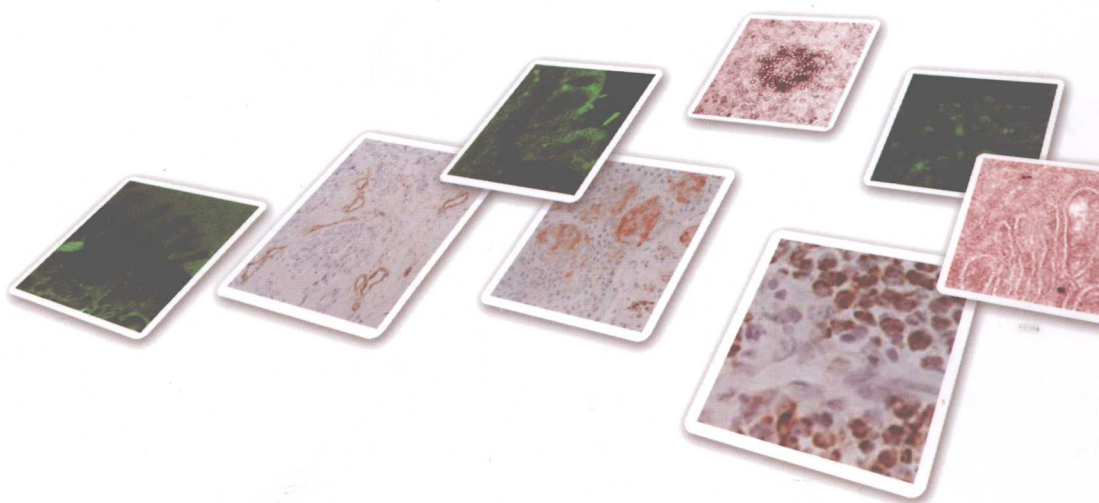


生物实验室系列

# 冰冻显微 免疫标记技术

黄炳权 著



Chemical Industry Press



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

ISBN 978-7-153-01077-3

生物实验室系列

# 冰冻显微免疫标记技术

黄炳权 著



平装本，32开，128页，1.50元

责任编辑：李 强  
责任校对：宋 夏

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区黄柏大街13号 邮政编码100011）

印 刷：北京云鹤印刷有限公司

装 订：天津新华印刷厂

750mm×1000mm 1/16 印张12.5 字数325千字

2007年10月北京第1版第1次印刷

邮 政 挂 号：010-61888888（传真）010-61888888 邮 政 挂 号：010-61888888



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

· 北 京 ·

定价：32.00元

32.00元

**图书在版编目 (CIP) 数据**

冰冻显微免疫标记技术/黄炳权著. —北京: 化学工业出版社, 2007. 9

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-01077-3

I. 冰… II. 黄… III. ①免疫测定②免疫诊断  
IV. R392-33 R446. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 136668 号

---

责任编辑: 李 丽 周 旭

文字编辑: 马丽平

责任校对: 宋 夏

装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 15% 字数 257 千字

2007 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

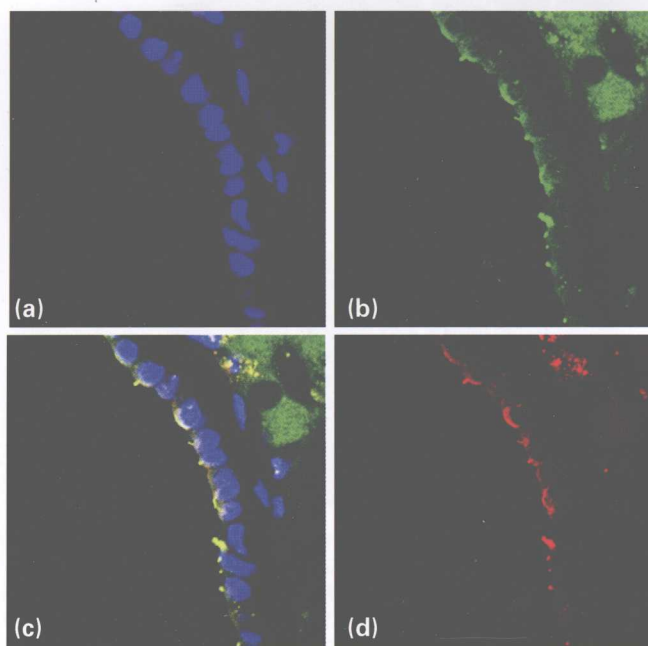
网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

