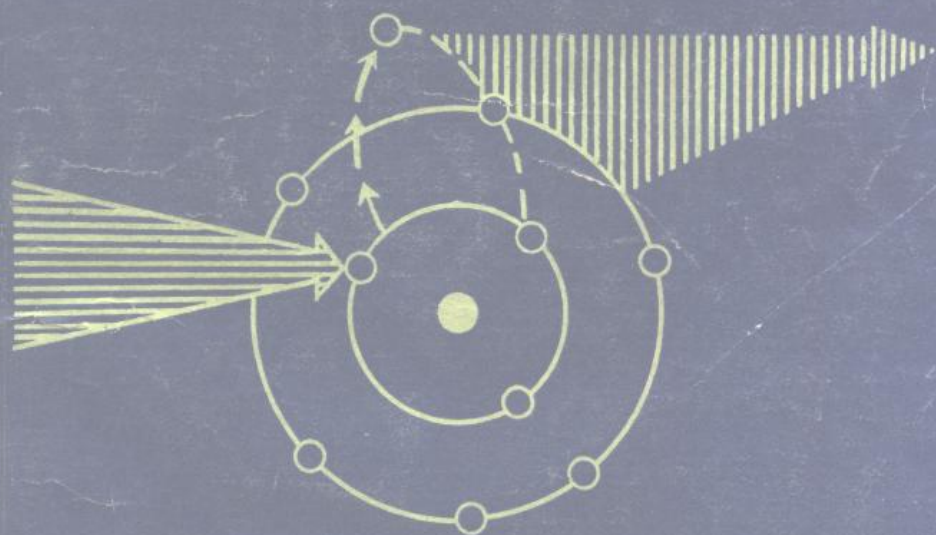


# 荧光 和免疫荧光染色技术 及应用



许 展

748/27  
荧光和免疫荧光染色  
技术及应用

许 屏 编

人 民 卫 生 出 版 社

**荧光和免疫荧光染色技术及应用**

许 屏 编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 5 $\frac{1}{2}$ 印张 8插页 113千字

1983年6月第1版 1983年9月第1版第1次印刷

印数：00,001—6,400

统一书号：14048·4342 定价：1.10元

[科技新书目 43 — 72 ]

# 前 言

荧光显微镜技术包括一般荧光染色和免疫荧光染色方法。荧光染色方法可以显示细胞内的各种成分，特别是对细胞内的两种核酸(DNA 和 RNA)及酸性粘多糖有较强的特异性，所以荧光染色法可以作为一种良好的细胞化学方法。免疫荧光方法是把免疫学技术和荧光染色结合起来的一种方法，它具有免疫学的特异性和荧光方法的敏感性。近年来，荧光显微镜技术，特别是免疫荧光技术得到了飞速发展，作为一种研究方法或实验手段，它已被广泛地应用于医学科学领域内各种基础理论研究和临床诊断。我们在多年的工作中积累了一些资料，现结合国内、外学者的经验作一简要介绍。本书着重介绍了荧光染色法和免疫荧光技术方法及其在组织细胞学、微生物学、寄生虫学和病理学，特别是自身免疫病诊断中的应用。书中若有不妥之处，望读者给予批评和指教。书中全部彩图均为作者的原图。彩图的摄制多承李淑莲同志的合作，特此致以谢意。本书中“各种寄生虫及其虫卵的荧光染色法”和“荧光抗体方法在寄生虫学中的应用”，是由白功懋同志编写的，亦致以谢意。

许 屏

(白求恩医科大学组织胚胎学教研室)

