-1



Masson染色
结果图-2

2.1 技术原理

利用三种不同分子量的染料(通常为铁苏木素、丽春红酸性品红、苯胺蓝/亮绿)分步染色。小分子染料先进入组织结构,大分子染料随后替换小分子染料——遵循"分子量越大,穿透性越差"的竞争原理:

细胞核:铁苏木素→蓝黑色

肌纤维/胞质:丽春红酸性品红→红色

胶原纤维:苯胺蓝或亮绿→蓝色或绿色

2.2 实验步骤

- (1)切片常规脱蜡至水,用配制好的 Weigert 铁苏木素染色 5~10 min。
- (2)用酸性乙醇分化液分化 2~10 s,水洗。
- (3)用 Masson 蓝化液返蓝 30~60 s,蒸馏水洗 1 min。
- (4)丽春红品红染色液染色 5~10 min,蒸馏水稍洗。
- (5)磷钼酸溶液洗 2~5 min(不经水洗)。
- (6)直接入苯胺蓝染色液中染色 1~3 min(不经水洗)。
- (7)用弱酸溶液冲洗切片,至无蓝色脱出(必要时,可镜下控制)。
- (8)95% 乙醇快速脱水,无水乙醇脱水 3 次,每次 5~10 s。
- (9)二甲苯或脱蜡透明液透明 3 次,每次 1~2 min,中性树胶封固。

2.3 注意事项

- (1)固定:推荐Bouin's液固定(24 h),也可用4% PFA。
- (2)试剂新鲜:Weigert铁苏木素A液+B液现配现用。

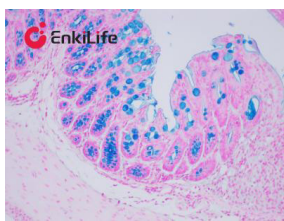
- (3)磷钼酸分化是关键:分化过短→胶原残留红色、过久→蓝色过淡,需镜下掌控。
- (4)苯胺蓝染色勿长:2-5 min即可,过长整体偏蓝,肌纤维与胶原难区分。
- (5)脱水速决:梯度乙醇(70%→95%→100%)快速脱水,乙醇有分化作用,避免颜色褪退。
- (6)骨组织需注意:脱钙液可能影响染色质量。

3: 阿利新蓝染色技术

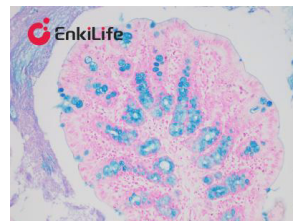
阿利新蓝染色液是一种基于阳离子型铜酞菁染料的组织化学染色试剂,可与组织中的酸性黏多糖(酸性糖胺聚糖)发生特异性结合,广泛应用于病理学、组织学及细胞生物学研究。EnkiLife阿利新蓝染色液提供 pH 2.5、pH 1.0、pH 0.4 三种规格,可分别用于检测不同类型的酸性黏液物质,满足科研中的差异化染色需求。



阿利新蓝 (PH2.5)



阿利新蓝 (PH1.0)



阿利新蓝 (PH0.4)

3.1技术原理

阿利新蓝是一种阳离子型铜酞菁染料,带正电荷的盐键可与酸性黏多糖中的负电荷基团(羧基、硫酸根)结合,形成不溶性蓝色复合物。不同pH值可区分不同类型的酸性黏液物质。

pH值	染色目标	应用说明
2.5	所有酸性黏多糖(含羧基和硫酸基)	最常用,广谱检测
1.0	硫酸化黏多糖(去除羧基反应)	区分硫酸化与非硫酸化黏液
0.4	强硫酸化黏多糖	特异性检测强硫酸化物质

3.2实验步骤

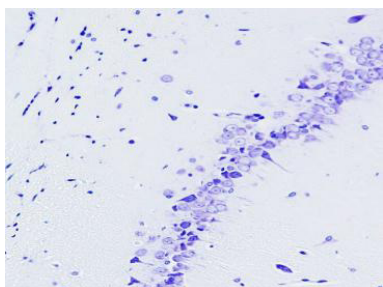
- (1)二甲苯或脱蜡透明液脱蜡,通过梯度乙醇后,入蒸馏水再水化。
- (2)Alcian 酸化液浸泡 3 min。
- (3)入 Alcian 染色液染色 15~30 min,流水冲洗 5 min。
- (4)入核固红染色液复染 10 min,流水冲洗 1 min。
- (5)梯度乙醇脱水,二甲苯或脱蜡透明液透明,中性树胶封片。

