

免疫细胞(组织)化学 和分子病理学技术

TECHNIQUES OF IMMUNOCYTOCHEMISTRY
(IMMUNOHISTOCHEMISTRY) AND MOLECULAR PATHOLOGY



主 审 王伯云
主 编 王文勇



 第四军医大学出版社

免疫细胞(组织)化学 和分子病理学技术

主 审 王伯沅

主 编 王文勇

编 者 (按姓氏笔画排序)

马福成 王 哲 王文勇

王伯沅 叶 菁 李 青

李玉松 李增山 张 静

范林妮 赵一岭 黄晓峰

黄高昇

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

免疫细胞(组织)化学和分子病理学技术/王文勇主编.
—西安:第四军医大学出版社,2010.11
ISBN 978-7-81086-884-6

I. 免… II. 王… III. 免疫学:细胞学:病理生理学—研究 IV. R392.32

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第204787号

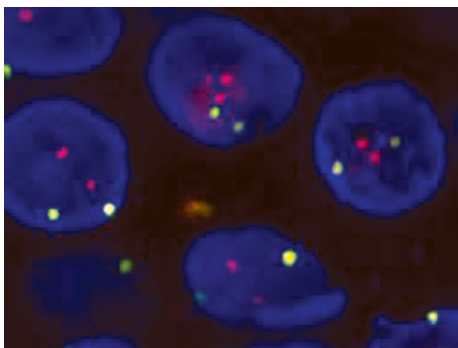
免疫细胞(组织)化学和分子病理学技术

主 编 王文勇
责任编辑 土丽艳
执行编辑 李俊功
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路17号(邮编:710032)
电 话 029-83376765
传 真 029-83376764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 人民日报社西安印务中心
版 次 2010年11月第1版 2010年11月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 黑白20.75 彩色0.25
字 数 280千字
书 号 ISBN 978-7-81086-884-6/R·764
定 价 42.00元

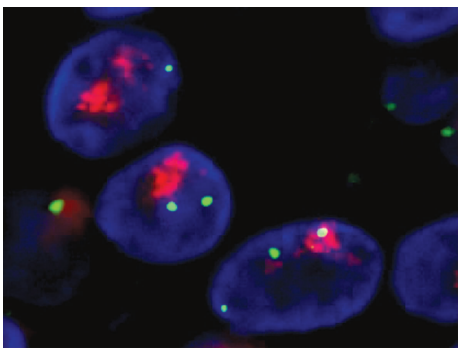
版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

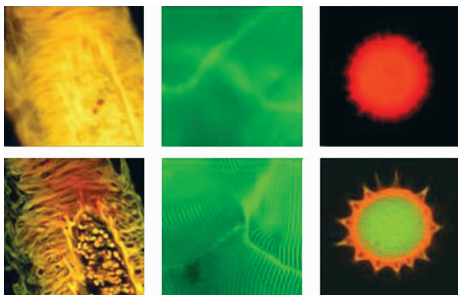
彩图



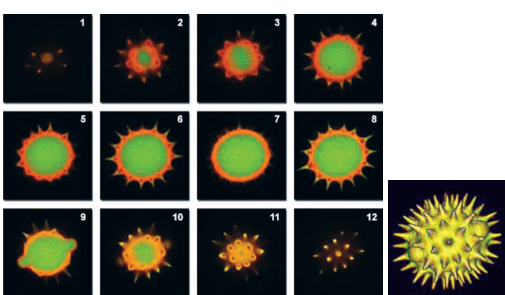
彩图1 FISH技术未检测到Her-2基因扩增



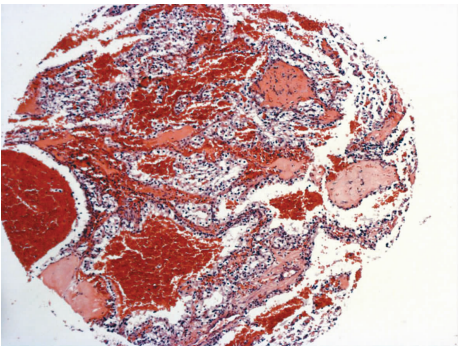
彩图2 FISH技术检测到Her-2基因扩增



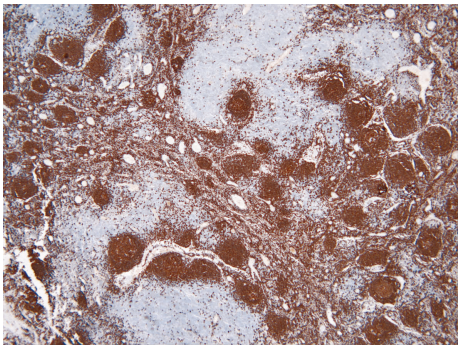
彩图3 普通光学显微镜(上排)与共聚焦显微镜(下排)成像的对比



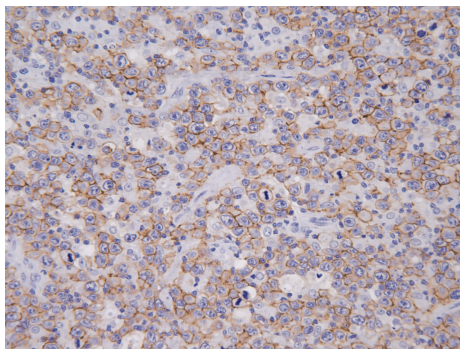
彩图4 向日葵花粉颗粒的光学切片(左侧图像,步距5 μ m)和3D重建后的图像(右侧图像)。



