

# 荧光显微术

五九一七五部队

上海科学技术情报研究所

# 前 言

荧光显微术是现代生物学和医学中的一门重要方法学。特别是免疫荧光技术,在许多国家已被广泛应用,近十多年来发展尤为迅速。无产阶级文化大革命以来,在毛主席革命路线指引下,我国广大工人、干部和科技人员,进一步激发了建设社会主义的积极性,贯彻“独立自主,自力更生”的方针,结合我国实际,试制成功了多种荧光显微光源,可与普通生物显微镜配套构成荧光显微镜,有的还具有重量轻、体积小、便于携带的特点,并已正式投产和供应,为在我国迅速推广和普及荧光显微术创造了必要的条件。最近一、二年来,在“抓革命,促生产,促工作,促战备”的伟大方针指引下,在学习无产阶级专政理论不断深入发展的大好形势鼓舞下,许多单位都已开展荧光显微术特别是免疫荧光的工作,并取得了迅速进展。

目前,国内有关这方面的技术资料甚嫌短缺,为了交流情况,我们于匆忙之中编写了这本资料,以供医学(包括畜牧兽医)检验人员、医生、医学院校师生和从事生物学工作的人员参考。限于水平,书中必有缺点错误,恳望读者批评指正。

在编辑出版过程中承有关方面大力协助,谨致谢忱。

中国人民解放军 59175 部队

1975 年 8 月

## 内 容 提 要

荧光显微术是现代生物学和医学中的一门重要方法学,具有荧光分析的敏感性和显微术的精确性;特别是免疫荧光技术,应用广泛。这本资料根据理论和实践相结合的原则,比较系统地介绍了荧光显微术的原理和方法,及其在细菌学、病毒学、寄生虫学、免疫学和免疫病理学等重要领域中的应用,并着重对传染病的快速诊断和自身免疫病的临床检验方法作了较为详细的叙述。可供广大医学(包括畜牧兽医)检验人员、医生、医学院校师生和从事生物学有关工作的人员参阅。

---

# 毛主席语录

路线是个纲，纲举目张。

古为今用，洋为中用。

我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国。

---

# 目 录

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 序 论 .....                   | 1  |
| 第一章 荧光的物理基础 .....           | 5  |
| 第一节 光 .....                 | 5  |
| 第二节 荧光 .....                | 7  |
| 第三节 荧光的量子产额 .....           | 10 |
| 第四节 荧光色素 .....              | 12 |
| 第五节 激发(吸收)光谱与荧光(发射)光谱 ..... | 21 |
| 第六节 影响荧光的因素 .....           | 23 |
| pH 值 .....                  | 24 |
| 温度 .....                    | 25 |
| 光分解 .....                   | 26 |
| 猝灭剂 .....                   | 26 |
| 浓度 .....                    | 27 |
| 第二章 荧光显微术的工具和特点 .....       | 30 |
| 第一节 光源装置 .....              | 31 |
| 超高压汞灯光源装置 .....             | 31 |
| 高色温溴钨灯光源装置 .....            | 35 |
| 滤色系统 .....                  | 39 |
| 1. 激发滤板 .....               | 41 |
| 2. 压制滤板 .....               | 44 |
| 第二节 显微镜 .....               | 46 |
| 反光镜 .....                   | 47 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| 聚光器 .....            | 47 |
| 1. 明视野聚光器 .....      | 47 |
| 2. 暗视野聚光器 .....      | 48 |
| 3. 相差荧光聚光器 .....     | 48 |
| 物镜 .....             | 49 |
| 目镜 .....             | 50 |
| 显微镜标本 .....          | 50 |
| 1. 载玻片 .....         | 50 |
| 2. 盖玻片 .....         | 50 |
| 3. 标本 .....          | 51 |
| 4. 封载剂 .....         | 51 |
| 5. 镜油 .....          | 51 |
| 落射光装置 .....          | 51 |
| 第三节 荧光显微术的特点 .....   | 54 |
| 一般特点 .....           | 54 |
| 荧光显微术方法的选择 .....     | 55 |
| 结果记录方法 .....         | 55 |
| 荧光显微摄影术 .....        | 56 |
| 1. 胶卷选择 .....        | 56 |
| 2. 聚焦 .....          | 57 |
| 3. 曝光时间 .....        | 57 |
| 第三章 免疫荧光的原理和方法 ..... | 58 |
| 第一节 免疫荧光的原理 .....    | 58 |
| 第二节 免疫荧光的方法 .....    | 59 |
| 直接法 .....            | 60 |
| 间接法 .....            | 60 |
| 补体法 .....            | 61 |
| 第三节 免疫荧光的特点 .....    | 63 |
| 第四章 免疫荧光试剂的制备 .....  | 65 |
| 第一节 免疫血清制备 .....     | 66 |

