

高等学校创新教材 医学实验技术系列

组织学与胚胎学 实验技术

主编 李继承



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

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

组织学与胚胎学 实验技术

主编 李维宁



人民卫生出版社

高等学校创新教材 医学实验技术系列

组织学与胚胎学 实验技术

..... 主 编 李继承
副主编 李 和

文建国 (中南大学湘雅医学院)	周德山 (首都医科大学)
齐建国 (四川大学华西医学院)	姚忠祥 (第三军医大学)
李 和 (华中科技大学同济医学院)	徐 晨 (上海交通大学医学院)
李继承 (浙江大学医学院)	唐 勇 (重庆医科大学)
张 雷 (河北医科大学)	唐军民 (北京大学医学部)
邵淑娟 (大连医科大学)	曾圆山 (中山大学医学院)
周作民 (南京医科大学)	雷 蕾 (哈尔滨医科大学)
周国民 (复旦大学上海医学院)	

秘 书 李冬梅 (浙江大学医学院)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

组织学与胚胎学实验技术/李继承主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010.5

ISBN 978-7-117-12594-9

I. ①组… II. ①李… III. ①人体组织学-实验
②人体胚胎学-实验 IV. ①R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 009842 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

组织学与胚胎学实验技术

主 编: 李继承

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 36.5

字 数: 885 千字

版 次: 2010 年 5 月第 1 版 2010 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-12594-9/R·12595

定 价: 136.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前言

2008年5月,我收到人民卫生出版社的邀请,主编医学实验技术系列教材之一《组织学与胚胎学实验技术》,并要求以常用的、成熟的以及代表未来发展方向的医学实验技术为主,着重阐述实验技术的用途(目的)、实验原理、实验方法和步骤等,突出实验技术的可操作性和实用性。

综观教材类丛书,有关医学实验技术系列教材甚少,更无《组织学与胚胎学实验技术》教材。我深知这是一项属于开创性的系列教材丛书,编写难度大。其原因在于医学科学的领域非常广阔,新技术日新月异、层出不穷,而医学不同学科之间互相交叉渗透,除了一些经典的组织学与胚胎学实验技术外,属于组织学与胚胎学的实验技术难以与其他学科相区分。然而,在我为研究生开设的课程中,确实感到研究生实验技术教材的缺少。有时为了组织一堂教学课,需要从不同的参考书中获得教学参考内容,提供给学生。开设一门研究生实验课,参考书多达几十本,导致教师备课非常辛苦,学生学习负担重,但涉及具体的研究工作,实用性差。有些新技术则更无参考资料可觅。鉴于上述原因,编写一本研究生的实验技术类教材、医学科研人员的实验参考书,以解决他们在学习和研究工作中遇到的实际问题,是非常必要的。

为此,我们联合北京大学、复旦大学、华中科技大学、中山大学、上海交通大学、中南大学、四川大学、第三军医大学、首都医科大学、哈尔滨医科大学、重庆医科大学、南京医科大学、河北医科大学、大连医科大学的教授们进行讨论,在取得共识的基础上,拟订编写大纲。在内容的编排上,既有经典的组织学与胚胎学实验技术,又有代表当今科学发展水平的形态学新技术;既注重阐述实验技术的原理,又突出在研究工作中的实际应用。由于参加编写的人员,都是该研究领域的专家,因此本书实验指导的可操作性和实用性非常强,研究人员可遵循本书的实验方法和步骤,完成实验工作。同时,必要的试剂和溶液的配制方法也可从书的附录中获得。

在本教材完稿之际,我回眸近一年半的时间里与我的朋友们共同努力,感慨良多:在我主编的数部教材中,《组织学与胚胎学实验技术》给我留下难以忘怀的记忆,为了使读者获得更大的收益,本教材聘请了本学科内具有丰富科研、教学和教材编写经验的学者参加编

写。许多学者在学术界名气大、地位高,在工作繁忙的情况下,仍欣然接受邀请担任本教材的编委,令我非常感动。我要感谢本教材的编委、编者和秘书在无前例可循的情况下,付出了艰苦的劳动,创造性地完成了编写任务!感谢人民卫生出版社有关医学实验技术系列教材的新创意!感谢为本教材提供资料而付出辛勤劳动的朋友们,因为你们的工作,使得本书更加绚丽!

