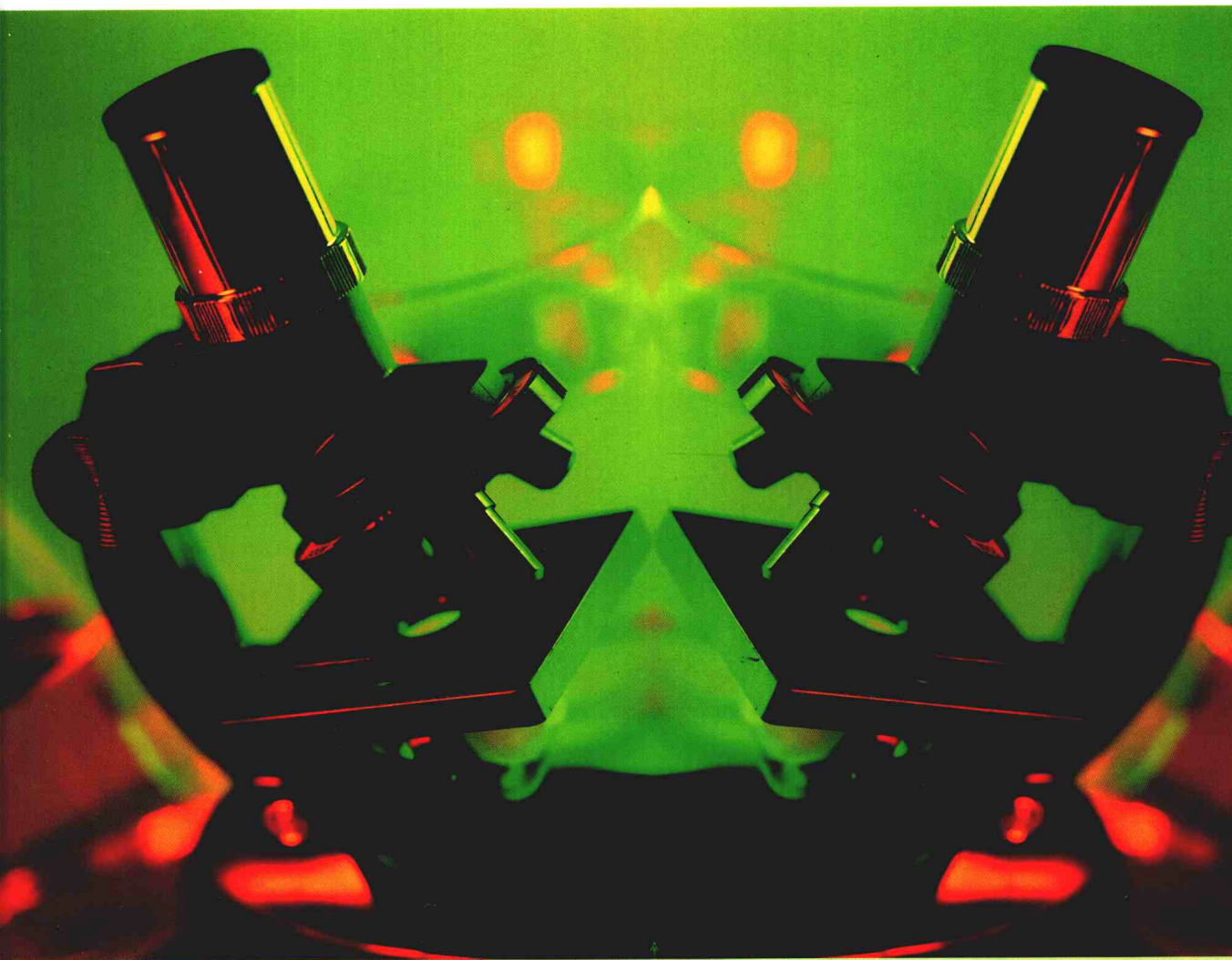


21世纪生物技术丛书

组织细胞化学理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 李力燕 Leong Seng Kee



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

组织细胞化学理论与技术

(第二版)

主 编 王廷华 李力燕 Leong Seng Kee

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

《组织细胞化学理论与技术》是《21 世纪生物技术丛书》的一个分册。该书于 2005 年出版,2006 年进行二次印刷。随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。第二版在第一版基础上补充了神经形态示踪、细胞凋亡染色等技术,并对组织细胞化学技术的实践经验进行了更全面的总结,从而使其更具实用价值。

本书分上、下两篇,全面阐述了组织细胞化学的基本理论和实践技术。全书由第一版的 13 章增至第二版的 17 章,系统介绍了组织细胞化学的基本理论,重点介绍了实验中常用的组织细胞化学技术方法,包括组织、细胞的结构与功能,免疫组织细胞化学,酶组织化学,原位杂交组织化学,神经形态示踪技术,形态定量技术和细胞凋亡染色技术等。

本书可供生物医学专业研究生、本科生以及从事与细胞组织化学研究有关的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

组织细胞化学理论与技术 / 王廷华等主编. —2 版. —北京:科学出版社, 2009

(21 世纪生物技术丛书)

