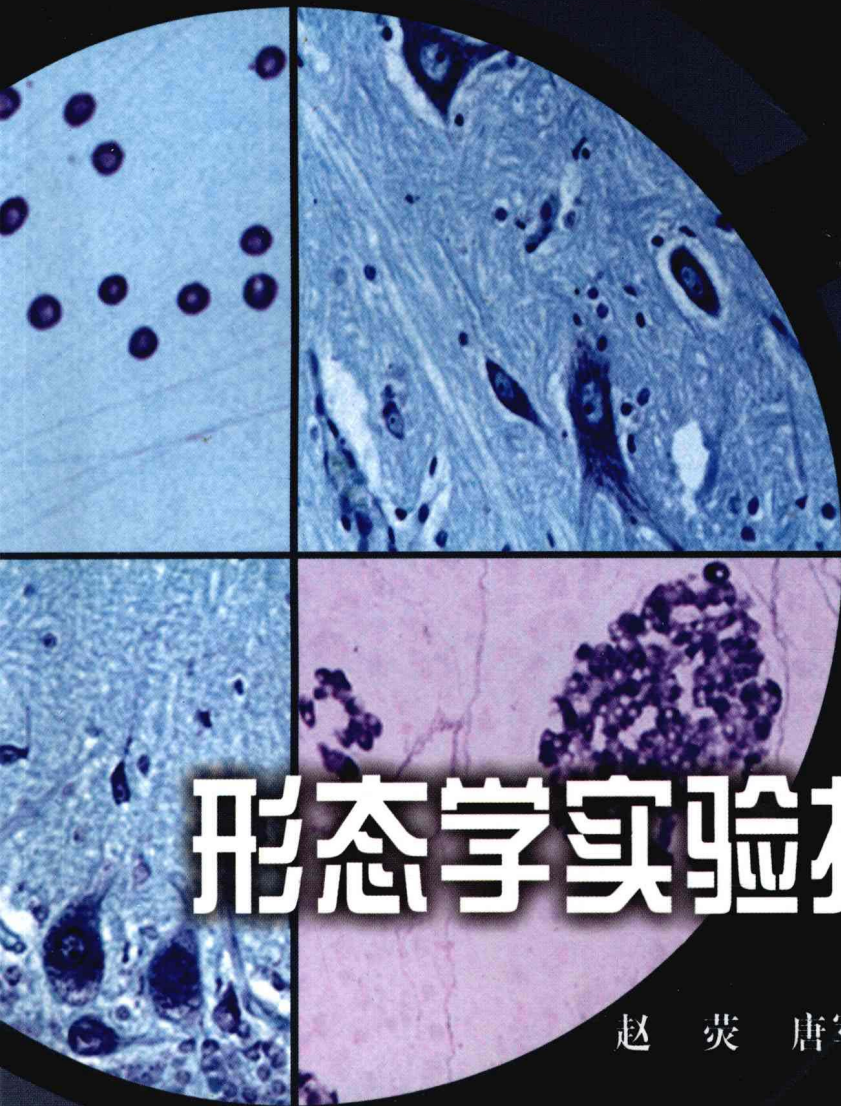


国家“十一五”重点图书
现代生物医学科研技术丛书



形态学实验技术

赵 莼 唐军民◎主编



北京大学医学出版社

国家“十一五”重点图书
现代生物医学科研技术丛书

形态学实验技术

主 编 赵 荧 唐军民

编 委 (按姓氏笔画排序)

王世忠	天津医科大学
史小林	首都医科大学
田艳霞	华北煤炭医学院
刘 皓	天津医科大学
孙海梅	首都医科大学
张栩胤	北京大学医学部
季凤清	首都医科大学
赵 荧	北京大学医学部
唐军民	北京大学医学部
高俊玲	华北煤炭医学院

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

形态学实验技术/赵莼, 唐军民主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008

(现代生物医学科研技术丛书)