1981年12月

# 目 录

<b>第一章 光、荧光和荧光色素</b> ·····	1
一、光和发光·····	1
二、荧光·····	3
三、荧光色素·····	5
(一) 荧光染色液的 pH 值·····	7
(二) 荧光染色液的浓度·····	13
(三) 荧光染色液的温度·····	14
<b>第二章 荧光显微镜</b> ·····	16
一、光源·····	18
二、滤片系统·····	20
三、显微镜·····	28
<b>第三章 动物组织的自发性荧光和续发性荧光</b> ·····	32
一、组织细胞的自发性荧光·····	32
(一) 显示肾上腺髓质细胞中去甲肾上腺素的荧光方法·····	34
(二) 显示神经纤维和肥大细胞中单胺成分的荧光方法·····	34
(三) 显示肾上腺素能神经纤维的改良法·····	35
(四) 显示脑中单胺神经元或消化道粘膜内分泌细胞的荧光方法·····	35
二、组织细胞的续发性荧光·····	36
(一) 活细胞荧光染色方法·····	36
1. 吖啶橙荧光染色法鉴别细胞的生死·····	37

2. 末梢血细胞吖啶橙荧光染色法·····	38
3. 淋巴细胞硫代黄素荧光染色法·····	40
4. 巨噬细胞硫代黄素异质性荧光染色法·····	43
5. 肥大细胞吖啶橙染色法·····	44
(二) 固定标本荧光染色方法·····	44
1. 显示细胞内 DNA 和 RNA 的吖啶橙荧光 染色法·····	45
2. 显示细胞内 DNA 和 RNA 吖啶橙荧光快 速染色法·····	48
3. 显示细胞核 DNA 的荧光 Feulgen 反应法··	48
4. 显示粘蛋白的荧光 PAS 反应法·····	49
5. 显示酸性粘多糖的荧光染色法·····	50
6. 显示淀粉样物质 (amyloid) 荧光染色法··	50
7. 显示类脂质的磷化氢 3 R 荧光染色法····	52
8. 显示类脂质的 3,4-苯并芘 (3,4-benzpyrene) 荧光染色法·····	52
9. 同时显示两种核酸和类脂质的荧光染色 法·····	53
10. 显示 Y 染色体的荧光染色法·····	53
11. 显示姊妹染色单体的荧光染色法·····	54
12. 荧光氨诱发细胞内一级氨基方法·····	57
13. 显示钙和铝的荧光染色法·····	57
(三) 病原微生物的荧光染色法·····	58
1. 抗酸杆菌金胺-罗达明荧光染色法·····	58
2. 抗酸杆菌金胺染色法·····	60
3. 白喉杆菌荧光染色法·····	60
4. 球菌荧光染色法·····	61

5. 螺旋体荧光染色法·····	61
6. 立克次体荧光染色法·····	62
(四)各种寄生虫及其虫卵的荧光染色法·····	62
1. 鉴别寄生虫虫卵死活的荧光染色法·····	62
2. 鉴别寄生虫死活的荧光染色法·····	64
3. 血液内寄生虫活体和涂片荧光染色法·····	66
4. 药物对寄生虫作用的荧光显微镜观察法·····	67
<b>第四章 免疫荧光技术·····</b>	<b>69</b>
<b>一、荧光抗体方法的基本原理·····</b>	<b>69</b>
(一)直接法·····	69
(二)间接法·····	70
1. 抗原间接显示法(双层法)·····	70
2. 细胞内抗体间接显示法(夹层法)·····	72
(三)补体法·····	72
<b>二、荧光抗体的制备和染色方法·····</b>	<b>73</b>
(一)抗原(免疫原)·····	74
(二)制备免疫血清·····	74
(三)提取免疫球蛋白·····	78
(四)制备荧光抗体·····	80
1. 荧光色素·····	80
2. 标记方法·····	81
3. 标记抗体的提纯·····	83
(五)荧光抗体的染色方法·····	91
1. 直接染色法·····	92
2. 间接染色法·····	92
3. 补体染色法·····	93
4. 双重染色法·····	94

