

分子病理生物学 实验技术指南



PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

分子病理生物学实验技术指南

FENZI BINGLI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU ZHINAN

主 编 朴英实 林贞花

副主编 尚永军 延光海 全成实 刘双萍 金铁峰 任香善

编 者 (以姓氏笔画为序)

王晓燕 长春中医药大学

孔界男 延边大学医学院

石英爱 吉林大学白求恩医学院

朴英实 延边大学医学院

朴俊杰 延边大学医学院

任香善 延边大学医学院

延光海 延边大学医学院

全成实 吉林大学白求恩医学院

刘双萍 延边大学医学院

刘树森 延边大学医学院

齐 玲 吉林医药学院

张永吉 延边大学医学院

林贞花 延边大学医学院

尚永军 内蒙古赤峰学院

金 丹 延边大学医学院

金 光 延边大学医学院

金艳花 延边大学医学院

金桂花 延边大学医学院

金铁峰 延边大学医学院

金海丹 延边大学医学院

赵丽薇 吉林医药学院

高文斌 大连大学附属中山医院

崔 弘 延边大学医学院

崔明花 延边大学医学院



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

分子病理生物学实验技术指南/朴英实,林贞花主编. —北京:
人民军医出版社,2015.5

ISBN 978-7-5091-8345-8

I. ①分… II. ①朴…②林… III. ①分子生物学—病理
学—实验—指南 IV. ①R36-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 073735 号

策划编辑:王琳 文字编辑:杨静 袁朝阳 责任审读:周晓洲

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927409

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印、装:三河市潮河印业有限公司

开本:850mm×1168mm 1/32

印张:9 彩页 8 面 字数:230 千字

版、印次:2015 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001—2500

定价:35.00 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

内容提要

本书共 4 章,内容涵盖了常用病理染色、常用细胞实验、分子生物学实验及动物实验在内的基本生物医药科研所需的常用实验手段。为辅助研究生及本科生更好地开展科研工作,书中对相关实验技术的基本原理均做了必要的介绍。本书的主要特点是每个实验都融入了编者在实践中的自身体会和经验,部分章节标注的实验注意点具有重要的指导价值,尽可能使初学者减少实验选择失误及操作失误。本书集实验教学的实用性和科学研究的前瞻性于一体,既适合研究生、本科生教学与开展科研工作,也可作为参考书供从事分子生物学研究的相关人员使用。

前 言

分子病理生物学是应用分子病理学和分子生物学的理论、技术和实验方法,检测器官、组织、细胞或体液中的核酸、蛋白质等生物大分子,研究和阐明疾病发生发展过程及其机制,为疾病的预防、临床诊断和治疗提供新的检测生物分子指标和基因靶点的交叉学科。

近二十年来,我国的分子病理生物学实验研究有了日新月异的发展,已经深入到医学、药学、生物学等各个领域的研究中。古语云“工欲善其事,必先利其器”,生物医学科研领域的重要研究利器就是分子病理生物学技术,对其技巧的掌握及对其原理的理解在一定程度上决定了科学研究水平。本研究团队创建十余年,主要研究方向为肿瘤分子病理学及遗传学,集纳了十几位分子生物学领域优秀的海外归来的专家及国内博士,主编及部分编者具有在美国约翰·霍普金斯大学、日本金泽大学、韩国高丽大学等国际知名院校的多年研究经历,熟练掌握了丰富的分子病理生物学实验技术。编者们的漫长的研究经历中,都收获了自己研究领域珍贵的实践研究经验。本书集众人之力,以每位编者最为熟悉和擅长的研究领域为基础,编写而成。全书共4章,内容涵盖常用病理染色、细胞实验、分子生物学实验及动物实验在内的基本生物医药科研所需的常用实验手段,以辅助研究生及本科生开展科研工作为目的,侧重各个技能的实用性,部分章节标注的实验注意点更

是各位编者在科研实践中总结的宝贵经验,具有重要的实验指导价值。本书对各个实验技术的基本原理均做了必要的介绍,争取让读者知其然,亦知其所以然。

通过各位编者近两年的整理编撰,《分子病理生物学实验技术指南》一书终于完成。本书的特点为简明、实用,可以作为研究人员实验操作的手边书,能为从事分子生物学研究人员提供一定的指导和参考作用。

