



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材
全国高等学校医学研究生规划教材

组织化学与 免疫组织化学

主 编 李 和 周 莉



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材
全国高等学校医学研究生规划教材

组织化学与 免疫组织化学

主 编 李 和 周 莉

编者 (以姓名拼音为序)

金连弘 (哈尔滨医科大学)

吴 强 (安徽医科大学)

李 和 (华中科技大学同济医学院)

张钦宪 (郑州大学基础医学院)

刘慧雯 (哈尔滨医科大学)

周 莉 (吉林大学白求恩医学院)

苏红星 (首都医科大学)

周德山 (第三军医大学)

唐 勇 (重庆医科大学)

周国民 (复旦大学医学院)



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

图书在版编目 (CIP) 数据

组织化学与免疫组织化学/李和等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2008. 9

ISBN 978-7-117-10361-9

I. 组… II. 李… III. ①组织化学-研究生-教材
②免疫学-组织化学-研究生-教材 IV. Q5 R392.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 095393 号

组织化学与免疫组织化学

主 编: 李 和 周 莉

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15.75

字 数: 368 千字

版 次: 2008 年 9 月第 1 版 2008 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-10361-9/R·10362

定 价: 45.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

出版说明

随着医学研究生培养规模的不断壮大,国内研究生培养硬件及软件水平的相对落后与培养高素质研究生之间的矛盾日益突出,如何解决这一矛盾成为我们国家医学研究生培养迫切需要解决的问题。

为了适应新时期国内研究生教育和教学的需要,全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室自2004年开始,针对各高校研究生院(处)、研究生导师、在校和毕业后研究生有计划、分期分批地进行了大量、大规模的调研和专家论证工作。在深入探讨“研究生规划教材在研究生培养过程中应该发挥的作用;研究生教材与五年制教材、八年制教材、专科医师培训教材、专著之间的区别与联系”的基础上,根据我国医学研究生教育的实际需要,率先组织策划了这套全国高等学校医学研究生规划教材。

在内容的组织上,该套教材突破传统应试教育教材系统全面的特点,紧扣研究生培养目标,着眼于学生进一步获取知识、挖掘知识和实践创新能力的培养。全套教材包括公共基础课和临床专业课两个系列:公共基础课系列主要围绕研究生科研过程中,从最初的科研设计到最终论文发表的各个环节可能遇到的实际问题展开。临床专业课系列以临床诊疗的回顾·现状·展望为线索,通过对具有转折点意义的诊疗理论、技术或方法探索过程的回顾,目前诊疗中的困惑、局限与不足以及诊疗实践中应注意问题等现状的分析,以及所在学科领域研究热点及发展趋势的展望来探讨新的解决问题的切入点,启发和培养临床创新思维。

该套教材的临床专业课系列主要适用于临床型的硕士生、博士生及相应的临床工作者;公共基础课系列适用于医药卫生各专业的硕士生、博士生及相应的医药卫生工作者。

教材目录

一、公共基础课系列

医学科研课题的设计、申报与实施	主编 李卓娅 龚非力	中英文医学科研论文的撰写与投稿	主编 张学军
医学信息搜集的途径与方法	主编 聂绍平	医学免疫学实验技术	主编 柳忠辉
医学实验技术的原理与选择	主编 李幼平	组织化学与免疫组织化学	主编 李 和 周 莉
医学实验动物学	主编 秦 川	断层解剖学	主编 刘树伟
人类疾病动物模型	主编 施新猷 苏 卫	医学免疫学	主编 曹雪涛
统计分析在医学课题中的应用	主编 蒋知俭	实验室生物安全	主编 叶冬青