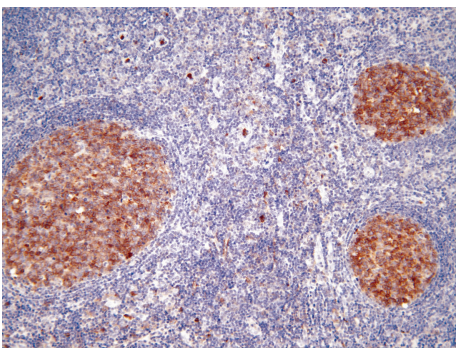
彩图5 组织芯片HE染色结果



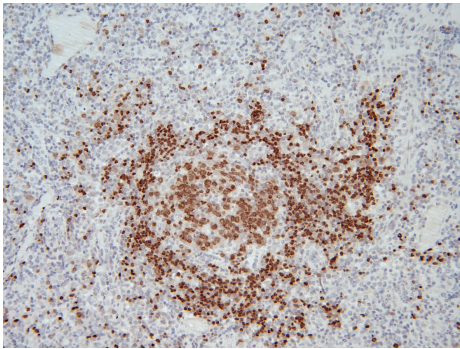
彩图6 淋巴结CD20染色切片。可见许多CD20阳性的次级淋巴滤泡，其间有散在分布的CD20阳性细胞。 $\times 4$,Envision 法



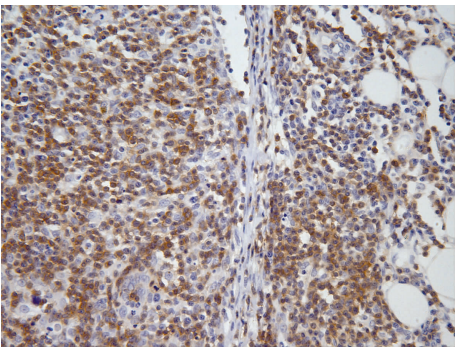
彩图7 CD20阳性的弥漫大B细胞淋巴瘤,可见阳性定位于淋巴瘤细胞膜。×40,Envision 法



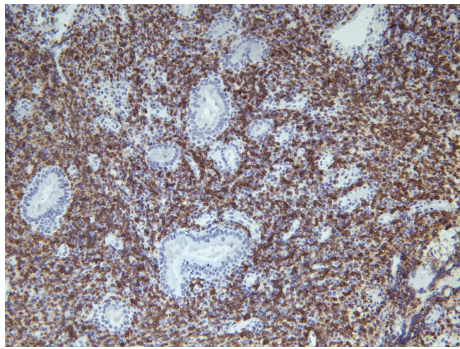
彩图8 淋巴结CD10染色切片,阳性细胞主要集中在反应性生发中心,生发中心外仅有极少散在的CD10阳性细胞。×10,Envision 法



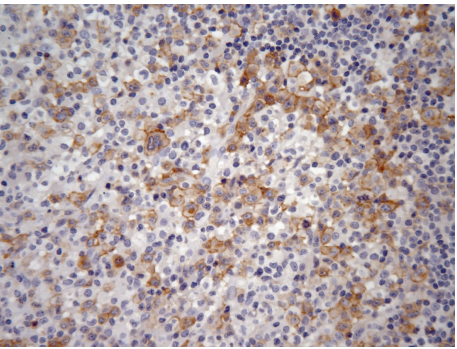
彩图9 淋巴结PAX-5染色切片,视野中是一个次级淋巴滤泡,可见生发中心及帽区有许多PAX胞核阳性的B细胞。×20,Envision 法



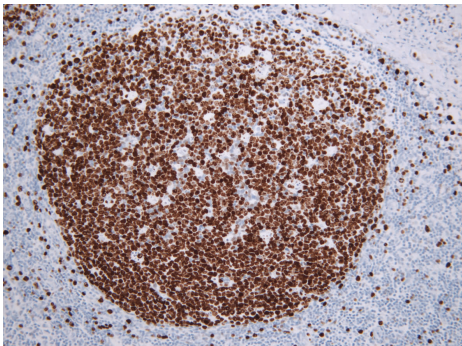
彩图10 淋巴结CD3染色切片,视野左侧为淋巴结被膜内组织,右侧为被膜外组织,内外侧均可见许多有异型性的胞浆CD3阳性淋巴样细胞。×40,Envision 法