3.3注意事项

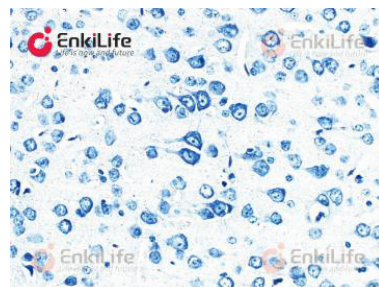
- (1)染色时间需根据组织类型和切片厚度适当调整,建议通过预实验优化。
- (2)染色后建议用核固红进行复染,以增强细胞核与黏液物质的对比度。
- (3)切片需充分水化后再进行染色,避免脱蜡不净影响染色效果。

4: 尼氏染色技术

尼氏染色液是一种用于显示神经元形态和细胞结构的经典组织学染色试剂。各种神经细胞内都含有尼氏体,但其形状、数量、分布位置常常不同,尼氏体也存在于树突中,但不在于轴突和胞体的轴丘。尼氏体的存在和消失是神经细胞是否受损的重要指标,当发生脑炎、脑缺血、轴突反应等情况时,尼氏体会发生溶解甚至消失。



尼氏染色(焦油紫)



尼氏染色(甲苯胺蓝)

4.1 技术原理

尼氏染色的技术原理基于碱性阳离子染料(如甲苯胺蓝、硫堇、焦油紫等)与细胞内核酸(DNA和RNA)之间的静电结合:染料带正电荷,核酸的磷酸基团带负电荷,两者通过离子键结合。由于神经元胞质中含有大量富含RNA的粗面内质网(即尼氏体),这些区域会特异性呈现蓝紫色颗粒状或斑块状染色,从而清晰标记神经元胞体,而不显著染色胶质细胞。

4.2 实验步骤

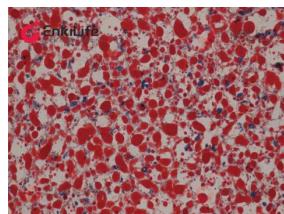
- (1)新鲜组织固定于乙醇、Carnoy 固定液或 10% 中性福尔马林溶液后,常规脱水包埋。
- (2)切片厚 6~8 μm , 常规二甲苯或脱蜡透明液脱蜡至水。
- (3)切片入 Cresyl Violet Stain, 将染色缸置于恒温箱 56 $^{\circ}\text{C}$ 浸染 1 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸染 2~3 h;如果染色效果不佳,可考虑酒精灯上加温使切片冒气泡为止(大约 10 min),冷蒸馏水冲洗。
- (4)入 Nissl Differentiation 分化 1~3 min,在显微镜下观察至背景接近于无色为止。
- (5)无水乙醇迅速脱水,常规二甲苯或脱蜡透明液透明,中性树胶封固。

4.3 注意事项

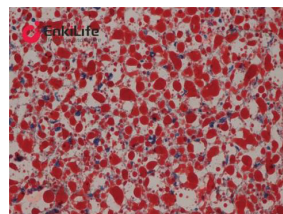
- (1)固定要求:组织需充分固定后再进行染色。常规使用4%多聚甲醛固定>10分钟,或中性福尔马林固定后经石蜡/冷冻切片处理。
- (2)染色时间控制:染色时间过短会导致着色不足,过长则背景染色过深,需根据切片厚度和组织类型适当优化。
- (3)分化步骤:染色后需用95%乙醇进行分化和脱水。分化时间需严格控制,通过镜下观察尼氏体清晰程度来掌握终点;分化不足时背景过深,分化过度则尼氏体染色变淡。
- (4)pH条件:染液的pH对染色选择性有显著影响。碱性染料在pH 3~4附近的缓冲溶液中更有利于核酸的选择性染色,pH过低(<2)则只能标记DNA。

5: 改良油红O染色技术

改良油红O染色液是在传统油红O (Oil Red O) 染色法基础上优化而来的商品化试剂产品。油红O是一种脂溶性重氮染料,能优先溶解并染色中性脂质(甘油三酯和胆固醇酯),在组织切片或细胞涂片中呈现红色/橙红色脂滴。



