

Z
U
Z
H
I
X
U
E

组织学

上海第一医学院 主编

人民卫生出版社

组 织 学

主 编

上海第一医学院

编 写

南 京 医 学 院	北 京 医 学 院
白 求 恩 医 科 大 学	中 山 医 学 院
四 川 医 学 院	武 汉 医 学 院
山 西 医 学 院	贵 阳 医 学 院
上 海 第 二 医 学 院	北 京 第 二 医 学 院
天 津 医 学 院	西 安 医 学 院
山 东 医 学 院	湖 北 医 学 院
湖 南 医 学 院	哈 尔 滨 医 科 大 学
遵 义 医 学 院	上 海 第 一 医 学 院

人 民 卫 生 出 版 社

内 容 介 绍

本书是我国自编的第一部大型组织学参考书，由上海第一医学院主编，联合18所医学院校组织胚胎学教师，结合各自的专长，协作编写而成。书中除对传统的组织学内容有详细深入的论述外，以较多篇幅介绍了各种组织的超微结构，并从结构出发联系功能，力求反映七十年代组织学的发展现状。全书共分25章，约100万字，附图700余幅。可作为组织学、解剖学科的基本教学参考书，医学其他学科及生物学科工作者、大学生也可参考。

组 织 学

上海第一医学院 主编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
(北京市崇文区天坛西里10号)

北 京 印 刷 一 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米 16开本 61 $\frac{1}{2}$ 印张 44插页 1376千字

1981年3月第1版第1次印刷

1983年12月第1版第2次印刷

印数：6,351—10,750

统一书号：14048·3903 定价：8.30元

前 言

我国的组织学教学工作多年来希望能出版一本国内自编的参考书。近十多年,组织学又有长足的进展,多种新技术应用于细胞学和组织学的研究,使其内容不仅在形态学的观察方面普遍深入到更微细的水平,而且与生物化学、生理学等日益密切地相互渗透,使组织学从形态描述发展到结构与功能相结合的组织生理的广阔领域。目前,组织学教学和师资培养工作,尤感需要一本既实用又能反映近代发展趋势、内容比较丰富的参考书。

1978年4月,在完成教科书编写的基础上,在人民卫生出版社的推动以及王有琪教授的指导和其他老教授的鼓励下,由18所医学院校组织胚胎学教研组共同协作,开始本的编写工作,经一年多时间完成了初稿。1979年10月各编写单位和出版社的代表,在北京讨论和修改了全书内容,会议期间承蒙南京医学院领导和组织胚胎学教研组的热忱帮助。此后,由成令忠、谷华运、郭仁强、何泽涌、杜卓民、尹昕、郭晓华七位同志组成审稿小组,又对全书进行了必要的审修和统一。各章插图除由编写单位绘摄外,白求恩医科大学组织胚胎学教研组、上海第一医学院电镜室、上海第二医学院电镜室和河北医学院组织胚胎学教研组等惠予提供若干电镜照片。薛同一、王鲁瑛二同志负责插图的整理、修改等技术性工作,并重新绘制了一些图。

本书内容的撰写,是根据组织学教学和师资培养的实际需要,努力汲取和反映国内近年发展的新成就和新资料。某些章节之间(诸如血液和淋巴与淋巴器官等),由于作选材不同以及有些问题至今还未取得一致认识,因此相关内容的阐述和看法不尽统一,读者参阅。此外,有些专业名词至今尚未核定统一,译名也很不同,我们尽可能参照用教科书和英汉医学词汇予以统一,或者经讨论后予以更改暂定。内容不妥和错误之处,希望读者提出批评指正。我们切望我国广大的细胞学、组织学工作者在今后的工作提出我们自己的资料和见解,使本书内容更加丰富和完善。

上海第一医学院组织胚胎学教研组 1980年1月

第一章 组织学、细胞学研究方法

活细胞观察法	2
兔耳或皮管透明窗法	2
组织培养或细胞培养	3
细胞融合术	3
差速离心和密度梯度离心	4
差速离心法	4
密度梯度离心法	4
机械显微操作法	5
激光显微光束照射法	5
细胞电泳	5
活体和体外活体染色	5
普通组织学标本制作方法	6
固定和固定剂	6
包埋和切片	7
染色	7
组织化学和细胞化学技术	8
组织化学和细胞化学染色法	8
荧光染色法	10
免疫组织学技术	10
直接染色法	10
间接染色法	10
放射自显影术	11
显微分光光度计	12
X射线显微摄影术	12
X射线衍射	13
特殊显微镜技术	14
相差显微镜术	14
荧光显微镜术	14
紫外线显微镜术	17
偏光显微镜术	17
干涉显微镜术	18
暗视野显微镜术	18
电子显微镜术	18
透射电子显微镜术	19

电镜组织化学方法·····	19
电镜放射自显影术·····	20
免疫电镜技术·····	20
冰冻蚀刻法·····	20
扫描电子显微镜术·····	21

在生物学和医学领域内，由于各种新的研究方法和研究技术的建立和发展，有关组织学和细胞学的研究，已积累了丰富的资料。特别是近 20 年来，细胞化学、细胞分子生物学以及细胞免疫学中的一些问题已取得和正在取得重大进展。因此，了解和掌握各种新的研究方法，对促进科学的发展有着非常重要的意义。本章将组织学和细胞学常用的研究方法概括为四类，即活细胞观察法、固定标本制作方法、组织化学、细胞化学技术和特殊显微镜技术。

活细胞观察法

兔耳或皮管透明窗法

兔耳或皮管透明窗法是直接观察活体内组织和细胞的分化及其生长变化的一种研究方法。

兔耳透明窗 兔耳透明窗是在兔耳壳上安装一个特制的透明窗，窗周围壁是由齿科塑料、有机玻璃和不锈钢金属等制成。窗的上、下两壁用透明的云母片或玻璃片构成。两层云母片或玻璃片之间留有间隙，可使周围组织能够伸入其间生长，形成极薄的组织层，便于在镜下观察。

皮管透明窗 在家兔躯干的一侧作一长 20~25cm 的皮管，然后切断一端，在游离端置入一个与透明窗类似的装置。这种透明窗由于皮管长，可将动物放在显微镜旁的特制笼中，实验者能长时间观察或进行间歇式缩时拍摄显微电影。