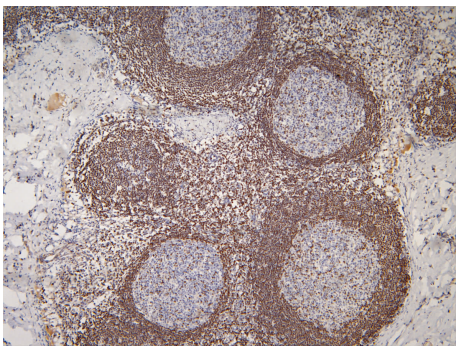
彩图11 鼻腔黏膜活检标本的CD56染色切片,可见大量弥漫分布的CD56胞浆阳性的淋巴样细胞。×20,Envision 法



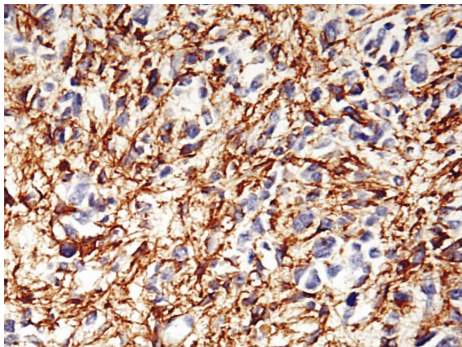
彩图12 淋巴结CD30染色切片,可见淋巴窦区域内有许多体积大的异型细胞,多数细胞胞膜CD30阳性,有的细胞胞膜阳性及Golgi区点状阳性。×40,Envision 法



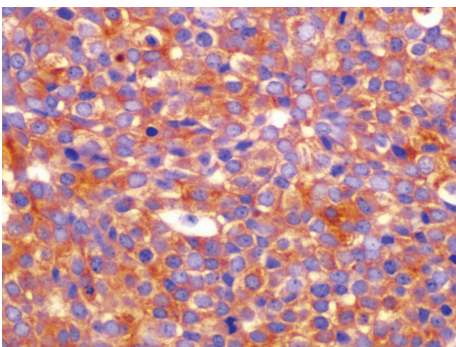
彩图13 淋巴结淋巴滤泡的Ki67染色切片，视野中是一个生发中心，其中几乎均为Ki67胞核阳性的细胞，分布有极性，生发中心外可见散在少数Ki67阳性细胞。×40，Envision法



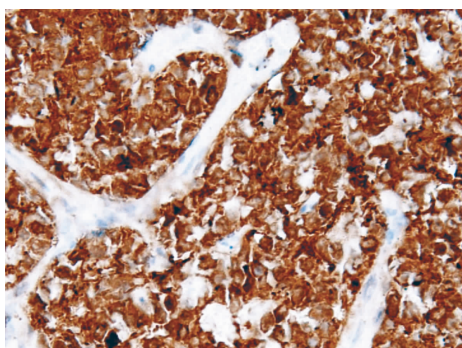
彩图14 反应性增生淋巴结的Bcl-2染色切片，可见阳性细胞主要分布在生发中心外，生发中心内可见散在Bcl-2阳性细胞。×20，Envision 法