改良油红O染色结果-1



改良油红O染色结果-2

5.1改良技术的关键优化

- (1)溶剂系统改良:传统油红O使用60%异丙醇作为溶剂。研究发现,改用含50%乙醇+5%-10%水杨酸的乙醇溶液配制油红O染液,染色效果更优——脂滴呈色鲜艳、背景干净、染色时间缩短。且该配方无毒、易于制备、可长期储存。
- (2)配方优化减少背景:通过调整染液浓度、过滤方式和溶剂比例,减少染料结晶析出和背景非特异性染色,使脂滴呈现清晰的点状染色,而非传统方法的弥散模糊外观。
- (3)组织兼容性增强:改良配方更好地保持了冷冻切片中脂质的完整性,减少脂质在染色过程中的流失,同时使小管腔(如血管腔)等非脂肪结构不被污染。

5.2实验步骤

- (1)冰冻切片厚度 6~10 μm , 不固定或 10% 福尔马林固定 10 min 后水洗,蒸馏水稍冲洗。
- (2)入 60% 异丙醇浸洗 20~30 s。
- (3)入改良油红 O 染色液 (加盖), 密闭染色 10~15 min。
- (4)入 60% 异丙醇稍洗以便去除染液,蒸馏水稍微清洗。
- (5)入苏木素染色液复染 2~5 min。
- (6)自来水漂洗 10 min 至核为蓝色。
- (7)蒸馏水稍微清洗,滤纸吸干周围水分。
- (8)水溶性封固剂 (甘油明胶或阿拉伯糖胶) 封固,镜检。

5.3注意事项

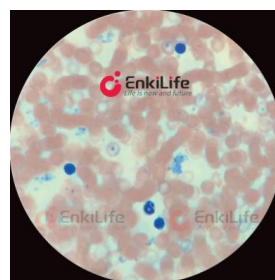
- (1)组织/细胞固定:脂质易溶于有机溶剂,因此固定时应避免使用含乙醇/二甲苯的常规固定液长时间处理。常用固定方法为4%多聚甲醛或10%中性福尔马林固定,冷冻切片(OCT包埋)进行染色。石蜡包埋过程中的有机溶剂会溶解脂质,因此油红O染色通常不进行石蜡切片。
- (2)染液配制与过滤:油红O原液为过饱和溶液,使用前必须充分溶解并经过滤(常使用0.22 μm 或0.45 μm 滤膜过滤),以去除染料结晶,减少背景非特异性沉积。
- (3)染色时间控制:通常染色时间为10-15分钟。染色时间过短则脂滴着色不足;时间过长则背景过深。改良配方因溶剂优化,可适当缩短染色时间。
- (4)分化步骤:染色后需用70%乙醇(或60%异丙醇)分化,在镜下监控至背景清晰、脂滴呈鲜明红色。分化不足则背景染红影响判读,分化过度则脂滴染色变浅。分化至组织呈现乳白色

即视为分化充分。

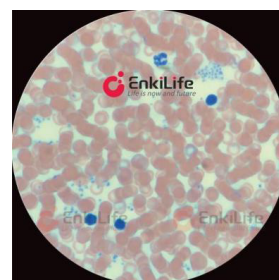
(5)脂质流失控制:染色和分化过程中,乙醇/异丙醇等有机溶剂可能部分溶解脂质,应严格控制处理时间,尽量减少脂质流失。改良配方在脂质保留方面优于传统方法。

6: 瑞氏-吉姆萨染色技术

瑞氏-吉姆萨染色液是一种复合型罗曼诺夫斯基染色试剂,由瑞氏染液和吉姆萨染液按特定比例复合而成;经常用于血细胞涂片、骨髓细胞涂片、细菌染色;细胞质呈红色,细胞核及细菌呈蓝色,嗜酸性颗粒呈橘红色;染液中加中性甘油,防止甲醇挥发或氧化,同时也可使血细胞染色较清晰。



瑞氏-吉姆萨染色液
结果-1



瑞氏-吉姆萨染色液
结果-2

6.1 技术原理

吉姆萨色素由天青 II 与伊红混合而成,染色原理和结果与瑞氏染色法基本相同,吉姆萨染色液对胞浆着色力较强,能较好的显示胞浆的嗜碱性程度,特别对血液和骨髓细胞中的嗜天青、嗜酸性、嗜碱性颗粒,着色清晰,但是对胞核着色偏深,核结构显色不佳,故吉姆萨染液常与瑞氏染液联合使用。