本书若存在疏漏和错误,敬请各位同行批评指正,以便再版时进一步更新完善。

林贞花 朴英实

2014年12月28日

目 录

第1章 组织病理染色.....	1
第一节 苏木素-伊红染色	1
一、制作切片	2
二、HE 染色	5
第二节 特殊染色.....	6
一、特殊染色的意义	7
二、常见的几种特殊染色	7
第三节 免疫组织化学染色	16
一、防脱片的制作.....	16
二、免疫组织化学染色.....	16
第2章 细胞实验	21
第一节 细胞培养基础	21
一、操作前准备.....	22
二、细胞复苏.....	22
三、细胞消化.....	23
四、细胞传代、接种	24
五、细胞冻存.....	24
六、细胞计数.....	25
七、原代细胞培养.....	27
八、常用细胞培养基及其配制方法.....	31
九、细胞污染及解救方法.....	34

第二节 细胞功能实验	36
一、肿瘤细胞生物学特性	36
二、体外培养细胞生物学检测方法	38
三、细胞增殖检测-MTT 实验	40
四、细胞转染	42
五、划痕实验	47
六、集落(克隆)形成实验	48
七、迁移实验和侵袭实验	53
八、细胞内抗氧化活性测定	55
九、细胞凋亡和自噬检测	59
第三节 三维细胞培养	84
一、三维成球培养	85
二、三维胶原支架材料细胞培养	89
第3章 分子生物学实验	99
第一节 质粒制备、提取	99
一、操作前准备	99
二、菌落制备主要环节	100
三、质粒提取	101
四、培养基配方	103
第二节 分子提取方法	104
一、总 RNA 提取	105
二、DNA 提取	111
三、蛋白提取	115
第三节 聚合酶链式反应	122
一、操作前准备	123
二、PCR 仪反应参数的设定	123
三、反应体系的准备	124
四、PCR 操作	126
五、PCR 产物的分析方法	127

六、PCR 产物电泳结果图异常及可能的原因	129
七、反转录 PCR	130
八、实时荧光定量 PCR	134
九、DNA 的 PCR 扩增	139
第四节 DNA 检测	140
一、DNA 测序	140
二、单核苷酸多态性检测	147
三、甲基化特异性聚合酶链反应	149
第五节 蛋白质检测	152
一、酶联免疫吸附试验	152
二、蛋白印迹法	156
三、凝胶迁移或电泳迁移率实验	170
四、体外 SUMO 修饰实验	174
五、免疫共沉淀	178
六、免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察	182
七、双荧光素酶报告基因检测	187
第六节 染色质免疫共沉淀	191
一、实验原理	191
二、实验注意点	192
三、基本流程	192
四、实验操作	193
第七节 流式细胞仪检测	195
一、流式细胞仪应用简介	196
二、细胞凋亡检测	197
三、细胞周期检测	199
四、DNA 倍体检测	202
五、表面抗原检测	213
六、细胞因子检测	216
七、细胞分选	221



第八节 基因芯片扫描检测	225
一、实验前准备	226
二、总 RNA 提取、纯化及检测	226
三、反转录合成单链 cDNA	227
四、Second strand cDNA 合成	228
五、体外转录合成 cRNA	229
六、aRNA 纯化	230
七、aRNA 质量检测	232
八、反转录	233
九、cDNA 纯化	234
十、荧光标记	236
十一、芯片的挑选及预处理	237
十二、芯片杂交	238
十三、芯片清洗、扫描	240
第九节 微卫星不稳定性检测	242
一、试剂	243
二、DNA 提取	244
三、DNA 质检及保存	244
四、聚合酶链式反应(PCR)	244
五、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	244
六、银染	244
七、阳性判定标准	244
第 4 章 动物体内实验	249
第一节 实验动物的捉拿及处死方法	249
一、捉拿法	249
二、给药方法	250
三、处死方法	253
第二节 动物模型制备	254
一、实验动物的选择原则	254

二、常用实验动物的特点	254
三、小鼠炎症性肠病模型制备	254
四、过敏反应小鼠模型制备	257
五、小鼠体内荷瘤模型制备	259
附录 A 英汉名词对照	264
彩图	275

第 1 章

组织病理染色

组织病理染色技术是医学领域中必不可少的基本实验方法,在教学、科研和临床病理诊断方面具有重要价值。组织病理染色技术主要利用各种染料的化学和物理学特性显示组织和细胞的形态结构,并研究疾病的病理变化及其发生发展过程。染色方法分为普通染色法和特殊染色法,普通染色法主要介绍最常用的苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)。