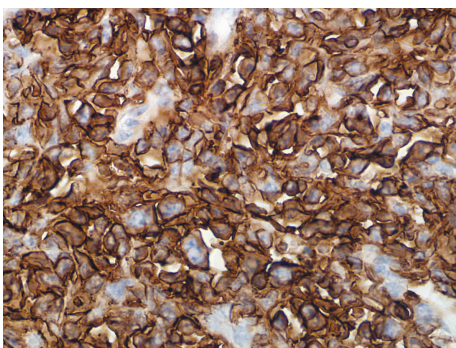
彩图15 间变型星形细胞瘤瘤细胞胞浆GFAP阳性，呈棕色



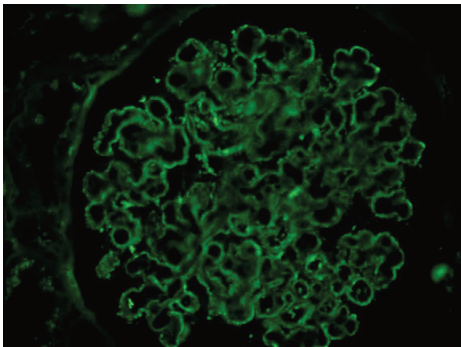
彩图16 中枢神经细胞瘤 瘤细胞胞浆突触素阳性，呈棕色



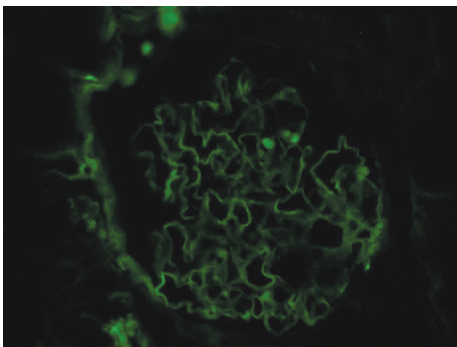
彩图17 中枢神经细胞瘤瘤细胞胞浆NSE阳性，呈棕色



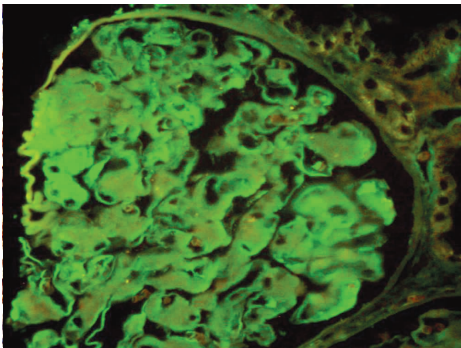
彩图18 中枢神经系统原发性淋巴瘤瘤细胞胞浆LCA阳性，呈棕色



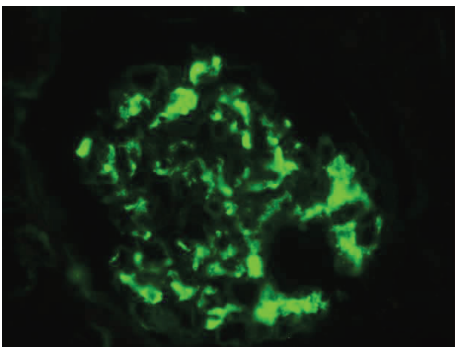
彩图19 IgG沿肾小球毛细血管壁颗粒样沉积



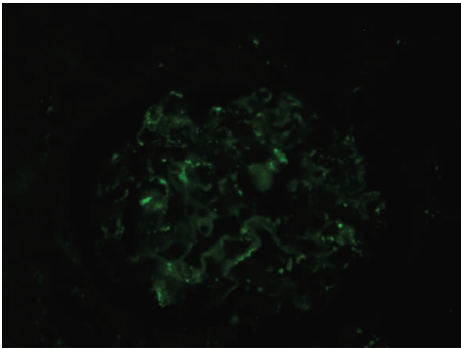
彩图20 IgG沿毛细血管壁线性沉积



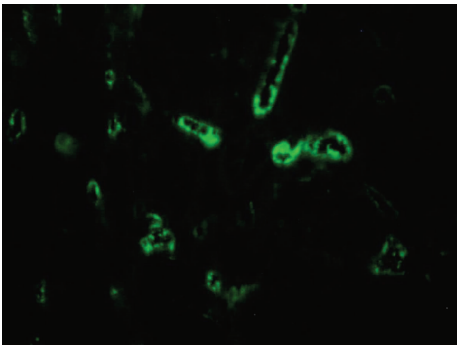
彩图21 淀粉样变性肾病患者的肾组织AA蛋白染色阳性



彩图 22 IgA 在肾小球系膜区团块状沉积 (×40)



彩图 23 C3 沿肾小球部分毛细血管壁颗粒状沉积 (×40)



彩图24 IgG沿肾间质小动脉壁颗粒状沉积 (×40)

前 言

免疫细胞化学(immunocytochemistry)又称免疫组织化学(immunohistochemistry),是利用抗原抗体反应原理,标记抗体技术和细胞化学的原位呈色反应方法,检测细胞或组织的成分(具有抗原或半抗原的成分),在显微镜下(如光学显微镜,荧光显微镜,激光共聚焦显微镜或电子显微镜)观察细胞的呈色反应,进行定位、定性和定量。免疫细胞化学与免疫组织化学的不同之处在于前者是以完整细胞的标本进行的免疫染色。在大多数情况下,所指的完整细胞是去除了细胞外基质的细胞,包括培养细胞、悬液沉淀物或细胞涂片等。免疫组织化学所使用的标本是组织切片,有特定的组织结构,包括完整组织内的不同细胞和细胞间质成分。

自从 Coons 等(1941 或 1950)发明了荧光免疫细胞化学以来,Nakane(1968)创立酶标记抗体技术,Sternberger(1970)等发明了辣根过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)技术,许世明(1981)创建了亲和组织化学方法-亲和素和生物素(ABC)方法。Danscher(1981)建立了免疫金银染色方法(IGSS),免疫电镜技术以及定量免疫细胞化学方法等相继创立。近年来多聚螯合物酶方法的问世,是免疫细胞技术又一个创新。原位分子杂交技术与免疫细胞化学的结合,使该技术发展为原位检测基因(核酸)和其表达产物(肽和蛋白质)的系列分子原位检测技术,把细胞形态,基因及其表达产物的分子水平联系了起来。因此免疫细胞化学技术不断发展进步,已发展成为生命科学的一门学科。

免疫细胞化学具有很高的特异性和敏感性,方法统一,简便易行。它能够将形态学的改变与功能代谢结合起来,技术不断创新,应用更加广阔,显示了其强大的生命力,在生命科学和医学等诸多领域的应用取得了惊人的成绩(在 Google 用 Immunocytochemistry 检索,可获得约 531 000 条结果,用 Immunohistochemistry 检索,获得约 5 790 000 条结果,截至 2010 年 8 月 10 日 10:23)。目前,单克隆抗体技术已给免疫细胞化学提供大量的特异性抗体,基因工程制造了各种用于分子杂交检测的核酸探针,在探索生命和疾病的分子机理,尤其是在病理的分子诊断,对疾病的治疗如靶向性治疗,以及科学研究中发挥着十分重要的作用。