ISBN 978-7-81116-075-8

I. 形… II. ①赵…②唐… III. 人体形态学—实验
IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 118530 号

形态学实验技术

主 编: 赵 莼 唐军民

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010—82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E — mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 药 蓉 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 880mm×1230mm 1/32 印张: 9.75 字数: 283 千字

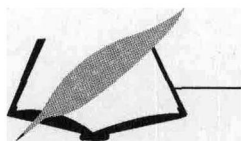
版 次: 2008 年 8 月第 1 版 2008 年 8 月第 1 次印刷 印数: 1—3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-075-8

定 价: 23.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)



出版说明

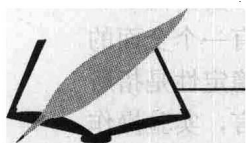
生物医学科研领域的技术多，方法杂，而且伴随着科技进步，还在不断涌现新的技术和方法。为了让该领域的研究人员能够扎实地掌握基本技术，提高在操作中解决实际问题的能力，并能在较短的时间内了解和应用新的方法、技术，我们策划并出版了这套《现代生物医学科研技术丛书》。本套丛书具有以下几点特色：

1. 专家牵头，组织有长期实践经验的一线科研工作者编写。每本书特别增加了“写在前面的话”，由作者介绍自己在科研实践中的思路和心得，为读者提供启示与帮助。

2. 内容全面，重点突出。本套丛书全面囊括了生物学领域中的常用实验技术，并重点介绍一些新兴的、热门的技术，同时还包括几本专门介绍与科研相关的仪器设备的使用和计算机软件应用的图书，以方便读者使用。

3. 内容简明、实用。本套丛书注重操作，强调经验的总结。内容中的“注意事项”介绍影响实验结果的关键步骤或易于出错的地方。

本套丛书主要面向生物、医学专业的研究生、高年级本科生，以及相关专业的其他研究人员。我们真诚地希望，这套丛书能为各位读者的科研实践提供切实有效的帮助。



写在前面的话

有位前辈曾说过：一名合格的实验技术人员应具备听、说、读、写、思五项能力。听，听他人的实验思路、实践经验，以充实自身的实验设计；说，多与他人交流，在交流中捕捉灵感，丰满与纠正实验过程；读，博览全书，阅读文献著作，积累素材，优选实验方案；写，手要勤，随时记录实验感受与疑惑，寻找解决疑惑的途径；思，则最为重要，实验中存在一些不确定性因素，勤于思考，设计严谨周密的实验技术路线，随时调整实验流程与操作。

在当今生物学和医学领域中，由于新技术、新方法的层出不穷、日益更新，以及各个专业间的相互渗透与融合，这就要求实验技术人员不仅要熟知本专业的实验技术与方法，同时还应了解与熟悉其他与本专业相关的实验技术内容。实验技术的实质是实践经验积累与沉淀的过程，多次循环往复，不单单是实验技术熟练的过程，更是熟能生巧、巧中生新的过程。如 Masson 三色染色 (Masson P, 1929) 经历了许多实验者不断摸索、改良与优化，以及各自对染色的理解与需求，使其在获得准确的染色结果前提下得到了技术上的提高，这就是一些传统技术方法一直能沿用至今的缘故。新技术、新方法应用的同时，传统实验技术也不应被忽略、放弃。为了能使更多的实验人员全面地了解形态学石蜡切片技术的相关内容，为了给以形态学改变为依托的研究课题提供实验原理、实验操作及注意事项等相应的信息，同时也是为了对过去所积累的实践经验进行梳理总结，十位不同院校的编者共同努力完成了本书的编写。

本书以实用性、稳定性、可操作性为编写宗旨。实用性是从使用者的角度，依据编者的实践经验总结和国内外实验技术的发展，去选择与编排实验技术方法与流程等，通过石

蜡切片、苏木精-伊红染色、特殊染色以及免疫组织化学和原位杂交技术的介绍，使读者对石蜡切片技术有一个全面的了解，也为相关形态学技术的学习奠定基础。稳定性是指所选用的实验技术结果的稳定性，对于初学者而言，实验操作及实验结果呈现的可重复性尤为重要。而可操作性则是指从初学者的实际出发，对每项实验技术力求介绍其原理、具体实验操作及实验注意事项等，通俗易懂且操作性强，以期起到实验指南的作用。