ISBN 978-7-03-024188-7

I. 组… II. 王… III. 组织细胞-细胞化学 IV. Q26

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 029564 号

策划编辑:沈红芬 吴茵杰 / 责任编辑:王 霞 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用。

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 3 月第 二 版 印张:17 插页:2

2009 年 3 月第三次印刷 字数:392 000

印数:5 001—8 000

定价:49.80 元

如有印装质量问题,我社负责调换

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴
委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯 华	第三军医大学西南医院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学基础医学院	教授
李成云	云南农业大学植物病理国家重点实验室	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
李建国	上海交通大学医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学医学院	教授
应大君	第三军医大学	教授
沈馨亚	上海交通大学医学院	教授
周 东	四川大学华西医院	教授
赵春华	协和医科大学	教授
胡长林	重庆医科大学	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
姜保国	北京大学医学部	教授
顾晓松	南通大学医学院	教授
曾国山	中山大学中山医学院	教授
游 潮	四川大学华西医院	教授
蔡文琴	第三军医大学	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授
John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚阿德莱德大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授

《组织细胞化学理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 李力燕 Leong Seng Kee

副主编 黄秀琴 邹晓莉 巴迎春

编 委 (按姓氏笔画为序)

王廷华 王旭阳 巴迎春 苏吉春

杨霄彦 李力燕 李官成 李晓莉

吴林艳 邹晓莉 张 丽 张 楠

张涟双 金立德 孟步亮 徐振波

殷露玮 高 燕 黄秀琴 章 为

戴 萍 Leong Seng Kee

第二版总序

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术和需求,科学出版社组织编写了这套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》。本套丛书共有八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。自 2005 年 3 月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于 2009 年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容 20 余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础。感谢国内外一批知名专家教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者们的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

2009 年 1 月

第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

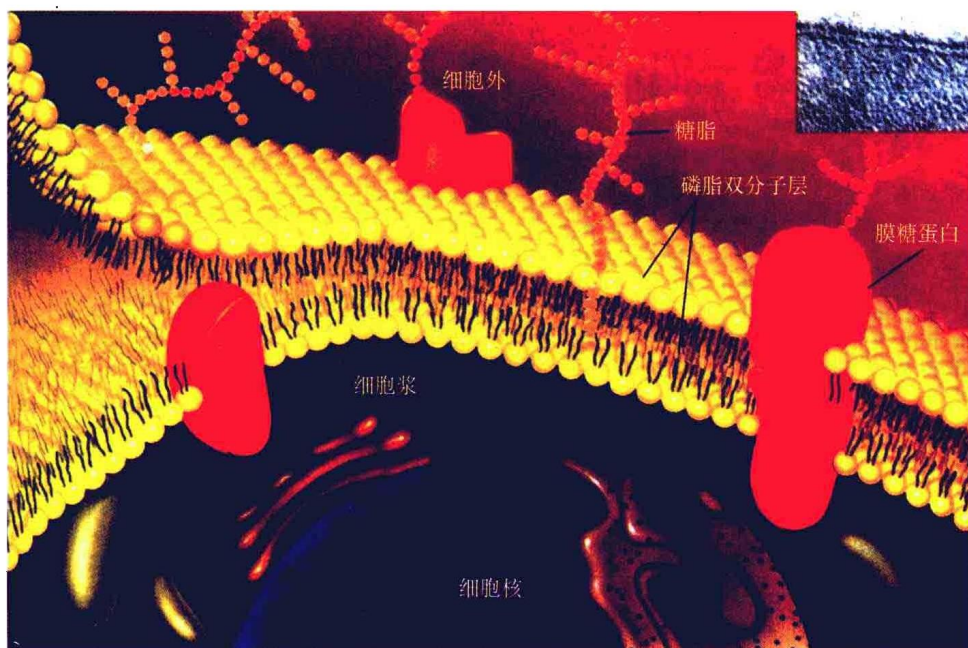
值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》