由于医学科学仍将在奔腾向前,新的技术继续汹涌而来,我们将在今后再版中不断给予新的补充和修改。既然属于开创性的工作,存在某些缺点在所难免,欢迎读者的批评和指正。本书的编写得到国家自然科学基金委国家基础科学人才培养基金的资助(NO. J0730856, J0830833),在此表示感谢。

李继承

2010年3月1日于杭州

目 录

第一章 组织标本切片和染色技术.....	1
第一节 标本取材与固定.....	1
一、标本取材.....	1
二、标本固定.....	4
第二节 脱水、透明、浸蜡和包埋.....	9
一、脱水.....	9
二、透明.....	11
三、标本脱水与透明的关系.....	11
四、浸蜡和包埋.....	12
第三节 组织切片技术.....	13
一、石蜡切片.....	13
二、冰冻切片.....	19
第四节 切片的染色与染料.....	20
一、生物学染色与染料.....	20
二、苏木精 - 伊红染色.....	26
三、封固.....	30
第五节 特殊标本的制备.....	32
一、脱钙骨标本.....	32
二、眼球标本的制备.....	35
三、微小标本的制备.....	38
四、胚胎标本的制备.....	39
五、涂片标本.....	41
第六节 常用的特殊染色.....	42
一、结缔组织染色.....	42
二、细胞染色.....	52
三、神经组织染色.....	59
第七节 激光捕获显微切割技术.....	68
一、原理.....	68
二、实验方法.....	69
三、实验操作的影响因素.....	69

四、激光捕获显微切割系统的优点	70
五、激光捕获显微切割系统的应用范围	70
六、激光捕获显微切割技术的最新进展	71
附录: 主要试剂与溶液的配制	72
第二章 光学显微镜技术	77
第一节 普通光学显微镜	77
一、显微镜的几何光学成像原理	77
二、物镜	78
三、显微镜的照明聚光镜	79
四、视场光阑与孔径光阑	80
五、目镜	81
六、普通光学显微镜的操作要点	81
第二节 荧光显微镜	82
一、荧光的基础知识	82
二、荧光显微镜	85
三、荧光显微镜的基本操作步骤	88
四、荧光显微镜的操作注意事项	89
五、荧光显微镜标本制作特点和观察要求	89
第三节 倒置显微镜	90
一、光学与结构特点	90
二、V型与U型倒置显微镜	90
第四节 相差显微镜	91
一、基本原理	91
二、配置	92
三、操作	92
四、相差图像特点及相差装置进展	93
第五节 其他光学显微镜技术	93
一、暗视野显微镜	93
二、近场光学显微镜	94
三、原子力显微镜	97
第六节 激光扫描共聚焦显微镜	101
一、基本原理	102
二、激光扫描共聚焦显微镜的主要特点	103
三、激光扫描共聚焦显微镜的主要应用	104
四、激光扫描共聚焦显微镜的基本结构	105
五、激光扫描共聚焦显微镜的主要操作步骤	107
六、双光子(多光子)激光共聚焦显微镜	107