由于本书编写时间紧迫，作者经验有限，书中难免存在问题和错误，欢迎使用者对此书提出宝贵的意见和建议。

愿此书能给更多的人带来启发和帮助。

目 录

引 言	1
第 1 章 形态学制片种类	3
一、非切片制作方法	3
二、组织切片制作方法	8
第 2 章 组织学石蜡切片制作技术	9
第 1 节 标本取材	9
一、实验动物的处死方法	10
二、不同组织器官的取材方法	13
三、取材注意事项	15
附：大鼠胸、腹腔脏器的取材方法	16
第 2 节 标本固定	21
一、固定的目的和作用	21
二、固定的方式	22
三、影响固定作用的因素	27
四、固定后的标本修整	33
五、固定后的标本冲洗	33
六、固定容器	35
七、常用固定剂的性质及应用	36
第 3 节 标本处理过程：脱水、透明、浸蜡、包埋	48
一、脱 水	48
二、透 明	51
三、浸 蜡	53
四、包 埋	55
第 4 节 石蜡切片	60
一、石蜡切片机与切片刀	60
二、石蜡切片技术	68
第 5 节 染色与染料	83

一、染色与生物染料	83
二、染色作用的原理	87
三、染色方法	88
四、媒染剂和促染剂	91
五、染色形式	93
第6节 苏木精-伊红染色	94
一、苏木精	94
二、伊 红	100
三、石蜡切片苏木精-伊红染色	102
第7节 封 固	111
一、封固的目的	111
二、封固剂种类	111
三、封固剂的折光率	113
四、常规石蜡切片封固方法	114
第3章 特殊染色技术	119
第1节 胶原纤维染色	121
一、形态结构与特点	121
二、胶原纤维染色	121
三、磷钼酸和（或）磷钨酸在染色中的作用	127
四、影响结缔组织三色染色的因素	127
附：苦味酸-天狼猩红染色显示胶原纤维	129
第2节 弹性纤维染色	130
一、形态结构与特点	130
二、弹性纤维染色	130
第3节 网状纤维染色	138
一、形态结构与特点	138
二、网状纤维镀银技术的基本步骤与作用	139
三、常用的镀银方法	141
四、网状纤维镀银方法的基本要求	146
第4节 肥大细胞染色	147
一、形态结构与特点	147
二、肥大细胞染色	148

三、异染性.....	150
第5节 胰岛细胞染色.....	151
一、胰岛细胞形态特点.....	151
二、胰岛细胞染色.....	152
第6节 糖原染色.....	157
一、显示糖原的高碘酸-雪夫 (PAS) 反应	157
二、Best 卡红染色显示肝糖原	162
第7节 细胞内 DNA 和 RNA 染色	163
一、Feulgen 反应显示 DNA	163
二、甲绿-派若宁染色显示 DNA 和 RNA	166
第8节 肌组织染色.....	168
一、Heidenhain 铁苏木精染色	168
二、Mallory 磷钨酸-苏木精 (PTAH) 染色	170
第9节 神经元 (细胞) 尼氏体染色.....	171
一、焦油紫染色.....	171
二、甲苯胺蓝染色.....	173
三、硫堇染色.....	174
四、Luxol 坚牢蓝-焦油紫染色	174
第4章 免疫组织 (细胞) 化学技术.....	176
第1节 免疫组织 (细胞) 化学相关的基本概念.....	177
一、抗 原.....	177
二、抗 体.....	178
第2节 免疫组织 (细胞) 化学基本类型与原理.....	183
一、免疫组织 (细胞) 化学直接法.....	183
二、免疫组织 (细胞) 化学间接法.....	184
三、非标记抗体法.....	186
四、抗生物素-生物素法	188
第3节 免疫组织 (细胞) 化学技术的种类.....	191
第4节 免疫组织 (细胞) 化学技术的基本过程.....	192
第5节 免疫组织 (细胞) 化学石蜡切片的有关基本技术	192
一、用于免疫组织 (细胞) 化学的标本取材.....	193