二、临床专业课系列

呼吸内科学	主编 钟南山 王 辰	泌尿外科学	主编 杨 勇 李 虹
心血管内科学	主编 胡大一 马长生	妇产科学	主编 曹泽毅
消化内科学	主编 胡品津 刘新光	儿科学	主编 桂永浩 申昆玲
肾内科学	主编 谌贻璞	神经内科学	主编 刘 鸣 谢 鹏
血液内科学	主编 周 晋 黄 河	精神病学	主编 江开达
内分泌内科学	主编 陆召麟 宁 光	眼科学	主编 崔 浩 王宁利
风湿内科学	主编 陈顺乐 邹和健	耳鼻咽喉头颈外科学	主编 孔维佳
普通外科学	主编 赵玉佩 姜洪池	传染病学	主编 李兰娟
骨科学	主编 田 伟 陈安民	急诊医学	主编 黄子通
胸心外科学	主编 胡盛寿	老年医学	主编 张 建 范 利
神经外科学	主编 王忠诚		
血管淋巴外科学	主编 汪忠镐		

前言

本教材是在卫生部全国高等院校医学研究生教材建设研究会组织领导下,为临床医学、基础医学、预防医学、药学和护理等专业的硕士生、博士生及相应的医药工作者而编写的。它以实用、简明、理论与实践紧密结合为特点,以培养研究生基本实验技能、提高科研能力和启发创新为目的,力争在研究生培养中起导航作用。

组织化学与免疫组织化学技术是医学与生命科学研究中重要研究手段之一,其研究方法种类繁多。为使研究生能够掌握基本方法,并在实际工作中触类旁通,灵活运用所学技能,我们在各章内容中均选择常用研究方法,并结合研究工作中常遇到的问题尽可能详细描述和深入讨论,因而不同于同类参考书。由于这门技术实践性颇强,仅学习理论犹如纸上谈兵,故我们专为研究生实验课设计了十个基本技能实验,可供各院校根据不同情况选择使用。为便于学生自学,采用图解和图片的形式帮助学生理解和体会其重要内容。我们还在大多数章的后面以插入科学史话和应用举例的方式讲述科学家和编者们的亲身科研经历,以引导学生学会如何设计和实施选题,希望读者不但能从中得到启迪,而且能感悟到科学研究所需要的情、好奇、勤奋和科学家所具有的坚忍不拔的信念和百折不挠的品格。

本教材在编写过程中,得到同行专家徐辉、苏学今和王芯蕊的帮助,也得到了许多博士、硕士研究生的支持和帮助,如第三军医大学肖岚和于彬;重庆医科大学李琛、卢伟、徐瑜、杨姝和陈林;安徽医科大学胡向阳等,在此向他们表示衷心地感谢。

由于本教材编写时间较短,难免会出现疏漏和不妥,真诚欢迎同行专家和广大师生批评指正,并由衷地期待这本教材能为广大研究生的创新提供探索、挖掘新知识的工具与技能,能为提高研究生的科研能力作出贡献。

李和 周莉

2008年4月

目录

第一章 绪论	1
第一节 组织化学发展的基础	1
一、细胞生物学发展与组织化学	1
二、生物化学发展与组织化学	2
三、免疫学发展与组织化学	2
四、分子生物学发展与组织化学	3
第二节 组织化学发展简史	3
一、组织化学的兴起	3
二、现代组织化学的发展	4
三、我国组织化学发展概况	5
第三节 组织化学技术基本要求	6
一、组织化学的分支和分类	6
二、组织化学技术的基本要求	7
第二章 组织化学与免疫组织化学染色样品制备	8
第一节 取材	8
一、组织标本取材	8
二、细胞标本取材	9
(一) 培养细胞	9
(二) 涂片法	9
第二节 固定	9
一、组织和细胞的固定方法	9
(一) 浸润法	9
(二) 灌流固定法	9
二、常用固定剂和固定方法	10
(一) 组织常用固定剂和固定方法	10
(二) 培养细胞常用固定剂和固定方法	11
第三节 包埋和切片	11
一、石蜡包埋	11
(一) 包埋前脱水	12
(二) 透明	12
(三) 浸蜡	12