6.2 实验步骤

- (1)常规方法制备血液涂片或骨髓涂片或细菌涂片,待涂片自然干燥,将涂片置于染色架上。
- (2)滴加 0.5~1 ml Wright-Giemsa Stain 覆盖涂片,并让染液覆盖整个标本涂片,染色 20~60 s。
- (3)滴加两倍量的磷酸盐缓冲液,以滴管、移液器或洗耳球使两液充分混合,血片染色 10~15 min、骨髓片 25~30 min、脑脊液片 10~15 min。
- (4)步骤 2、3 亦可以采用如下方法:取 Wright-Giemsa Stain 和磷酸盐缓冲液 1:2 混合,即为 Wright-Giemsa 工作液,滴加该工作液于血液涂片或骨髓涂片上,室温静置 10~30 min。
- (5)用自来水或蒸馏水从玻片一端轻轻冲洗 (冲洗时不能先倒掉染色液,可缓慢从玻片一端冲洗以防有沉渣沉淀在标本上,时间控制在 30 s 左右)。
- (6)干燥,镜检:先用低倍镜观察血涂片,再用油镜。

6.3 注意事项

- (1)涂片固定:涂片应新鲜制备,干燥充分后使用甲醇固定(一般3~5min),固定不充分会导致细胞形态破坏或脱落。
- (2)染色时间控制:染色时间需根据涂片厚度、细胞密度和染液批次适当调整。时间过短则细

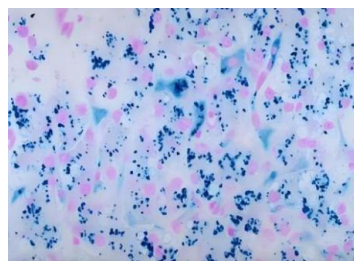
胞核着色浅、染色质形态不清;时间过长则背景过深、染料沉淀增多。

(3)分化与水洗:染色后需用中性蒸馏水(或缓冲液)充分冲洗,冲洗至涂片由蓝绿色变为粉红色为止。冲洗不充分会导致背景残留过深,影响观察;冲洗时间过长则可能使染色褪色。

(4)pH控制:理想pH范围为6.8–7.2。pH过低时染色偏红(伊红占优势),pH过高时染色偏蓝(天青占优势)。建议使用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.8)作为冲洗液以维持染色稳定性。

7: 普鲁士蓝染色技术

普鲁士蓝染色液,亦称Perls'染色液(PPB),是一种用于组织切片和细胞涂片中三价铁(Fe^{3+})检测的经典组织化学染色试剂。该染色方法最早由德国病理学家Max Perls于1867年建立,至今仍是组织铁检测的金标准方法。



普鲁士蓝染色结果图

7.1 技术原理

普鲁士蓝染色的核心是组织原位生成不溶性普鲁士蓝沉淀:其染色原理在于亚铁氰化钾溶液使三价铁离子从蛋白质中被稀盐酸分离出来,三价铁与亚铁氰化钾反应,生成一种不溶解的蓝色化合物即三价铁的亚铁氰化物。

复染:普鲁士蓝染色后,通常用核固红、中性红或伊红等对细胞核进行复染,使核呈现粉红色/红色,便于同时观察组织细胞结构和铁沉积的相对位置。

7.2 实验步骤

• 石蜡切片染色

1. 组织固定于 10% 中性福尔马林固定液,常规脱水包埋。
2. 切片厚度 4 μm , 常规二甲苯或浸蜡脱蜡透明液脱蜡至水,蒸馏水水洗 1 min。
3. 切片入 Perls Stain (见注意事项 2) 浸染 15~30 min。
4. 蒸馏水充分冲洗 2~5 min。
5. 入核固红染色液淡染细胞核 5~10 min, 自来水冲洗 1~5 s。
6. 常规脱水,二甲苯或浸蜡脱蜡透明液透明,中性树胶封固。