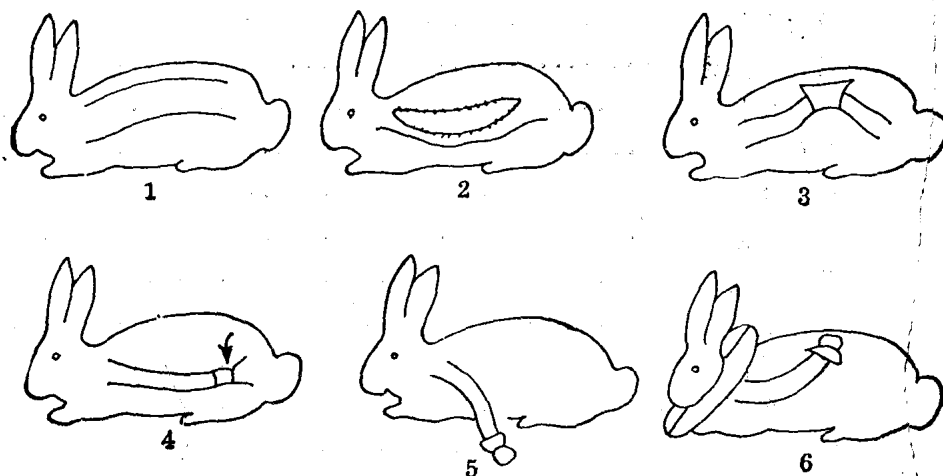


图 1-1 皮管成形术简图

1. 两条纵行切口 2. 缝合 3. 固定于背部 4. 切断 5. 切断以后 6. 固定于背部

兔耳透明窗和皮管透明窗均可以在显微镜下，直接连续观察活体组织的生长和细胞的分化过程，以及观察在各种实验条件下活体组织内微循环的变化。活体组织嵌入透明窗后，如立即观察，则可见两玻片间隙内充满血液，数日后血液被吸收，红细胞逐渐减少，白细胞增多。一周左右，可见透明窗周边部出现很多带突起的细胞。10天后，由周围组织开始向透明窗内生长肉芽组织，此时可以清楚地观察血管的发生和成纤维细胞的分化。

组织培养或细胞培养

动物细胞可以悬浮在适当的液体内，在显微镜下进行短时间观察，但不久就会自溶死亡。如对细胞进行较长时间观察，必须将它们放入含有它们生活所必需的无菌的营养液中，在适当的温度下进行体外培养，这种方法称为组织培养或细胞培养。组织培养作为一种研究方法，在二十世纪初已经被建立。古典的培养方法是將小块组织移植到含有胎汁的血浆凝块物中进行培养。在培养过程中，细胞呈放射状由组织块中移出，经过生长繁殖，在生长带内形成群聚的细胞层。近年来，在培养方法方面有了迅速的发展。分离的细胞用液体培养基培养，使细胞附着在培养瓶壁上，或附着在培养液中的盖玻片上，呈一单层细胞生长。并可以用毛细玻管分离单一细胞培养成纯细胞株，称为克隆(clone)。细胞在培养瓶中生长繁殖，并不断地从培养液中吸取营养和不断地排出代谢产物，因此，每隔一定时间需要分装和更换营养液。

利用细胞培养方法，可以观察正常细胞或肿瘤细胞在实验条件中的各种变化和分离的病毒在细胞内的繁殖状况及各种因素对病毒繁殖的影响等。因此，细胞培养在细胞学、微生物学和肿瘤学等的研究中已被广泛应用。并且，短时间培养末梢血液中的白细胞，用来观察人染色体的组型和进行分带染色，已成为鉴定某些先天性疾患和性别异常的一种较简便的研究方法。

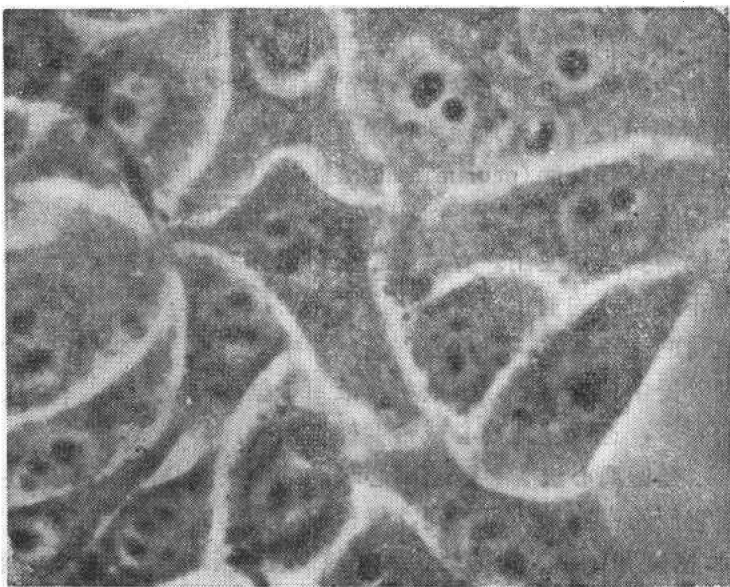


图 1-2 组织培养细胞的相差显微镜观察

细胞融合术

很早以前，人们就注意到发炎的组织、肿瘤组织或体外培养的细胞中有多核细胞的形成。以后又发现麻疹病毒和仙台病毒等可以诱导培养的细胞发生融合。仙台病毒是RNA病毒，外面包有脂蛋白膜。将仙台病毒适当灭活后可作为细胞融合的“融合剂”。细胞融合并不限于同种细胞，在同种不同品系和异种细胞之间亦可发生，有文献报导培养的不同品系鼠细胞可以合并，产生一种单核的新型杂种细胞，核内含有两种不同的染

色体。

近年来,应用细胞融合技术在生物学的基础理论研究方面开辟了一条新的途径。细胞融合技术的基本方法是将A和B两种不同的细胞悬浮液,在悬浮状态下混合,并充分振荡,然后在4℃离心,弃去上清液,加入一定量含有2%新鲜牛血清冷培养液稀释的灭活仙台病毒。细胞-病毒混合物放置4℃水浴中,轻轻摇动10分钟,使病毒颗粒吸附到细胞膜上,然后把细胞移到37℃水浴中振荡30分钟,这时细胞已融合。再经离心、弃去含有病毒的上清液,最后再悬浮于常规培养液中培养观察。

