



研究生教学丛书



现代实验病理技术

XIANDAI SHIYAN BINGLI JISHU

主编 彭瑞云 李 杨

第2版 2015年5月第1次印刷

现代实验病理技术

MODERN EXPERIMENTAL PATHOLOGY TECHNOLOGY

王健 王健 王健

科学出版社

现代实验病理技术

Modern Experimental Pathological Technology

主 编 彭瑞云 李 杨

副 主 编 高亚兵 刘 超

主 审 王德文

编 者 (以姓氏笔画排序)

王水明 王长振 王少霞 王丽峰

左红艳 刘 超 杨蕾蕾 李 杨

吴小红 张 静 赵 黎 姚斌伟

徐新萍 高亚兵 彭瑞云 董 霖

瞿文生

学术秘书 边 岳 王 惠

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内 容 提 要

本教材是针对病理学硕士研究生《实验病理学》教学、课题研究而编写的,是各位教员在长期从事研究生教学和科研活动基础上编写而成的,是他们从事科研、教学工作的经验总结,既有基础理论知识,更注重各种技术的操作性和实用性。内容分现代实验病理技术总论、常用病理技术、分子病理技术和病理相关实验技术等四篇。第一篇介绍实验病理技术总论和实验设计。第二篇介绍动物解剖与取材、切片的制作与染色、特殊染色技术、电镜标本制作技术、显微摄影等技术。第三篇介绍免疫组化、原位杂交、原位PCR、原位末端标记、原位荧光检测、免疫电镜和组织芯片等技术。第四篇介绍核酸、蛋白电泳及成像、比较基因组杂交、实时荧光定量PCR、基因工程、自由基检测、生理功能检测和生殖功能检测等技术。本教材内容丰富翔实,实用性强,是从事病理学、临床医学乃至分子和细胞生物学等学科研究生的必备教材,对科研人员、教育工作者及临床医生亦有重要的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

现代实验病理技术/彭瑞云,李杨主编.
—北京:军事医学科学出版社,2012.8
(研究生教学丛书)
ISBN 978-7-80245-997-7

I. ①现… II. ①彭… ②李… III. ①病理学—
实验技术—研究生—教材 IV. ①R36-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第170758号

策划编辑:易 凌 责任编辑:吕连婷 责任印制:丁爱军
出 版 人:孙 宇
出 版:军事医学科学出版社
地 址:北京市海淀区太平路27号
邮 编:100850
联系电话:发行部:(010)66931049
编辑部:(010)66931127,66931039,66931038
传 真:(010)63801284
网 址:<http://www.mmsp.cn>
印 装:中煤涿州制图印刷厂北京分厂
发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16
印 张:20(彩9)
字 数:486千字
版 次:2012年8月第1版
印 次:2012年8月第1次
定 价:50.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

《研究生教学丛书》编委会名单

主 任 徐天昊

副主任 张永祥 毛军文 孙岩松 王东根

委 员 王福庄 高杰英 颜贤忠 鲁显生 胡良平

吴志军 徐 雷 刁天喜 赵东升 刘兴林

彭瑞云 郑晓飞 陈肖华 杨 征 朱玲玲

于晓妩 汪 海 李君文 曹务春 秦鄂德

杨瑞馥 谢剑炜 王永安 宫泽辉 丁日高

李 松 梅兴国 徐新喜 杨 晓 梁 龙

章金刚 贾 红 王兴龙 张伟京 艾辉胜

尉承泽 陈建魁 刘传和 范 薇 王 宁

杨松涛 王 壮

秘 书 边 岳

序

凝聚着军事医学科学院专家教授、研究生导师和研究生教育工作者多年心血的《研究生教学丛书》于2008年开始陆续出版,并已成为研究生学习理论课程、完善知识结构的良师益友。

军事医学科学院是全军最高层次的多学科综合性医学科研机构及国家重要的综合性生物医学研究与高级人才培养基地,主要从事军事医学及相关基础医学、生物高新技术、新药研发等研究。作为国家首批博士、硕士学位授权单位,军事医学科学院自1965年开始招收培养研究生,是全军研究生培养规模最大的科研机构,学位授权学科涵盖理、工、农、医、管、军6个门类,拥有一级博士学位授权学科6个(生物学、生物医学工程、兽医学、基础医学、公共卫生与预防医学和药理学),实际招收培养研究生的二级博士学位授权学科25个、硕士学位授权学科33个,博士后流动站5个。通过多年实践积累,军事医学科学院形成了一整套既注重基础理论教学,又注重科研实践的研究生教育体系,先后为国家、军队培养和输送了以两院院士为代表的研究生4000余名,被誉为培养军事医学科研和疾病防控领域高层次人才的摇篮。