• 冰冻切片染色

1. 无需脱蜡,直接迅速用蒸馏水冲洗 2~3 min。
2. 染色、封固步骤同石蜡切片的染色步骤,时间可以相应缩短。

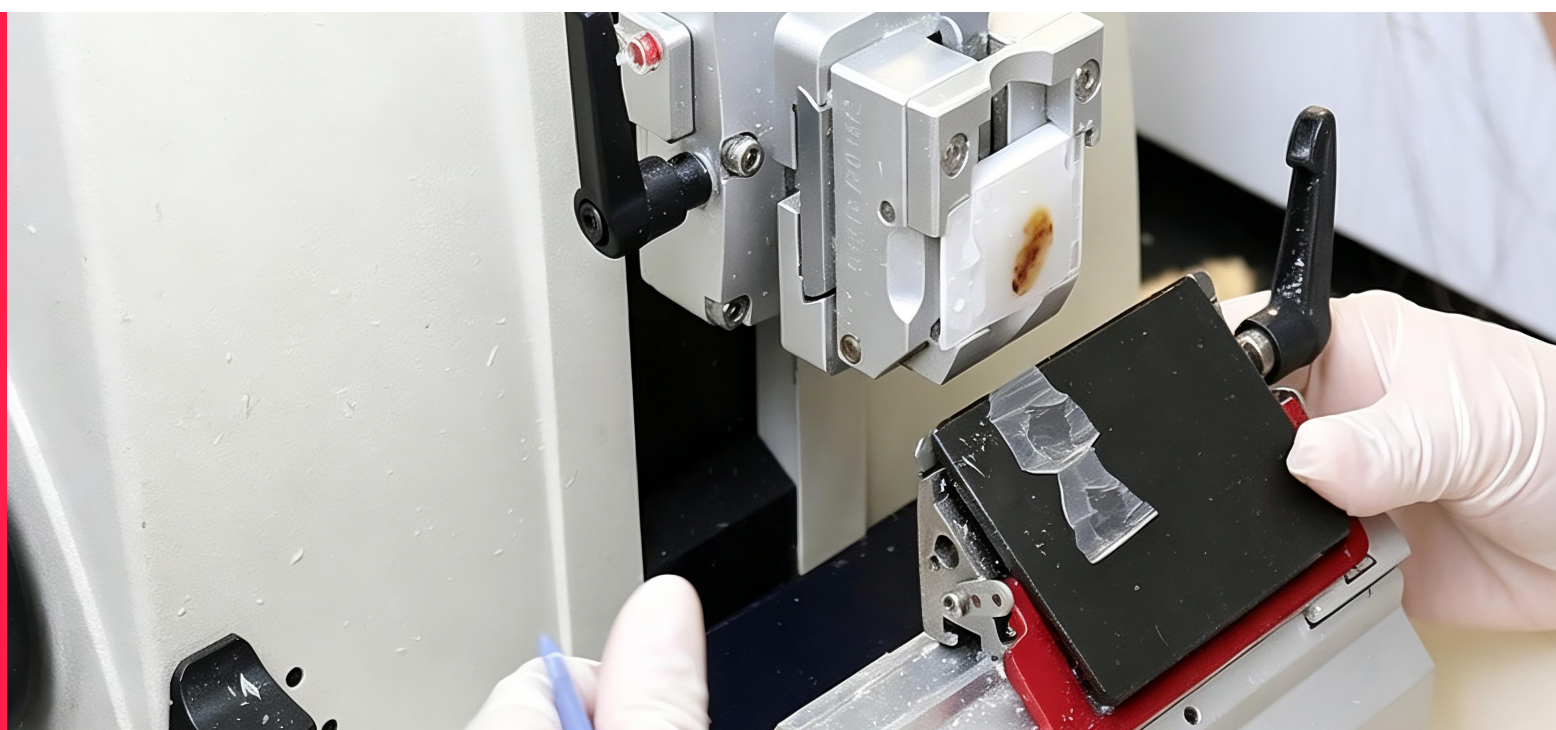
• 细胞染色

1. 4% 多聚甲醛固定 10~20 min。
2. 自来水冲洗 2 次,每次 2 min。

3. 蒸馏水冲洗 2 次, 每次 2 min。
4. 染色、封固步骤同石蜡切片的染色步骤, 但操作时间应相应延长。

7.3 注意事项

- (1)组织固定:组织需充分固定;常规使用4%多聚甲醛或10%中性福尔马林固定后,做石蜡切片或冰冻切片。甲醇固定也适用于细胞涂片(10–15min)。
- (2)试剂配制与新鲜度:Perls反应液需现配现用,避光保存。亚铁氰化钾溶液在光照下会逐渐分解,影响染色效果。工作液应在使用前新鲜配制,不宜长期储存。
- (3)盐酸浓度控制:盐酸浓度过低时,铁离子从铁蛋白中释放不充分,染色偏弱;盐酸浓度过高则会破坏组织结构或产生非特异性染色。标准工作液中盐酸终浓度约为1N,反应30min。对于不同组织类型,可在镜下监控染色深度以调整反应时间。
- (4)反应时间:室温30min或50°C10min为通用条件。时间过短则铁沉积显示不全,时间过长可能增加背景非特异性染色。建议使用阳性对照(如含铁丰富的肝/脾组织)来控制染色质量。
- (5)水洗充分:反应后必须用蒸馏水充分冲洗2min以上,去除残余的反应液和游离铁氰化物,否则残留的试剂会导致背景染色或后续复染干扰。
- (6)玻璃容器与器材:普鲁士蓝反应涉及铁离子,应避免使用含铁的金属器材接触组织切片,以免引入外源性铁导致假阳性。建议使用玻璃染色缸或塑料染色瓶。
- (7)复染选择:核固红(Kernechtrot)是最常用的复染液,其红色核染色与蓝色铁沉淀对比清晰。也可使用中性红或伊红。注意:苏木素复染时,铁的普鲁士蓝和苏木素染核的蓝色在灰度上相近,容易混淆,一般不推荐。