(六)染色标本的保存和封片介质的制备·····	94
三、免疫荧光技术在医学中的应用·····	95
(一)荧光抗体方法在组织细胞学研究方面的应用·····	95
1. 激素和酶的定位·····	95
2. 组织和细胞内的抗原性物质的示踪·····	96
3. 细胞膜抗原和膜受体的观察·····	98
4. 有关免疫细胞学研究·····	99
(二)荧光抗体方法在细菌学和病毒学中的应用·····	100
(三)荧光抗体方法在病理学和自身免疫病研究与诊断中的应用·····	102
(四)荧光抗体方法在寄生虫学中的应用·····	108
<b>第五章 荧光显微摄影方法·····</b>	<b>126</b>
一、自动摄影装置的组成部件·····	126
二、显微摄影方法和步骤·····	130
(一)自动曝光方法·····	130
(二)手控曝光方法·····	132
三、显微摄影过程中易发生的问题和纠正方法·····	133
四、常用黑白和彩色正负片及彩色相纸冲洗过程和配方·····	135
(一)冲洗印放黑白片常用配方·····	136
(二)冲洗印放彩色片常用配方和冲洗过程·····	137
五、冲洗彩色正负片和彩色相纸时的注意事项·····	148
<b>参考文献·····</b>	<b>148</b>



# 第一章 光、荧光和荧光色素

Stokes 1852 年发现有些物质在短光波的照射下，物质本身能放射出一种比激发光波长较长的光波，他把这种光称为荧光。Wood 在 1903 年设计了一种能吸收可见光和允许紫外光通过的滤片。在此基础上，Reichert 1911 年设计了第一台荧光显微镜。荧光显微镜制成后，由于人和动物组织的自发荧光很弱，当时荧光技术在医学中的应用仍不满意。Haitinger 1935 年发现用非常稀薄的有机色素溶液处理组织后，可使标本的荧光亮度增强，从而可以观察组织的续发性荧光。以后，由于荧光方法和荧光装置的改进，特别是荧光抗体方法的建立及激发光源和滤片系统的发展，使荧光显微镜技术在细胞学、微生物学、免疫学、病理学和临床诊断方面得到了广泛的应用。

## 一、光和发光

光，实质上是物质的原子和分子向外辐射的、具有一定波长和频率的能量。即光是能量的辐射形式，它是一种可见的电磁波。光有波动性和量子性。波动性表现为光有反射、折射、绕射和干涉等现象。量子性表现为原子和分子辐射能量时，是以一连串微粒子形式进行的，这种微粒子称为光子（光量子）。

在均匀透明的介质中，光沿直线传播。光在传播时，它是在与它进行方向相垂直的平面内呈波形振动。两个波峰之间的距离为波长，波峰的大小即为该光波的振幅，不同波长

1105317

的光具有不同的颜色，即光的波长不同，光的颜色也不同。而光波的振幅决定光的强度，振幅越大，光的亮度越强；振幅越小，光的亮度越弱。此外，不同波长或不同频率的光，具有不同的能量，波长短（频率高）的光，其光量子的能量大；波长长（频率低）的光，其光量子的能量小。

光的波长不同，其折射率亦不同。波长越长，折射率越小；波长越短，折射率越大。因此，当一束平行白光通过透镜后，由于组成白光的七色光的波长不同，它们的折射率各异，而被分散为红、橙、黄、绿、青、蓝、紫七色光（图 1）。红光的波长最长（800 毫微米，nm），折射率最小。紫光的波长最短（400 毫微米），折射率最大。波长长于 800 毫微米的红外光和短于 400 毫微米的紫外光均为非可见光。