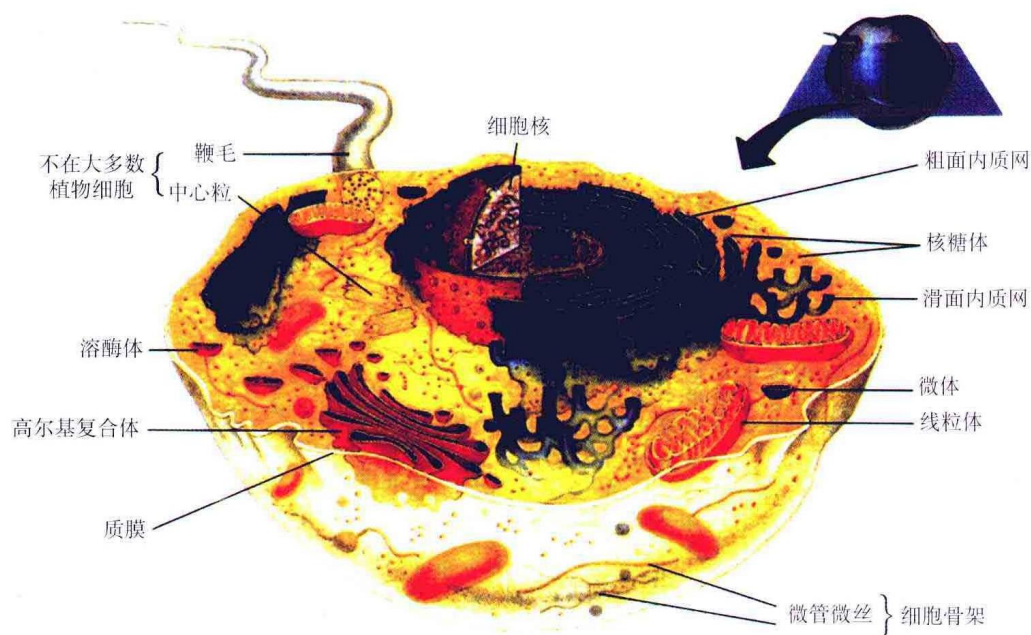
编审委员会

2004 年 12 月 8 日

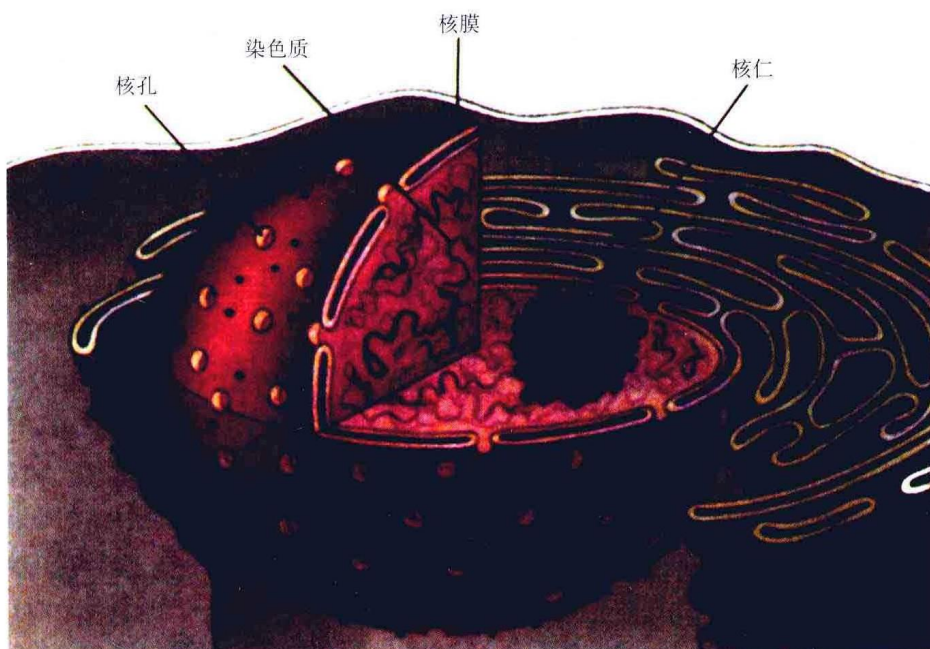
彩图



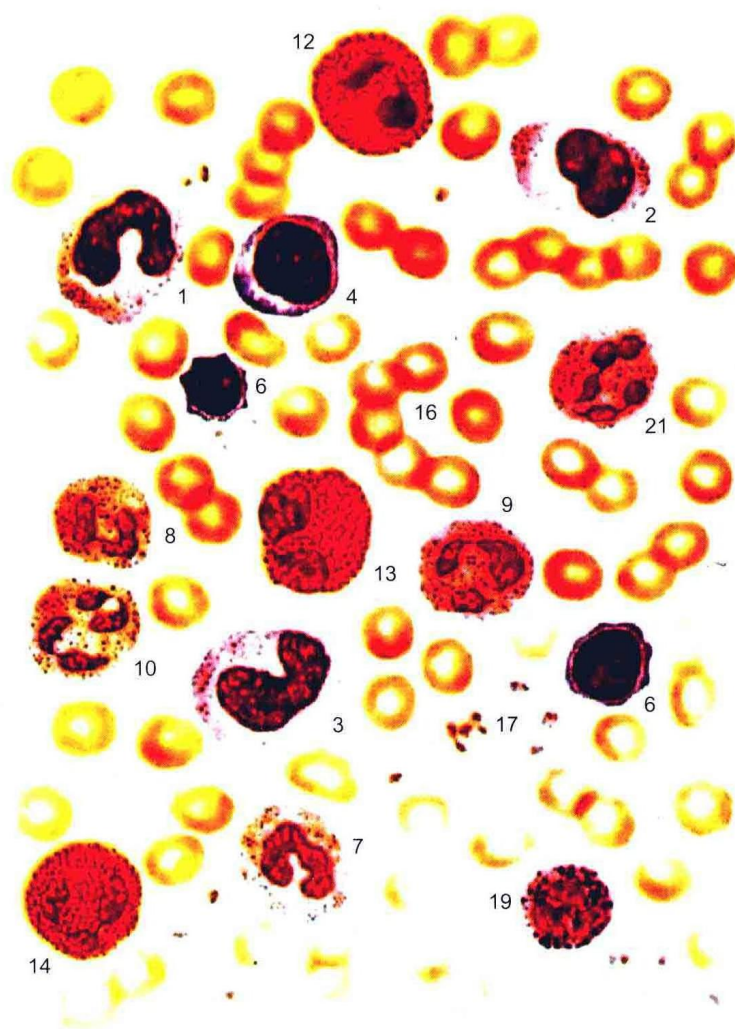
彩图1 生物膜的分子结构图



彩图2 细胞膜式图