军事医学科学院研究生教育工作始终坚持质量第一的原则,着眼新时期军事医学人才需求,不断深化教学改革、优化课程设置,进一步提高了研究生的综合素质和创新能力。本套丛书既注重基础理论的学习与巩固,又面向科技发展前沿;既保持生物医学的系统性,又体现军事医学特色,力求理论性、系统性、前沿性、实用性的统一;同时,兼顾了不同层次读者的需求,不仅适合在校研究生学习,也可作为高等院校或科研机构专业人员的参考书。

“桃李不言,下自成蹊。”我相信,经过军事医学科学院一批又一批专家教授的深入研究与积极探索,《研究生教学丛书》必将结出更为丰硕的果实,引领更多的莘莘学子走进科学的殿堂,为军队乃至国家的医学科研事业做出积极贡献。

贺锡印

前 言

多年来,军事医学科学院病理学教研室的师生们一直盼望着能有一本供本院研究生使用的《现代实验病理技术》教材。在院科技部研究生处的大力支持下,经本院病理学与病理生理学教研室各位教员的共同努力,《现代实验病理技术》研究生使用教材终于和大家见面了。这本教材倾注了各位教员几年乃至几十年科研与教学的智慧,也汇集了他们的研究成果。各位教员在实际工作中收集、整理并参考有关资料,结合自己工作中的经验、体会和研究成果,从研究生教学实际出发,按照本院研究生教学大纲要求编写了该教材。

本书共分二十一章,内容主要有四方面:①实验病理技术和实验设计的基础知识与基本技能;②常用病理技术,包括动物解剖与取材、切片的制作与染色、特殊染色技术、电镜标本制作技术、显微摄影等技术;③分子病理技术,包括免疫组化、原位杂交、原位 PCR、原位末端标记、原位荧光检测、免疫电镜和组织芯片等技术;④病理相关技术,包括核酸、蛋白电泳及成像、比较基因组杂交、实时荧光定量 PCR、基因工程、自由基检测、生理功能检测和生殖功能检测等技术。内容丰富,理论密切联系实际,图文并茂,实用性强。相信《现代实验病理技术》教材的出版,必将对我院研究生教学和学位论文的完成有重要意义。

在该教材编写过程中,除得到本教研室各位教员的大力支持外,还得到军事医学科学院科技部研究生处的大力支持。此外,赵黎博士、王惠和孙成峰为本教材的收集整理、编排、目录和引言制作等付出了艰辛的劳动。在此一并致以衷心的感谢!

由于编者水平有限,时间紧迫,在编写过程中难免有遗漏和错误之处,敬请各位读者批评指正并提出宝贵意见,以期能更加完善和实用。

彭瑞云 李 杨
2012 年 8 月

目 录

第一篇 总 论

第一章 实验病理技术总论	(3)
第一节 绪论	(3)
第二节 常用病理技术	(5)
第三节 分子病理技术	(7)
第四节 实验病理技术方法选择	(12)
第二章 实验设计	(14)
第一节 绪论	(14)
第二节 实验设计的内容和类别	(15)
第三节 如何进行实验设计及注意事项	(16)

第二篇 常用病理技术

第三章 动物解剖与取材	(21)
第一节 实验动物的抓取、固定	(21)
第二节 实验动物的编号和分组	(25)
第三节 实验动物的给药方法	(26)
第四节 实验动物的麻醉	(29)
第五节 各种检验标本的采集方法	(31)
第六节 实验动物的处死	(36)
第七节 实验动物的解剖	(38)
第八节 组织取材	(40)
第九节 组织的固定	(40)
第九节 脱钙	(47)
第四章 切片制作与染色技术	(50)
第一节 概论	(50)
第二节 石蜡包埋技术	(51)
第三节 石蜡切片技术	(60)
第四节 冷冻切片技术	(65)
第五节 染色与染色剂	(67)

第五章 特殊染色技术	(81)
第一节 糖原染色	(81)
第二节 脂肪染色	(83)
第三节 尼氏小体染色	(85)
第四节 天狼猩红染色方法	(86)
第五节 弹力、胶原纤维双重组合染色法	(87)
第六节 AgNOR 染色法	(88)
第七节 病原微生物染色	(89)