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| 免疫原 .....                    | 66         |
| 1. 免疫原的种类 .....              | 66         |
| 2. 免疫原的制备 .....              | 70         |
| 3. 免疫原的质量鉴定 .....            | 82         |
| 免疫方法 .....                   | 94         |
| 1. 动物 .....                  | 94         |
| 2. 途径 .....                  | 95         |
| 3. 佐剂 .....                  | 95         |
| 4. 抗原剂量 .....                | 96         |
| 5. 抗血清效价 .....               | 97         |
| 6. 免疫方案示例 .....              | 97         |
| 7. 自然感染抗血清的利用 .....          | 99         |
| <b>第二节 抗体提纯和鉴定 .....</b>     | <b>99</b>  |
| IgG 的提纯 .....                | 100        |
| 1. 盐析法 .....                 | 100        |
| 2. 制备电泳分离法 .....             | 102        |
| 3. 分子筛层析法——凝胶过滤 .....        | 104        |
| 4. 离子交换层析法 .....             | 110        |
| 抗体鉴定 .....                   | 115        |
| <b>第三节 标记抗体制备 .....</b>      | <b>117</b> |
| 适于蛋白质标记的荧光色素 .....           | 117        |
| 1. 异硫氰酸荧光黄 (FITC) .....      | 117        |
| 2. 四乙基罗达明 (RB200) .....      | 119        |
| 3. 四甲基异硫氰酸罗达明 (TMRITC) ..... | 119        |
| 标记方法 .....                   | 122        |
| 1. 异硫氰酸荧光黄 (FITC) 的标记 .....  | 122        |
| 2. 四乙基罗达明 (RB200) 的标记 .....  | 125        |
| 3. 四甲基异硫氰酸罗达明的标记 .....       | 128        |
| 标记抗体的提纯 .....                | 128        |
| 1. 游离荧光色素的去除 .....           | 128        |
| 2. 过度标记的蛋白分子的去除 .....        | 132        |
| 3. 特异交叉或额外反应性标记抗体的去除 .....   | 137        |