第七节 显微镜摄影与显微摄影技术	108
一、显微摄影的基本原理	109
二、显微镜摄影中 CCD 的选择	110
三、显微摄影技术应用	111
四、CCD 成像的操作步骤	112
第八节 图像分析技术	113
一、图像分析处理的基本概念	113
二、图像分析系统的基本配置	116
三、图像分析的医学应用	118
第三章 组织与细胞化学技术	120
第一节 总论	120
一、组织与细胞化学的技术要求	120
二、组织与细胞化学的研究内容	120
三、组织与细胞化学的研究方法	121
第二节 碳水化合物和核酸显示技术	122
一、碳水化合物的显示技术	122
二、核酸的显示技术	128
第三节 脂类和含铁血黄素显示技术	132
一、脂类	132
二、含铁血黄素	134
第四节 蛋白质和氨基酸的显示技术	135
一、蛋白质的四氮化联邻茴香胺显示法	135
二、蛋白质巯基(—SH 基团)的铁-铁氰化物显示法	135
第五节 酶组织与细胞化学	136
一、影响酶活性的几种因素	136
二、常用酶组织与细胞化学反应显示的基本理论和方法	138
三、几种常用的酶组织与细胞化学技术	141
附录:主要试剂与溶液的配制	172
第四章 免疫组织化学技术	175
第一节 免疫组织化学技术的基本原理和分类	175
一、免疫组织化学技术的基本原理	175
二、免疫组织化学技术的分类	176
第二节 免疫荧光组织化学技术	176
一、免疫荧光组织化学技术的基本原理	176
二、免疫荧光组织化学技术的基本方法	177
三、非特异性荧光染色的抑制或消除	179

第三节 免疫酶组织化学技术.....	179
一、免疫酶组织化学技术的基本原理	179
二、免疫酶组织化学技术的基本方法	180
三、注意事项	183
第四节 亲和免疫组织化学技术.....	185
一、亲和免疫组织化学技术的基本原理	185
二、亲和免疫组织化学技术的基本方法	185
三、注意事项	187
第五节 免疫胶体金技术.....	187
一、免疫胶体金染色法	187
二、蛋白 A 胶体金法	188
三、免疫金银法	189
第六节 组织与细胞标本的制备和抗原修复	190
一、取材	190
二、固定	190
三、包埋	190
四、切片	191
五、抗原修复及应用	191
第七节 常用免疫组织化学技术实验步骤	192
一、免疫荧光法	192
二、免疫酶技术	194
三、亲和免疫组织化学技术	197
四、免疫胶体金技术(光镜水平).....	199
第八节 免疫组织化学技术方法的注意事项	201
一、免疫组化染色方法的选择	201
二、非特异染色或背景的控制	202
附录:主要试剂与溶液的配制.....	204
 第五章 原位杂交组织化学技术.....	213
第一节 原位杂交概述.....	213
一、基本原理	213
二、基本类型	213
三、发展特点	215
第二节 核酸探针	216
一、核酸探针的种类	216
二、核酸探针的标记	218
第三节 普通原位杂交技术.....	220
一、基本过程	221

二、实验步骤	223
三、检测与分析	224
四、影响因素	225
五、对照实验	227
第四节 荧光原位杂交	227
一、FISH 的标记物	229
二、FISH 的探针	229
三、实验步骤	231
四、FISH 的技术类型	232
五、多色荧光原位杂交技术	233
第五节 比较基因组杂交	234
一、基本原理	234
二、技术特点	236
三、实验步骤	236
四、微阵列 CGH 技术	239
第六节 原位 PCR	240
一、基本原理与技术类型	241
二、实验步骤	243
第七节 引物原位标记	244
一、基本原理	244
二、技术特点	246
三、实验步骤	247
第八节 原位杂交在胚胎发育研究中的应用	248
一、胚胎样品的制备	248
二、整胚原位杂交实验步骤	249
三、胚胎切片的原位杂交实验步骤	250
四、胚胎原位杂交时的几个主要问题	251
附录:主要试剂与溶液的配制	252
第六章 细胞与组织培养技术	256
第一节 细胞培养的基本原理	256
一、细胞培养实验室设计原则和常用设备	256
二、无菌室的灭菌	257
三、器械的清洗和灭菌	258
四、细胞培养的一般条件	259
五、细胞原代培养和传代培养	262
六、培养细胞的计数与活力测定	263
七、细胞培养中的污染问题	264