差速离心和密度梯度离心 (different centrifugation and density gradient centrifugation)

利用离心方法,可以把一种细胞类型由含有多种细胞类型的组织中,于生活状态下分离出来,或把细胞粉碎,将其各种成分分别分离出来。分离细胞时,除血液外,要把组织制备成悬浮液。制备组织悬浮液时,一般是将组织切成小块,加入一定量的消化酶和生理盐水,通过机械搅拌,便成为含有各种细胞成分的悬浮液。胰蛋白酶在适当的情况下可以消化大部分蛋白质,可以破坏和解聚细胞外物质,而不破坏较多的细胞成分。胶原酶可以选择性地除去细胞外的胶原成分。神经氨酸酶(neuraminidase)能够从细胞表面除去粘稠的糖衣。以上各种酶可根据实验的需要选择使用。有的组织制备悬浮液时可不经过酶的消化,将其切成小块后加入一定量的生理盐水,直接放入匀浆器中匀浆或粉碎器中粉碎。悬浮液或粉碎液可根据不同的要求,进行差速离心或密度梯度离心。

差速离心法 差速离心时,细胞或细胞的各种成分主要是在离心力的作用下,由于它们的密度和体积不同,每种成分到达离心管底的速率不一样而被分离出来。离心时,密度和体积较大的结构首先被沉淀下来。离心结束后,较大较致密的结构位于管底,较小较轻的物质位在它们的上面。例如红细胞密度大,白细胞密度小,差速离心的结果,使红细胞位于白细胞的下面而彼此分开(红细胞有堆积成钱串状的倾向,亦增加了它们的有效单位体积,而使沉淀加快)。

密度梯度离心法 密度梯度离心是在离心管中放入一种由蔗糖溶液组成的密度梯度不同的溶液,作为沉降密度载体。这种离心方法可使分离更趋向完全。例如血细胞混悬液可用密度介于红、白细胞之间的蔗糖溶液作为密度载体,红细胞可通过密度载体,而白细胞不能通过,从而可以获得较好的分离。

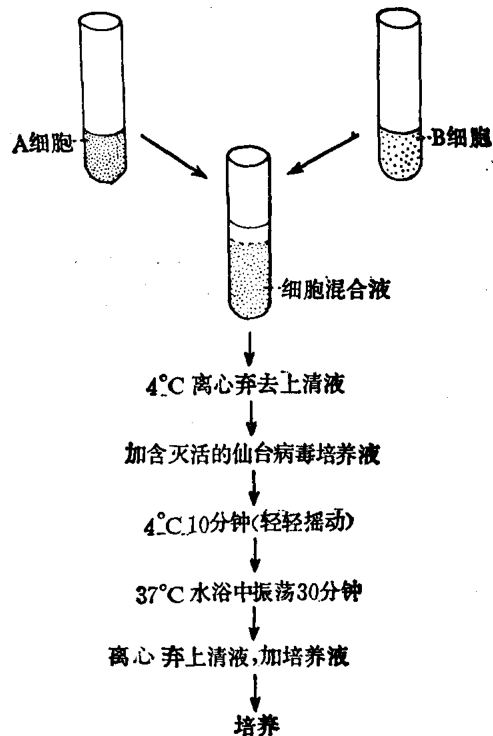


图 1-3 细胞融合技术基本过程示意图

这种技术也可以由低密度到高密度作成一个连续的线性密度梯度,最大浓度的蔗糖溶液在管底,浓度最小的溶液在管顶,由顶到底浓度逐渐增加。假如这样的多种密度层或者连续密度梯度中的密度范围包括被离心的细胞或细胞成分的密度,则离心时,细胞或细胞成分便停留在与其密度相等的梯度层内(即离心力的作用和细胞的浮力之间达到平衡时,细胞便停留在该密度梯度层内)。这种方法可以使细胞核、线粒体、核蛋白体、溶酶体等各种成分分布在不同的密度梯度内。分离出的成分可以进行生物化学分析,在电镜下观察它们的形态及鉴定它们的性质。

机械显微操作法

机械显微操作法是通过特制的显微操作器,在显微镜下对活细胞进行各种实验的一种技术。显微操作器包括显微镜、显微镜台上的操作室和特殊设计的显微玻璃针、显微吸管、微电极及微热电偶等。

显微操作室能控制显微玻璃针、显微吸管等在显微镜视野内作不同方式的移动。利用这种装置可进行细胞解剖、测量细胞内的电变化和进行细胞核的移植等。显微操作法作为一种研究方法已被应用于细胞生物学的研究,例如在活细胞内插入两个微电极,一个电极为刺激电极,另一电极用来记录刺激所引起的电位变化。并可用显微吸管向细胞内注入微量指示剂,观察该指示剂的颜色变化,测定细胞质的酸碱度,或者将微量物质注入哺乳动物的受精卵内,探讨这些物质对受精卵发育的影响;或者对细胞进行外科手术,摘除细胞核,探讨细胞核与细胞质的相互关系。实验证明摘出变形虫的胞核后,变形虫的蛋白质生物合成机能减弱,运动停止。但无核的变形虫仍能继续生存一段时间。

激光显微光束照射法

激光在医学领域中,不仅作为一种治疗手段,而且可以作为一种新的研究工具。由于激光具有很好的方向性及足够强的能量密度和功率密度,通过一定的光学系统可将激光束聚焦成很小的强光点,所以作为一种研究细胞的理想“手术刀”。用直径小于几个微米的微束激光作用细胞内部,并且对细胞发生光化效应、热效应、电磁效应等作用。通过这些效应更深入地显示细胞内部结构与其功能间的关系。但该种技术应用于细胞学的研究还仅仅是开始,积累的资料尚不多。

细胞电泳

细胞电泳技术的原理和纸上电泳技术原理基本相同。都是把多相物质(例如蛋白质胶体溶液或血液悬浮液)放在外加电场中,在外加电场的作用下,带有不同电荷的物质分别向两个相反方向泳动,即带正电荷的物质泳向电场的负极,而带负电荷的物质泳向电场的正极。带有不同数目的相同电荷的物质,亦出现不同的泳动速度。细胞电泳是根据细胞在电场中的不同的泳动方向和泳动速度测定细胞所携带的电荷性质和电荷数目,以及研究在药物、代谢产物、抗体、细菌和病毒等作用下所引起的细胞表面结构和功能的变化。