第四军医大学病理学与病理生理学教研室从 20 世纪 60 年代初开始建立免疫细胞化学技术和创建全军重点建设免疫细胞化学实验室,具有较好的科研和教学条件。不断跟踪国际水平,相继建立了接近或达到国际水平的免疫荧光细胞化学技术,免疫酶细胞化学技术,亲和细胞化学技术,EnVision 技术以及 DNA 和 cDNA 分子探针的制备、HBV 分子杂交和原位分子杂交技术等,在科研和病理临床诊断中应用,获得许多成果和国家科技进步奖

(二等奖 2 个,三等奖 1 个)。研制了多种常用免疫细胞化学试剂(抗体和标记抗体)和分子探针(DNA、cDNA)供应全国使用。向全国、全军大力推广,培养了大批骨干人才,推动了全国免疫细胞化学的发展和广泛应用。

1978 年第四军医大学将免疫细胞化学列入硕士研究生课程,也是全国首次为研究生开设此门课程,每年有大量研究生选修。经几届研究生讲课和实验的教学实践,不断完善教学计划、教材和教学方法,提高教学质量,进一步得到了领导的重视,被列入硕士研究生重点建设课程,也得到全校许多学科硕士导师们和学员们的青睐,每届选课学员 80~120 人,30 年来近 3000 名硕士研究生和课程班学员获得本科目学分,学习了解免疫细胞化学和分子杂交的基本理论,学会了基本操作技术。30 年来,许多研究生在研究中应用了这一先进技术,为完成科研实验提供了先进实用的分子检测手段,有一些获得了国际先进水平的研究成果。

30 年来教研室的全体教授积极参加免疫细胞化学教学工作,教学内容不断丰富,教学方法不断改进,尤其是教材建设已形成全国通用教材,引起了国家卫生部的重视,对全国研究生教学内容的充实发展起到一定的作用。参加教学的各位教授作出很多贡献。他们都是相关领域的专家,具有丰富的经验和应用的体会,给学员讲历史回顾、原理、方法、应用、问题和展望;讲他们的思路 and 经历的成功和失败,启发研究生的自主思维和培养创新能力。

免疫细胞化学课程总学时为 40~60 学时,共 2 学分。课程负责人先后有王伯沅、李玉松、王文勇。授课人先后有王伯沅、刘彦仿、王文亮、隋延仿、黄高昇、李青、王瑞安、杨守京、王哲、叶菁、黄晓峰、李玉松、王文勇、闫庆国、郭双平、李增山、晏伟、张静、赵一岭。

免疫细胞化学教学目的是使硕士生认识免疫细胞化学的先进性、实用性,掌握或了解各种技术的基本原理、方法、结果、应用、最新发展动态、问题和展望,了解每种技术的优缺点和适用范围,知道自己如何选择。启发研究生的自主思维和培养创新能力,通过实验操作,培养动手能力和实验技能。

课程的教学要求为掌握免疫荧光技术、免疫酶及免疫胶体金与亲和细胞化学技术的基本原理和应用;掌握荧光素、酶及胶体金标记抗体的基本原理;掌握原位核酸分子杂交的原理和方法以及应用;掌握定量图像分析的原理和方法;了解细胞和组织切片技术和免疫电镜技术的常规标本处理和制备技术;掌握免疫荧光直接法和间接法、PAP、ABC、SP、EnVision、CSA、免疫金银的染色技术,对照实验,结果判断;了解常用试剂的配制和有关仪器的使用。

所使用的教材包括《实用免疫细胞化学》(1988 年,四川科技出版社,蔡文琴、王伯沅主编),《免疫组织化学》(1990 年,人民卫生出版社,刘彦仿主编,王伯沅参编),《实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术》(1994 年,四川科技出版社,蔡文琴、王伯沅主编),《病理学技术》(2000 年,人民卫生出版社,王伯沅、李玉松、黄高昇、张远强主编),《组织病理技术》(2002 年,人民卫生出版社,王伯沅主审,李甘地主编,李玉松参编),《免疫荧光细胞化

学示教影片》(1986年,王伯沅主编,四医大电教中心摄制)。

本书就是30年免疫细胞化学课程中的主要讲习内容。参加本书的编者都是担任本课程的主讲教授,他们都具有所讲内容深厚的理论基础和熟练的技术经验,以及应用获得的丰富成果。本书具有较高的科学性、先进性、启发性,实用性强,能指导操作和启发读者如何使用。本书既有基础理论又有国内外的最新进展,作为研究生教材,对生命科学,尤其是医学科学工作者具有重要参考价值。

本书承蒙王伯沅教授审阅,并提出了宝贵意见。编写过程中,得到各位编者的积极支持和参与,黄晓峰教授给予了更多协助。研究生院、基础部和教研室领导给予宝贵的指导和支持,在此深表谢意。书中参考了一些网络资料,未能一一注明出处,特此致歉,并向原作者表示感谢。