第二节 细胞冻存和复苏	265
一、细胞冻存技术	265
二、细胞复苏技术	267
三、细胞的运输和收到后的处理	268
第三节 细胞和组织培养常用方法	268
一、单个(群)细胞培养法	269
二、组织和器官培养法	280
三、全胚胎培养法	281
第四节 细胞的特殊培养方法	286
一、支持物培养法	286
二、悬浮培养法	288
三、单细胞分离(克隆)培养法	288
四、大规模细胞培养技术简介	289
附录:常用细胞培养液的配制与灭菌	296
 第七章 体视学	 300
第一节 体视学的原理	300
一、二维图像与三维结构之间的关系	300
二、几何探针	301
三、卡瓦列里原理	302
四、随机抽样	305
第二节 常用体视学方法的应用	308
一、特征物断面计数与轮廓密度	308
二、长度密度和总长度	311
三、面积分数和平均面积	313
四、体积分数和总体积	313
五、交叉点密度和边线密度	314
六、表面积密度和总表面积	315
七、数目测量	316
八、体视学技术与图像分析技术的关系	324
 第八章 电子显微镜技术	 326
第一节 概述	326
一、透射电子显微镜	326
二、扫描电子显微镜	327
三、超高压电子显微镜	327
四、分析型电子显微镜	327
五、扫描隧道显微镜	327

第二节 透射电子显微镜技术及生物样品制备	328
一、透射电子显微镜的结构	328
二、超薄切片技术	329
三、其他生物样品制备技术	337
第三节 扫描电子显微镜技术及生物样品制备	339
一、扫描电子显微镜的结构及原理	339
二、扫描电子显微镜生物样品制备技术	339
第四节 透射电镜的观察与记录	346
第五节 冰冻蚀刻电镜技术	348
一、物理固定	348
二、物理固定方法	349
三、样品制备基本步骤	350
四、冰冻置换法	352
第六节 电镜组织化学与细胞化学技术	352
一、酶组织化学的特点	353
二、样品制备	353
三、常用电镜酶组织细胞化学方法	354
第七节 免疫电镜技术	357
一、免疫电镜技术的特点	357
二、几种常用免疫电镜技术	360
附录:主要试剂与溶液的配制	367
 第九章 流式细胞检测技术	369
第一节 流式细胞仪原理和组成	369
一、流式细胞术分析的基本原理	369
二、流式细胞仪的基本结构	370
第二节 流式细胞仪常用的荧光素	373
第三节 流式细胞仪样本制备和标记方法	373
一、实验准备阶段	373
二、样本处理	373
三、荧光染色	373
四、细胞分选	374
第四节 流式细胞仪的数据处理	374
一、数据的显示	374
二、数据的分析	375
第五节 流式细胞仪分选技术	376
第六节 流式细胞仪的应用	377
一、细胞周期检测	377

二、细胞凋亡检测	378
三、细胞增殖检测	378
四、细胞膜标记检测——淋巴细胞亚群	379
五、细胞质标记检测——细胞内细胞因子检测	380
六、肿瘤干细胞的检测 and 分选	380
七、染色体分析	381
八、精子分选	381
九、阳性转染细胞的分选	383
附录: 常见荧光素的性质	384
第十章 生物芯片技术	387
第一节 生物芯片技术概述	387
一、生物芯片技术的发展史	387
二、生物芯片的分类和应用	388
第二节 组织芯片技术	389
一、组织芯片的原理	389
二、石蜡组织芯片的制备	389
三、组织芯片的应用	392
四、组织芯片的优点和存在的问题	394
第三节 基因芯片	395
一、基本原理	395
二、芯片制作	395
三、样品制备	398
四、实验步骤	398
五、生物分子杂交	399
六、信号的检测及分析	401
七、数据分析	401
八、基因芯片的应用领域	402
第四节 抗体芯片	403
一、蛋白质表达谱检测	403
二、蛋白质磷酸化的检测	404
三、蛋白质相互作用的检测	404
第五节 其他芯片技术	405
一、微流控芯片	405
二、microRNA 表达芯片	406
附录: 主要试剂与溶液的配制	408