细胞电泳装置是在显微镜镜台上安装一个保温观察室,其中包括有细胞悬浮液灌充和排出系统,以及电极系统,通电后在显微镜下可直接观察细胞在电场中的活动。

活体和体外活体染色

将无毒或毒性较小的染料注入动物体内,被细胞选择性地摄取,称为活体(或生体)

染色。由动物体取出活的细胞进行染色,称为体外活体(或超生体)染色。茜素(alizarin)作为一种活体染色的染料注入动物体内,可以被骨的钙化基质选择性地摄取,沉淀在骨基质内,新沉淀的骨基质颜色较红。这种古典的标记方法为了解长骨增长和增粗的机制曾作出了较大的贡献。台盘蓝(trypan blue)或锂卡红(lithium carmine)注入动物体,可被吞噬细胞吞噬,借此,可以观察吞噬细胞的分布和吞噬机能及鉴别细胞类型。

中性红(neutral red)和杰纳斯绿(Janus green)可单独或联合应用于活细胞的研究。杰纳斯绿可选择性地使线粒体着色;而中性红则集中在白细胞的特殊颗粒内,并把各种颗粒染成不同颜色;中性颗粒呈淡粉色,嗜酸性颗粒呈黄色,嗜碱性颗粒呈砖红色。杰纳斯绿对鉴别通过差速离心分离出的线粒体和其它颗粒方面亦有一定的实用意义。此外,用生理盐水配制的0.01%吖啶橙溶液染色,在荧光显微镜下可以鉴别细胞的死活。活细胞核的荧光呈黄至黄绿色荧光,而死亡后的细胞核的荧光变红。根据末梢血液呈红色胞核的白细胞数目的增多情况,可以判断辐射对机体损伤的严重程度。但必须注意荧光激发光源不宜过强,否则过强的激发光会直接损伤白细胞,可出现红色核的细胞数目的进行性增加。

普通组织学标本制作方法

活的生物标本为无色透明,光波通过这些成分时波长和振幅不发生显著变化,因此不能清楚地观察它们的微细结构,并且活细胞离体后很快死亡和自溶。所以必须采取固定、切片和染色等措施,以停止细胞死后变化,并使光波的波长和振幅发生变化,从而观察它们的微细结构。

固定和固定剂

固定是将组织块用化学试剂浸泡,使组织内的蛋白质等成分迅速凝固或沉淀,停止细胞濒死前和死后的变化。同时使组织硬化,便于切片和染色观察。能使蛋白质等成分凝固的固定剂有酒精、甲醛、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾、氯化汞和四氧化锇等。这些固定剂有的是还原剂,有的是氧化剂,它们对组织的固定作用各有其优缺点。除少数固定剂可以单独作为固定液使用,大多是由两种或两种以上的固定剂配制成混合固定液。配制混合固定液时严禁氧化剂和还原剂联合使用。

酒精对组织的固定作用是使蛋白质通过脱水发生不可逆性的凝固变性。所以,酒精对组织有固定、硬化兼脱水作用,因此它对组织有较强烈的收缩作用。大多数脂类均被酒精所溶解,如若证明组织内的脂类与类脂物质,则不能用酒精作为固定剂。甲醛是通过与蛋白质结合而对蛋白质发生固定作用的。它除对蛋白质有凝固作用外,尚能保存脂肪和类脂成分。不过甲醛易被氧化产生甲酸,使固定液的酸度增加,影响染色效果,故用磷酸缓冲液配制中性甲醛固定液的效果较好。醋酸对核蛋白有明显的沉淀作用,所以它是证明核蛋白的优良固定剂。醋酸能使组织成分特别是胶原纤维有很强的膨胀作用,因此醋酸不能单独作为固定剂使用。它和酒精等联合应用可以减弱或抵消酒精固定液对组织的收缩作用。苦味酸能沉淀所有的蛋白质,并溶解粘蛋白,使固定的组织较柔软。铬酸是强氧化剂,能沉淀所有的蛋白质。重铬酸钾是氧化剂,对蛋白质和类脂质有固定作用。特别是对类脂质有很强的固定作用,但它对核蛋白有溶解作用。氯化汞能沉淀所

有蛋白质，渗透力强，但用它固定的组织必须脱汞。四氧化锇即锇酸是一种强氧化剂，对蛋白质有良好的固定作用，固定均匀而不产生沉淀，组织几乎不收缩。对脂肪和类脂成分亦有很强的亲和力。经四氧化锇固定的标本，脂类形成黑色的、不溶于酒精和苯等有机溶剂的氧化物或氢氧化物。四氧化锇是固定和保持细胞微细结构的一种最佳的固定剂。但四氧化锇的渗透力弱，常与渗透力强的试剂配制成混合固定液使用。

包埋和切片

组织块固定后，经各度酒精脱水，除去组织内的水分，然后入二甲苯中透明，经二甲苯的媒介作用，移出组织内的酒精，以便使石蜡浸入组织内部。透明后的组织块置入熔化的石蜡中，最后进行包埋和切片。

染色

一般认为染色是染料和组织细胞的某些成分通过化学结合，或者物理吸附作用而实现的。染料是一种有机化合物，它们均含有发色团和助色团。发色团是不饱和的基团，如亚硝基（ $-\text{N}=\text{O}$ ）、偶氮基（ $-\text{N}=\text{N}-$ ）等。发色团决定染料的颜色，各种染料含有不同的发色团，因此显示不同的颜色。助色团是染料的酸性或者硷性基团，它们是染料与某些物质的基团结合形成盐类的部位，所以助色团可以决定染料的性质。氨基（ $-\text{NH}_2$ ）为硷性基团，而羧基（ $-\text{COOH}$ ）和磺基（ $-\text{SO}_3\text{H}$ ）为酸性基团。含有氨基的染料为硷性染料，它们在溶液中带阳电荷，为阳离子染料，与组织内的酸性物质有亲和力。含有羧基或磺基的染料是酸性染料，它在溶液内带阴电荷，为阴离子染料，与组织内的硷性物质有亲和力。此外，还有一种染料它们兼有阳离子和阴离子，是一种复合染料。