第一节 苏木素-伊红染色

组织易被碱性或酸性染料着色的性质称为嗜碱性(basophilia)和嗜酸性(acidophilia)。构成组织蛋白质的氨基酸种类很多,具有不同的等电点,普通染色中染色液的酸碱度(pondus hydrogenii, pH)为 6.0 左右时,细胞内的酸性物质(如细胞核染色质、腺细胞和神经细胞内的粗面内质网及透明软骨基质等)被碱性染料染色,称为嗜碱性;而细胞质中的其他蛋白质(如红细胞的血红蛋白、嗜酸粒细胞的颗粒及胶原纤维和肌纤维等)被酸性染料染色,称为嗜酸性。染色液的 pH 可直接影响染色反应,当染色液的 pH 升高时,原来的嗜酸性物质可被碱性染色液着色变为嗜碱性,当染色液的 pH 降低时,原来的嗜碱性物质可被酸性染色液着色变为嗜酸性。

苏木素-伊红染色法是石蜡切片的常规染色方法,能较好地显示组织结构和细胞形态,用于观察、描述正常和病变组织的形态学,并可保存较长时间。碱性苏木素(hematoxylin)染料容易与带

负电荷/呈酸性的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)磷酸基以离子键方式结合,故细胞核内的染色质与胞质内的核糖体呈紫蓝色。化学合成的酸性伊红(eosin)染料在水中解离成带负电荷的阴离子,并与蛋白质氨基带正电荷的阳离子结合,将细胞浆、红细胞、肌肉、结缔组织、嗜伊红颗粒等染成不同程度的红色或粉红色。

一、制作切片

(一)取新鲜组织和固定

动物或人体中取新鲜组织,立即放入 10% 福尔马林(formalin)或 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde)固定液固定 24~72h,根据组织大小可调节固定时间。

(二)固定液

固定液有福尔马林的简单固定液和 Bouin 固定液等复合固定液。一般固定液的量要超过标本体积的 5~10 倍。

固定液的配制方法

1. 配制 10% 福尔马林 1L 配方如下。

甲醛 100ml

蒸馏水 900ml

2. 配制 10% 中性福尔马林(pH 7.0) 1L 配方如下。

甲醛 100ml

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4g

Na_2HPO_4 13g

蒸馏水 900ml

3. 配制多聚甲醛 用于免疫组织化学染色或免疫细胞化学染色。

(1) 配制 A 液(磷酸二氢钠溶液): 1L 配方如下。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2g

蒸馏水 1L

(2) 配制 B 液(磷酸氢二钠溶液):1L 配方如下。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6g

蒸馏水 1L

(3) 配制磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)液:1L 配方如下。

A 液 95ml

B 液 405ml

蒸馏水 500ml

用 NaOH 调整 pH 至 7.4。

(4) 配制 4%多聚甲醛:1L 配方如下。

多聚甲醛 40g

PBS 液 1L

* 因多聚甲醛难溶,故边加热边漩涡溶解(避免沸腾)。

4. Bouin 固定液 100ml 配方如下,用于组织学和免疫组织化学固定。

苦味酸(Picric acid)饱和水溶液 75ml

甲醛 25ml

冰醋酸 5ml

5. Carnoy 固定液 100ml 配方如下,用于染色体、DNA、RNA 和糖原的固定。

无水乙醇 60ml

冰醋酸 10ml

三氯甲烷 30ml

(三)石蜡标本制备

1. 洗涤 材料经固定后,流水冲洗数小时或过夜。

2. 取材 取材目的要明确,根据取材规范取病变组织和其周围正常组织,有疑问处重点取,变化不明显时全面取。尽量在短时间(24~48h 为好)内取材,大小一般在 $1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ 。固定组织要在流水中冲洗 1h 以上再取标本。

3. 脱水 脱水是指用某些溶媒置换组织内水分的过程,为保护组织不被破坏,通常选用从低浓度至高浓度的梯度乙醇。一般步骤和时间参见表 1-1,自动石蜡标本处理机的程序和时间参见表 1-2。

表 1-1 不同厚度组织标本的脱水、透明、浸蜡步骤和时间

厚度 (μm)	时间(min)								
	80%	95%	95%	无水	无水	二甲	二甲		
	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	苯	苯	蜡	蜡
		I	II	I	II	I	II	I	II
<2	45~60	45~60	45~60	45~60	45~60	15~30	15~30	60	60
2~4	60~120	60~120	60~120	60~120	60~120	30	30	60	120
4~5	120~240	120~240	120~240	120~240	120~240	60	60	60~120	120~240

表 1-2 自动组织石蜡标本处理机的程序和时间

程序	处理时间(min)										
	80%	95%	95%	95%	无水	无水	无水	二甲	二甲		
	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇	苯	苯	蜡	蜡
		I	II	III	I	II	III	I	II	I	II
	60	90	90	90	60	60	60	60	60	90	60