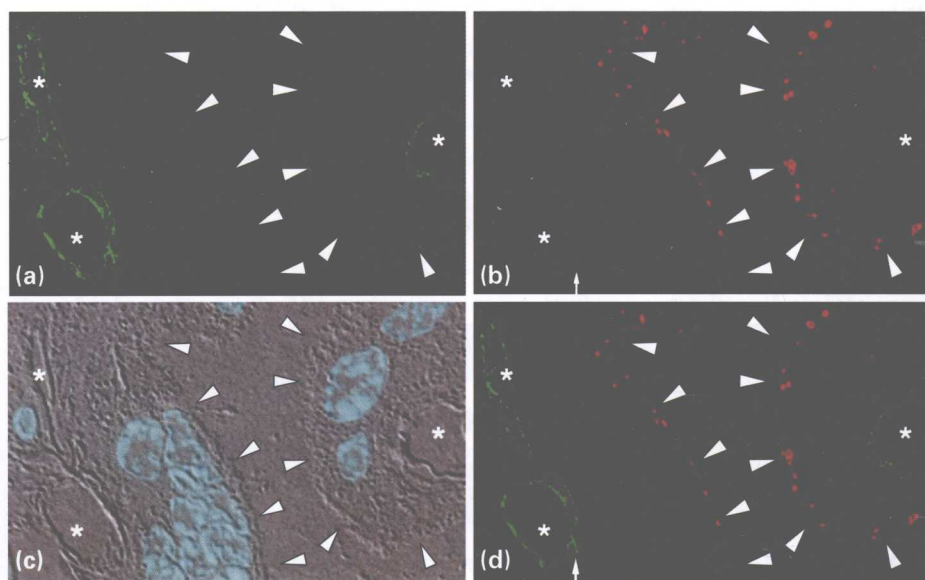
定 价: 39.00 元

版权所有 违者必究



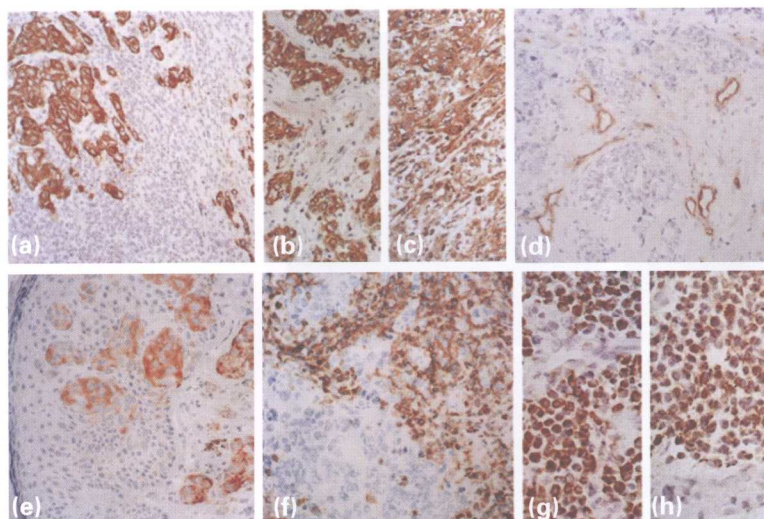
**彩图 2-8** 老鼠胆管纤毛的冰冻半薄片荧光标记

(a) 胆管横切面标记表皮细胞核(蓝色); (b) 胆管横切面标记 SSTR 蛋白(绿色);  
(c) 标记  $\alpha$ -微管蛋白(红色); (d) 三种标记重叠



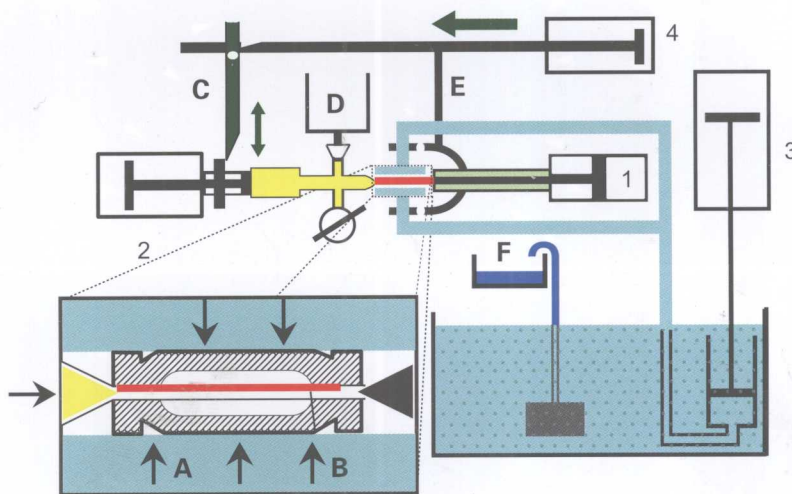
**彩图 2-9** 胎盘冰冻超薄切片 Cav-1 $\alpha$  和 EEA 1 的荧光双标记