本书中难免有不正之处,望读者批评指正。

王文勇 王伯沅
2010年8月11日

目 录

第一章 病理学组织制片常用技术	(1)
第一节 组织标本取材	(1)
第二节 组织标本固定	(3)
第三节 组织脱钙	(10)
第四节 组织冰冻切片	(13)
第五节 常规 HE 染色	(18)
第二章 免疫细胞化学及其进展	(24)
第一节 免疫细胞化学概述	(24)
第二节 免疫组织化学的特点	(25)
第三节 免疫组织化学在我国的推广应用	(26)
第四节 免疫组织化学的新进展	(27)
第五节 在肿瘤靶向性用药筛选检测中的应用	(29)
第三章 免疫细胞化学基础理论	(31)
第一节 抗 原	(31)
第二节 抗 体	(34)
第三节 补体系统	(39)
第四节 免疫细胞化学的有关基本技术方法	(40)
第五节 抗原修复	(44)
第四章 免疫荧光组织化学技术	(50)
第一节 免疫荧光组织化学技术的发展史概述	(50)
第二节 免疫荧光组织化学的原理	(50)
第三节 荧光抗体的制备	(53)
第四节 免疫荧光组织化学染色方法	(57)
第五节 荧光显微镜检查方法	(59)
第六节 非特异性染色的消除方法	(60)
第七节 现状与展望	(61)
第五章 自身抗体免疫荧光组织化学检测	(64)
第一节 自身抗体的免疫组织化学检测方法	(64)
第二节 用免疫荧光组织化学方法可检查的主要自身抗体	(67)

第三节 自身抗体产生的机制	(81)
第六章 免疫酶细胞化学技术	(85)
第一节 酶的标记与染色方法	(85)
第二节 新的多聚螯合物酶免疫组织化学方法	(97)
第三节 染色结果及判断	(101)
第七章 亲和免疫细胞化学技术	(108)
第一节 生物素-抗生物素免疫细胞化学技术	(108)
第二节 葡萄球菌蛋白 A(SPA)	(114)
第三节 凝集素	(118)
第四节 其他亲和细胞化学	(126)
第八章 免疫金标记细胞化学技术	(129)
第一节 免疫金技术的基本原理	(129)
第二节 溶胶的基本概念	(130)
第三节 胶体金的制备	(132)
第四节 胶体金标记	(136)
第五节 光镜免疫金组织化学技术	(141)
第六节 光镜免疫金银组织化学技术	(143)
第七节 免疫胶体金快速诊断技术	(147)
第九章 免疫电镜技术	(155)
第一节 基本原理和主要标记技术的特点	(155)
第二节 铁蛋白标记免疫电镜技术	(156)
第三节 酶标记免疫电镜技术	(158)
第四节 胶体金标记免疫电镜技术	(162)
第五节 其他免疫电镜技术	(166)
第六节 免疫电镜技术实验步骤	(170)
第七节 免疫电镜的影响因素	(177)
第十章 免疫组织化学双标和多标记技术	(180)
第一节 双标和多标的意义	(180)
第二节 双标和多标的基本原理和方法	(180)
第三节 双重免疫荧光标记	(184)
第四节 双重免疫酶染色	(186)
第五节 其他双重免疫染色方法	(190)
第六节 电镜下的双重及多重免疫标记	(191)

第十一章	核酸分子杂交技术	(197)
第一节	核酸分子杂交技术原理	(197)
第二节	探针的种类和标记及制备	(197)
第三节	核酸分子杂交的种类和方法	(198)
第四节	原位核酸分子杂交技术	(203)
第五节	荧光原位杂交技术	(219)
第六节	原位 PCR 检测技术	(220)
第七节	电镜原位核酸分子杂交技术	(222)
第八节	双重原位杂交方法	(223)
第九节	原位杂交结合免疫细胞化学双标记法	(224)
第十节	生物芯片技术	(225)
第十二章	细胞凋亡检测	(227)
第一节	凋亡的形态学改变	(228)
第二节	凋亡的 DNA 断裂检测	(230)
第三节	凋亡的细胞膜结构改变检测	(234)
第四节	凋亡的线粒体膜电位检测	(235)
第五节	凋亡相关蛋白的检测	(236)
第十三章	计算机图像分析方法及应用	(238)
第一节	基本概念	(238)
第二节	计算机图像分析系统	(239)
第三节	计算机图像分析方法	(239)
第四节	DNA 倍体的计算机图像分析原理和方法	(240)
第五节	计算机图像分析在病理学中的应用	(241)
第十四章	荧光原位杂交技术	(248)
第一节	荧光原位杂交的原理	(248)
第二节	荧光原位杂交的特点	(249)
第三节	荧光原位杂交实验方法	(249)
第四节	FISH 的临床应用	(251)
第十五章	激光扫描共聚焦显微镜技术	(256)
第一节	激光扫描共聚焦显微镜技术的发展简史	(256)
第二节	激光扫描共聚焦显微镜的基本原理	(258)
第三节	共聚焦显微镜图像模式	(259)
第四节	激光扫描共聚焦显微镜的标本制备和图像采集	(263)
第五节	激光扫描共聚焦显微镜的应用	(269)