机体内各种组织的主要组成成分是蛋白质，而蛋白质又由若干氨基酸构成的，所以蛋白质分子是既含有硷性氨基又含有酸性羧基的两性电解质。在溶液内氨基和羧基均可以电离，如羧基的电离大于氨基时则蛋白质带阴电荷，此时它和带阳离子的硷性染料亲和力大。当氨基的电离大于羧基时，则蛋白质带阳电荷，此时它和带阴离子的酸性染料亲和力大。在一定的 pH 值时，某种蛋白质带有的阴电荷和阳电荷的数目相等时，此 pH 值为该种蛋白质的等电点。这时蛋白质为不带电荷的两性离子，故染色效果不良。如溶液的 pH 值高于等电点时，对该种蛋白质来说是硷性溶液，蛋白质的两性离子则给出 H^+ ，蛋白质带阴电荷，将与硷性染料如亚甲蓝（methylene blue），硷性品红（basic fuchsin）等结合。如溶液的 pH 值低于该种蛋白质的等电点时，对此种蛋白质来说是酸性溶液，蛋白质的两性离子则与 H^+ 结合而带阳电荷。它将与酸性染料如曙红（eosin）、橙黄 G（orange G）和光绿（light green）等相结合。

组织内的蛋白质和构成蛋白质的氨基酸的种类很多，蛋白质有不同的等电点，在普通染色方法中，一般染色液的酸硷度为 pH6.0 左右，细胞内的酸性物质，如细胞核的染色质、腺细胞和神经细胞质内的粗面内质网，以及透明软骨基质等易被硷性染料染色。这些物质称为嗜硷性。而细胞质中的其它物质，如红细胞中的血红蛋白，嗜酸性白细胞的颗粒，以及胶原纤维和肌纤维，易被酸性染料染色，这些物质称为嗜酸性。

如果改变染色液的酸硷度，升高染液的 pH 值时，则原来被酸性染料染色的物质亦可变为嗜硷性；而降低溶液的 pH 值时，原来被硷性染料染色的物质亦可变为嗜酸性。

所以说染色液的 pH 值可影响染色反应。

组织化学和细胞化学技术

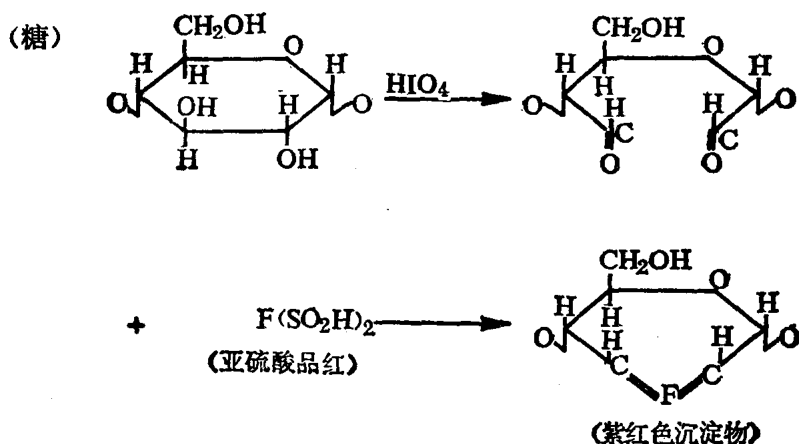
组织化学和细胞化学技术是指把化学分析、物理学和免疫学等方法引用到形态学中，对组织和细胞内的无机成分和有机化合物进行定性或定量的一些研究方法。它包括组织化学和细胞化学染色法、荧光染色法、免疫组织学技术、放射自显影术和 X 射线显微摄影术等。

组织化学和细胞化学染色法

组织化学和细胞化学染色法是将化学分析方法引用到组织标本内的一种染色方法。该种染色方法是使化学试剂与组织或细胞内的某些物质发生化学反应，在局部形成有色沉淀物，从而可以在显微镜下观察某些物质的正常分布和在某些情况下的这些物质含量变化。组织化学和细胞化学染色法可以通过以下几种方式，在标本内形成有色沉淀物：

(1) 某些试剂和组织内的一定成分直接作用，形成有色沉淀物。例如亚铁氰化钾溶液在酸性环境下，与组织内的铁离子结合，形成蓝色亚铁氰化铁的普鲁士蓝反应等。

(2) 某些试剂可以和组织或细胞内的一些物质的中间产物发生反应，形成有色化合物，从而证明该物质的存在。例如过碘酸 Schiff 试剂反应 (PAS 反应)，即是通过过碘酸对糖的氧化作用，打开糖分子内的 1,2-乙二醇中的碳-碳键，或糖中的氨基、羟氨基衍生物，形成 2-醛基。这些醛基和 Schiff 试剂中的亚硫酸品红反应，形成紫红色化合物，沉淀在糖原、粘多糖或者糖蛋白的存在部位，从而证明这些成分的分布。其反应过程如下：

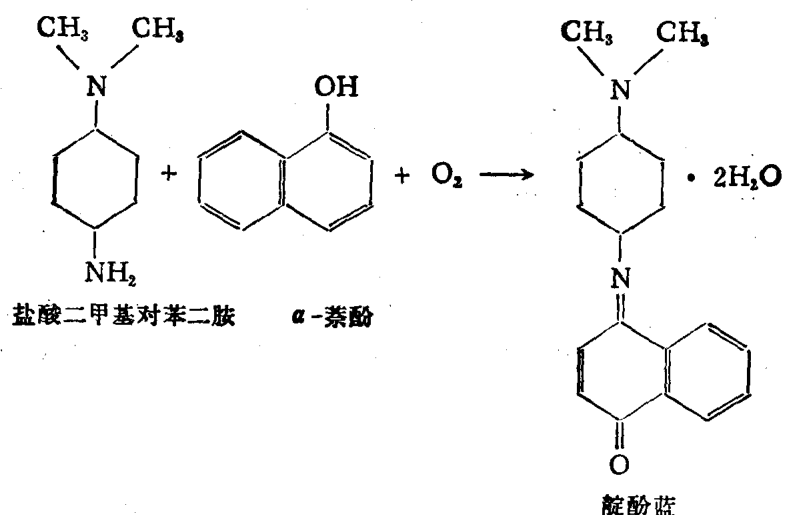


特异性较强的孚尔根 (Feulgen) 反应亦是利用同一原理证明细胞内的脱氧核糖核酸成分的。标本经 1N 盐酸水解，将 DNA 分子中脱氧核糖和嘌呤碱之间的连接键打开，则脱氧核糖暴露醛基，这些醛基和 Schiff 试剂中的亚硫酸品红结合，在核染色质部位形成紫红色化合物。