第六章 电镜标本制作技术	(104)
---------------------	---------

第七章 显微摄影技术	(108)
第一节 显微摄影技术的原理	(108)
第二节 显微摄影的操作程序	(110)
第三节 显微摄影的应用和注意事项	(115)

第三篇 分子病理技术

第八章 免疫组织化学技术	(121)
第一节 概述	(121)
第二节 免疫荧光细胞化学	(125)
第三节 免疫酶细胞化学	(128)
第四节 亲和免疫细胞化学	(130)
第五节 免疫组织化学染色中常见的问题及对策	(134)

第九章 原位杂交技术	(143)
第一节 原位杂交的基本原理	(143)
第二节 原位杂交的主要过程	(144)
第三节 原位杂交的基本操作步骤	(149)
第四节 常用试剂的配制	(152)
第五节 原位杂交的应用	(154)

第十章 原位 PCR 技术	(157)
第一节 原位 PCR 概论	(157)
第二节 原位 PCR 基本原理与设计方案	(157)
第三节 原位 PCR 方法分类	(158)
第四节 几种常用的 IS PCR 方法和设计方案	(159)
第五节 原位 PCR 方法的选择	(161)

第六节	原位 PCR 基本步骤	(162)
第七节	主要试剂配制	(165)
第八节	原位 PCR 操作示例	(167)
第九节	原位 PCR 操作注意事项	(169)
第十节	原位 PCR 存在的问题和结果分析	(170)
第十一节	原位 PCR 的应用	(171)
第十一章	原位末端标记技术	(173)
第一节	原位末端标记法的概念	(173)
第二节	原位末端标记法的原理	(173)
第三节	原位末端标记法的方法	(173)
第四节	试剂配制	(175)
第十二章	原位荧光检测技术	(177)
第一节	免疫荧光技术	(177)
第二节	荧光原位杂交技术	(181)
第十三章	免疫电镜技术	(184)
第一节	免疫电镜技术概述	(184)
第二节	免疫电镜铁蛋白标记技术	(188)
第三节	酶标记免疫电镜技术	(190)
第四节	胶体金标记免疫电镜技术	(193)
第五节	其他免疫电镜技术	(200)
第十四章	组织芯片技术	(204)
第一节	生物芯片简介	(204)
第二节	组织芯片	(207)

第四篇 病理相关实验技术

第十五章	核酸、蛋白电泳及成像技术	(217)
第一节	核酸电泳	(217)
第二节	蛋白电泳	(221)
第三节	凝胶成像技术	(228)
第十六章	比较基因组杂交技术	(231)
第一节	比较基因组杂交技术概述	(231)
第二节	CGH 基本步骤	(233)
第三节	比较基因组杂交新方法	(235)

第四节	CGH 的应用	(237)
第十七章	实时荧光定量 PCR 技术	(240)
第一节	实时荧光定量 PCR 技术概述	(240)
第二节	实时荧光定量 PCR 的原理	(241)
第三节	实时荧光定量 PCR 的应用	(246)
第十八章	基因工程动物	(253)
第一节	转基因动物	(253)
第二节	基因敲除动物	(255)
第三节	大规模基因诱捕	(257)
第四节	基因干涉小鼠	(257)
第五节	基因工程动物的应用	(257)
第十九章	自由基检测技术	(260)
第一节	化学检测法	(260)
第二节	物理检测法	(261)
第二十章	生理功能检测技术	(268)
第二十一章	生殖功能检测技术	(282)
第一节	男性生殖功能检测技术	(282)
第二节	女性生殖功能检测技术	(300)
缩略词表		(304)

第一篇

总 论

<<< 第一章

实验病理技术总论

内容提要:实验病理技术的概念、发展史;实验病理技术的地位和重要性;常用病理技术和分子病理技术的内容提要、特点和方法选择等。

第一节 绪 论

一、病理技术的概念

病理技术是进行病理研究或临床诊断必不可少的方法或手段,它是相关学科在病理学中应用和交叉产生的。其他相关技术方法主要有生理和生化功能检测、蛋白和基因检测等分子生物学等技术。