第十六章	显微组织(细胞)切割技术	(285)
第一节	激光捕获显微切割发展简史	(285)
第二节	激光捕获显微切割的分类和原理	(286)
第三节	激光捕获显微切割的应用	(288)
第四节	激光捕获显微切割的优点和存在的问题	(290)
第五节	激光捕获显微切割的展望	(291)
第十七章	组织芯片技术及其应用	(295)
第一节	组织芯片的发展历史与展望	(295)
第二节	组织芯片的分类	(296)
第三节	组织芯片的制作	(296)
第四节	组织芯片技术的应用	(299)
第五节	组织芯片技术存在的问题	(300)
第十八章	淋巴造血组织及其肿瘤的免疫组织(细胞)化学	(303)
第十九章	免疫组化在神经系统肿瘤诊断中的应用	(311)
第二十章	免疫病理技术在肾活检组织中的应用	(315)
第一节	免疫病理技术在肾小球疾病中的应用	(315)
第二节	免疫病理技术在肾移植中的应用	(319)

第一章

病理学组织制片常用技术

第一节 组织标本取材

一、组织取材的一般要求

1. 标本的大体检查及取材应按编号顺序进行,检查前应阅读申请单上各项主要内容,然后取出全部标本,核对无误后再进行检查(不透明的标本瓶应仔细查看,防止小块标本遗留在瓶内)。

2. 扼要地描写标本大小、形状,表面和切面的颜色、硬度、病变部位、大小、形状、特点和周围组织的关系等。某些器官如甲状腺、肾脏、脾脏及某些肿瘤如甲状腺肿瘤等必须记录重量,先描写主要病变,后描写次要病变,必要时以绘图或摄影说明。

3. 剖检标本时,应注意暴露标本的最大面积,以便全面检查,并应保留其特点,以备诊断、研究使用。

4. 结合病情、手术所见和大体检查的结果,选择性切取组织,例如,肿瘤组织,切取瘤体或包括瘤体交界处一起切取;肠道组织,为了寻找病变所在部位,通常剖开肠管检查后切一长条肠道组织。切取时最好保留病变和病变交界处的组织,可作为病变组织的对照。根据研究需要一般取材原则如下。

(1)小件标本:每块检查完之后全部取材作为包埋和切片,可能时一半作为包埋和切片,一半保存备用,以便重复检查或做特殊检查时使用。若标本太小,应该选用细孔组织脱水包埋盒脱水或用拭镜纸包裹后放入组织脱水包埋盒中脱水,以防组织脱水处理时遗失(图 1-1)。

(2)肿瘤:尤其是恶性肿瘤标本,除了在肿瘤部位取组织块之外,还要在被手术切除的标本断端及病变边缘等部位取组织块做检查。局部淋巴结必须逐个取材切片进行显微镜检查,以便明确肿瘤侵犯范围和转移情况。

二、组织标本取材方法

1. 组织块取材厚度 2~4mm 为宜,一般不超过 5mm。取材刀要锋利,切面要平整。不能用剪刀剪取组织,防止出现人为的组织挤压现象。须注明其形状、数目、切取部位(如左、

右、上、下等),如有特殊要求,应向技术人员交代清楚(图 1-2)。

2. 在标本取材时,每一例标本取好之后,剩余的标本,应放回原送检容器中妥善保存,直到发出病理报告之后再行处理。取材所用的工具必须用流水和纱布擦洗干净后再取下一例标本,以免互相污染,造成误诊。

3. 标本取好之后必须附上标本来源编号,每一例都要有标本来源编号。需要特殊标记时可在来源号末尾缀加英文字母或汉字。末尾缀加英文字母表示的内容要记录在病理送检申请单的记录项目中。例如,肠切除的标本取材,来源号为 0900001,上切缘以 0900001A 表示,下切缘标为 0900001B,并分别放于组织脱水包埋盒中(图 1-3)。

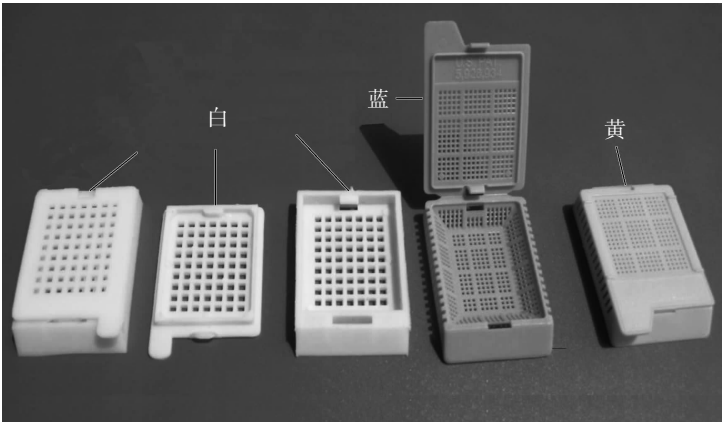


图 1-1 不同类型的脱水包埋盒

注:图片中白色为粗孔包埋盒,蓝色和黄色为细孔包埋盒。包埋盒有白色和彩色,一般常规使用白色,特殊目的为了区分选用不同颜色的包埋盒。包埋盒有粗孔和细孔之分,大块组织选用粗孔而细小的组织选用细孔包埋盒