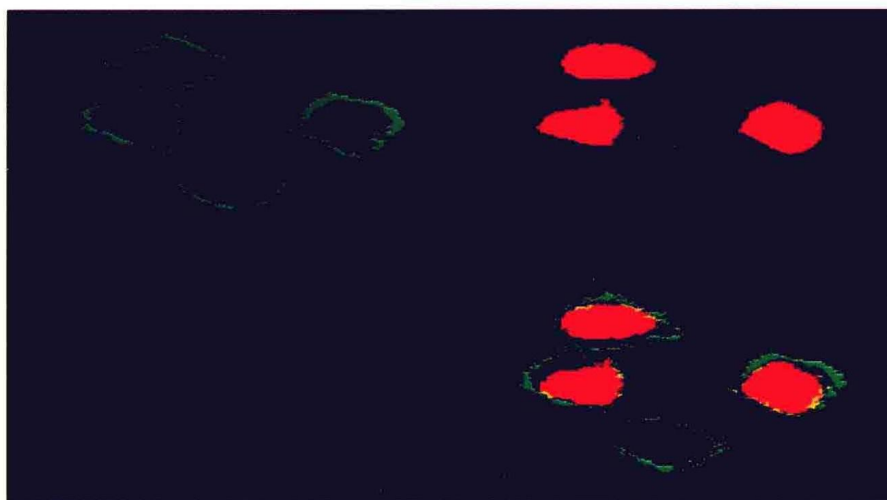


彩图3 细胞核模式图

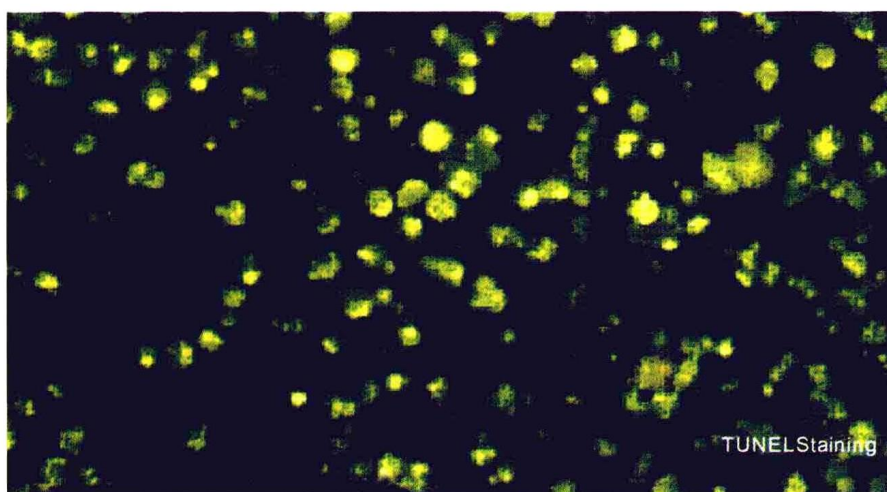


彩图4 各种血细胞

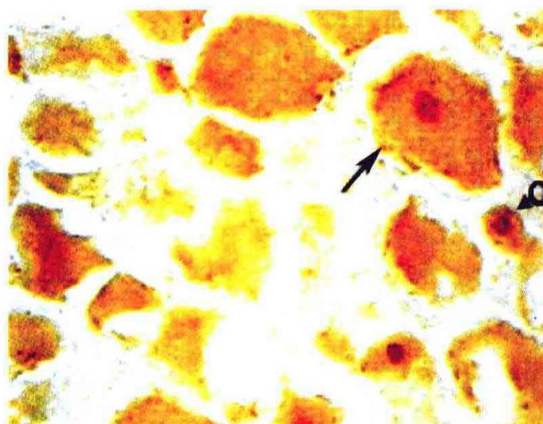
1~3. 单核细胞；4~6. 淋巴细胞；7~11. 中性粒细胞；12~14. 嗜酸粒细胞；15. 嗜碱粒细胞；16. 红细胞；17. 血小板