(a) Cav-1 $\alpha$  (绿色) 主要标记在毛细血管内皮细胞和附近的外膜细胞上; (b) EEA1 (红色) 主要分布在合体滋养层中; (c) 同一切片的干涉差 (DIC) 图像, 蓝色荧光是 DAPI 染的细胞核; (d) Cav-1 $\alpha$  和 EEA1 抗体标记的合并图像 (Reproduced with permission. from Takizawa T, Robinson J M. Ultrathin cryosections: an important tool for immunofluorescence and correlative microscopy. Histochem Cytochem, 2003, 51(6): 707-714. )



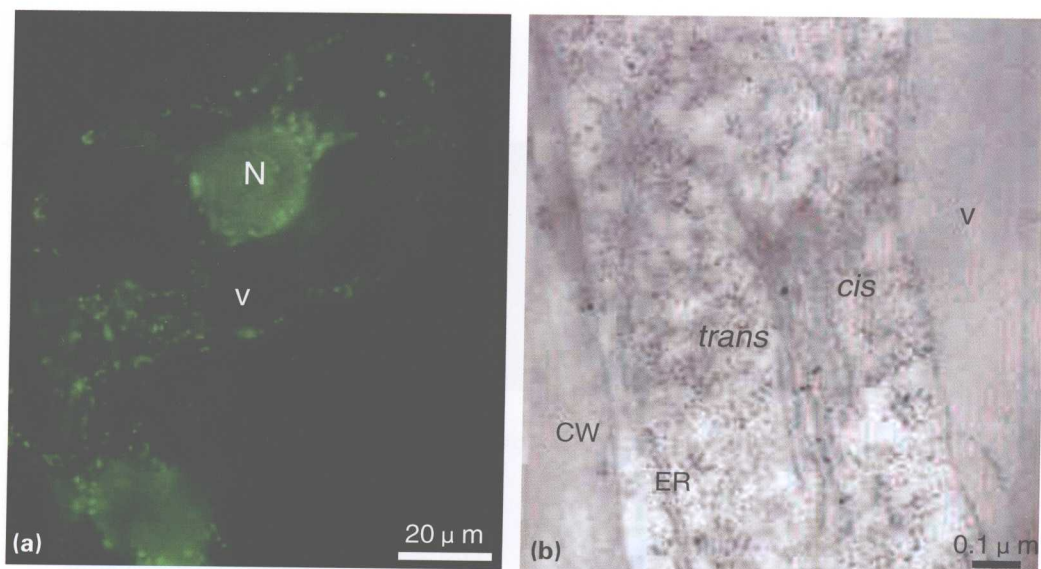
**彩图 2-10 快速 EnVision 免疫标记染色**

(a)~(d), (f)~(h) 染色原用 3, 3'-二氨基联苯胺, (e) 染色原用 3-氨基-9-乙基咔唑。(a) Pancytokeratin 抗体在淋巴瘤转移性乳癌的免疫标记; Pancytokeratin (b) 和 vimentin (c) 在乳腺癌细胞的表达; (d) CD34 在乳癌血管内皮细胞的免疫标记; (e) Melan A 在恶性黑色素瘤的免疫染色; (f) 在乳腺癌肿瘤渗透淋巴细胞中的白细胞抗原免疫反应; Pancytokeratin (g) 和突触体素 (synaptophysin) (h) 在 Merkel 细胞癌的免疫标记; (Reproduced with permission. from Kammerer, et. al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. J Histochem Cytochem, 2001, 49: 623-630.)