- (8)切片保存:普鲁士蓝染色切片应避光保存,长期暴露于光线和空气中可能出现褪色(因普鲁士蓝在还原条件下可转化为普鲁士白而褪色)。使用氧化松节油稀释的加拿大树胶封片可在一定程度上延长保存时间。建议尽早镜检拍照存档。



常见问题解答 (FAQ)

Q1: 苏木素染色时, 细胞核染色过深或过浅, 如何调整?

A1: 苏木素染色分为渐进染色 (如Mayer's苏木素, 染色强度随时间增加) 和退行染色 (常规HE, 先过度染色再用酸酒精分化) 两种模式。核染色过深时, 可延长酸酒精分化时间; 核染色过浅时, 可缩短分化时间或延长苏木素染色时间。分化标准: 胞浆无多余染液残留, 核呈清晰的蓝色/紫红色。

Q2: 组织切片在Masson染色过程中脱落, 怎么办?

A2: Masson三色染色涉及多种酸性溶液, 长时间浸泡容易导致切片与载玻片分离。建议使用多聚赖氨酸或APES处理过的防脱玻片, 烤片温度适当 (60°C, 1h以上), 并减少各步骤之间的剧烈晃动。

Q3: 阿利新蓝染色后黏液/酸性黏多糖不着色或着色极弱, 如何解决?

A3: 阿利新蓝分子中的阳离子基团在很温和的条件下即可被移除, 导致原位产生不溶性蓝色色素, 这是它能够通过重复染色循环大幅提高检测灵敏度的理论基础。不着色或着色弱的常见原因:

- ① 染液pH不正确——阿利新蓝在不同pH下选择性不同, pH2.5染色羧基化及硫酸化酸性黏多糖, pH 1.0仅染色硫酸化黏多糖;
- ② 染色时间过短——建议室温30分钟至过夜。

Q4: 尼氏体染色模糊或不清晰, 是什么原因?

A4: 尼氏体不清晰的常见原因包括:

- ① 分化不恰当——95%乙醇分化时间不足会导致背景过深, 掩盖尼氏体; 分化时间过长则尼氏体染色变淡;
- ② 组织固定不充分——4%多聚甲醛至少固定10分钟以上;
- ③ 染色时间不当——商品化染液一般推荐5-10分钟, 需根据切片厚度调整。

Q5: 尼氏体染色背景过深, 如何改善?

A5: 背景过深通常由分化不足或染液过滤不充分引起。可通过延长95%乙醇分化时间至镜下背景清晰透明为止, 或染色前对染液进行过滤以去除沉淀颗粒。

Q6: 油红O染色后脂滴不着色或着色极浅, 如何排查?