彩图 5 共聚焦显微镜观察黏附细胞凋亡过程中的 FITC-Annexin V 和染色 PI

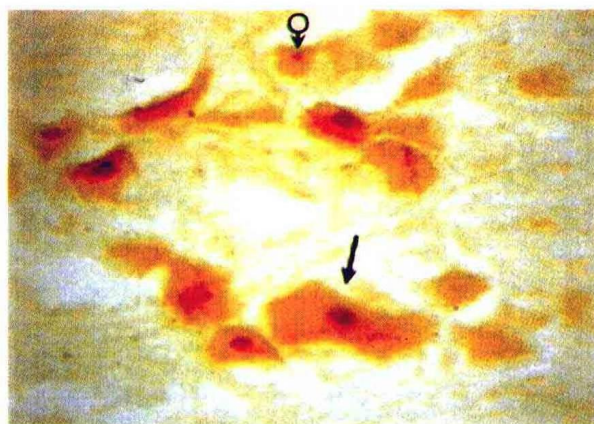


彩图 6 荧光素标记 TUNEL 检测细胞凋亡



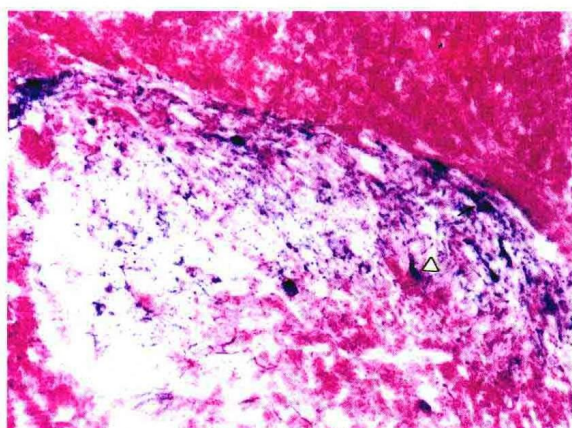
彩图 7 正常猫 L_6 背根节 c-jun 免疫组化染色
(400 ×)

c-jun 阳性大神经元 (↑)、c-jun 阳性中小神经元 (⊙)



彩图 8 正常猫 L_6 背根节 c-fos 免疫组化染色
(400 ×)

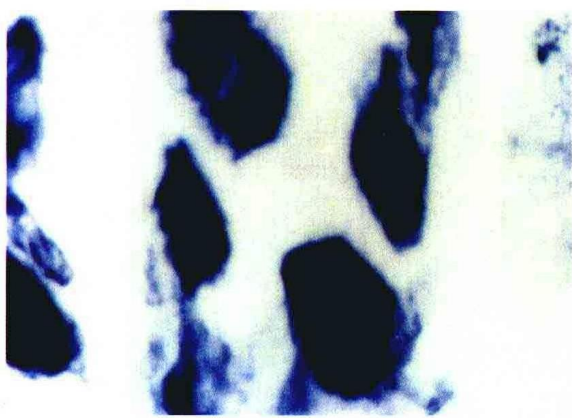
c-fos 阳性大神经元 (↑)、c-fos 阳性中小神经元 (⊙)



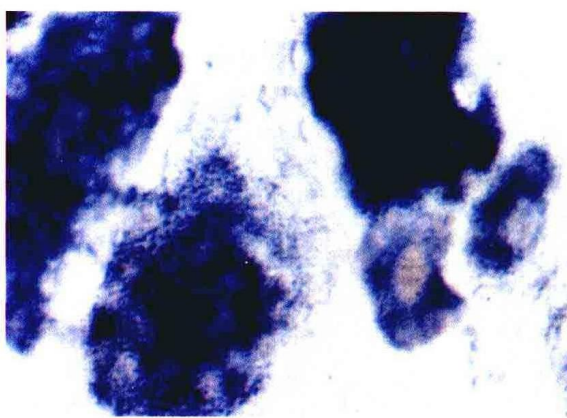
彩图 9 NADPH-d 酶组织化学法
 ↑ 示脊髓 I 板层的 NOS 神经元, △ 示神经膨体
 (本图由昆明医学院神经科学研究所王延华实验室提供)



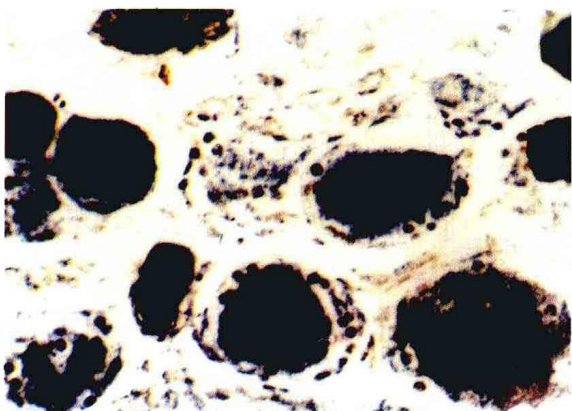
彩图 10 NADPH-d 酶组织化学法
 ↑ 示脊髓中间带 NOS 阳性反应神经元
 (本图由昆明医学院神经科学研究所王延华实验室提供)