(四) 包埋	12
(五) 修块	12
二、切片	12
(一) 石蜡切片	12
(二) 冰冻切片	13
(三) 振动切片	14
三、防脱片处理步骤	14
(一) 载玻片和盖玻片的处理	14
(二) 黏附剂的使用	14
(三) 免疫组织化学染色中常见脱片原因	15
科学史话	
——幽门螺杆菌与胃溃疡	15
第三章 组织化学	18
第一节 核酸组织化学	18
一、Feulgen 反应	18
(一) 原理	18
(二) Schiff 液的配制	19
(三) Feulgen 反应步骤	19
二、吖啶橙染色	20
(一) 吖啶橙区分活细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法	20
(二) 吖啶橙原位区分组织细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法	21
三、Hoechst 33258 染色	22
四、DAPI 染色	23
五、溴化乙啶和碘化丙啶染色法	24
(一) 溴化乙啶染色	24
(二) 碘化丙啶染色	25
第二节 脂类组织化学	25
一、乙醇苏丹黑 B 染色法	26
(一) 染色程序	26
(二) 注意事项	26
二、油红 O 染色法	26
(一) 油红 O 染液的配制	27
(二) 染色程序	27
第三节 酶组织化学	27
一、酶组织化学的基本原理及一般原则	27
(一) 酶组织化学的基本原理	27
(二) 酶显示方法	28

(三) 酶组织化学对组织处理的基本要求	29
二、常用酶组织化学染色方法	30
(一) 磷酸酶	30
(二) 三磷酸腺苷酶	34
(三) 羧酸酯水解酶	35
(四) 氧化酶和脱氢酶	37
(五) 一氧化氮合酶	40
第四节 凝集素组织化学	41
一、凝集素的标记物	42
二、染色程序	42
(一) FITC 标记凝集素的组织化学染色程序	42
(二) 辣根过氧化物酶标记凝集素的组织化学染色程序	42
(三) 生物素标记凝集素的组织化学染色程序	43
第五节 荧光组织化学	43
一、组织细胞荧光分类	44
(一) 自发荧光	44
(二) 诱发荧光	44
(三) 酶促荧光	44
(四) 荧光染色	44
(五) 免疫荧光	44
二、生物胺荧光组织化学	44
(一) Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法	45
(二) 乙醛酸诱发生物单胺荧光法	45
(三) 邻苯二醛显示组胺荧光法	46
科学史话	
——周期蛋白的发现	47
第四章 免疫组织化学技术	50
第一节 免疫组织化学基本原理	50
一、直接法	50
二、间接法	51
三、亲和免疫组织化学	51
(一) 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法	52
(二) 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法	53
第二节 免疫组织化学染色步骤	54
一、SABC 法免疫组织化学染色步骤	54
(一) 石蜡切片免疫组织化学染色	54
(二) 冰冻切片免疫组织化学染色	57

(三) 培养细胞免疫细胞化学染色	57
二、SABC法与其他免疫组织化学染色方法比较	58
(一) SP法或SAP法	58
(二) EnVision TM Systems	58
(三) MaxVision法	58
三、免疫组织化学染色结果评价	59
(一) 以抗原表达模式定位	59
(二) 阳性染色结果定量	59
四、讨论	59
(一) 实验计划	59
(二) 抗体的稀释度	60
(三) 滴加抗体注意事项	60
(四) 抗体的保存	60
(五) 对照实验	61
(六) 免疫组织化学技术应用的基本原则	61
(七) 疑难问题剖析	62
第三节 免疫组织化学双重染色	64
第四节 免疫荧光组织化学技术	65
一、荧光的基本知识	65
(一) 荧光	65
(二) 荧光物质的特性和种类	65
二、免疫荧光组织化学基本原理及方法	69
(一) 基本原理	69
(二) 基本方法	69
三、免疫荧光组织化学染色步骤	71
(一) 直接法	71
(二) 间接法	71
(三) SABC-Cy3法	72
(四) 双重染色法	72
(五) 膜抗原荧光抗体染色法	73
(六) 补体法	73
(七) 荧光抗体再染色法	74
四、非特异性荧光染色的消除	74
五、生物荧光显微镜	75
(一) 荧光显微镜的分类及主要组成	75
(二) 荧光显微镜的基本操作及注意事项	77
六、激光扫描共聚焦显微镜	78
(一) 激光扫描共聚焦显微镜基本原理	78