A6: 常见原因:

- ① 冷冻切片保存不善——OCT包埋的冷冻切片应尽快染色, 长期保存 (尤其是室温存放) 可导致脂质氧化降解或流失;
- ② 染色液失效或未过滤——油红O为过饱和溶液, 使用前必须充分溶解并经过滤 (0.22-0.45 μm

滤膜)，否则染料结晶无法有效结合脂滴；

③分化或水洗过度——70%乙醇分化或水洗时间过长会洗脱脂滴中的染料。

Q7:油红O染色后背景呈弥散性红色,脂滴结构不清楚,如何改善?

A7:背景过深通常由以下原因引起:

①染色后清洗不彻底——残留的染料在组织表面形成不规则红色斑块和条纹,可染后充分冲洗并镜下监控洗涤终点;

②未充分过滤——染料结晶沉积于组织表面,造成假阳性弥散染色;

③分化不足——适当延长70%乙醇分化时间。

Q8:瑞氏-吉姆萨染色液染色结果整体偏蓝,如何调整?

A8:整体偏蓝提示天青B(碱性染料)染色过强,常见原因:

①染色时间太长或染液比例失衡(Giemsa染液比例过高);

②冲洗水的pH偏高(>7.2)会使天青B易于与核酸结合。可通过缩短染色时间、降低Giemsa比例或将冲洗液(蒸馏水或缓冲液)调整为pH 6.8–7.2来控制。

Q9:瑞氏-吉姆萨染色液染色结果整体偏红,如何调整?

A9:整体偏红提示伊红Y(酸性染料)染色过强,常见原因:

①分化不足或冲洗不充分——残留的伊红Y使背景和胞浆呈明显红色;

②冲洗水pH偏低(<6.8)使伊红Y优先结合;

③瑞氏染液占比例过高。可调整染液比例为Wright:Giemsa=3:1,染色时间3–5min,并用pH 6.8磷酸盐缓冲液冲洗。

Q10:瑞氏-吉姆萨染色后细胞核与胞质分界不清、核染色质细节模糊,如何解决?

A10:常见原因:

①固定不当——涂片未充分干燥或用甲醇固定时间不足(应3–5min);

②分化步骤缺失——染色后应充分水洗至涂片由蓝绿色变为粉红色。

Q11:瑞氏-吉姆萨染色后背景中有大量染料沉淀,如何避免?

A11:①染液在使用前经过滤;

②染色后充分水洗,冲洗至流水无色为止;

③染色过程中涂片保持水平,防止染液干燥形成沉淀;

④即用型染液应在有效期内使用,长期存放后甲醇挥发会导致染料浓度改变。

Q12:普鲁士蓝染色结果蓝色很弱或呈阴性,是什么原因?

A12:蓝色偏弱的常见原因:

①盐酸浓度不足——盐酸是释放铁蛋白中 Fe^{3+} 的关键,标准工作液盐酸终浓度约为1N;

②反应时间不足——室温需30分钟或50°C 10min;

③切片中确实不含三价铁(属阴性结果,需用阳性对照验证)。

Q13:普鲁士蓝染色后出现非特异性蓝色背景,如何判断是假阳性?

A13:假阳性的蓝色颗粒无细胞学定位,形态不规则,可能来源于:

①外源性铁污染——固定液中的铁杂质、切片刀痕上的铁屑、含铁器材接触切片均可引入假阳性;

②染液过滤不充分——亚铁氰化钾溶液中若含有未反应的铁配合物沉淀,会沉积在切片表面。建议:每次染色设置空白对照(不加亚铁氰化钾的反应液),以识别外源性铁污染。

Q14:如何区分普鲁士蓝阳性染色与组织本身的黄褐色色素?

A14:含铁血黄素在普通HE染色中呈黄褐色颗粒,与内源性脂褐素颜色相近。在普鲁士蓝染色中,真正的铁沉积呈鲜艳的蓝色颗粒,主要位于巨噬细胞胞质中,这些细胞称为含铁巨噬细胞/含铁血黄素巨噬细胞。脂褐素等非铁色素则仍呈黄褐色。阳性对照(如含铁丰富的肝/脾组织)可帮助判读。

参考文献

[1] KIM J, CHOI W, YOO D, et al. Solution-free and simplified H&E staining using a hydrogel-based stamping technology[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1292785.

[2] LLEWELLYN B. Nuclear staining with alum hematoxylin[J]. Biotechnic Histochem, 2009, 84(4): 159-177. DOI: 10.1080/10520290903052899.