二、用于免疫组织(细胞)化学的标本固定	194
三、用于免疫组织(细胞)化学的标本处理过程:脱水、 透明、浸蜡、包埋	197
四、用于免疫组织(细胞)化学石蜡切片的制作	198
五、常用的免疫组织(细胞)化学方法	201
六、免疫组织(细胞)化学染色主要步骤及注意事项	205
七、血清封闭排除非特异性着色	213
八、减少或消除内源性生物素	213
九、抗 体	214
十、显 色	217
十一、检测系统	221
十二、免疫组织(细胞)化学复染	221
十三、孵育盒的作用	222
十四、封固剂的使用	223
十五、免疫组织(细胞)化学结果与非特异染色的控制	223
十六、常见的免疫组织(细胞)化学问题	227
第6节 双重免疫组织(细胞)化学技术	229
一、双重免疫标记染色种类	229
二、常用的双重免疫标记配伍类型	230
三、双重免疫组织(细胞)化学的基本种类	231
四、常用的双重免疫组织(细胞)化学染色方法	231
五、消除双重免疫组织(细胞)化学染色间抗体系统的 交叉反应	236
附:常用的酸性溶液洗脱方法与应用	238
六、双重免疫组织(细胞)化学注意事项	239
第5章 原位核酸分子杂交	243
第1节 原位核酸分子杂交的基础知识	243
一、核酸的化学组成	243
二、DNA 和 RNA	244
三、DNA 变性与复性	244

第2节 原位分子杂交的基本原理	246
一、基本原理	246
二、探针类型与制备	247
三、探针标记物与探针标记方法	249
第3节 原位核酸分子杂交技术的基本步骤与原理	251
一、杂交前准备	251
二、杂交预处理	253
三、杂交反应	254
四、杂交后处理	258
五、杂交体的检测	258
第4节 对照实验和实验中的问题与对策	259
一、对照实验	259
二、实验中的问题与对策	259
第6章 形态学技术实验指导	262
实验1 标本取材与固定	262
实验2 标本的处理:脱水、透明、浸蜡、包埋	263
实验3 石蜡切片	265
实验4 苏木精-伊红(HE)染色	267
实验5 胶原纤维染色和弹性纤维染色	268
实验6 细胞染色	270
实验7 网状纤维镀银技术	271
实验8 PAS反应及Schiff试剂配制	272
实验9 肌组织染色	273
实验10 尼氏体染色	275
实验11 免疫组织(细胞)化学染色	276
实验12 免疫组织(细胞)化学双重染色	277
实验13 免疫组织(细胞)化学染色与特殊染色	278
第7章 附录	281
附录1 常用试剂的配制	281
附录2 玻璃制品的清洁	284
附录3 常用染料的中英文名称	286
附录4 石蜡切片评估标准及计分	288

附录 5	动物常用麻醉剂的用法和剂量	289
附录 6	生物染料分类——根据染色对象分类	291
附录 7	石蜡切片操作所遇到的常见问题	292
附录 8	苏木精-伊红染色技术流程	294

引 言

组织学的发展源于 1665 年英国物理学家虎克 (Robbert Hooke, 1635—1703) 利用简陋的显微镜对软木塞薄片的观察。他发现软木塞是由许多有隔壁的像蜂房的小室组成的, 特称此小室为细胞 (cell, 1665)。由于受到显微镜制作技术以及其他科学技术发展的限制, 人们对组织形态结构的认识也仅局限于显微镜下观察机械分离的生鲜组织, 其主要的缺陷是不能观察到组织形态的进一步结构和细胞内部的变化。为了更多地了解组织内部的形态结构, 人们创建了徒手切片方法和简单的机械切片方法, 这也就是组织学切片技术的前身。