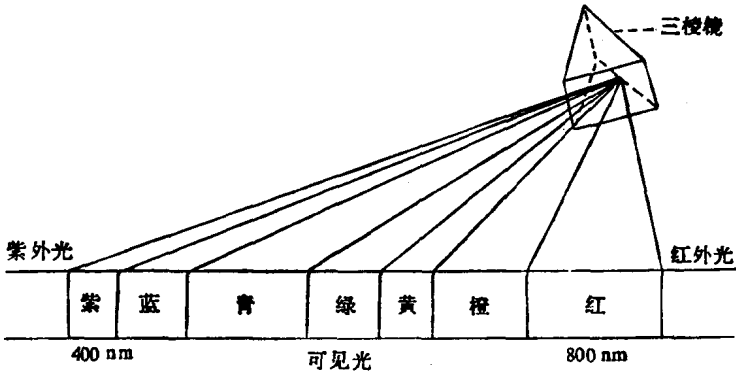


图 1 光的色散

光进入某些物质后，部分或全部光能可被物质的分子或原子所吸收。物质从外部吸收能量后，进入新的状态，称为“激发态”。当物质从激发态回到原来的基态时，能以电磁辐

射的形式放出所吸收的能量，这种现象叫作“发光”。有些物质由激发态回到原来的基态时，不是以电磁辐射的形式，而是以其它形式（如以热能的形式）放出所吸收的能量，这种物质不发光。此外，必须强调指出，光的吸收具有高度选择性，即一定能量的光量子辐射，只能被一定结构的物质分子所吸收。例如，石英玻璃对可见光几乎不吸收，而对红外光有强烈的吸收作用。利用物质对光吸收的高度选择性，可制成各种滤片，使之吸收一定波长范围的光，而允许特定波长的光通过，作为荧光显微镜中的激发滤片和阻断滤片。

## 二、荧 光

某些物质在光的照射下吸收光能进入激发态，从激发态回到原来的基态时，可以电磁辐射的形式放射出所吸收的光能，这种现象叫“光致发光”。在光致发光现象中，如果用一定波长的光（如紫外光）照射某种物质时，这种物质在极短的时间内，能发射出波长较照射光的波长为长的光（如可见光），这种光就称为“荧光”。停止供能时，荧光现象立即停止。如果停止供能后，物质在较长时间内发出波长较荧光波长更长的光，即为“磷光”。

由光激发所引起的荧光为“光致荧光”。如由化学反应所引起的荧光为化学荧光。由X射线或阴极射线引起的荧光分别称为X射线荧光或阴极射线荧光。如果化学发光在有生命的生物体中产生（例如萤火虫和含磷的真菌）就称为“生物发光”。无论哪一种荧光，其发光机理都是相同的。

众所周知，物质的原子是由原子核和电子层构成的。每一电子层所容纳的电子数是一定的。每个电子都沿着自己的固有轨道围绕原子核旋转。电子带有负电荷，其在带正电荷

的核电场中绕原子核运动。每一轨道上的电子是有固定的能量，在最内层电子层上的电子能量最小，其随着轨道半径的增加而加大，即外层的电子能量较内层的能量大。当电子吸收一个能量相当的光量子后，它可以由低能级的电子层跳到高能级的电子层，或跳到同一电子层的高能带，这个过程称为“能级跃迁”。此时，电子由低能态进入高能态，即激发态。电子的高能态是不稳定的，约经  $10^{-8}$  秒，以辐射光量子的形式释放能量后，再回到原来的能态（即基态），这种辐射的能量即荧光（图 2）。