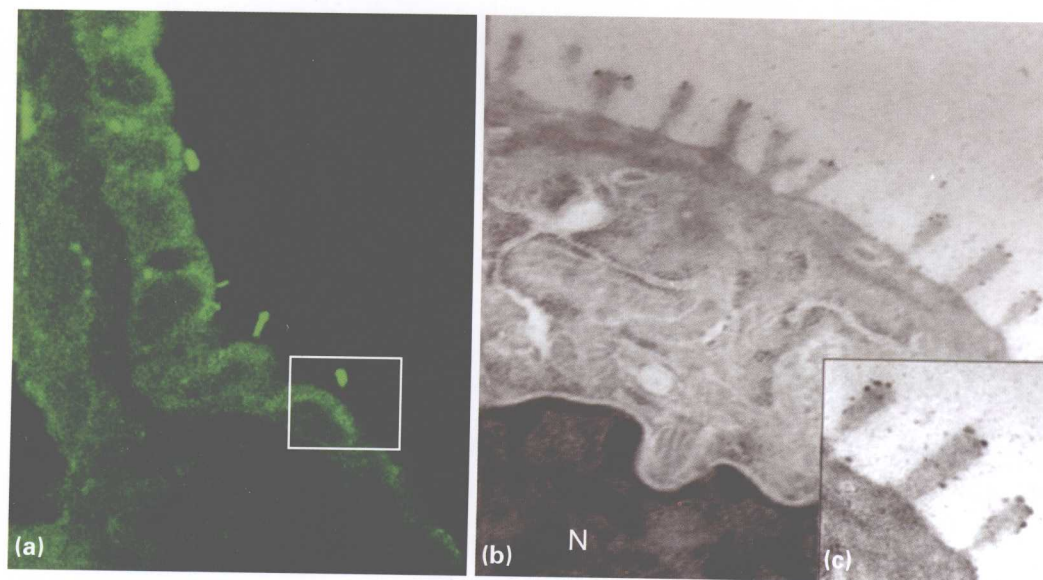
**彩图 5-2 Leica EMPACT 新型高压冰冻机的工作示意**

样品 B 装进外围带孔的钢管 A 或帽坯系统中。它通过样品杆安放在机器中, 由于压力系统和活塞 1 的作用把样品载体固定在机器中。在 2000bar 的压力下样品载体紧紧地夹在一起。压力系统的容积大约在 300 $\mu$ l 左右, 灌满了甲基环乙烷并通过单向阀门通到 D 容器中。当样品固定后, 活塞 2 启动, 但可通过闸门 C 停止。然后活塞 3 在 10bar 左右的压力下开始预冷系统, 喷射到样品的液氮可通过系统 E 来调整。最后闸门 C 开启, 活塞 4 启动, 压缩气动活塞产生 150kPa 的压力, 压力通过 3 mm 直径的高压活塞在 20ms 内产生 2000bar 的压力, 与此同时系统 E 直接把液氮喷射在样品上。当高压冰冻完成后, 活塞 1 回原位, 样品转放到液氮容器 F 上。(图引自 Studer 等, 2001)



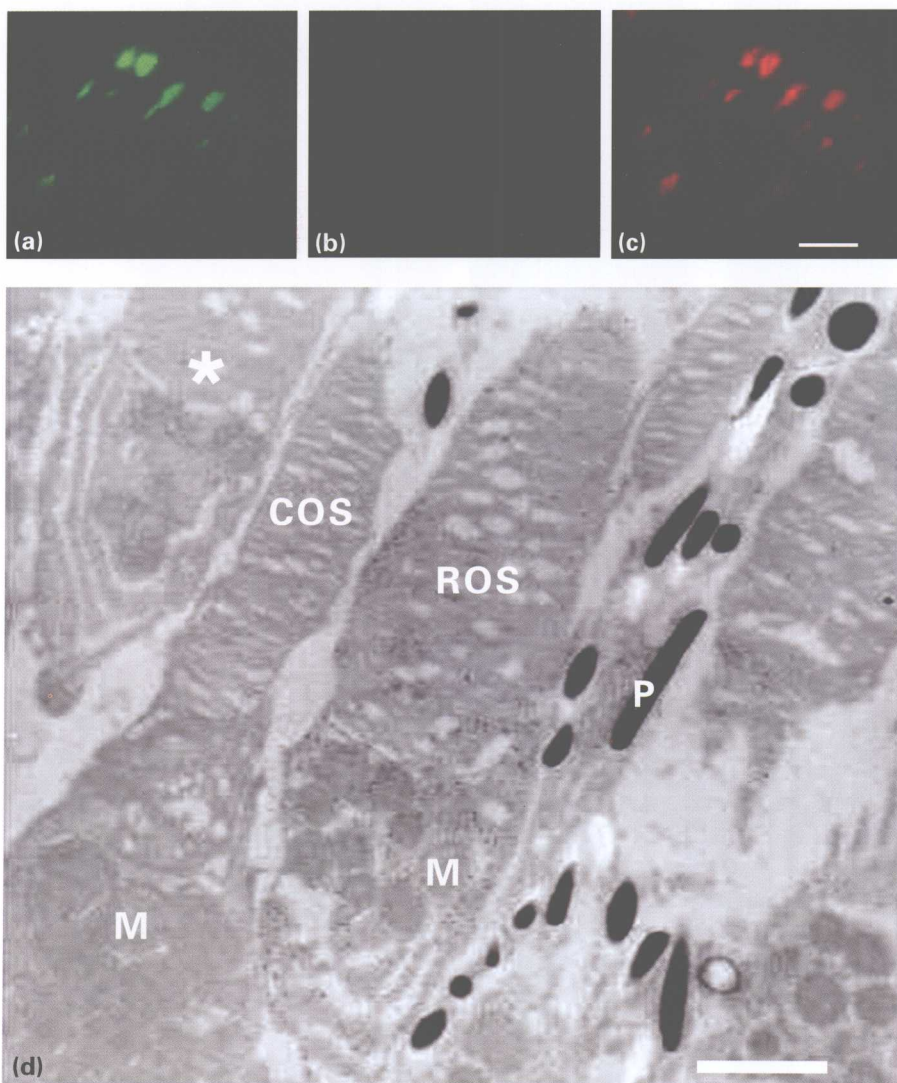
**彩图 7-3** XylT36::GFP 在转基因烟草 BY-2 悬浮细胞的分布