(二) 激光扫描共聚焦显微镜操作步骤及注意事项	79
(三) 组织芯片中免疫荧光染色的定量分析	81
应用举例	
——免疫荧光组织化学双重染色在神经元发生研究中的应用	82
第五章 原位杂交组织化学	84
第一节 原位杂交组织化学基本原理	84
一、核酸的化学组成与基本结构	84
二、DNA 变性与复性	85
(一) 变性	85
(二) 复性	86
第二节 核酸分子杂交	86
第三节 核酸分子探针	87
一、探针的种类	87
(一) 基因组 DNA 探针	88
(二) cDNA 探针	88
(三) cRNA 探针	88
(四) 寡核苷酸探针	88
二、探针的标记	90
(一) 探针标记物	90
(二) 探针标记方法	90
第四节 原位杂交组织化学基本程序	93
一、标本制备	94
(一) 取材	94
(二) 固定	94
(三) 切片	95
二、杂交前处理	96
(一) 增强组织通透性和核酸探针穿透性	96
(二) 减低背景染色	96
三、杂交反应	97
(一) 双链 DNA 探针和靶 DNA 变性	97
(二) 杂交液	97
(三) 探针长度	97
(四) 探针浓度	97
(五) 杂交温度和时间	98
(六) 杂交严格度	98
四、杂交后处理	98
五、杂合体检测	99

(一) 放射性核素标记探针的检测	99
(二) 非放射性标记探针的检测	99
六、对照实验	100
(一) 组织对照	100
(二) 探针对照	100
(三) 杂交反应对照	101
(四) 检测系统对照	101
第五节 原位杂交组织化学技术进展	101
一、原位 PCR 技术	101
二、荧光原位杂交技术	103
三、胚胎原位杂交技术	104
四、双重和多重原位杂交技术	104
(一) 放射性核素和非放射性标记探针的双重标记原位杂交	105
(二) 非放射性标记探针的双重标记原位杂交	105
(三) 两种放射性核素标记探针的双重标记原位杂交	106
五、原位杂交结合免疫组织化学技术	106
六、电镜原位杂交技术	107
(一) 电镜原位杂交的特点	108
(二) 常用电镜原位杂交技术的基本程序	109
七、肽核酸原位杂交	109
科学史话	
——割裂基因的发现	110
第六章 电镜组织化学与免疫电镜技术	113
第一节 电镜技术	113
一、透射电子显微镜基本原理	113
二、超薄切片技术	113
(一) 固定	113
(二) 脱水	116
(三) 浸透与包埋	116
(四) 超薄切片制作	118
三、观察与记录	120
第二节 电镜组织化学技术	122
一、基本原理	122
(一) 酶组织化学反应过程	122
(二) 酶反应底物的特异性	122
(三) 捕捉反应	122
二、样品制备	122

三、结果观察	123
第三节 免疫电镜技术	124
一、免疫电镜技术的特点	124
(一) 组织取材与固定	124
(二) 染色方法	124
(三) 包埋	126
(四) 对照实验	127
二、几种常用电镜免疫染色技术	127
(一) 免疫铁蛋白电镜技术	127
(二) 免疫酶电镜技术	128
(三) 免疫胶体金电镜技术	130
(四) 免疫纳米金电镜技术	132
第七章 组织化学与免疫组织化学定量分析技术	135
第一节 显微图像分析	135
一、显微图像分析系统组成	136
二、基本术语和常用测量参数	136
(一) 像素与灰度	136
(二) 色彩	136
(三) 光密度	137
(四) 长度	137
(五) 面积	137
三、吸光和发光组织样品的常用测量参数	137
(一) 吸光组织细胞样品的测量	137
(二) 发光组织细胞样品的测量	137
四、显微图像分析处理程序	138
(一) 制作切片样品	138
(二) 获取图像	138
(三) 图像分割	138
(四) 测量	139
(五) 统计分析	139
(六) 结果输出	139
五、显微图像分析应用中的注意事项	139
(一) 设计在先,测试在后	139
(二) 测试样本的代表性	139
(三) 实验操作过程的一致性	140
(四) 图像分析系统输入条件的一致性	140
(五) 图像分析系统现有参数的局限性	140

