



西安交通大学研究生教育系列教材

组织化学与 免疫组织化学

邱曙东 宋天保 主编



科学出版社
www.sciencep.com

西安交通大学研究生教育系列教材

组织化学与免疫组织化学

邱曙东 宋天保 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书共十六章,既简要介绍了经典的光镜组化和电镜组化常用技术,又重点介绍了近年发展较快的免疫组化技术、原位杂交和原位 PCR 技术,对组织化学和免疫组织化学常用的定量测定方法也用一定篇幅做了介绍。附录中列入了常用缓冲液的配制方法和免疫组化常用抗体标记谱,以方便研究生实际应用时查找和参考。本教程既涵盖了生命科学类研究生必须掌握的组织化学与免疫组织化学的主要实验手段,又对各种方法的原理、理论意义及操作中可能遇到的常见问题给予了较为细致的说明,对于研究生的课题研究具有指导意义。

本书也可作为医学和生物学等生命科学类研究者和实验技术人员进行教学和科学研究的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

组织化学与免疫组织化学/邱曙东,宋天保主编. —北京:科学出版社, 2008

(西安交通大学研究生教育系列教材)

ISBN 978-7-03-021831-5

I. 组… II. ①邱…②宋… 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 062027 号

责任编辑:罗 静 李秀伟 席 慧/责任校对:鲁 素

责任印制:钱玉芬/封面设计:北极光视界

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 6 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2008 年 6 月第一次印刷 印张: 18 3/4 插页: 1

印数: 1—3 000 字数: 352 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

《组织化学与免疫组织化学》编委会名单

主编 邱曙东 宋天保

编委 (按姓氏笔画为序)

田 宏 宋天保 邱曙东 张秋养

武 捷 周劲松 霍涌玮

前 言

组织化学与免疫组织化学是介于组织形态学、细胞生物学、生物化学、免疫学以及分子生物学之间的一门边缘学科。随着生命科学的迅猛发展及各学科间的相互借鉴、相互渗透和相互融合,组织化学与免疫组织化学的内涵正在不断延伸,应用面正在不断拓展。组织化学与免疫组织化学越来越受到基础医学、临床医学、生物学等生命科学研究者的重视,并已成为该类学科研究生学习的主要课程之一;组织化学与免疫组织化学的方法也在他们的学位课题研究中得到广泛应用,对提高他们的学位论文质量起到了十分重要的作用。为了更好地帮助研究生掌握这门课程,也为了适应相关学科年轻教师和科研工作者教学和科研的需要,我们在不断修订使用的研究生讲稿以及1994年宋天保和邱曙东教授编著出版的《实用免疫组织化学技术》一书的基础上,结合近年来该领域的成果、资料以及研究生的反馈意见进行了重新修订,取名《组织化学与免疫组织化学》,使之能更加适合广大研究生的实际需要,希望能对他们的学习和课题研究有所裨益,同时也供相关研究工作者参考。

本书部分图片的切片制作得到我系技术室葛玲、王丽蓉和李明老师的帮助;在修订期间,有幸得到西安交通大学“985工程”二期“创新性人才培养条件建设”项目中有关“985工程”二期教材建设项目的资助,因而能得以正式出版,在此一并表示衷心的感谢。

由于编写时间仓促,作者的知识面有限,尽管我们尽了很大努力,但书中难免存在不妥或错误之处,希望读者批评指正。

邱曙东 宋天保
西安交通大学医学院
人体解剖与组织胚胎学系
2008年1月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 组织化学的研究内容和原理	1
一、组织化学的兴起与发展	1
二、组织化学的研究内容	2
三、组织化学技术的原理	3
第二节 组织化学方法的基本要求和注意事项	3
一、基本要求	4
二、注意事项	4
第二章 组织制备	5
第一节 取材	5
一、注意事项	5
二、样品大小	5
第二节 固定	5
一、固定的目的.....	6
二、固定的对象.....	7
三、固定剂的性质.....	7
四、固定的方法.....	7
五、固定的注意事项	8
六、常用固定剂.....	9
第三节 洗涤、脱水和透明	18
一、洗涤	18
二、脱水	19
三、透明	19
第四节 包埋	20
一、石蜡包埋法	20
二、电镜包埋剂	21
第五节 切片	23
一、石蜡切片法	23
二、冰冻切片法	24