二、病理技术的发展趋势

生物高新技术在病理学中的应用使病理学向两方面发展:一方面,由于计算机和图像分析技术的应用,使病理学由简单的形态描述向量化方面发展,由直接观察向远程运输“间接”观察,因此产生了定量病理学和远程病理学。另一方面,由于原位杂交、原位 PCR 和原位末端标记技术的诞生和在病理学中的应用,使病理学向分子病理学水平发展。近些年来,尤其是纳米技术的诞生,使人们对疾病的认识达到了原子水平。

三、发展简史

距今 2000 年前,仅有大体解剖和宏观病理;18 世纪中叶,出现了器官病理学(organ pathology),并认为是病理形态的开端;19 世纪中叶,光学显微镜问世,出现了细胞病理学(cellular pathology),至今仍广泛应用;20 世纪后,尤其是半个多世纪以来,由于电子显微镜的诞生,产生了超微病理学(ultra-pathology),使人们认识细胞的亚细胞结构、细胞器成为可能。尤其是 20 世纪以来,由于免疫学的进步及其在病理学中的应用,产生了免疫组化技术,使人们在蛋白水平检测基因表达和认识疾病。

20 世纪以来,由于生命带头学科如分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物化学等方法在病理学中的应用,产生了原位杂交(in situ hybridization, ISH)技术(起源于 20 世纪 60 年代末)、原位 PCR(in situ polymerase chain reaction, IS PCR)技术(诞生于 1990 年)和原位末端标记(in situ terminal end labelling, TUNEL)技术(诞生于 1992 年),使人们在基因水平检测认识基本的本质,因此产生了分子病理学(molecular pathology)。近 20 年来,由于原子力显微镜的

问世,使人们认识疾病达到了原子(纳米)水平。

病理学传统三水平:①整体:大体解剖、宏观;②组织:苏木素和伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,组织化学染色;③细胞。

细胞病理学三水平:①蛋白水平(基因表达产物、基因翻译):应用免疫组化和组织芯片技术进行研究;②mRNA水平(基因转录):应用ISH、IS PCR和组织芯片技术;③DNA水平:采用ISH、IS PCR、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)、组织芯片和原位末端标记(检测细胞凋亡)技术。

四、发展趋势

1. 技术手段的进步

(1)分子免疫学与病理学乃至整个形态学科(解剖学、组织学与胚胎学、细胞生物学、病理学、寄生虫学、传染病学)结合产生了免疫组织化学。

(2)分子生物学技术如探针、PCR和分子杂交与形态学科的结合,产生了ISH、FISH、CGH、IS PCR和原位末端标记技术。

(3)生物芯片技术与组织芯片技术的诞生,使规模化、集成化研究疾病分子机制成为可能。

(4)纳米技术和原子力显微镜的问世,使人们对疾病的认识达到了原子水平。

2. 研究内容的进步

(1)由“大海捞针”式探讨单个致病基因与疾病关系研究发展为人类基因组计划。

(2)阐明信号转导与疾病的关系。使人们认清疾病发生的信号转导机制,最终阐明其机制,以便寻求干预措施和防治疾病。

五、分子病理学和分子病理技术

1. 分子病理学 分子病理学是从分子水平研究患病机体生命现象的科学,是从分子水平研究疾病的发生、发展与转归机制的科学。它是分子生物学、细胞生物学、遗传学、生物化学和经典病理学互相渗透、交叉产生的。分子病理学的形成是分子生物学技术在病理学中应用的具体体现。

2. 分子病理技术 分子病理技术是在分子(蛋白和基因)水平研究患病机体的病因、病理改变、发病机制和转归等的手段和方法,也是在组织细胞原位检测蛋白或基因的方法,是分子生物学技术与经典病理学技术的结合。

分子生物学技术即蛋白、基因检测技术;经典病理技术即组织细胞固定、制片、染色等技术。与分子生物技术相比,分子病理技术的优点有:①蛋白和基因不用提取,直接进行原位检测;②蛋白和基因的检测与组织细胞形态相结合;③可进行基因和蛋白的定位及其组织分布的研究。

3. 分子病理技术和传统病理技术的区别 见表 1-1-1。

表 1-1-1 分子病理技术和传统病理技术的区别

	分子病理技术	传统病理技术
研究内容	遗传学、基因组和蛋白质组学	组织形态学
研究手段	分子生物学、遗传学、生物化学技术	HE、特染、光镜
研究对象	DNA、RNA、蛋白	组织、细胞
优点	灵敏、特异	金标准
缺点	要求高,难度大,影响因素多	主观判断