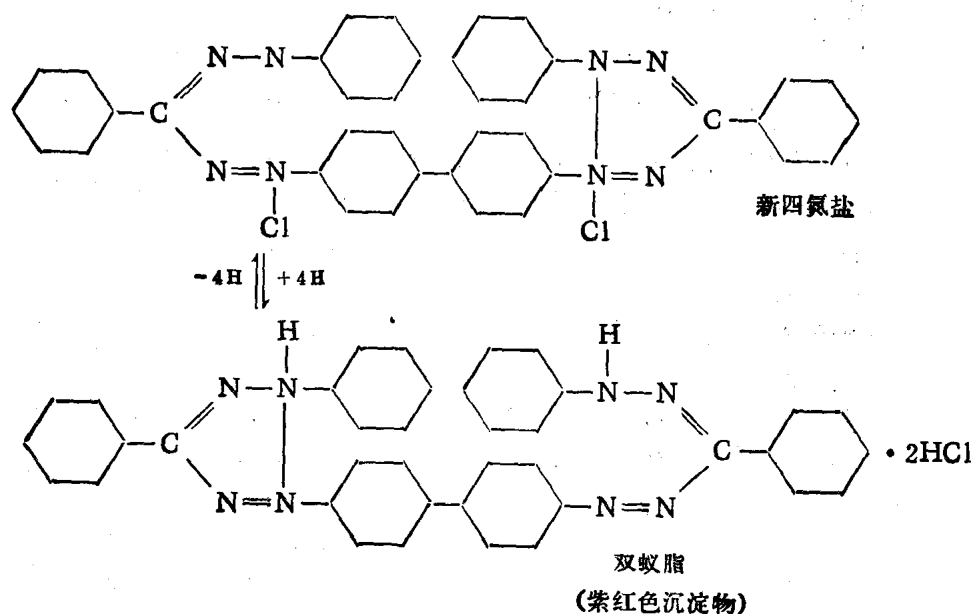
(3) 使标本内的酶和能被该种酶特异性水解的物质一起孵育，产生不溶性水解产物。这种水解产物可以有色的沉淀物在酶的部位沉淀，或者水解产物为无色的化合物，再与其他物质作用，最后形成有色沉淀物而证明该酶的活性。例如 Gomori 硷性磷酸酶方

法，即是將含有磷酸酶的标本与含有能被磷酸酶水解的甘油磷酸钠和硝酸钙缓冲液一起孵育，使磷酸酶水解甘油磷酸钠，释放出磷酸根，磷酸根和钙离子结合，形成无色的磷酸钙，无色的磷酸钙再与其他物质作用，最后形成棕色的硫化钴沉淀物。

(4) 细胞内的氧化酶和过氧化酶可使某些物质氧化，形成有色化合物，在局部沉淀。如 α -萘酚 (α -naphthol) 和盐酸二甲基对苯二胺 (dimethyl p-phenyldiamine) 液经细胞色素氧化酶作用后，在酶的存在部位形成不溶性的靛酚蓝颗粒，而证明该酶的活性。其反应过程如下：



(5) 细胞内的脱氢酶可使作用液内的底物脱氢，脱下氢离子又使作用液中的另一物质还原而呈现有色化合物。如标本内的琥珀酸脱氢酶与含有琥珀酸钠、新四氮盐的缓冲液一起孵育后，可使琥珀酸钠脱氢，氢离子使新四氮盐还原，在酶的活性部位形成紫红色的双蚁脂 (diformazan)。其反应过程如下：



此外,有些染料为脂溶性,可被脂类物质选择性地吸收而呈现一定的颜色,从而证明脂类物质的存在。例如油红O(oil red O)、苏丹黑B(Sudan black B)等染料。

荧光染色法

见荧光显微镜术。

免疫组织学技术

免疫组织学技术是把免疫学方法与荧光染色方法以及酶标记方法相结合,证明组织细胞的抗原或抗体成分。因此,它具有免疫反应和酶反应的特异性和荧光分析的敏感性。其基本方法是把抗原物质多次输入动物体,使之产生相应的抗体,然后将抗体(免疫球蛋白)分离出来,以辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,简写 HRP)或异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)等标记(它们能与免疫球蛋白结合而不影响其免疫活性),制成特异性的酶抗体溶液或荧光抗体溶液。以这种特异性抗体溶液浸染含有相应抗原(或抗体)的组织细胞,由于抗原抗体进行特异性结合,而定位组织或细胞内的抗原或抗体成分。免疫组织学技术可分为直接染色法和间接染色法。

直接染色法

直接法定位组织细胞内的抗原:用制备的特异性荧光或酶标记抗体溶液,浸染含有相应抗原的标本,利用抗原-抗体的特异性结合,直接定位组织细胞的抗原物质(图1-4a)。

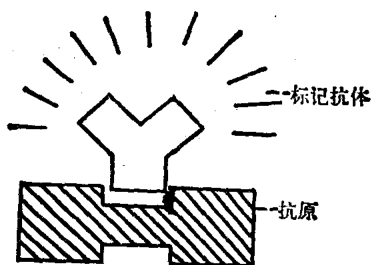


图 1-4a 直接法显示细胞内的抗原

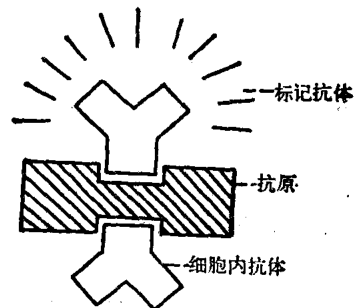


图 1-4b 夹层法显示细胞内的抗体

夹层法定位细胞内的抗体:该染色法首先是用相应的特异性抗原处理含有抗体的标本,经过一定的作用时间,除去未反应的抗原,再用荧光或酶标记抗体处理。则抗原一面与标本内细胞的抗体结合,另一面与表层的荧光或酶标记的抗体结合,使含有抗体的细胞呈现荧光或酶反应,从而证明细胞内的抗体成分(图1-4b)。