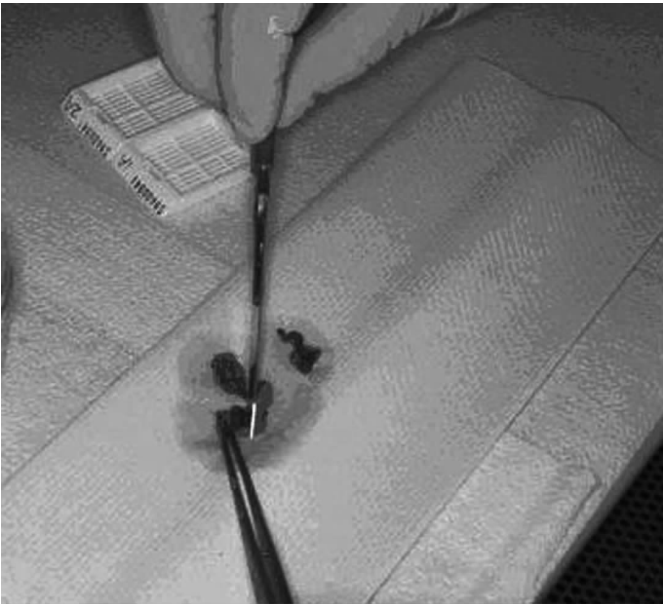


图 1-2 切取组织

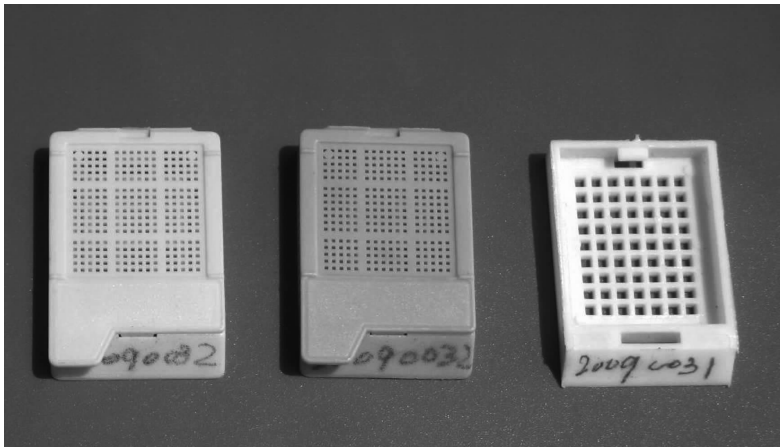


图 1-3 在脱水包埋盒上用铅笔标记病理检验号

- 4. 不同病例的组织绝对不能放到同一个脱水包埋盒中脱水处理。取材需要记录块数,特点及制片时注意事项,要认真与送检单核对,防止张冠李戴,然后放入组织脱水机中脱水。
- 5. 用特殊固定液固定的标本,制片过程有特殊处理要求时应向技术人员交代清楚。如含汞固定液固定的组织常需要脱汞处理后再进行脱水处理。
- 6. 骨组织和有钙化的组织应进行脱钙处理。
- 7. 除了冰冻切片之外组织切除后应及时固定,组织取材越新鲜越好,固定越及时越好。组织经过取材→固定→修切→组织装入脱水包埋盒里,然后再用铅笔或专用打号机把来源号标记在该组织的脱水包埋盒上。
- 8. 取材完成后将脱水包埋盒及标本继续放入固定液中固定,防止长时间暴露在空气中,以防影响组织制片。组织充分固定后应及时进行脱水处理。脱水完成后应及时包埋组织。一般包埋后组织在包埋块中非常稳定,组织包埋块可以常温长期存放,一般 1~2 年内对研究结果不会有影响。
- 9. 取材用的器械要用 1%新洁尔灭溶液浸泡消毒,工作台面和取材板可用 0.2%~0.4%过氧乙酸溶液擦拭消毒,此外,还应用紫外线对取材室进行空气和物体表面消毒,室内用紫外线消毒时物品应保持清洁、干燥,温度不低于 20℃,相对湿度不超过 50%。照射剂量不应低于 90 000 μ W·s/cm²,一般照射 20~30min。

第二节 组织标本固定

一、目的和作用

固定是组织学和细胞学技术研究工作的基础。目的是使细胞和组织尽可能保存的和生活状态一样。因此,组织块、冰冻切片或细胞涂片通常需要放入固定剂中固定。固定剂的作用主要是阻止内源性溶酶体酶的自溶,抑制细菌和霉菌生长,防止组织腐败。总之,固定