4. 透明 组织脱水后,必须经过一种既能与乙醇相混合又能溶解石蜡的溶剂,通过这种溶剂的媒介作用使石蜡易浸入组织块。在此过程中,因组织块中的水分被溶剂所取代,组织块变得透亮,因此称之为透明。二甲苯是目前常用的透明剂。

5. 浸蜡 组织经透明后在溶化的石蜡内浸渍的过程称浸蜡。一般用于浸蜡的石蜡熔点为 $56\sim 58^{\circ}\text{C}$ 。

6. 包埋 组织块经过浸蜡或浸透后,用石蜡、火棉胶、碳蜡和树脂等包埋剂包起的过程称包埋。包埋后便制成含组织的块,这

种包埋块可使组织达到一定的硬度和韧度,有利于切成薄片。石蜡包埋是病理日常工作中最常用的包埋方法。用于包埋的石蜡熔点一般为 60°C 左右。但在有些情况下,如某些酶染色时,则需采用低温石蜡包埋,以保存组织内酶的活性。

7. 防脱片的制作 用于免疫组织化学染色或需热处理的特殊染色

(1) 将普通载玻片浸泡于“84 消毒液”中 $1\sim 2\text{h}$ 。

(2) 洗洁精清洗,蒸馏水清洗数次。

* 一张一张手洗,确保片子上没有杂质。

(3) 56°C 烤箱烘干至少 1h 。

(4) 每张载玻片涂抹多聚赖氨酸若干(均匀铺平)。

(5) 56°C 烤箱烘干 $0.5\sim 1\text{h}$ 。

8. 切片和制片 石蜡切片常用的切片机有轮转式和平推式,多用轮转式切片机,切片厚度一般为 $3\sim 5\mu\text{m}$ 。切片时先将组织片平摊于一块玻璃上,迅速滴加 30% 乙醇水溶液使组织片完全展开,再移入 40°C 恒温热水器中。也可直接将组织切片移入 40°C 的恒温热水器中,待组织片完全展开后将其贴附于载玻片上,经 $56\sim 60^{\circ}\text{C}$ 烤片 $30\sim 60\text{min}$ 后即可进行染色。

二、HE 染色

(一) 操作前准备

Harris 苏木素、 0.5% 伊红(醇溶液)、二甲苯 1 瓶、无水乙醇 2 瓶、 1% 盐酸水溶液、中性树胶封片剂等。

(二) 操作步骤

1. 58°C 烤石蜡标本载玻片 1h 至溶蜡。

2. 脱蜡、水化,二甲苯(Ⅰ) $5\sim 10\text{min}$ → 二甲苯(Ⅱ) $5\sim 10\text{min}$ → 95% 乙醇(Ⅰ) $1\sim 3\text{min}$ → 95% 乙醇(Ⅱ) $1\sim 3\text{min}$ → 80% 乙醇 1min → 蒸馏水 1min 。

3. 苏木精液染色 5min

* 染色时间应根据染液的新鲜度和着色力适当调整。

4. 流水稍洗去苏木精液 8s。

5. 1%盐酸乙醇 7s。

* 盐酸分化要恰当,分化不足导致核和浆的共染,分化过度会造成核染色过浅。

6. 稍水洗 10~30s,促蓝液反蓝 10~30s。

* 水洗蓝化时间应充分,以防褪色。

7. 流水冲洗 10~15min,蒸馏水稍洗 1~2s。

8. 0.5%伊红液染色 1min。

9. 蒸馏水稍洗 1~2s。

10. 80%乙醇稍洗 1~2s→95%乙醇(I)3~5min→95%乙醇(II)3~5min→无水乙醇(I)5~10min→无水乙醇(II)5~10min→二甲苯(I)3~5min→二甲苯(II)3~5min→二甲苯(III)3~5min。

11. 中性树脂封片,贴标签,写编号

* 注意防止盖玻片封片时气泡的产生,影响镜下观察。

12. 镜下观察结果:细胞核呈深蓝色,胞质及纤维组织呈深浅不等的粉红色(彩图 1-1)。

第二节 特殊染色

特殊染色是指专门用于显示某些特定目的物质的选择性染色方法。特殊染色方法按所染目的物质进行分类,染色物有结缔组织、肌肉组织、神经组织、性染色质、骨、血液、造血组织、脂类、糖类、色素、内源性沉着物、病原微生物、内分泌物质、核酸和酶类等。特殊染色的命名至今尚无统一的规定:多数以发明者的姓名命名,如 Van Geison 染色等;部分按所用染色剂命名,如甲基绿-派若宁染色等;也有按所染目的物质命名,如网织纤维染色;还有采用混合命名,如试剂+人名等。

特殊染色方法对目的物质的选择性染色具有相对性,一种方