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| 标记抗体的鉴定 .....            | 144        |
| 1. 免疫化学特征 .....          | 144        |
| 2. 染色性能 .....            | 152        |
| 标记抗体的保存 .....            | 154        |
| <b>第五章 免疫荧光染色法 .....</b> | <b>156</b> |
| <b>第一节 标本的制备 .....</b>   | <b>156</b> |
| 材料的收集和保存 .....           | 156        |
| 显微镜标本片的制备 .....          | 158        |
| 1. 涂片和压印片 .....          | 158        |
| 2. 组织切片 .....            | 159        |
| 3. 组织培养单层 .....          | 160        |
| 4. 组织扩张法 .....           | 160        |
| 5. 细胞悬液 .....            | 160        |
| 6. 细胞沉淀 .....            | 161        |
| 标本片的固定和保存 .....          | 161        |
| 1. 标本片的固定 .....          | 161        |
| 2. 标本片的保存 .....          | 165        |
| <b>第二节 染色方法 .....</b>    | <b>165</b> |
| 直接染色法 .....              | 166        |
| 间接染色法 .....              | 168        |
| 1. 双层法 .....             | 168        |
| 2. 夹层法 .....             | 168        |
| 3. 混合法 .....             | 169        |
| 4. 三层法 .....             | 169        |
| 抗补体染色法 .....             | 170        |
| 1. 补体-抗补体染色法 .....       | 170        |
| 2. 异属补体结合反应 .....        | 171        |
| 标记类风湿因子染色法 .....         | 172        |
| 1. 标记类风湿因子的制备 .....      | 172        |
| 2. 染色步骤 .....            | 172        |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 特殊染色法 .....            | 174 |
| 1. 双重染色法 .....         | 174 |
| 2. 反衬染色法 .....         | 174 |
| 3. 活细胞膜荧光染色法 .....     | 175 |
| 4. 滤膜集菌染色法 .....       | 175 |
| 5. 荧光计定量染色法 .....      | 175 |
| 6. 与其它技术联合应用 .....     | 176 |
| 对照问题 .....             | 176 |
| 1. 阴性标本对照 .....        | 177 |
| 2. 标记非免疫血清对照 .....     | 177 |
| 3. 抑制试验 .....          | 177 |
| 4. 吸收试验 .....          | 179 |
| 染色标本的保存 .....          | 180 |
| 第三节 标本的非特异荧光 .....     | 180 |
| 第六章 免疫荧光的应用(一) .....   | 183 |
| 第一节 免疫荧光在细菌学中的应用 ..... | 183 |
| 概说 .....               | 183 |
| 在细菌诊断中的应用 .....        | 184 |
| 1. 甲组溶血性链球菌 .....      | 185 |
| 2. 脑膜炎双球菌 .....        | 186 |
| 3. 致病性大肠杆菌 .....       | 188 |
| 4. 痢疾杆菌 .....          | 189 |
| 5. 霍乱弧菌和副霍乱弧菌 .....    | 194 |
| 6. 布氏杆菌 .....          | 198 |
| 7. 土拉杆菌 .....          | 200 |
| 8. 鼠疫杆菌 .....          | 202 |
| 9. 炭疽杆菌 .....          | 205 |
| 10. 钩端螺旋体 .....        | 207 |
| 11. 梅毒螺旋体 .....        | 211 |
| 第二节 免疫荧光在病毒学中的应用 ..... | 213 |

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 概说 .....                    | 213 |
| 1. 病毒和病毒抗原在感染细胞内的定位研究 ..... | 213 |
| 2. 病毒感染过程的研究 .....          | 215 |
| 3. 近缘型病毒的鉴别 .....           | 215 |
| 4. 肿瘤病毒的研究 .....            | 215 |
| 5. 病毒计数 .....               | 216 |
| 在病毒快速诊断中的应用 .....           | 217 |
| 1. 流感病毒 .....               | 220 |
| 2. 流行性乙型脑炎病毒 .....          | 222 |
| 3. 狂犬病病毒 .....              | 223 |
| 4. 脊髓灰白质炎病毒 .....           | 226 |
| 5. 恙虫病立克次体 .....            | 227 |
| 6. Q热立克次体 .....             | 228 |
| 第三节 免疫荧光在寄生虫学中的应用 .....     | 229 |
| 概说 .....                    | 229 |
| 在寄生虫病诊断中的应用 .....           | 230 |
| 1. 血吸虫病 .....               | 231 |
| 2. 疟疾 .....                 | 232 |
| 第七章 免疫荧光的应用(二) .....        | 237 |
| 第一节 免疫荧光在免疫病理学中的应用 .....    | 237 |
| 免疫球蛋白和病理球蛋白 .....           | 237 |
| 自身免疫病的发病机理 .....            | 240 |
| 1. 肾疾病 .....                | 240 |
| 2. 肝疾病 .....                | 242 |
| 肿瘤免疫 .....                  | 243 |
| 第二节 免疫荧光在自身免疫病诊断中的应用 .....  | 244 |
| 抗核抗体 .....                  | 245 |
| 抗甲状腺自身抗体 .....              | 251 |
| 抗胃抗体 .....                  | 255 |
| 抗骨骼肌自身抗体 .....              | 258 |
| 抗肾上腺自身抗体 .....              | 259 |
| 抗肝活性 .....                  | 260 |