(六) 二维定量信息的局限性	140
第二节 流式细胞术	140
一、流式细胞仪的工作原理	140
二、流式细胞术在组织化学与免疫组织化学中的应用	141
(一) 流式细胞术的常用样品制备方法	142
(二) 免疫荧光标记样品	143
(三) 流式细胞术数据处理与分析	144
(四) 运用流式细胞仪计数细胞应注意的问题	145
第三节 激光扫描共聚焦显微镜技术	146
一、激光扫描共聚焦显微镜在组织化学和免疫组织化学中的应用	146
(一) 光学切片	147
(二) 三维图像重建	147
(三) 荧光标记物的定位和定量分析	148
二、激光扫描共聚焦显微镜定量分析的优势	150
三、注意事项	150
(一) 制备高特异性和高效价的荧光抗体	150
(二) 标本制作要求	151
(三) 定量研究的要求	151
第四节 体视学	151
一、体视学的基本概念及基本原则	152
(一) 二维图像与三维结构之间的关系	152
(二) 几何探针	152
(三) 卡瓦列里原理	154
(四) 随机抽样	157
二、常用体视学方法在免疫组织化学中的应用	161
(一) 特征物断面计数与轮廓密度	161
(二) 长度密度和总长度	163
(三) 面积分数、平均面积、体积分数和总体积	165
(四) 交叉点密度、边线密度、表面积密度和总表面积	167
(五) 数目测量	168
应用举例	
——体视学在雌激素替代治疗改善老年大脑功能研究的应用	176
第八章 显微摄影技术	178
第一节 摄影基础	178
一、照相机镜头	179
(一) 照相机镜头口径	179
(二) 照相机镜头种类与焦距	179

二、控制曝光	180
(一) 光圈	180
(二) 快门	181
(三) 胶片的感光度	182
三、景深	182
(一) 光圈口径对景深的影响	182
(二) 镜头焦距对景深的影响	182
(三) 物距对景深的影响	182
四、感光片	182
(一) 彩色负片	182
(二) 彩色反转片	182
(三) 感光度	183
(四) 反差	183
五、常用滤色镜的作用	183
(一) 原色光和补色光	183
(二) 滤色镜的特性	183
(三) 滤色镜在摄影中的应用	184
六、色温	184
第二节 显微摄影基础	185
一、显微镜的几何光学成像原理	185
二、分辨率与放大率	185
三、显微镜的主要部件	187
(一) 视场光阑和孔径光阑	187
(二) 聚光镜	188
(三) 物镜	188
(四) 目镜	189
四、柯勒照明	190
五、几种常用特殊显微镜的结构与原理	190
(一) 相差显微镜	190
(二) 微分干涉显微镜	193
第三节 显微摄影技术应用	195
一、普通显微摄影技术应用	195
(一) 显微镜的使用环境	195
(二) 摄影前准备	195
(三) 显微照相的操作步骤	196
(四) 胶卷的选用	197
(五) 显微照片放大倍数的标注方法	197
二、特殊显微摄影技术应用	197