间接染色法 间接染色法可以直接显示细胞内抗体又能间接证明组织、细胞内的抗原。间接染色法是用抗原免疫动物,使之产生相应的抗体(抗体I),然后再用抗体I做抗原,免疫另一种动物,使之产生抗-抗体(抗体II),用荧光色素或酶标记抗体II。间接染色法一方面可以定位细胞内的抗原,另一方面可以定位细胞内的抗体。

间接染色法显示细胞内的抗原,首先以未标记的抗体I处理标本,使之发生特异性结合,经过一定的作用时间,除去过剩的未结合的抗体I,再以荧光或酶标记的抗体II浸染标本,则标记的抗体II与抗原-抗体复合物结合,而在抗原存在的部,呈现荧光或

酶反应 (图 1-4c)。间接染色法显示抗原比直接法敏感性高。因为一个抗原分子能结合很多抗体分子, 例如一个抗原可结合 20 个抗体时, 则抗原在间接染色法中能以 $1:20^2$ 即 400 倍的含量而被显示出来。间接染色法的缺点是易出现非特异性染色。

用荧光色素标记的抗体处理的标本, 可直接在荧光显微镜下进行观察。于荧光抗体的存在部位呈现特异性荧光。而用酶标记的抗体处理标本后, 需进一步用 HRP 的底物作用, 最后呈现棕褐色反应产物, 于普通光学显微镜下观察。

用免疫反应代替化学反应有很大优点。首先, 抗体是检出组织内抗原的极敏锐的试剂, 并有高度的特异性; 第二, 原则上只要被检查的物质具有抗原性, 都能应用此种方法证明。所以, 免疫组织学技术除了应用于免疫细胞学的研究外, 对组织、细胞内各种物质如酶、激素和其他具有抗原性的大分子物质, 均能进行直接定位。免疫组织学技术是组织化学技术的一种新发展。同时它已成为微生物学、病理学和肿瘤学等研究的重要手段之一。

同时, 荧光抗体间接法亦可用于临床诊断。如对某些病原微生物(病毒)或自家免疫病患者血清内的抗核抗体、抗线粒体抗体或抗平滑肌抗体的检出。检查自家免疫病患者血清内的抗体方法是将含有细胞核、平滑肌或线粒体的标本, 用患者血清处理, 经一定时间洗去血清, 加荧光标记抗体 (II)。如血清内存在有与标本内抗原相应的抗体, 则呈现荧光, 为阳性反应; 如无相应的抗体则为阴性反应。

放射自显影术

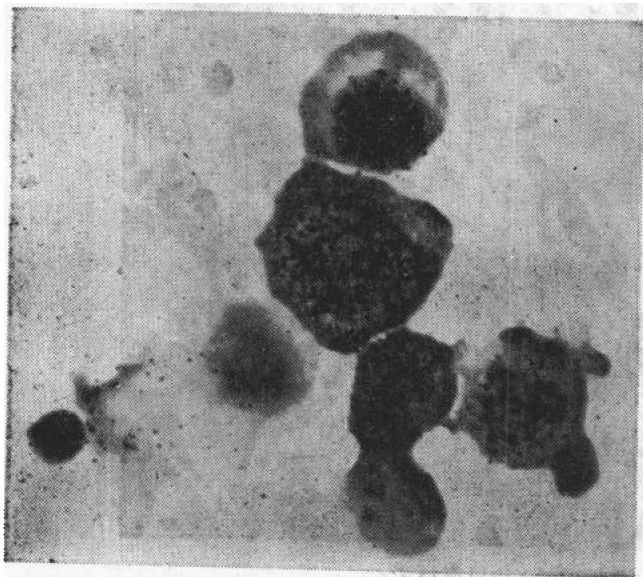


图 1-5 ^3H 胸腺嘧啶核苷标记后培养细胞的自显影
细胞核和染体内的黑色颗粒即 ^3H 胸腺嘧啶核苷存在部位(北京医学院组织胚胎学教研组供图)



图 1-4c 间接法显示细胞内的抗原

放射自显影术是将标记有某种放射性同位素的物质, 注入动物体内或放入培养细胞的营养液内, 经过一定时间被细胞摄取后, 洗去未被摄取的标记物, 把含有放射性同位素的标本与照相底片紧贴在一起, 或涂上一层乳胶膜。经过一定时间的感光, 再经过显影处理后, 在显微镜下观察, 可以比较精确地定位放射性同位素的分布 (图 1-5)。

放射自显影术在近代细胞学的研究中已占有极其重要的地位。它可以分析细胞内物质代谢与分布的动态过程, 如用氚 (^3H) 标记胸腺嘧啶核苷, 由于 ^3H 仅被 DNA 合成期的细胞所摄取, 借此, 可以示踪

脱氧核糖核酸的代谢和探讨细胞的增殖规律。现在对上皮细胞、血细胞、肿瘤细胞的增殖规律已积累了丰富的科学资料。

显微分光光度计

显微分光光度计的原理与吸收分光光度法的原理基本相同，是以物质分子对光波的选择吸收为基础；又把吸收分光光度法引用到显微镜上，对细胞内物质进行定量分析。

显微分光光度计是在显微镜的目镜上面安装一个光电倍增管和光电测定自动控制系统。为便于整个光学系统的校准，要把光源、显微镜和光电倍增管位于一条直线上，使光源(来自单色仪)发射的光自下而上通过显微镜，直到光电倍增管。通过光电测定自动控制系统，把光强度转化为电流强度，并记录出一定的数值。由光线透过标本前的强度和通过标本内被检物质的透光度的数值，计算出光密度，从而测定细胞内某种化学物质的相对含量。显微分光光度计在细胞化学的研究中已成为一种进行细胞内微量定量分析的有力工具。