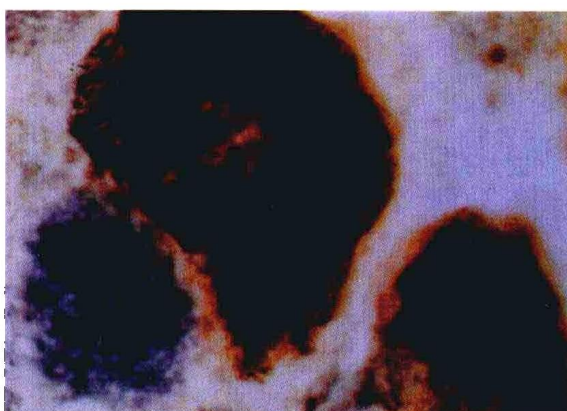
彩图 11 BDNF mRNA 的阳性反应细胞



彩图 12 NT₃ 及 NT₃ mRNA 的阳性反应细胞



彩图 13 BDNF 和 BDNF mRNA 的阳性反应细胞



彩图 14 NT₃ 及 NT₃ mRNA 的阳性反应细胞

目 录

上篇 组织细胞化学理论

第一章 免疫组织细胞化学基础	(1)
第一节 细胞	(1)
第二节 组织概述	(5)
第三节 显示细胞和组织成分、结构的方法	(12)
第二章 组织细胞化学的免疫学与酶学基础	(15)
第一节 抗体的发现及其特性	(15)
第二节 免疫球蛋白分子	(18)
第三节 组织细胞化学的酶学基础	(31)
第三章 免疫组织化学基本理论	(36)
第一节 免疫组织化学的基本原理、发展及展望	(36)
第二节 免疫组织化学技术的分类	(39)
第三节 免疫组织化学技术常用仪器设备、器皿准备及试剂配制	(46)
第四节 免疫组织化学标本的获取及处理	(50)
第五节 免疫组织化学染色后的观测	(58)
第六节 常用免疫组织化学技术的注意事项	(58)
第四章 酶组织化学	(60)
第一节 福尔根显示 DNA 的方法	(60)
第二节 高碘酸-雪夫反应显示糖原和其他多糖	(62)
第三节 异丙醇油红 O 法	(63)
第四节 碱性磷酸酶显示法	(64)
第五节 碱性磷酸酶与 PAS 反应合并染色法	(66)
第六节 酸性磷酸酶显示法	(67)
第七节 腺苷三磷酸酶显示法	(69)
第八节 葡萄糖-6-磷酸酶铅法显示	(71)
第九节 偶氮耦联法显示非特异性酯酶	(72)
第十节 乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶显示法	(73)
第十一节 同时耦联法显示氨基肽酶	(74)
第十二节 细胞色素氧化酶显示法	(76)
第十三节 琥珀酸脱氢酶显示法(四唑盐法)	(76)
第十四节 乳酸脱氢酶显示法	(77)

第十五节	3 β -羟甾体脱氢酶显示法	(78)
第五章	原位杂交组织化学	(80)
第一节	探针制备	(80)
第二节	原位杂交的组织标本制作	(81)
第三节	杂交组织化学反应	(82)
第四节	实验对照	(82)
第五节	生物素标记探针杂交方法	(83)
第六章	神经形态示踪方法学	(86)
第一节	辣根过氧化物酶示踪技术	(86)
第二节	荧光染料追踪技术	(91)
第三节	放射自显影神经示踪	(93)
第四节	顺行示踪技术	(95)
第七章	形态定量技术及其应用	(98)
第一节	概述	(98)
第二节	目前形态定量研究方法简介	(98)
第三节	体视学概述	(99)
第四节	体视学技术的基本方法	(104)
第五节	体视学技术中各参数的计算	(124)
第六节	图像分析仪在医学实验研究中的应用	(130)
第八章	细胞凋亡	(137)
第一节	概述	(137)
第二节	与细胞凋亡相关的酶类	(141)
第三节	细胞凋亡的信号转导途径	(144)
第四节	细胞凋亡的调控	(149)
第五节	细胞凋亡与疾病	(152)
第六节	细胞凋亡的研究方法	(156)

下篇 组织细胞化学技术

第九章	组织化学技术的应用	(175)
第一节	免疫组织化学 ABC 法检测猫背根节 c-jun、c-fos 的表达	(175)
第二节	免疫组织化学 SP 法在检测成年猴脑 BDNF、NT ₄ 和 NGF 中的应用	(179)
第十章	用酶组化技术显示猫脊髓 II 板层一氧化氮合酶的表达	(189)
第十一章	原位杂交组织化学技术检测猫背根节 BDNF 和 NT ₃ 的 mRNA 表达	(192)
第一节	材料和方法	(192)
第二节	结果	(201)
第三节	结果分析与经验体会	(202)
第十二章	组织化学双标技术	(204)
第一节	脊髓 II 板层 NOS、BDNF 样神经膨体的免疫组化与酶组化双标技术	(204)