第十一章 活体动物体内功能成像技术	410
第一节 活体动物体内可见光成像技术	410
一、生物发光成像技术	411
二、活体动物荧光成像技术	414
三、生物发光成像与荧光成像的比较	416
四、活体动物可见光成像原理与操作流程	418
第二节 活体动物放射性核素成像技术	419
一、PET/SPECT 的技术原理	419
二、小动物 PET/SPECT 技术的优势	421
三、应用领域	422
第三节 多模式分子成像平台	427
一、活体动物光学成像系统与核素成像的融合	427
二、核素成像与 CT、MRI 的融合	428
第十二章 干细胞技术	431
第一节 成体干细胞	432
一、造血干细胞的分离、培养和鉴定	432
二、骨髓间充质干细胞的分离、培养和鉴定	436
三、神经干细胞的分离、培养和鉴定	439
四、表皮干细胞的分离、培养和鉴定	440
五、脂肪干细胞的分离、培养和鉴定	442
六、少突胶质干细胞的分离、培养和鉴定	445
七、胰腺干细胞的分离、培养和鉴定	448
第二节 胚胎干细胞	454
一、小鼠胚胎干细胞的分离、培养和鉴定	454
二、人胚胎干细胞分离、培养及鉴定	459
三、胚胎生殖细胞的分离、培养和鉴定	463
第三节 诱导的多潜能干细胞	468
一、概述	468
二、诱导的多潜能干细胞的获得	468
三、诱导的多潜能干细胞的鉴定	470
四、影响诱导的多潜能干细胞建系的因素	471
五、诱导的多潜能干细胞的应用	471
第四节 肿瘤干细胞	471
一、肿瘤干细胞的概念	472
二、肿瘤干细胞的生物学特性	472
三、肿瘤干细胞的分选与鉴定	473
四、信号通路与肿瘤发生	474

五、肿瘤干细胞的起源	475
第五节 干细胞在组织工程中的应用	475
一、组织工程的研究内容	475
二、干细胞在组织工程中的应用	477
附录:主要试剂与溶液的配制	479
第十三章 细胞核移植技术及应用	481
第一节 细胞核移植的相关细胞	481
一、细胞核移植研究的初衷及演变	482
二、细胞核供体的准备	483
三、细胞核受体胞质的准备	487
四、供体细胞核与受体卵母细胞的相互作用	491
第二节 细胞核移植胚胎的构建	493
一、直接注射法	493
二、电融合法	495
三、激活重组胚	496
第三节 核移植胚胎的培养	499
一、早期胚胎发育过程中的基本生命现象	500
二、培养液的种类和基本成分	500
三、体外培养系统	503
第四节 体细胞核移植基本操作步骤	505
一、实验准备工作	505
二、细胞核移植的基本步骤	508
第五节 细胞核移植技术的应用	511
一、制备人胚胎干细胞	511
二、促进转基因动物生产	512
三、加深核质互作关系的研究	513
四、提高牲畜育种的效率和扩大珍稀动物的数量	513
第十四章 体外受精及其衍生辅助生殖技术	515
第一节 体外受精 - 胚胎移植	515
一、体外受精的发展历史	515
二、体外受精的应用价值	516
三、小鼠体外受精步骤	516
四、胚胎移植	522
五、精子的体外获能和顶体反应	524
第二节 单精子卵浆内注射	529
一、单精子卵浆内注射的发展历史	529

二、小鼠单精子卵浆内注射的步骤	530
第三节 植入前基因诊断	535
一、植入前基因诊断取材	536
二、植入前基因诊断分析	537
第四节 胚胎冷冻	538
一、冷冻保护剂的分类	539
二、常用冷冻方法	539
中英文名词对照索引	542
英中文名词对照索引	555