(a) 高尔基结合的 GFP 荧光；(b) 用抗 GFP 抗体标记转基因细胞的电子显微镜图像，胶体金标记在高尔基体上。细胞固定 120min，包埋在 LR White 树脂中。CW—细胞壁，V—液泡，ER—内质网，*trans*—反式，*cis*—顺式 (引自 Follet-Gueye 等，2003)



**彩图 9-8** 胆管上皮细胞 AC6 蛋白对应荧光共聚焦显微镜和电镜图像

(a) 量子点标记的胆管上皮 AC6 蛋白 (绿色，框内为对应电镜观察的部位)；(b) 胆管上皮细胞的电镜图像；(c) 放大的胆管上皮细胞电镜图像，箭头指示为黑色的量子点粒主要标记在细胞膜和细绒毛上



**彩图 9-10** 斑马鱼杆视觉蛋白的 GFP 转染组织的光电镜对应标记图像

(a) 斑马鱼眼杆视觉蛋白的 GFP 绿荧光；(b) 在抗 GFP 抗体温育前切片在红光通道无荧光；(c) 在染抗 GFP 抗体后 GFP 的免疫荧光定位；(d) 超薄切片上免疫金在视杆 (ROS) 上 GFP 的定位 (Reproduced with permission from Luby-Phelps, et, al. Visualization of identified GFP-expressing cells by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51(3): 271-274. )

# 生物实验室系列

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004 年 3 月)
- 拟南芥实验手册 [影印] (2004 年 5 月)
- 转基因动物技术手册 [译] (2004 年 9 月)
- RNAi——基因沉默指南 [译] (2004 年 10 月)
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (2005 年 1 月)
- 生物安全柜应用指南 (2005 年 3 月)
- 生物化学实验技术 (2005 年 5 月重印)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2005 年 6 月重印)
- 分子生物学实验参考手册 [译] (2005 年 6 月)
- DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 (2005 年 6 月)
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册 [译] (2005 年 7 月)
- 医学微生物学实验技术 (2006 年 1 月)
- 小鼠胚胎操作实验手册 (第三版) [译] (2006 年 1 月)
- 植物分子生物技术应用手册 (2006 年 2 月)
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法 [译] (2006 年 2 月)
- PCR 技术实验指南 (第二版) [译] (2006 年 3 月)
- 植物细胞工程实验技术 (2006 年 4 月)
- 生物安全实验室建设 (2006 年 4 月)
- 人肿瘤细胞培养 [译] (2006 年 5 月)
- 细胞生物学实验技术 (2006 年 6 月)
- 组织工程方法 [译] (2006 年 6 月)
- 免疫组织化学实验技术及应用 (2006 年 6 月)
- 生物芯片技术应用详解 (2006 年 9 月)
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [译] (2006 年 10 月)
- 现代实验动物学技术 (2007 年 1 月)
- 核酸分子杂交技术 (2007 年 7 月)
- 基因表达分析手册 [译]
- 蛋白质纯化实验指南 [译]
- 冰冻显微免疫标记技术

## 出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。

而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

**在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。**一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

**本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。**一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

**“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。**

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！**

**祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！**

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

## 序

当今冰冻显微免疫细胞化学技术经过逐步改进和完善，已广泛应用于分子生物学基础理论、医学病理及医疗诊断上。为适应当前的需要，黄炳权博士编著了《冰冻显微免疫标记技术》。我认识黄炳权博士是在 20 世纪 80 年代，他在植物生殖生物学方面有很出色的研究成果，其中部分工作就是应用免疫标记方法揭示一些在理论上具有重大意义的问题。二十多年来，黄博士不断钻研冰冻显微免疫标记技术，并将其应用于自己的研究中和作为自己教学讲授的“细胞生物学技术”课的一部分内容，可以说，黄博士在冰冻显微免疫标记技术方面积累了很丰富的经验。

本书对技术原理阐述清楚，对技术操作的步骤、方法说明详细。此外，本书还有一些特点，如对关键步骤特别附简图和图片说明，使读者容易理解；对各种技术的优、缺点进行了分析；指出了在实验操作中出现问题解决方法等。此外，本书还在附录中介绍了互联网中的有关参考资料，便于读者必要时查阅。这些都说明作者对编写此书有高度的责任感，力求使读者在理解技术原理的基础上掌握实验方法，并能根据具体的实验室条件、实验目的灵活运用。本书不失为一本好教材，也可作为细胞生物学、医学研究人员的参考书。