19 世纪科学技术的进步, 尤其是物理学、化学、光学、电子学等方面的发展, 推动了显微镜制造技术的不断改进 (1820—1880)。光学仪器制造技术和机械制造业的发展, 较高倍数和质量较高的显微镜的出现, 以及组织切片机的诞生 (Gudden 和 Welker, 1856) 与逐步完善, 对组织学技术的建立和发展起到了至关重要的作用。1838 年德国植物学家希来登 (Schneiden MJ, 1804—1881) 用显微镜发现了新鲜的植物细胞。次年德国的动物学家施万 (Schwann T, 1810—1882) 用显微镜发现了动物的新鲜细胞。他们于 1838—1839 年各自发表了研究结果, 提出了 19 世纪三大发现之一的细胞学说, 从而为生物学和医学的深入研究打下了牢固基础。可以说, 组织学研究的发展是与显微镜的发明和进步, 以及组织切片和染色技术的进步和发展密切相关、相互促进的。在某种程度上, 组织学技术对组织学的研究起着推进的作用。

当今的组织学技术已经从过去的单纯观察组织或细胞形态, 发展到与生物化学、免疫学、分子生物学等多种学科的交叉与融合, 并派生出各种相应组织学研究的技术手段, 如组织化学技术、电子显微镜技术、免疫组织 (细胞) 化学技术、分子形态学

技术等，使得人们对于组织与细胞结构的了解深入到了分子水平和基因水平，而这些技术方法的派生都与传统的组织学技术有着密切的联系。



第1章

形态学制片种类

组织学标本的制作有很多方法，但总体上可以粗略归纳为两大类：非切片制作方法和切片制作方法。

一、非切片制作方法

非切片制作方法，顾名思义就是无需借助于切片机（不需要切片操作）即可制成组织标本的方法。非切片法制作组织标本的种类很多，大致可包括：组织分离标本、组织活体标本、细胞涂片标本、磨片标本、整体封存标本、组织铺片标本 6 类。依据实验目的和所观察的实验对象的要求可适当地选择不同的标本制作方法。

非切片制作方法的优点：标本制作方法简单，组织结构基本不被破坏，能保持原有的组织或细胞的形态结构，最为重要的是标本内的细胞是完整的。制作过程所产生的人工假象较少；使用的药物、仪器较少；在较短的时间内即可观察到组织或细胞的形态。但是，非切片制作方法应用的范围局限，有些组织标本不能长期保存、不能观察到细胞内部的结构是其不足之处。

（一）组织分离标本

组织分离标本主要是观察机体的单个细胞形态结构，如平滑肌细胞、脊髓前角神经细胞、呼吸道或消化道的上皮细胞等。目前，分离标本制作的方法已不同于以前的应用范围，而是较为广泛地应用在许多专业，尤其是细胞培养方面的细胞形态学观察。

传统的组织分离标本制作方法：将一小块新鲜组织浸泡在一定浓度的某种化学试剂（氢氧化钠）中，通过化学作用（腐蚀作用），溶解组织内的结缔组织和细胞间质，再经过振荡、吹打和离心等程序，最后构成组织的细胞成为一个个分离的单细胞状态。

目前制作分离标本的方法：新鲜组织经过消化酶（胰蛋白酶等）的消化作用将被分离成单个细胞，再经密度梯度离心等步骤，

可获得较为纯化的单个细胞悬液。

无论是采用传统的化学试剂溶解作用，还是采用消化酶的消化作用，所获得的细胞悬液都将制备成细胞涂片，再经过固定、染色，如 HE 染色、特殊染色、免疫细胞化学以及荧光染色等，即可在显微镜下观察到一个个呈分离状态的单个细胞形态（图 1-1、图 1-2）。