三、其他切片法	26
第六节 切片贴附和封固	26
一、贴附和贴附剂	26
二、封固和封固剂	27
第七节 缓冲液	28
一、缓冲液的组成及应用	28
二、摩尔(克分子)溶液	29
第三章 糖类及其衍生物的组织化学	31
第一节 分类	31
一、糖类化学	31
二、糖类的组织化学分类	32
第二节 糖类的组织化学方法	35
一、糖原的显示法	35
二、糖共轭物(黏蛋白类)的显示法	39
三、纤维素及类纤维素的显示法	43
四、淀粉样物质的显示法	45
第四章 核酸和核蛋白组织化学	47
第一节 显示 DNA 的方法	47
一、Feulgen 反应	47
二、改良 Feulgen 反应	49
第二节 对比显示 DNA 和 RNA 的方法	49
一、甲基绿-派洛宁法	49
二、吖啶橙反应	50
第三节 核酸的消化与提取	51
一、DNA 的消化	51
二、RNA 的消化	52
三、过氯酸提出法	53
四、三氯乙酸提出法	53
第四节 显示核蛋白的方法	53
一、氨银法染组氨酸	53
二、肝素-阿尔新蓝反应	54
第五节 核仁组成区嗜银蛋白染色	55
一、Ag-NOR 经典染色法	55
二、李氏 Ag-NOR 改良法	56

第五章 脂类组织化学	57
第一节 脂类组织化学概述	57
一、分类	57
二、固定	57
三、常用组化显示法	57
第二节 物理方法显示脂类	58
一、苏丹黑法显示中性脂肪	58
二、溴-苏丹黑法显示脂类	59
三、油红 O 显示中性脂肪	60
四、偏振光显微镜检测法	61
第三节 化学方法显示脂类	61
一、四氧化钼显示不饱和脂类	61
二、硫酸尼罗蓝显示中性及酸性脂类	62
三、过氯酸-萘醌 (PAN) 法显示胆固醇及胆固醇酯	63
四、酸性苏木红显示磷脂法	64
第六章 蛋白质组织化学	67
第一节 蛋白质的组化显示原理	67
第二节 蛋白质的组织化学显示方法	68
一、茚三酮-Schiff 法显示氨基酸	68
二、米伦反应显示酪氨酸	69
三、坂口反应显示精氨酸	69
四、DDD 反应显示巯氢基	70
五、汞-橘黄法显示巯基	71
六、过甲酸-阿尔新蓝显示二硫键	72
第七章 酶类组织化学	74
第一节 酶及其组织化学的基本理论	74
一、生物体内酶的分类	74
二、酶组织化学的意义	75
三、酶的组化反应	75
四、影响酶组化显示效果的因素	78
第二节 几种常见酶的组织化学	79
一、碱性磷酸酶	79
二、酸性磷酸酶	81
三、葡萄糖-6-磷酸酶	83
四、硫胺素焦磷酸酶	84

五、非特异性酯酶	85
六、琥珀酸脱氢酶	86
七、乳酸脱氢酶	88
八、 3β -羟甾体脱氢酶	89
九、三磷酸腺苷酶	90
十、明胶薄膜法显示顶体酶	92
第八章 免疫组织化学的基本理论	94
第一节 免疫学基础	94
一、抗原	94
二、抗体	95
第二节 常用标记物及其检测	98
一、荧光染料	98
二、酶	99
三、生物素	103
四、胶体金	104
第三节 基本条件	110
一、组织抗原的保存与暴露	110
二、特异性抗体	115
三、免疫组织化学常用试剂	118
第九章 常用的免疫组织化学方法	123
第一节 基本原理	123
一、直接法	123
二、间接法	124
三、未标记抗体酶法	124
四、标记抗原法	126
第二节 免疫荧光法	126
一、原理	126
二、染色方法	127
三、对照试验	128
四、结果的观察与记录	129
五、非特异性荧光的消除	129
第三节 免疫酶法	131
一、原理	131
二、酶标抗体法	131
三、PAP法	132