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| 肾病抗体 .....                        | 261        |
| 抗皮肤自身抗体 .....                     | 264        |
| 类风湿因子 .....                       | 265        |
| 自身抗体检出的联合过筛试验 .....               | 267        |
| <b>第八章 荧光色素染色法及其应用 .....</b>      | <b>269</b> |
| <b>第一节 概说 .....</b>               | <b>269</b> |
| 试剂制备 .....                        | 270        |
| 标本制备 .....                        | 271        |
| 染色方法 .....                        | 271        |
| 标本保存 .....                        | 272        |
| <b>第二节 荧光色素染色法在微生物学中的应用 .....</b> | <b>272</b> |
| 细菌学染色法 .....                      | 272        |
| 1. 菌体染色法 .....                    | 272        |
| 2. 芽胞染色法 .....                    | 277        |
| 3. 鞭毛染色法 .....                    | 278        |
| 4. 菌落染色法 .....                    | 279        |
| 5. 死菌活菌鉴别染色法 .....                | 279        |
| 6. 荧光显微凝集试验 .....                 | 280        |
| 立克次体染色法 .....                     | 281        |
| 病毒染色法 .....                       | 281        |
| 1. 樱草素染色法 .....                   | 281        |
| 2. 硫代黄素 S 染色法 .....               | 282        |
| 真菌染色法 .....                       | 282        |
| 原虫染色法 .....                       | 283        |
| 1. 疟原虫染色法 .....                   | 283        |
| 2. 锥虫染色法 .....                    | 284        |
| 活体染色法 .....                       | 284        |
| <b>第三节 荧光色素染色法在细胞学中的应用 .....</b>  | <b>285</b> |
| 在癌细胞检查中的应用 .....                  | 285        |
| 在血细胞和骨髓细胞检查中的应用 .....             | 287        |

## 序 论

毛主席教导我们：“人类的历史，就是一个不断地从必然王国向自由王国发展的历史。”荧光现象，人们很早就看到了，但多少世纪以来，由于科学发展水平的限制，一直是处于“必然王国”的阶段。十九世纪末，随着物理科学的巨大进展，发现了伦琴射线(X光)和放射性元素。与此相关，物质的发光现象，至本世纪初，人们的认识出现了飞跃，大量的研究工作使发光和荧光现象的本质逐步得到阐明，随之荧光现象在各种科学和技术领域中逐渐得到日益广泛的利用，并形成为一门内容丰富的方法学——“荧光分析”。在生物学和医学领域中，由于“荧光分析”方法的敏感性极高，而且几乎所有的有机分子都能够直接或经过适当的化学处理后发生荧光而能以一定方式检查，故很早就受到了重视，并亦逐渐形成“荧光分析”的一个重要分枝——“生物学和医学中的荧光分析”，其中，利用光学显微镜观察对象的荧光现象，即荧光显微术，占有重要的地位。早在1904年，就有人提出了建立荧光显微术的思想，1908年，试制成功了第一台紫外荧光显微镜，以高压火花放电作光源，用以观察生物体内的自体荧光结构。但由于光源强度不足，不能对微细结构进行系统的研究，因而未能取得很大的进展。1914年，有人利用喹啉作为染料处理纤毛虫以增强荧光，开辟了荧光色素染色法的道路。至三十年代，开始用荧光色素进行大量的研究工作，并在1938年采用了超高压水银石英灯作光源，使荧光色素染色检查方法获得了显著的进步，并为组织学、细胞学和微生物学领域中的荧光染色方法奠定了基础。与此同时，发现大多数荧光染料可以不用紫外光而只用可见光的短波部分（紫光、蓝

光)即能被激发而产生荧光,这就使得有可能利用普通显微镜作荧光检查,从而扩大了应用范围。现在,荧光染色方法已成为生物学领域中的一种重要观察手段,并逐步被成功地应用于微生物诊断和某些疾病的临床实验诊断等等。