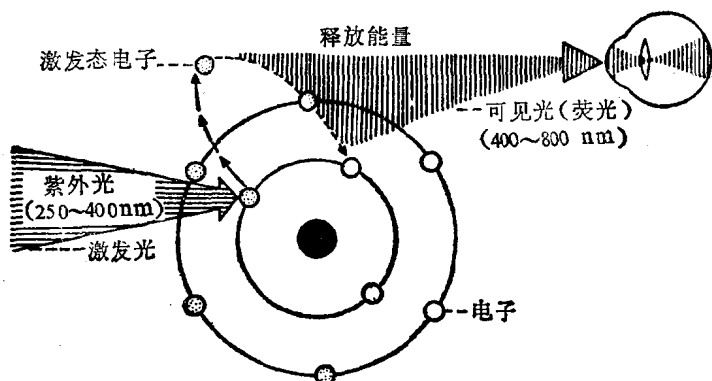


图 2 紫外光如何激发荧光物质放射荧光示意图

一般最容易被激发的电子是最外层的价电子。很多物质如荧光染料等具有光致发光的性能，将该种物质放到光谱中的各色区域内，就可以看到，引起荧光的最有效的光波，是光谱上波长较短的区域，即紫外光或蓝紫光。显然，这部分短波长的光，光能大。当荧光物质吸收这部分光能成为激发态，再重新回到它原来的基态之前时，它的一部分能量作为热能被丢失。所以，它释放出的光较激发光的波长为长（能

量较低), 即释放出的光向光谱的红光端偏移。在荧光显微镜技术中, 用紫外光或蓝紫光作为激发光源, 可以产生蓝、绿、黄、橙和红色波长较长的荧光。这种现象符合 Stokes 所确定的法则, 即物质的发射光的波长比激发光的波长要长些。

动物组织和细胞内的大部分成分经短光波照射后, 可以发出淡蓝色荧光, 这种荧光称为“组织的自发性荧光”。这种现象说明生物体内具有光能代谢的物质。但组织的自发性荧光一般都很弱(弹性纤维例外)。有些细胞成分可与发荧光的有机化合物——荧光染料结合后而呈现一定颜色的荧光。这种荧光称为“续发性荧光”。利用某些成分的续发性荧光, 可对各种组织进行细胞化学的观察和研究。此外, 有些荧光染料可以和免疫球蛋白结合而不破坏抗体的免疫活性。这种荧光抗体溶液可以作为特异性试剂, 使免疫学技术和荧光分析方法相结合, 进行免疫组织学的研究。这种方法具有荧光分析的敏感性和免疫反应的特异性, 称为“荧光免疫技术”。

### 三、荧光色素

荧光染料经短光波照射后, 可以吸收激发光的光能和发射荧光。它和动物组织内的某些成分结合后而发生一定颜色的荧光。利用荧光色素作为染料, 可以观察组织和细胞的续发性荧光。

荧光色素对光的吸收和荧光的发射具有高度选择性, 这和它的分子结构有密切关系。

产生荧光的最重要的条件, 是物质的分子必须具有吸收一定频率光能的基团——生色团, 和能产生一定光量子的荧光团。如果一种物质的光量子的产率等于零, 就不能发射荧

光。这是因为处于激发态物质的分子，可以由很多形式把激发光的光能释放出去，而发射荧光只是其中的一种形式。大部分物质没有发射荧光的性质，即使荧光色素也不是将吸收的全部光能都转变为荧光，而是在发射荧光的同时，或多或少地亦以其它形式释放其所吸收的光能。吸收的光能转变为荧光的百分数称为“荧光效率”。荧光效率与发射荧光光量子的数值成正比。

$$\text{荧光效率} = \frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收光的光量子数}}$$

由上式可知，荧光强度（即发射的荧光光量子数）和激发光（吸收的光量子数）的强度有关，在一定范围内，激发光越强，荧光也越强。即荧光强度等于吸收光强度乘以荧光效率。

所以，选用适当强度的光源作为荧光显微镜的激发光源，和选用适合于被检荧光物质选择性吸收的光谱滤片作为激发滤片，是提高荧光强度的根本方法。

每种物质所吸收的光不仅有一定的波长，而且在各波长上的吸收量也不均匀，从而可以构成特殊的吸收光谱曲线。相应地，其发射荧光的情况也是如此。因此，一定物质在一定的条件下有一定的吸收光谱（激发光谱）和荧光光谱（发射光谱）。荧光色素的吸收光谱和荧光光谱是符合 Stokes 定律的，它们一般在可见区域内，如吖啶橙的吸收光谱（最大吸收波长）是 455 毫微米，其发射的荧光光谱是 450~700 毫微米。因此，吖啶橙和不同的细胞成分结合后，可以发射红、橙、黄、绿、蓝各色荧光。也有部分荧光染料在紫外区带有 1~2 个吸收带，如硫代黄素 T 的最大吸收波长是 380 毫微米，它发射的荧光范围是 420~500 毫微米。它与细胞