四、EnVision 法	135
第四节 抗生物素蛋白-生物素法	135
一、原理	136
二、ABC 法	136
三、SP 法	139
第五节 蛋白 A 法	140
一、蛋白 A 的性质及应用	140
二、染色方法	142
第六节 免疫金法与免疫金银法	142
一、免疫金法	143
二、免疫金银法	144
第十章 免疫组织化学的特异性与敏感性	148
第一节 特异性与特异性染色	148
一、特异性	148
二、特异性染色与非特异性染色	148
第二节 对照试验	149
一、阳性对照	149
二、阴性对照	150
第三节 提高免疫组织化学敏感性的方法	152
一、增强特异性染色	152
二、背景染色的来源及消除	155
第十一章 免疫组织化学双重染色技术	158
第一节 连续切片双重染色法	158
第二节 免疫荧光双重染色法	158
一、直接法	159
二、间接法	159
第三节 免疫酶双重染色法	160
一、基本考虑	160
二、抗体洗脱	161
三、第一抗体来自不同种属动物的双重染色	164
四、第一抗体来自同种属动物的双重染色	165
五、免疫荧光和免疫酶双重染色法的比较	168
第四节 免疫酶-免疫荧光双重染色法	169
第五节 免疫酶-免疫金(银)双重染色法	169

第十二章 凝集素组织化学	171
第一节 凝集素的特性与应用	171
一、组织中糖的结构	171
二、凝集素的特性	172
三、凝集素的应用	175
第二节 凝集素组织化学方法	175
一、基本原理与条件	176
二、直接法	177
三、抗体法	178
四、生物素法	180
五、糖-凝集素-糖夹层法	181
六、电镜方法	182
七、对照试验	184
第三节 凝集素的标记与抗体制备	185
一、凝集素和糖蛋白的标记	185
二、凝集素抗体的制备	186
第十三章 原位杂交组织化学	188
第一节 原位杂交组织化学的基本原理	188
第二节 探针制备	189
一、探针的种类及选择	190
二、探针标记的原理和方法	192
第三节 原位杂交组织化学的程序	193
一、基本流程	193
二、使用 DNA 探针检测石蜡切片中 mRNA	193
三、使用地高辛标记的 cRNA 探针检测石蜡切片中 mRNA	204
第四节 影响原位杂交的因素	207
一、探针的浓度	207
二、杂交温度	207
三、杂交反应的时间	208
四、杂交液	208
五、严格度	209
第五节 对照试验	209
一、组织对照	209
二、探针对照	210
三、杂交反应对照	210

四、检测系统对照	211
第十四章 原位 PCR 技术	212
第一节 原位 PCR 技术的基本原理	212
第二节 原位 PCR 技术的基本类型	213
一、直接法原位 PCR 技术	213
二、间接法原位 PCR 技术	213
三、原位反转录 PCR	213
第三节 原位 PCR 技术的程序	214
一、标本的制备	214
二、原位聚合酶链反应	215
三、原位检测	215
四、直接法原位 PCR 技术的操作步骤	215
五、间接法原位 PCR 技术的操作步骤	216
六、对照试验	216
第四节 原位 PCR 技术的应用	217
一、用于外源性基因的检测	217
二、用于内源性基因的检测	217
第十五章 电镜细胞化学技术	218
第一节 电镜酶细胞化学技术	218
一、电镜酶细胞化学程序	218
二、电镜酶细胞化学举例	223
三、细胞器的电镜酶细胞化学	227
第二节 电镜免疫细胞化学技术	232
一、免疫电镜的技术要求	232
二、免疫酶电镜技术	237
三、免疫金电镜技术	240
四、免疫电镜双重染色技术	242
五、扫描免疫电镜技术	246
六、冷冻蚀刻免疫电镜技术	249
第十六章 组织化学和免疫组织化学的定量测定	252
第一节 显微分光光度术	252
一、显微分光光度计的工作原理	252
二、显微分光光度术	253
三、显微分光光度术的应用	253
第二节 图像分析术	254

一、图像分析仪的基本原理	255
二、图像分析仪的工作程序	255
三、图像分析系统在生物医学研究中的应用	257
第三节 流式细胞术	257
一、流式细胞仪的主要构成和原理	257
二、流式细胞术的样品制备	258
三、流式细胞术的应用	262
第四节 激光扫描共焦显微镜术	263
一、激光扫描共焦显微镜术的基本原理和特点	264
二、激光扫描共焦显微镜的功能	265
三、几种荧光染料的染色方法	267
主要参考文献	270
附录	274
附录 1 常用缓冲液的配制	274
附录 2 免疫组织化学常用抗体标记谱	282
彩图	