六、分子病理技术的地位

人类科学进步的历史和学科的发展是以研究方法与工具创新为先导。一项新技术的创立,将随之带来一批新的研究成果。在病理学领域中,由于系统解剖、光学显微镜、电子显微镜和免疫组化技术的问世,先后出现了器官病理学、细胞病理学和免疫病理学。原位杂交和原位 PCR 技术的兴起,又将病理学这门有着悠久历史的学科推进到了分子病理学水平。21 世纪是生命科学的世纪,分子生物学是生命科学的带头学科,随着生物高新技术在病理学中应用的不断增多,分子病理学将在此领域中占有越来越重要的位置。

第二节 常用病理技术

一、动物实验和解剖技术

为基本技术,如不同动物抓取、给药、辐射等模型制作;脏器解剖部位、正确取材等。

二、切片制作

主要包括冰冻和石蜡切片制作技术。

三、HE 染色技术

此技术为形态学观察最基本的技术,注意组织固定要彻底,染色时分化要适度。

四、组织化学(特殊染色)技术

方法多,有专著。根据不同目的,选用不同的方法。如特殊细胞(肥大细胞染色、神经元的尼氏体染色)、结缔组织(三联染色显示胶原、网状、弹力纤维)、糖原(PAS 染色)、脂肪(苏丹染色)、DNA(Feulgen 染色)、核仁组成区嗜银蛋白(AgNOR 染色)等。

五、电镜技术

有透射电镜和扫描电镜技术,常用的固定剂为 2.5%~3% 戊二醛;取材要及时,不宜过大

(一般 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$)。

六、免疫组织化学技术

1. 免疫组织化学 (immunohistochemistry) 是组织学的分支,它是用标记的特异性抗体(或抗原)对组织内抗原(或抗体)的分布进行组织原位的显示;是免疫学与组织学相互渗透、相互交叉而产生的一门学科。

2. 免疫组化技术 是在组织细胞原位检测抗原(或抗体)的一种方法,也是在蛋白水平原位检测基因表达的一种方法。

3. 免疫组化技术发展简史 1914年,Coons等人首次用荧光素标记抗体检测肺炎双球菌获得成功,开创了免疫组化的新时代。Sternberger改进并建立了辣根过氧化物酶-抗过氧化物酶(peroxidase anti-peroxidase, PAP)技术。20世纪80年代以后,生物素亲和素复合物(avidin-biotin complex, ABC)、碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶复合物(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase, APAAP)、标记的链亲和素生物素(labelled streptavidin-biotin, LSAB)法等,使免疫组化技术的应用更加广泛。近年来,由于ISH、流式细胞仪(flow cytometry, FCM)及图像分析(image analysis, IA)等技术的兴起和应用,使免疫组化引向基因水平和定量检测,形成新的分支——杂交免疫组化和定量免疫组化。20世纪90年代初,原位PCR技术诞生,免疫组化技术主要是用作原位PCR检测结果的化学放大和显示,标志着免疫组化又进入了一个新的发展阶段。

4. 免疫组化分类

(1)按标记物种类:免疫荧光法、免疫酶法、免疫铁蛋白法、免疫金法及放射免疫自显影法。

(2)按标记物标记的部位:直接法(一步法)、间接法(二步法)和桥联法(多步法)。目前应用最为广泛的为免疫酶法。根据三抗、酶的不同又分为PAP法、APAAP法、BA法、ABC法、LSAB法和SP法等。

5. 常用的免疫酶组织化学技术及其原理

(1)ABC: Ag—Ab1—Bio—Ab2—ABC—DAB(棕黄色)。

(2)PAP: Ab1—Ab2—PAP(鼠或兔)—DAB(棕黄色)。

(3)SP(LSAB)

1) Ab1—Bio—Ab2—SA—HRP—DAB(棕黄色)。

2) Ab1—Bio—Ab2—SA—AP—NBT 或 FR(紫蓝色或玫瑰红色)。

(4)APAAP: Ab1—Ab2—APAAP(鼠)—FR(玫瑰红色)。

(5)BA: Ab1—Bio—Ab2—BA—DAB(棕黄色)。

(6)免疫荧光: Ab1—荧光—Ab2(荧光显微镜直接观察)。

上述免疫酶组织化学技术及其原理中英文简略语的含义见表1-1-2。