荧光抗体法是荧光色素染色法的特例,也是它的重大发展。随着荧光色素染色法的进展,早在三十年代初人们已开始试图将荧光物质标记到蛋白分子上,以研究其免疫学性质,至四十年代开始,已有人(Coons 氏等)进行用荧光化合物标记抗体蛋白的工作,试图用标记荧光抗体检验关于风湿热是体内某些组织中发生抗原抗体反应所致的假说,如果抗体用带色物质标记,相应的抗原将能利用抗体在组织学上检出。1941 年,他们合成了一种新的荧光色素——异氰酸荧光黄 (FIC),能够有效地标记抗体球蛋白而不损害抗体的活性。次年,第一次报告可溶性肺炎球菌多糖体能够在感染小白鼠的组织切片中被荧光抗体染色,从而为荧光抗体技术的现代发展奠定了基础。1958 年,合成了异硫氰酸荧光黄 (FITC),能够很容易地与抗体球蛋白形成稳定的结合物,使一般实验室都能应用这个方法,从而使荧光抗体技术迅速得到推广,应用的领域日益扩大。同年,又合成了一种新的荧光色素——罗达明 B200 (RB200),它也容易与蛋白结合,并且发射橙红色荧光,可与异硫氰酸荧光黄的黄绿色荧光形成鲜明的对衬,为背景染色和双标记工作提供了有力的手段,使荧光抗体技术锦上添花。随后,成功地应用了凝胶过滤和柱层析方法提纯标记抗体,使荧光抗体的制备工作大大简化,并在很大的程度上解决了荧光抗体的非特异染色问题。至此,荧光抗体技术已经成熟并发展成为一门完整的方法学,称为免疫荧光 (Immunofluorescence),使免疫学的敏感性和特异性与显微术的精确性结合起来,是传统的免疫学和显微镜方法的重要补充手段,解决许多为其他方法很难解决的问题,如对免疫学中的重要问题——抗体形成部位的解决,就有突出的贡献。二十余年来,荧光抗体技术方面的工作是非常丰富的,有关的文献报道已积累了数千篇以上。早期的工作,主要是关于外界蛋白和多糖

体、激素、病毒和立克次体等在动物组织中的转归方面的研究，以后逐步用于观察和鉴定细菌、病毒、原虫、蠕虫、真菌和动物组织抗原，检出血清抗体，研究抗体的特性等。现在，在检验室中，免疫荧光工作占有重要的地位，有一些项目已形成常规。如在某些国家，将荧光螺旋体抗体试验作为诊断梅毒的常规血清学方法，取代了经典的瓦氏反应；将荧光抗体检查血清抗核和抗甲状腺活性作为诊断某些自身免疫病的常规试验；以及用荧光抗体检出某些常见传染病的病原体等。

在免疫荧光技术迅速发展和广泛应用的基础上，已先后于1967、1968和1970年在佛罗朗斯(Florence)、伦敦和斯得哥尔摩召开过三次国际免疫荧光学术会议，在这些会议上，对免疫荧光技术的标准化、定量化等问题进行了技术交流和讨论，促进了免疫荧光的发展。

免疫荧光作为一种免疫组织化学方法，正在与其他新方法结合，如放射自显影(同位素标记)和铁蛋白抗体技术，前者较免疫荧光更为敏感，但不能作组织和细胞定位，后者特异性低但能用于超微结构的研究，它们结合起来，取长补短，必能在医学和生物学工作中发挥更大的作用。

诚然，免疫荧光由于有自己的独特优点，作为一种新的技术方法已经建立起来。但它还不是完美无缺的。目前，其主要缺点是，非特异染色问题还未完全彻底解决，结果判断的客观性不足，技术程序仍然比较复杂，容易受外界条件变化的干扰，等等。但这些无疑是次要方面，随着技术的进一步发展，将能逐步地得到克服。

我国在解放前，荧光显微术的工作基本上没有开展。解放后不久，一些单位即应用荧光色素染色法作为诊断手段，作了不少工作。至1957年，引进了荧光抗体技术，主要在传染病的快速诊断方面进行工作，至今已有一定的发展，各种报告近百篇。但由于工具——荧光显微镜装置的限制，应用不广，发展不快。近年来，我国已能自己生产成套超高压汞灯荧光显微光源装置，并发展了一种轻便型的高色温溴钨灯荧光显微光源装置，成本低，生产方便，