第一章 绪 论

随着生命科学研究的深入发展，人们迫切要求了解各种生命活动的物质基础，即构成有机体的化学组成及其相互关系，各种检测组织细胞化学成分的方法技术应运而生，逐渐发展成为一门独立的边缘性学科——组织化学。作为一种方法学，组织化学技术目前广泛应用于生物医学科学的基础和临床研究的各个领域，并显示出巨大的实用价值。

第一节 组织化学的研究内容和原理

一、组织化学的兴起与发展

组织化学 (histochemistry) 又称显微化学，即在显微镜下而不是在试管中观察的化学反应。在科学发展过程中，随着组织学及其相关学科的发展，逐渐出现了在组织切片上显示组织细胞内的化学成分，并能用显微镜观察其反应产物颜色的方法，如用碘显示淀粉、用普鲁士蓝显示铁、用卡红显示糖原、用钼酸显示脂类等。在早期，由于化学知识的贫乏，组织化学发展较慢，在组织学技术中只占很小一部分。20 世纪是科学技术快速发展的时期，尤其是核酸、蛋白质和酶的研究，要求准确地 在细胞水平上定位各种化学成分。于是，组织化学也有了长足的进展，各种著名的组织化学技术相继建立，如显示核酸的 Feulgen 反应和甲绿-派若宁染色法、显示糖原的 PAS 反应、显示碱性磷酸酶的钙钴法和酸性磷酸酶的硝酸铅法等。特异性抗原-抗体反应也被应用于检测组织细胞的抗原成分，从而产生了免疫组织化学，并迅速发展。与此同时，人们也开始在电镜下研究某些化学物质在各种超微结构的分布和定位。此外，分子生物学技术从一开始出现，就受到组织学家的关注，并很快应用于组织学研究，建立了诸如原位杂交和原位 PCR 等新的组织化学方法。现代组织化学的另一个重要进展是各种定量方法的出现，如显微分光光度术、显微图像分析术、激光共聚焦扫描显微镜术、流式细胞术等。

所以，组织化学是组织学与相关学科的新知识和新技术融合而成的一门新兴的边缘学科。现代组织化学的概念是，以组织学技术为基础，运用化学和生物化学、物理学、免疫学、分子生物学等原理和技术，在组织细胞原位显示其中的各种化学成分，并对这些化学物质进行定性、定位和定量研究，从而分析生物体在生理或病理状态下组织细胞的代谢、机能及形态变化规律。

由于细胞学和组织学已经发展到亚微结构的水平，化学成分的定位研究也随之发展到亚细胞水平。细胞化学 (cytochemistry) 研究细胞内各种结构成分分子组成、定位和机能状态。而组织化学是一个广义的概念，细胞化学与组织化学的区别在于后者着重研究细胞及各种细胞器的化学成分。

二、组织化学的研究内容

目前，对于大多数已知的组织细胞化学成分都建立了相应的组织化学方法。所以，组织化学的研究内容非常广泛。

(一) 组织细胞中的无机物质

无机物质主要包括各种金属元素和微量元素 (如钾、钙、镁、锌、铁、铅、铜、汞、金、银、铀、砷、碘等) 以及盐类 (如氯化物、磷酸盐、碳酸盐、硝酸盐等)。

(二) 组织细胞中的有机物质

有机物质主要包括糖类 (糖原、黏多糖、淀粉、淀粉样物质、纤维素、细胞表面糖链等)、脂类 (中性脂肪、游离脂肪酸、胆固醇及其酯、磷脂类等)、核酸 (DNA 和 RNA)、氨基酸、蛋白质、色素 (黑色素、脂褐素、胆色素等) 以及各种维生素等。

(三) 组织细胞中各种酶类

酶是一类特殊的蛋白质，在组织细胞的代谢活动中起着非常重要的作用。目前，能用组织化学方法显示的酶超过 200 多种，主要包括酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、5-核苷酸酶、葡萄糖-6-磷酸酶、三磷酸腺苷酶、硫胺素焦磷酸酶、碳酸酐酶、非特异性酯酶、胆碱酯酶、细胞色素氧化酶、过氧化物酶、单胺氧化酶、琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、 3β -羟基甾体脱氢酶、乙酰化酶、磷酸化酶等。