刘述宣 (北京大学 教授)

2007 年 5 月

## 前言

随着人和其他主要生物模型基因测序的完成,了解基因产物——蛋白质的功能是分子生物学新的任务和挑战。蛋白质和其他抗原的显微免疫细胞化学定位为了解蛋白质在细胞中的作用和功能提供了重要的信息。近年来细胞生物学的研究技术发展迅猛,尤其是在免疫细胞生物学技术方面既整合了宏观的细胞整体和微观的分子水平,又结合了活体的分子追踪和固定的超微定位。其中冰冻显微免疫细胞化学作为发展中的一门前沿技术正广泛应用在分子生物学基础理论研究、医疗诊断和医学病理研究上。

自 20 世纪 80 年代中期以来,作者一直从事有关免疫显微荧光标记和冰冻免疫电镜的科研和技术开发工作,先后在美国俄克拉荷马大学电镜实验室、马萨诸塞州大学生物图像中心实验室、香港大学植物系、约翰·霍金斯大学生物图像中心和现在美国梅尔医院 GI 基础研究中心和电镜中心实验室进行免疫光电镜和细胞生物学的学习、研究和教学工作。研究课题涉及各种冰冻免疫细胞学新技术和生物医学材料。同时承担研究生、博士后和其他研究人员细胞生物学技术的教学和训练。本书是在多年研究成果和教学实践的基础上参考大量有关文献编写而成,其中部分技术和方法是作者多年积累的经验。

本书共 11 章,系统地介绍了生物样品的冰冻处理、固定方法和免疫细胞化学的标记技术。本书除介绍当前在分子生物学上广泛使用的各种冰冻免疫显微标记技术外,还重点介绍了近年来发展的高压冰冻固定、光学和电子显微镜对应定位技术。其中部分技术已作为常规方法在作者的实验室成功使用。免疫细胞化学特别是冰冻免疫电镜是一门技巧性强和技术条件要求高的技术,要获得高质量的免疫标记图像,不但需要对各种技术的原理和实验的关键步骤有所了解,而且要善于发现问题并加以改进和优化。基于以上的要求,本书在编写中注意突出以下几个特点。①技术成熟性和发展性。围绕生物样品的冰冻处理,除了介绍目前成熟的常规冰冻免疫技术外,还推荐近年来发展的相关新技术。如现在冰冻切片技术(第 2 章和第 3 章)比早期的技术有了相当大的改进,特别是在形态的保存方面,本书对于关键步骤作了重点阐述,同时在现有技术的基础上介绍了最近发展的冰冻切片免疫荧光和电

镜对应定位新技术(第9章)。②技术的特殊性。针对位于不同细胞层面抗原的技术,如用免疫冰冻断裂技术去标记细胞膜的抗原(第10章)和冰冻负染色免疫标记颗粒生物样品(第11章)。③技术的适用性。在快速冰冻固定(第4章)、高压冰冻固定(第5章)和冰冻置换(第6章)中对各种技术的优、缺点以及它们应用的范围作简要说明,以期读者可根据自己的设备和条件作适当的选择,同时介绍一些设备要求和简单的自制方法。④取材尽量广泛。涉及不同动物、植物、微生物材料的处理方法,介绍不同的应用实例,介绍的方法是一般实验室的常规方法。⑤阐述重点,具简明性。在介绍常规实验方法的同时对关键步骤的原理作简要阐述,以期举一反三,并采用简图和图片对关键实验步骤进行说明。⑥逻辑分析性。分析实验结果和图像经常出现的问题和提出可能的纠正方法,以期改进和优化实验条件。⑦在附录中介绍了互联网中有关参考资料、设备和试剂的主要供应商和显微细胞化学技术问题的讨论等。

编写过程中北京大学的胡适宜教授和美国匹兹堡大学医学院电镜中心国凤利博士对本书大纲和全文作了认真审阅和修改,特别是对现代中文专业名词术语的准确使用等方面提出了宝贵的意见,在此表示真挚的谢意。同时感谢美国俄克拉荷马大学电镜实验室主任 Scott Russell 教授对本人电镜技术的指导,美国马萨诸塞州大学 Peter Hepler 教授在高压冰冻电镜技术方面的帮助,美国约翰·霍金斯大学生物图像中心主任 Michael McCaffery 在冰冻固定和切片技术方面的指导和帮助。

免疫显微细胞化学技术发展日新月异,本书力求全面涵盖冰冻显微免疫标记技术的各层面,但近年来一些新技术如冰冻电镜技术和重构三维结构图像的电子X射线断层术在不断地发展和完善中,所以未收集在本书中,书中不足之处望读者指正。

黄炳权

美国梅尔医院 (Mayo Clinic)