配合普通生物显微镜即能进行荧光显微术工作(包括免疫荧光工作),为推广荧光显微术创造了有利条件。我们相信,在毛主席“洋为中用”的方针指引下,荧光显微术尤其是免疫荧光技术必能在我国迅速推广应用,为社会主义革命和社会主义建设事业服务。

# 第一章 荧光的物理基础

毛主席说：“我们的实践证明：感觉到了的东西，我们不能立刻理解它，只有理解了的东西才更深刻地感觉它”。荧光显微术的基本问题就是分析被检标本的荧光现象。因此，对于荧光现象原理的理解，是正确运用荧光显微术于各种不同领域的重要条件。下面我们将与荧光显微术有关的一些基本理论概略作一介绍。

## 第一节 光

要了解荧光，必须先了解光。现代物理学证明，光是一类电磁波，是整个电磁波谱的一个组成部分。各种电磁波在自由空间中的传播速率都相等，它们之间的差别只是波长或频率不同而已（如图 1.1）。其关系由下式给出：

$$\lambda = \frac{C}{\nu}$$

式中  $\lambda$  代表波长， $\nu$  代表频率（即每秒振动次数）， $C$  代表速度（在真空中每秒约等于  $3 \times 10^5$  公里）。

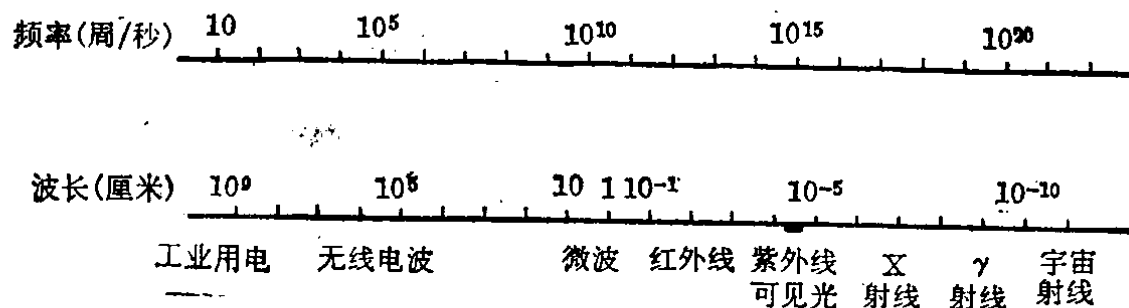


图 1.1 电磁波谱的组成

表 1.1 各色光谱的组成

| 波 长 （毫微米）  | 色 觉 | 种 类   |
|------------|-----|-------|
| 120~380    | 不可见 | 紫外光   |
| 380~430    | 紫   | } 可见光 |
| 430~460    | 蓝   |       |
| 460~500    | 靛   |       |
| 500~550    | 绿   |       |
| 550~600    | 黄   |       |
| 600~660    | 橙   |       |
| 660~750    | 红   | } 红外光 |
| 750~10,000 | 不可见 |       |

“光”一般是指眼睛可以看见的那一部分电磁波，光学频率范围内的“光”还包括看不见的紫外光和红外光。

光具有二象性。它在传播时表现为波动的性质(即有折射、反射、绕射、干涉等性质)，在和实物作用时表现为粒子的性质。光是能量的辐射形式，它发射是一份一份的，即成一连串的微粒子的形式，这种微粒子称为光子，是光能量的基元，所以又叫量子或光量子。一个光子或量子的能量以下式表示：

$$E = h\nu$$

或

$$E = \frac{C}{\lambda}$$

式中  $E$  表示光子能量， $h$  为普朗克常数，等于  $6.63 \times 10^{-34}$  焦耳·秒。

由上式可见，不同波长或不同频率的光子具有不同的能量，频率高(波长短)的光较频率低(波长长)的能量大。可见光根据波长对眼睛色觉依次(从长到短)分为红、橙、黄、绿、靛、蓝、紫，比红光波长更长的光称为红外光或红外线，比紫光波长更短的光称为紫外光或紫外线(表 1.1)。所以，在红外到紫外这一范围内，紫外光的能量最大，次为紫光，再次为蓝光，依次类推，能量最小的为红外光。