第二节	免疫组织化学和原位杂交双标技术检测猫背根节 BDNF、NT ₃ 及其 mRNA 的表达	(205)
第十三章	组织化学技术的关键与要点	(210)
第一节	高压控制免疫组化非特异性反应	(210)
第二节	组织化学标本处理要点	(211)
第三节	组织化学实验步骤操作中的注意事项	(211)
第四节	组织化学结果显色要点	(211)
第十四章	石蜡切片免疫组织化学实验的技术关键点	(212)
第一节	石蜡切片制备	(212)
第二节	免疫组织化学染色	(214)
第三节	免疫组化染色的对照设置	(216)
第四节	免疫组化染色过程中出现问题的原因与对策	(217)
第十五章	原位细胞凋亡 TUNEL 法检测大鼠全横断损伤脊髓细胞凋亡	(219)
第十六章	大鼠皮质脊髓束 BDA 追踪实验	(226)
第一节	实验原理	(226)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(226)
第三节	实验步骤	(227)
第四节	实验结果	(228)
第五节	结果分析与实验体会	(229)
第十七章	大鼠背根节细胞中枢终末脊髓内 CB-HRP 示踪技术	(231)
第一节	实验原理	(231)
第二节	实验仪器、试剂及其配制	(231)
第三节	实验方法	(233)
第四节	实验结果	(234)
第五节	结果分析	(235)
第六节	经验体会及注意事项	(236)
附录		(237)
附录一	组织化学的常用试剂及处理	(237)
附录二	原位杂交组织化学常用试剂及处理	(243)
彩图		

上 篇 组织细胞化学理论

第一章 免疫组织细胞化学基础

第一节 细 胞

细胞是生物体形态结构、生理功能和生长发育的基本单位。

一、细胞的发现及细胞学说的建立

细胞(cell)概念的提出,是随16世纪末光学显微镜(light microscope,简称光镜)的发明而提出的。1665年,英国人胡克(Hooke)用光镜观察了软木塞薄片后,将所发现的蜂窝状的小室命名为“细胞”。其实,他所见到的仅是植物的细胞壁。但该工作却无意中开创了用显微镜研究生物构造的先河。此后,许多学者对显微镜的使用投入了极大的热情,并陆续发现了各种各样的细胞,如意大利人马尔比基(Malpighi)观察了脾、肺、肾、表皮;荷兰人列文虎克(Leeuwenhook)发现了红细胞、精子、肌纤维;格拉夫(Graaf)发现了卵泡。1801年,法国人比沙(Bichat)提出“组织”一词,并认为是组织构成了各种器官。

1838年至1839年间,德国人施万(Schwann)和施莱登(Schleiden)在综合归纳了前人的研究成果的基础上提出了细胞学说,认为细胞是机体的基本结构单位 and 功能单位;细胞中进行着复杂的化学反应;新的细胞是由原有的细胞产生的。此后,随着显微镜制造技术的发展,组织切片机的发明与改进,各种生物标本固定和染色方法的出现,使19世纪下半叶成为组织学和细胞学发展的黄金时代。到19世纪末,人们已能较准确地描述细胞的结构,组织学已发展为一门独立而系统的学科。1906年,意大利神经组织学家高尔基(Golgi)和西班牙人拉蒙·卡哈尔(Ramony Cajal)因发明镀银染色法和对神经系统组织结构的开创性研究而获得诺贝尔生理学/医学奖。

二、细胞的形态

根据显微镜的观察结果,细胞大小不一,形态各异,有梭形、扁平形、立方形、圆柱形、多边形、球形和星形多突起状等。细胞的形态与其执行的生理功能和所处的部位密切相关。例如,接受刺激、传导冲动的神经细胞具有很多长突起;流动的血细胞呈圆形;紧密排列的上皮细胞呈方形、柱形、扁平形和多边形。有些细胞为了特殊功能的需要,具有纤毛、鞭毛、微

绒毛等突起,如精子等。

人体内各种不同类型的细胞,其大小差别也很大,有些细胞的大小可随功能而变化。大多数细胞的直径只有几微米,肉眼看不见。最小的细胞(如小脑的颗粒细胞)直径只有 $4\mu\text{m}$;较大的细胞(如成熟的卵细胞)直径可达 $100\sim 140\mu\text{m}$,肉眼勉强可见;最大的某些神经细胞,其突起最长可超过 1m 。肌细胞大小还可随生理需要发生变化。如骨骼肌可因锻炼使肌细胞变粗大;非妊娠子宫平滑肌的长度约为 $50\mu\text{m}$,但在妊娠期可增大到 $500\mu\text{m}$ 。

三、细胞的结构和功能

尽管人体细胞千差万别,但仍具有共同的基本结构,即细胞膜、细胞质和细胞核。

(一) 细胞膜

细胞膜(cell membrane)结构不仅存在于细胞表面,而且也出现在细胞内部。因此,将位于细胞表面的膜称为细胞外膜,细胞内的膜结构称为细胞内膜或内膜系统,两者统称为生物膜(biological membrane)。

1. 生物膜的结构 生物膜主要由类脂、蛋白质和糖类组成,其分子结构为液态镶嵌模型,其基本内容为:膜的结构以液态的类脂双分子层为基架,其中镶嵌着各种不同生理功能的球状蛋白质。生物膜在光镜下难以辨出;在电镜下可见其呈两暗夹一明的三层结构,又称单位膜(unit membrane),总厚度约 7.5nm (图 1-1,彩图 1)。