(四) 组织细胞中的各种抗原或抗体成分

利用特异性抗原-抗体反应，不仅可以原位检测组织细胞中的抗原性物质，还可以发现感染的病原微生物的抗原成分、自身抗体和抗原-抗体复合物等，从而对临床诊断提供可靠的依据。

(五) 细胞中的内源性或外源性基因片段

利用原位核酸分子杂交技术，不仅可以检测细胞的内源性基因 (包括 DNA 和 mRNA) 及其表达、异常情况，也可以检测到感染病原体，如病毒的核酸，以协助临床诊断。

三、组织化学技术的原理

组织化学是应用已知的物理、化学反应过程使组织细胞内的各种化学物质在原位形成可见的有色反应终产物。组织化学的基本原理有以下几种类型。

(一) 化学反应

通过已知的化学反应，在组织切片上生成有色沉淀以显示其化学成分及其定位。大多数组织化学方法属于此类，如酶组织化学。也可通过化学反应改变组织细胞内的化学成分的结构，然后再与一定的试剂反应以显示该化学物质，如PAS反应和Feulgen反应。

(二) 类化学反应

少数组织化学方法的染色结果有特异性，但其机制不明，如卡红显示糖原等。

(三) 物理学原理

运用物质的生物物理学特性来显示其存在。例如，苏丹染料可溶于脂类而使其显色；单胺类物质（去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺等）经甲醛诱发可产生荧光而被显示等。其他运用物理学原理的组织化学方法还有组织吸收光谱法、组织X射线显微分析法、放射自显影法，以及检查有机物燃烧后残留中无机物质的显微烧灰法等。

(四) 生物学特性

利用生物大分子物质有抗原性的特性，用荧光色素、酶、胶体金等标记某抗原的特异性抗体，通过抗原-抗体的免疫学反应可显示该抗原物质，形成目前广泛应用的免疫组织化学。某些物质之间的亲和反应也可应用于组织化学，如利用抗生物素蛋白和生物素间的高亲和力所形成的亲和组织化学。

(五) 核苷酸链互补原理

两条互补的核苷酸链可聚合形成稳定的杂交体，利用该原理可显示细胞内的靶核酸分子，如原位杂交技术。

第二节 组织化学方法的基本要求和注意事项

不同的组织化学方法的原理、操作流程、结果显示等不同，但其目的是一

致的，即准确显示组织细胞的化学成分及其定位。所以，所有组织化学方法都要遵守一些基本的要求，并注意一些共同的问题。

一、基本要求

一个满意的组织化学方法必须满足以下要求：

(1) 具备高度的特异性，这样才能鉴别所示物质的类属，正确分析实验结果。

(2) 应有一定的敏感性，以显示含量极微的物质，并弥补组织制备过程中化学物质及酶活性的丢失。

(3) 保持组织细胞良好的形态结构及其化学组成，保证组织化学反应是由存在于组织细胞中的成分所引起，并能进行定位。

(4) 组织化学反应的产物必须在原位沉淀，不扩散、不溶解、有颜色或具有一定的电子密度，这样才能用光学显微镜或电子显微镜来观察、定位。反应产物如为结晶，则结晶要尽量小，以保证定位精确。此外，反应产物应是稳定的，以便于反复观察。

(5) 要有重复性。

二、注意事项

要保证每一个组织化学与免疫组织化学方法的准确性，还必须注意以下事项：

(1) 必须掌握被检测物质的物理特性和化学特性，如水溶性、脂溶性、溶解度、特异反应等，以及该物质在组织细胞内的分布、定位等。如被检物质是酶，必须清楚该酶存在的特定部位、酶促反应的最适温度和最适 pH、酶的特异性激活剂和抑制剂、影响酶活性的因素等。

(2) 严格控制化学反应的条件，特别是反应液中各种试剂的浓度、反应时的温度、试剂溶液的 pH 以及反应时间。同时，尽量使同一实验中前后几次反应的条件保持一致。

(3) 必须设立各种对照实验，包括阳性对照和阴性对照。阳性对照是为了证明所用方法和试剂是有效的，而阴性对照是证明实验结果的特异性，排除假阳性反应，证明反应的特异性，正确地、科学地分析实验结果。

(4) 选择的试剂必须是分析纯 (A. R.)，而且对被检物质或酶的活性无任何影响。

(5) 实验所用器皿必须清洁、无污染，配制溶液时使用的水应为双蒸水或纯化水。

(宋天保)