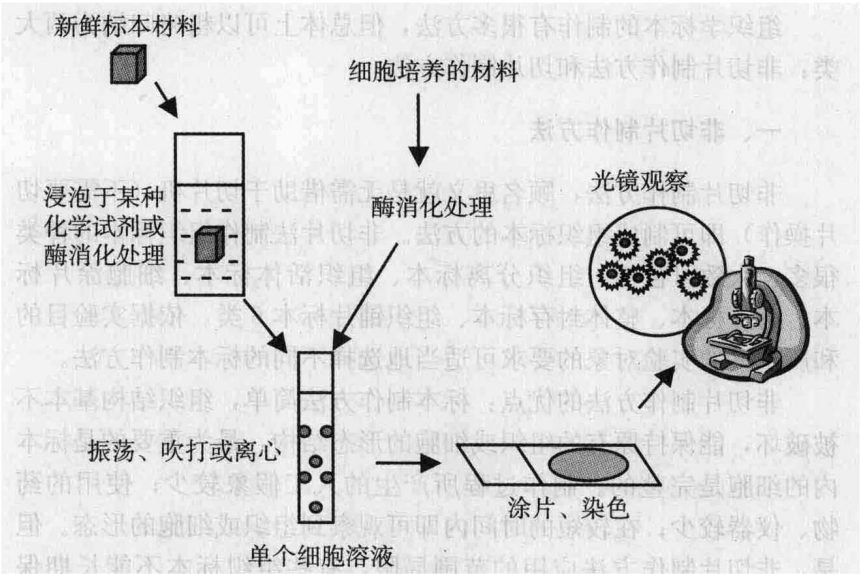


图 1-1 分离标本制作步骤示意图

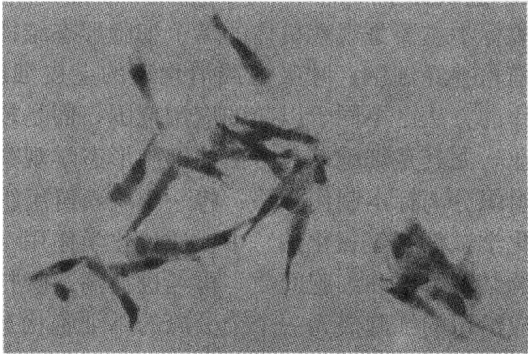


图 1-2 分离的大鼠气管上皮细胞（HE 染色）

（二）组织活体标本

组织活体标本，顾名思义就是在组织细胞生活状态下进行观察的标本，或在生活状态下进行活体染料染色后制成的标本。这是一种较为特殊的标本制作方法，多数是用于观察细胞个体的活动情况（如精子运动状况）、观察生活状态下细胞内某些细胞器（如线粒体）的活动与分布，以及研究活体状态中机体内某些细胞（如上皮细胞、巨噬细胞）的生理功能等（图 1-3）。既可以使用普通光学显微镜观察，也可通过相差显微镜观察。

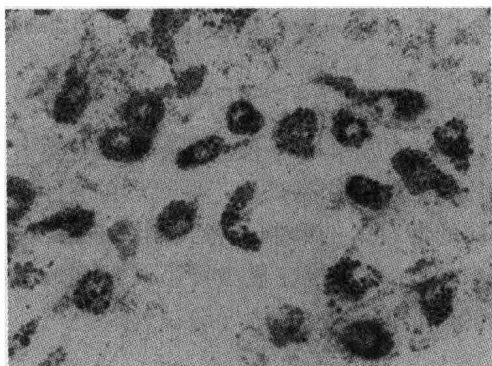


图 1-3 台盼蓝注射显示大鼠皮下组织巨噬细胞

常用的活体染料有台盼蓝（Trypan blue）、中性红（neutral red）、詹纳斯绿（Janus green）、煌焦油蓝（brilliant cresyl blue）等。

（三）细胞涂片标本

涂片标本主要是以液体或半流体性质的物质为材料，多数应用于临床检查和病理诊断，如血涂片、骨髓涂片、腹水涂片、阴道涂片、痰涂片等，而在实验室应用的多是分离的细胞悬液。制备的细胞涂片需要经过适当染色，如 HE 染色、Giemsa 染色、Wright 染色、巴氏染色以及免疫细胞化学染色等，才可通过光学显微镜进行观察（图 1-4）。