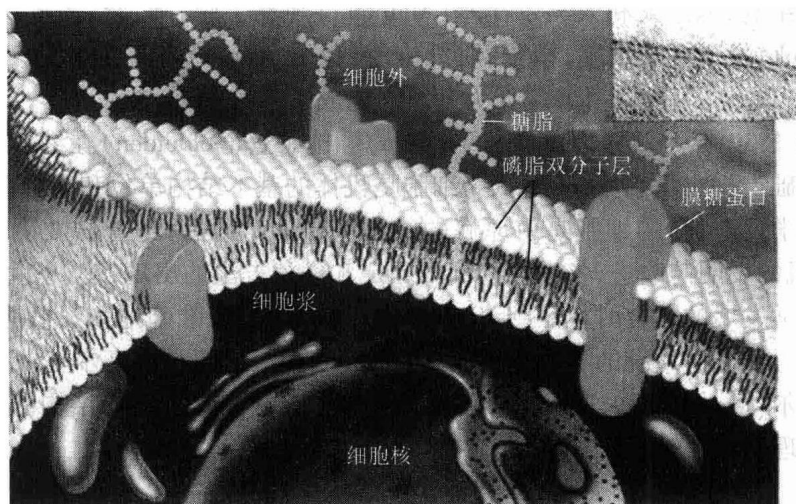


图 1-1 生物膜的分子结构图

2. 细胞膜的功能 细胞膜具有多方面的功能:①维持细胞的一定构型。②构成细胞屏障。③选择性地物质交换。④构成细胞支架。⑤与细胞识别、细胞粘连和运动有关。⑥细胞膜内各种嵌入蛋白的功能也是细胞膜的功能。

(二) 细胞质

细胞质(cytoplasm)为细胞膜与细胞核之间的结构,是细胞新陈代谢与物质合成的重要场所。生活状态为透明胶状物,在固定标本上常呈颗粒状、泡沫状或网络状,由基质、细胞器和内涵物组成。

1. 基质 为无定形的胶状物质。

2. 细胞器 为细胞质内有特定形态结构、执行一定生理功能的有形成分,观察其微细结构需在电镜下进行,光镜下通过特染,可见线粒体、高尔基复合体、中心体等细胞器(图 1-2,彩图 2)。

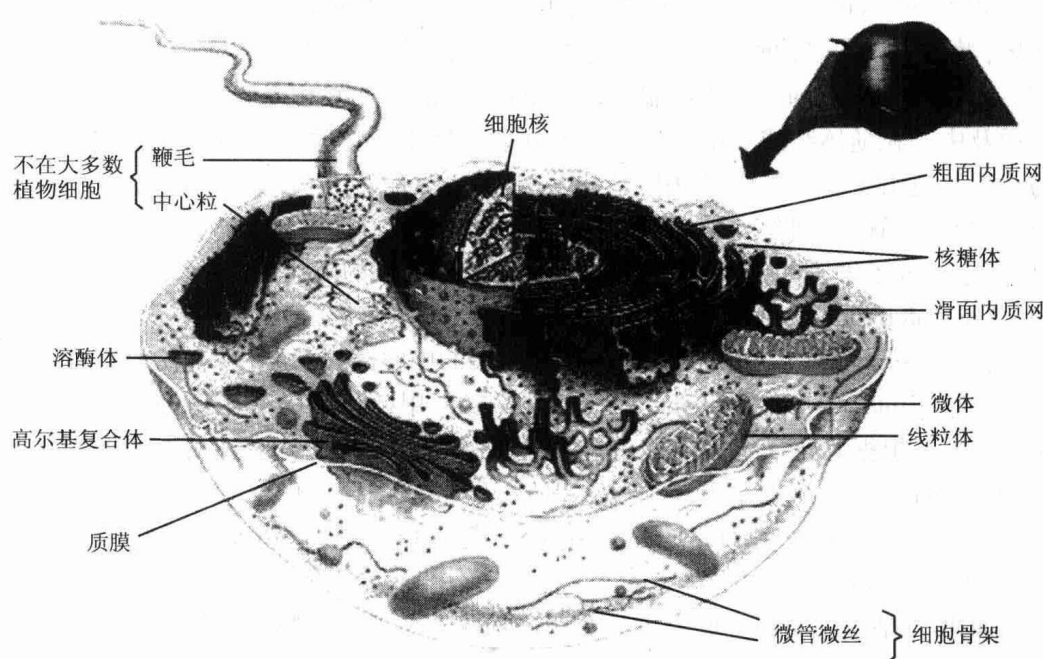


图 1-2 细胞模式图

(1) 线粒体(mitochondria):为细胞的供能站。光镜下呈线状或颗粒状。电镜下为双层单位膜构成的椭圆形小体,外膜光滑,内膜向内折叠形成板状或管状的线粒体嵴。线粒体的主要功能是通过氧化磷酸化作用产生能量,将能量储存于 ATP 中,以备细胞进行各种生命活动所用。

(2) 核糖体(ribosome):为细胞内合成蛋白质的基地,由核糖核酸(RNA)和蛋白质构成。电镜下呈近似球形的致密颗粒,由大亚基和小亚基结合而成,有游离核糖体和附着核糖体两种存在形式。核糖体易被碱性染料着色,故光镜下细胞质中核糖体丰富的部位呈嗜碱性。

(3) 内质网(endoplasmic reticulum):为多功能的膜性小管系统,是由一层单位膜围成的囊状或小管状结构,根据其表面有无核糖体附着而分为粗面内质网和滑面内质网。