[3] GOLDNER J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes[J]. Am J Pathol, 1938, 14(2): 237-243.

[4] LIU Y, CHEN L, GONG Q, et al. Hypoxia-induced mitophagy regulates proliferation, migration and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells through FUN14 domain-containing 1[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(5): 72.

[5] GREENSPAN P, MAYER E P, FOWLER S D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets[J]. J Cell Biol, 1985, 100(3): 965-973.

[6] DU J, ZHAO L, KANG Q, et al. An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution[J]. Adipocyte, 2023, 12(1).

[7] KOOPMAN R, SCHAART G, HESSELINK M K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids[J]. Histochem Cell Biol, 2001, 116: 63-68.

[8] AKHLAGHI A, AHMADI-HAMEDANI M. Introducing a combined Leishman-Giemsa stain as a new staining technique for avian blood smears[J]. Iran J Vet Res, 2019, 20(2): 147-150.

EnkiLife（恩玑生命）

病理染色液系列产品推荐

EnkiLife 病理染色液系列共 51 款标准化染色试剂，覆盖临床病理常规染色系列、结缔组织与肌纤维染色系列、糖类及黏液染色系列、神经组织染色系列、脂类与矿化染色、细胞与微生物染色系列、病理沉着物染色系列与其他特殊染色系列八大品类，适配石蜡切片、冰冻切片、细胞涂片，满足医院病理科、高校科研实验室、药企药理毒理实验全场景需求。

全系染料配方经过优化，染色均匀、背景低、色彩对比度高，配套完整说明书，同时同步供应近万种抗体、重组蛋白、IHC/ELISA/TSA/WB 试剂盒，可一站式配齐病理实验耗材。

为什么选择 EnkiLife 病理染色液

- **双配方可选**: 水溶型、醇溶型染色液区分适配不同制片工艺。
- **分化时间短**: 优化配方，缩短实验周期。
- **色彩清晰鲜艳**: 染色对比度高，组织结构清晰可辨。
- **适用范围广**: 兼容石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片等多种样本类型。
- **保存时间长**: 所染切片不易褪色，便于长期存档观察。

产品分类	货号	产品名称
常规染色系列	RA20141	HE染色液（水溶）
	RA20142	HE染色液（醇溶）
	RA20092	伊红染色液（水溶）
	RA20093	伊红染色液（醇溶）
结缔组织纤维化染色系列	RA20094	Masson三色染色液
	RA20095	改良番红O-固绿软骨染色液
	RA20096	番红O-固绿植物组织染色液
	RA20129	天狼星红染色液
	RA20134	Van Gieson染色液
	RA20139	维多利亚蓝胶原纤维染色液
	RA20132	弹力纤维染色液

产品分类	货号	产品名称
糖类及黏液染色系列	RA20121	糖原PAS染色液
	RA20099	阿利新蓝染色液（pH 2.5）
	RA20100	阿利新蓝染色液（pH 1.0）
	RA20101	阿利新蓝染色液（pH 0.4）
	RA20102	AB-PAS染色液
神经组织染色系列	RA20097	尼氏染色液（焦油紫法）
	RA20098	尼氏染色液（甲苯胺蓝法）
	RA20125	髓鞘染色液（LFB法）
	RA20126	髓鞘染色液（固绿法）
脂类与矿化染色系列	RA20128	改良油红O染色液
	RA20114	茜素红S染色液（0.1%，pH 4.2）
	RA20115	茜素红S染色液（0.2%，pH 4.2）
	RA20116	茜素红S染色液（1%，pH 4.2）
	RA20117	茜素红S染色液（2%，pH 4.2）
	RA20130	Von Kossa染色液
细胞与微生物染色系列	RA20127	瑞氏-吉姆萨染色液
	RA20104	结晶紫染色液
	RA20105	台盼蓝染色液（0.08%）
	RA20106	台盼蓝染色液（0.2%）
	RA20107	台盼蓝染色液（0.4%）
	RA20108	丽春红S染色液（1×）
	RA20109	丽春红S染色液（10×）
病理沉着物染色系列	RA20134	普鲁士蓝染色液(核固红法)
	RA20139	磷钨酸苏木素染色液（(PTAH自然氧化法)）
	RA20132	磷钨酸苏木素染色液(PTAH化学氧化法)

Thank you
for choosing
us!