2007年1月

# 目 录

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 第 1 章 冰冻显微免疫细胞化学的发展和应用 .....     | 1  |
| 1.1 历史简述和技术发展 .....              | 1  |
| 1.2 标记方法的选择 .....                | 3  |
| 1.3 显微免疫细胞化学在分子生物学和医学研究的应用 ..... | 7  |
| 1.3.1 在细胞分子生物学中的应用 .....         | 7  |
| 1.3.2 在病理学和肿瘤诊断中的应用 .....        | 9  |
| 第 2 章 冰冻切片和光学显微镜的免疫细胞化学 .....    | 12 |
| 2.1 免疫标记的基本原理 .....              | 12 |
| 2.1.1 抗体的种类 .....                | 12 |
| 2.1.2 抗体的结构 .....                | 13 |
| 2.1.3 抗原定位标记物 .....              | 13 |
| 2.1.4 抗体的标记方式 .....              | 17 |
| 2.1.5 抗体对不同抗原的双重或多重标记 .....      | 20 |
| 2.2 抗体特异性测定和实验对照 .....           | 20 |
| 2.2.1 测定新的第一抗体 .....             | 20 |
| 2.2.2 抗体所引起的非特异性染色 .....         | 21 |
| 2.2.3 防止非特异性标记的方法 .....          | 21 |
| 2.3 生物样品的处理和冰冻切片 .....           | 22 |
| 2.3.1 大组织块的冰冻切片方法 .....          | 22 |
| 2.3.2 冰冻半薄切片方法 .....             | 25 |
| 2.4 免疫荧光标记 .....                 | 30 |
| 2.4.1 抗体和标记方法的选择 .....           | 30 |
| 2.4.2 荧光染料的特性和选择 .....           | 31 |
| 2.4.3 双重或多重荧光标记 .....            | 33 |
| 2.4.4 标记的步骤 .....                | 33 |
| 2.5 免疫过氧化物酶显色标记 .....            | 34 |
| 2.5.1 抗生物素蛋白-生物素方法 .....         | 35 |
| 2.5.2 快速临床免疫组织化学染色方法 .....       | 38 |
| 2.6 免疫标记出现问题的处理 .....            | 39 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 2.7 免疫标记实例 .....                    | 42 |
| 2.7.1 老鼠胆管纤毛的冰冻半薄片荧光标记 .....        | 42 |
| 2.7.2 用荧光和冰冻超薄切片对人胎盘抗原定位 .....      | 43 |
| 2.7.3 快速免疫组织化学染色 .....              | 44 |
| <b>第3章 冰冻超薄切片和电子显微镜的免疫金标记</b> ..... | 46 |
| 3.1 引言 .....                        | 46 |
| 3.2 设备和试剂的准备 .....                  | 47 |
| 3.2.1 冰冻切片机 .....                   | 47 |
| 3.2.2 切片刀 .....                     | 47 |
| 3.2.3 支持膜制作和碳覆盖 .....               | 48 |
| 3.2.4 免疫金粒标记物的制备 .....              | 49 |
| 3.3 生物样品的固定和处理方法 .....              | 54 |
| 3.3.1 固定剂 .....                     | 54 |
| 3.3.2 其他影响固定质量的条件 .....             | 55 |
| 3.3.3 固定程序 .....                    | 56 |
| 3.3.4 样品包埋处理 .....                  | 58 |
| 3.3.5 蔗糖冰冻保护 .....                  | 59 |
| 3.3.6 样品的安放和冰冻 .....                | 59 |
| 3.4 冰冻超薄切片 .....                    | 60 |
| 3.4.1 样品的初修整和半薄片 .....              | 60 |
| 3.4.2 样品块的细修整 .....                 | 61 |
| 3.4.3 冰冻超薄切片 .....                  | 61 |
| 3.4.4 切片的收集 .....                   | 62 |
| 3.4.5 冰冻切片的保存 .....                 | 62 |
| 3.5 免疫标记 .....                      | 63 |
| 3.5.1 标记方法和程序 .....                 | 63 |
| 3.5.2 蛋白 A 法 .....                  | 64 |
| 3.5.3 IgG 法 .....                   | 67 |
| 3.6 图像的分析和问题处理 .....                | 67 |
| 3.7 应用实例 .....                      | 71 |
| 3.7.1 蛋白 A 标记的应用例子 .....            | 71 |
| 3.7.2 IgG 方法的应用例子 .....             | 71 |
| <b>第4章 快速冰冻固定方法</b> .....           | 72 |
| 4.1 引言 .....                        | 72 |