的不同成分结合后，可发生橙、黄、绿、蓝色等荧光。了解各种荧光染料的吸收光谱和发射光谱后，有利于我们在观察被检标本时，有效地选择适当的滤片，而获得最好的荧光效果。

荧光色素有很多种，一般较常用的色素见下表：

某种，染料是否发射荧光或荧光的强弱，主要决定于该染料的分子结构。同时，与它所处的环境及其状态也有密切关系，如染色液的 pH 值、浓度和染色时的温度等，均对荧光效应有一定影响。因此，了解荧光染料的性质及影响发射荧光的各种因素，对提高荧光分析的效能和改进荧光染色方法有着重要意义。

### (一) 荧光染色液的 pH 值

在溶液中，荧光染料基本上都呈离子状态，有色离子可以是阴离子，也可以是阳离子，这决定于溶液的酸碱度。所以，溶液的氢离子浓度对荧光的影响极大。每种荧光色素有它最适宜的 pH 值。改变 pH 值即可引起荧光色素光谱的变化，并明显影响荧光色素吸收光能的能力和荧光效率。所以进行荧光染色时，必须选用各种荧光染料所适合的 pH 值。荧光染色时常用缓冲液配制染液，配制荧光染色液的缓冲液时先配制成干液，可在低温中较长时间地保存。在使用前，根据所需要的 pH 值，由干液配制缓冲液。

缓冲液干液配制方法：

原液 I ( $\frac{1}{10}$ M 盐酸)：

盐酸	3.65 毫升
蒸馏水	1000 毫升

原液 II ( $\frac{1}{15}$ M 磷酸二氢钾)：

磷酸二氢钾	9.08 克
-------	--------

常用 的 荧 光 色 素

名 称	结 构 类 型	结 构 式	分 子 量	最 大 吸 收 波 长 (nm)	最 大 发 光 波 长 (nm)	荧 光 颜 色 和 应 用
吖啶橙 (Acridine orange)	吖啶	<chem>CN(C)C1=CC=C2C(=C1)N(C)C(=C2)N(C)C</chem>	301.822	405	585 (530~630)	黄绿色-桔红色 细胞和细菌
吖啶黄 (Acridine yellow)	吖啶	<chem>CN(C)C1=CC=C2C(=C1)N(C)C(=C2)N(C)C</chem>	273.768	455	620 (450~700)	黄绿色-桔黄色 细胞和细菌
芥子奎纳克林 (Quinacrine mustard)	吖啶	<chem>CN(C)CCNC(=O)N1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=C(C=C2)Cl</chem>	541.8	270	500	绿色 细胞, 特别是染色体



名称	结构类型	结构式	分子量	最大吸收波长 (nm)	最大荧光波长 (nm)	荧光颜色和用途
沉香磷化氢 (Coriphosphine)	吡啶	<p style="text-align: center;"> <math>(H_3C)_2N</math>  <math>H</math>     <math>Cl</math>  <math>H</math> </p>	643.482	458	530 (470~660)	蓝色-桔黄色 细胞和细菌
硫代黄素 T (Thioflavin T)	杂环噻唑	<p style="text-align: center;"> <math>H_3C</math>  <math>H_3C</math>     <math>Cl</math>  <math>H_3C</math> </p>	318.871	380	460 (420~550)	天蓝色-桔黄色 原虫和病毒
噻唑黄 (Thiazol Yellow)	杂环噻唑	<p style="text-align: center;"> <math>SO_3Na</math>  <math>SO_3Na</math>  <math>CH_3</math>  <math>CH_3</math>  <math>N=N</math> </p>	695.729	408	540 (500~600)	绿色 细胞