三、数码显微摄影技术	198
(一) 数码摄影的基本原理	198
(二) 数码显微摄影技术应用	202
参考文献	204
第九章 组织化学与免疫组织化学实验指导	206
实验一 组织标本石蜡切片和冰冻切片的制备	206
(一) 石蜡切片和 HE 染色标本制备	206
(二) 冰冻切片标本制备	209
实验二 DNA 的 Hoechst 33258 和 DAPI 荧光组织化学染色	210
(一) DNA 的 Hoechst 33258 荧光组织化学染色	210
(二) DNA 的 DAPI 荧光组织化学染色	211
实验三 脂类的异丙醇油红 O 法染色	212
实验四 钙-钴法显示碱性磷酸酶	213
实验五 偶氮偶联法显示酸性磷酸酶	214
实验六 胆碱酯酶染色——Karnovsky-Roots 法	215
实验七 还原型辅酶 II-黄递酶(NADPH-d)染色	216
实验八 免疫组织化学实验——SABC 法	217
实验九 免疫荧光细胞化学染色(间接法)	219
实验十 半抗原标记 cRNA 探针原位杂交组织化学染色	220
附录一 免疫组织化学染色常用试剂配制	223
(一) 固定液	223
(二) 缓冲液	225
(三) 常用消化液	227
(四) 显色液	227
(五) 黏附剂	228
(六) 封固剂	229
(七) 其他	229
附录二 原位杂交试剂配制	231

第一章 绪 论

组织化学(histochemistry)也称细胞化学(cytochemistry),是运用物理学、化学、免疫学和分子生物学等原理与技术,对组织与细胞的化学成分或酶活性进行定性、定位和定量研究的科学。

传统的组织化学只是利用物理或化学反应显示组织或细胞内的化学成分或酶活性而对其进行定性、定位和定量研究。随着电镜技术、免疫学和分子生物学技术的发展,在传统组织化学的基础上逐渐形成免疫组织化学、免疫电镜组织化学和原位杂交等技术。因此,广义的组织化学则包括传统的组织化学、免疫组织化学、电镜组织化学、免疫电镜组织化学和原位杂交组织化学。

第一节 组织化学发展的基础

组织化学基于并源于组织学、细胞学和生物化学,又有别于这些学科。组织化学与组织学和细胞学的不同在于,前者的着眼点是研究组织细胞内的化学组成及其含量和酶的存在及其活性,而后者的着眼点是研究组织细胞的形态结构及其与功能的关系。组织化学与生物化学的不同在于,虽然两者均着眼于组织细胞内的化学组成及其含量和酶的存在及其活性,但是,生物化学技术中通常是将组织和细胞破坏,制成匀浆,然后进行化学测定,而不考虑定位;在组织化学技术中,是尽可能在组织或细胞内原位显示各种化学成分,故定位性能好。生物化学技术中的化学反应是在试管内进行,而组织化学技术中的化学反应通常是在组织切片或细胞涂片中进行。组织化学要求一定在显微镜下能观察到所检测的化学物质,但在大多数情况下,所见到的并不是某种化学物质本身,而是该物质在其存在部位经过化学反应的产物,这种产物在镜下可直接或间接被观察到,它所在的位置和数量能够代表该物质的位置和数量。组织化学自出现以来,已取得长足的发展,这些发展以细胞生物学、生物化学、免疫学和分子生物学的快速发展为基础。

一、细胞生物学发展与组织化学

细胞生物学是从细胞、亚细胞和分子三个水平研究生命活动规律的科学,组织化学以细胞生物学为基础发展而来。显微镜的发明与细胞的发现将人类对机体的认识从宏观世界引向微观世界的广阔领域,由此人们从肉眼所见的大体结构开始探索光学显微镜下组织细胞的微细结构,正因为有了对机体微细结构的充分认识,才有可能产生对组织细胞的化学成分进行定性、定位和定量研究的渴求。然而,光学显微镜的分辨率有限,仅能观察到细胞膜、细胞质和细胞核,对于亚细胞结构,即超微结构的观察无能为力。1932年,德国科学家 Knoll 和 Ruska 在西门子(Siemens)公司设计研制了世界上第一台透射电子显微镜,又