X射线显微摄影术

X射线显微摄影术是利用不染色标本内的各种元素对X射线的吸收程度不同，而对组织内的物质进行定性定量分析的一种研究方法。如X射线分别穿过单一元素所形成的X射线的吸收曲线，可成为该元素特有的X射线吸收曲线，或称为某元素的X射线吸收光谱。利用这种X射线吸收光谱，可作为对该元素的定性基础，并通过X射线使照相底片感光而进行显微照相，用以观察某种元素在组织内的分布(图1-6)。如果需要测定

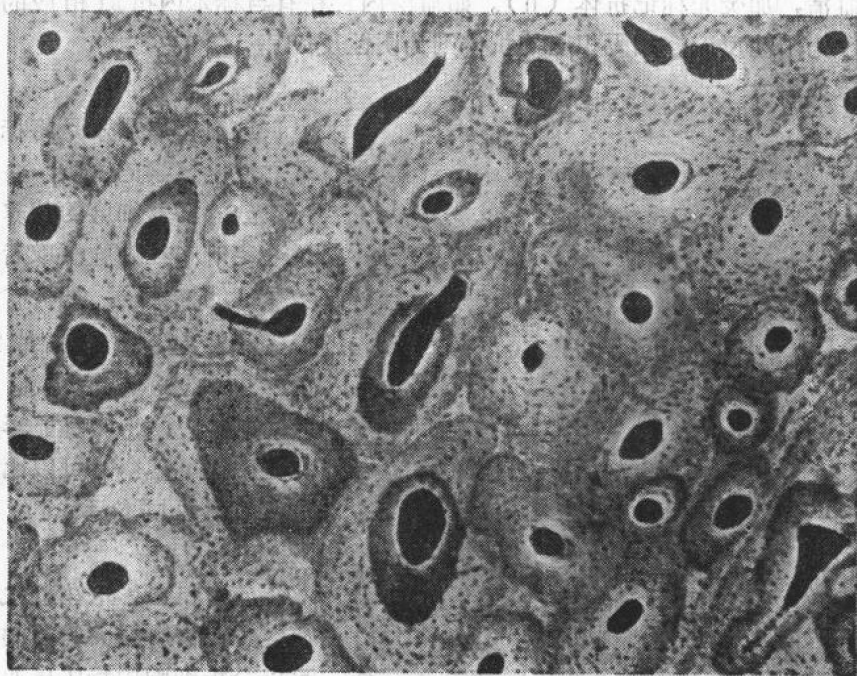


图 1-6 骨磨片X线显微摄影

矿物质含量多的哈佛氏系统，对X线吸收强，感光弱，影像暗

该元素的含量，则标本经X射线显微摄影后，再用光度计进行定量。

X射线衍射

X射线衍射技术是根据X射线的衍射现象,分析物质的内部结构,对物质结构进行定性或定量研究。它具有速度快、精密度高、对样品破坏性小以及需要的样品量少等优点。它可以分析蛋白质、核酸等晶体分子的空间排列和准确地测量分子间距离等。

光的衍射现象已为大家所熟知,例如取一个很小的光源,在距光源一米处放一面障碍屏,在屏上开一个小圆孔,在这个屏的后面再放一白色屏。此时于白色屏上就可以看到穿过小圆孔的光影。但是光影的大小比用几何光学方法求得的大得多,在这个光影的旁边还围绕有明环和暗环。当波的传播超出了波束的几何范围,并且发生能流的新分布现象,这种现象称为波的衍射。一束白光(波长平均 $0.5\mu\text{m}$)射到每毫米一千格的衍射光栅时,就会衍射成光谱中各种波长的带。但X射线波长短,通过同一衍射光栅时不发生衍射。而结晶中的原子或分子组成一个分子大小的晶格时,由于物质内部晶面间距与X射线的波长可以相比拟,短波长的X射线通过它们时便发生衍射。

将要分析的蛋白质等分子结晶,放置在细的单波长的X射线光束光路中,旋转晶体并在结晶后面一定距离内放一照相底片,使通过结晶的X射线衍射图像,在照相底片上感光而被记录下来(图1-7)。于是在衍射图像中便可以看到一系列的黑点或深带,每一黑色区与中心之间的距离决定于标本中产生衍射的重复单位(等构周期)的距离,衍射角越小、表示重复单位间的距离越大。然后,可以应用计算公式准确地计算出等构周期的距离,从而可以测定结晶分子的大小、形状、甚至可以判断其分子的内部结构。对高度规则排列的物质来说,X射线衍射是研究其超微结构的一种重要方法。但它还不能完全准确地确定生物高分子结构,必须结合可见光、红外线和紫外线吸收光谱、双折射和电子显微镜等其它多种技术进行分析,才能获得明确的结构形状和参数。近年来,对肌红蛋白和血红蛋白的结构或它们变性后的结构改变,以及大部分蛋白质的结构已进行了X射线衍射分析。对DNA结构的分析也作出了重大贡献。

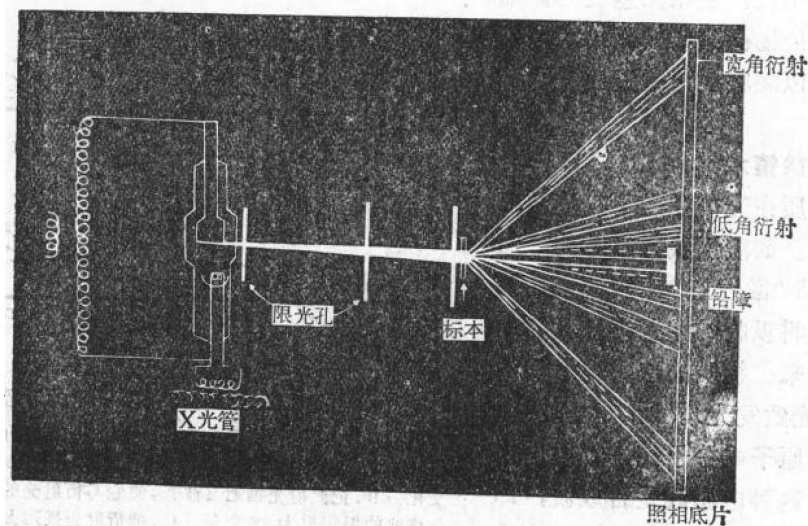


图 1-7 生物标本 X 射线衍射装置简图