|            |                    |            |
|------------|--------------------|------------|
| 4.2        | 冰冻固定的原理            | 73         |
| 4.3        | 冰冻保护剂              | 76         |
| 4.3.1      | 渗透性冰冻保护剂           | 77         |
| 4.3.2      | 非渗透性冰冻保护剂          | 77         |
| 4.4        | 冰冻固定的主要方法          | 78         |
| 4.4.1      | 插入式冰冻方法            | 79         |
| 4.4.2      | 冷金属块撞击式冰冻固定        | 85         |
| 4.4.3      | 丙烷喷射冰冻固定           | 89         |
| 4.4.4      | 喷洒式冰冻固定            | 92         |
| 4.4.5      | 高压冰冻固定             | 95         |
| <b>第5章</b> | <b>高压冰冻固定</b>      | <b>98</b>  |
| 5.1        | 高压冰冻固定的基本原理        | 98         |
| 5.2        | 样品处理和装放的关键步骤       | 100        |
| 5.2.1      | 样品载体               | 100        |
| 5.2.2      | 载体内细胞和组织的填充剂       | 103        |
| 5.2.3      | 冰冻保护剂              | 104        |
| 5.2.4      | 样品的装放              | 104        |
| 5.3        | 冰冻样品的处理            | 109        |
| 5.4        | 常规化学固定和高压冰冻固定效果的比较 | 111        |
| 5.4.1      | 化学固定和高压冰冻固定的比较     | 111        |
| 5.4.2      | 高压冰冻固定的局限性         | 113        |
| 5.5        | 冰冻固定过程中出现的问题和解决方法  | 114        |
| 5.5.1      | 高压冰冻固定的注意事项        | 114        |
| 5.5.2      | 冰冻固定过程中出现的问题和解决方法  | 114        |
| <b>第6章</b> | <b>冰冻置换</b>        | <b>116</b> |
| 6.1        | 概述                 | 116        |
| 6.2        | 冰冻置换的条件            | 118        |
| 6.2.1      | 冰冻置换的温度和材料的准备      | 118        |
| 6.2.2      | 冰冻置换的有机溶剂的选择和评估    | 119        |
| 6.2.3      | 冰冻置换装置             | 120        |
| 6.3        | 冰冻置换方法             | 121        |
| 6.3.1      | 加入固定剂的冰冻置换         | 121        |
| 6.3.2      | 免疫标记的冰冻置换          | 123        |
| 6.3.3      | 冰冻置换的各种使用方法        | 124        |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>第7章 低温包埋和免疫标记</b>             | 129 |
| 7.1 渐进低温脱水和丙烯树脂包埋                | 129 |
| 7.1.1 温度调整的方法和脱水溶剂               | 129 |
| 7.1.2 丙烯树脂的特点和 Lowicryl 的配方      | 130 |
| 7.1.3 渐进低温脱水方法                   | 131 |
| 7.1.4 低温渗透                       | 132 |
| 7.1.5 低温包埋                       | 134 |
| 7.1.6 树脂聚合                       | 134 |
| 7.1.7 Lowicryl 树脂包埋块的切片          | 136 |
| 7.2 LR White 和 LR Gold 树脂包埋      | 137 |
| 7.2.1 LR White 树脂的准备和包埋          | 137 |
| 7.2.2 LR Gold 树脂的包埋              | 139 |
| 7.3 免疫标记                         | 141 |
| 7.3.1 免疫标记的准备和应注意的问题             | 141 |
| 7.3.2 丙烯酸树脂切片的免疫标记步骤             | 141 |
| 7.3.3 后包埋免疫标记法                   | 142 |
| 7.4 免疫标记信号增强法                    | 144 |
| 7.4.1 纳米金-银染信号增强法                | 144 |
| 7.4.2 胶体金/抗生物素法                  | 145 |
| 7.4.3 生物素-抗生物素金技术                | 147 |
| 7.4.4 生物素化酪胺和纳米金银染法              | 148 |
| 7.5 免疫标记中可能遇到的问题和处理方法            | 149 |
| 7.6 应用实例                         | 151 |
| 7.6.1 动物单层细胞的后包埋免疫标记             | 151 |
| 7.6.2 植物细胞的低温包埋和免疫标记             | 152 |
| 7.6.3 大鼠胰腺和肝组织的免疫电镜标记——生物素-酪胺增强法 | 153 |
| <b>第8章 前包埋免疫电镜技术</b>             | 156 |
| 8.1 细胞和组织标记前的处理                  | 156 |
| 8.2 抗体标记                         | 157 |
| 8.3 前包埋免疫标记应用实例                  | 160 |
| 8.3.1 过氧化物酶标记单层培养细胞抗原            | 160 |
| 8.3.2 纳米金前包埋免疫电镜                 | 161 |
| 8.3.3 前包埋纳米金-银染和酪胺扩增法            | 162 |
| 8.4 前包埋免疫双标记                     | 163 |