

荧光和免疫荧光 染色技术及应用

(第二版)

许屏 编著



人民卫生出版社

第二版

荧光和免疫荧光 染色技术及应用

许 屏 编著

参编者 (以姓氏笔画为序)

白 岚 白 虹 任怡敏
许 屏 姜 俭 梁 玉

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

荧光和免疫荧光染色技术及应用/许屏编著.
—2版.北京:人民卫生出版社,2000
ISBN 7-117-03687-7

I. 荧… II. 许… III. ①荧光-染色(生物学)-
应用-医学检验②免疫荧光法-染色(生物学)-应
用-医学检验 IV. R446

荧光和免疫荧光染色技术及应用 第二版

编 著:许 屏

出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园3区3号楼

网 址:[http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: pmph @ pmph. com

印 刷:北京人卫印刷厂

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:9.5 插页:18

字 数:157千字

版 次:1983年10月第1版 2000年5月第2版第2次印刷

印 数:6 401—9 400

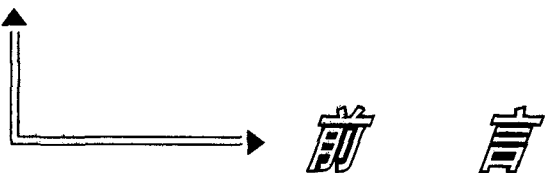
标准书号:ISBN 7-117-03687-7/R·3688

定 价:47.00元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前言



荧光显微镜技术包括荧光染色法和免疫荧光染色方法。荧光染色法可以显示细胞内的某些成分，特别是可以同时显示细胞和病原体内的两种核酸（DNA 和 RNA）的含量变化，从而可以观察细胞的增生能力和病原体的繁殖状况。荧光颜色对比鲜明、特异性强。所以，荧光染色法是一种良好的细胞化学染色法。在多年科研工作中，我们创建和改进了两种荧光染色方法，除可应用于细胞学和免疫细胞学研究外，在检测癌细胞和引起性传播疾病的多种病原体方面，亦有良好的实用价值。免疫荧光染色法是把免疫学技术和荧光染色结合起来的一种技术方法，它具有免疫学的特异性和荧光染色的敏感性。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，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。

本书着重介绍荧光染色法和免疫荧光技术方法和其在细胞学、免疫细胞学、微生物学、病理学和寄生虫学等各种医学科学研究及其在临床诊断方面的应用。其中包括多年来我们在实际工作中积累的科研成果资料，结合国内外学者们的工作一起进行简单介绍。

近年来，我国学者应用免疫荧光技术在基础理论研究和临床诊断方面的报道较多，但应用荧光染色方法对细胞学研究和临床检测方面的报道很少。我们改进的荧光快速染色法，根据细胞和病原体内两种核酸（DNA 和 RNA）不同颜色的荧光，可以清楚地观察细胞和多种病原体的形态、大小和分布。在一张涂片上用一种染色方法，可以较早期地发现癌变细胞和检测

► 2 …… 荧光和免疫荧光染色技术及应用

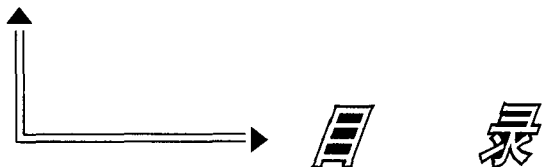
引起泌尿生殖器官的性传播疾病的多种病原体，诊断范围广泛。同时，能及时发现性传播疾病的合并感染，这一特点是其它染色方法和检测技术不能做到的。该染色法简单、快速、染色结果稳定可靠，图像清晰、荧光颜色对比鲜明，易于观察，有良好的实用价值，特别适用于对人群普查癌变细胞和初筛性传播疾病的感染者。该染色试剂现有试剂盒出售（由中华预防学会保健学会推荐，北京利德成科贸有限公司生产），特此作一简单介绍。

书中有不妥之处，望读者给予批评和指教，谢谢！

许 屏

1999年9月

目录



第一章 光、荧光和荧光色素	1
一、光和发光	1
二、荧光	3
三、荧光色素	4
(一) 荧光染色液的 pH 值	5
(二) 荧光染色液的浓度	6
(三) 荧光染色液的温度	7

第二章 荧光显微镜	9
一、光源	10
二、滤片系统	11
(一) Reichert 荧光显微镜中的各型滤片	11
(二) Nikon 荧光显微镜中的各型滤片	14
三、显微镜	17

第三章 动物组织的自发性荧光和续发性荧光	21
一、组织细胞的自发性荧光	21
(一) 显示肾上腺髓质细胞中去甲肾上腺素的荧光方法	23
(二) 显示神经纤维和肥大细胞中单胺成分的荧光方法	23
(三) 显示肾上腺素能神经纤维的改良法	24

(四) 显示脑干单胺神经元或消化道粘膜内分泌细胞的荧光方法	24
二、组织细胞的续发性荧光	25
(一) 吖啶橙 (简称 AO) 活细胞荧光染色法	25
1. 培养细胞 AO 荧光染色法	25
2. 末梢血细胞 AO 荧光染色法	26
3. 肥大细胞 AO 荧光染色法	27
4. 精子 AO 荧光染色法	27
5. 各种寄生虫和虫卵 AO 荧光染色法	27
(二) 7690-Xu 活细胞荧光染色法	29
1. 淋巴细胞 7690-Xu 荧光染色法	29
2. 巨噬细胞 7690-Xu 荧光染色法	34
3. 尿液中癌细胞 7690-Xu 荧光染色法	36
4. 骨髓穿刺液骨髓瘤细胞 7690-Xu 荧光染色法	37
5. 胸腹水癌细胞 7690-Xu 荧光染色法	38
(三) 固定细胞荧光染色法	38
1. 显示细胞内 DNA 和 RNA 的 AO 荧光染色法	38
2. 检测疟原虫血涂片 AO 荧光染色法	40
3. 改进的 AO 荧光快速染色法	41
4. 显示细胞核 DNA 荧光 Feulgen 反应法	44
5. 显示粘蛋白的荧光 PAS 反应法	45
6. 显示酸性粘多糖的荧光染色法	46
7. 显示淀粉样物质 (amyloid) 荧光染色法	46
8. 显示类脂质的磷化氢 3R 荧光染色法	47
9. 显示类脂质的 3, 4-苯并芘 (3, 4-benzopyrene) 荧光染色法	47
10. 同时显示两种核酸和类脂质的荧光染色法	48
11. 显示 Y 染色体的荧光染色法	48
12. 显示姊妹染色单体的荧光染色法	49
13. 荧光氨诱发细胞内一级氨基方法	51
14. 显示钙和铝的荧光染色法	51
(四) 病原微生物的荧光染色法	52
1. 抗酸杆菌金胺-罗达明荧光染色法	52
2. 抗酸杆菌金胺荧光染色法	53
3. 白喉杆菌荧光染色法	53

4. 球菌荧光染色法 54
 5. 螺旋体荧光染色法 54
 6. 立克次体荧光染色法 54

第四章 免疫荧光技术 56

一、荧光抗体染色方法的基本原理 56

(一) 直接法 57

(二) 间接法 57

1. 抗原间接显示法 (双层法) 57

2. 细胞内抗体间接显示法 (夹层法) 58

(三) 补体法 58

二、荧光抗体的制备和染色方法 59

(一) 抗原 (免疫原) 59

(二) 制备免疫血清 60

1. 制备高效价免疫血清的条件 60

2. 制备免疫血清的方法 61

(三) 提取免疫球蛋白 62

(四) 制备荧光抗体 64

1. 荧光色素 64

2. 标记方法 65

3. 标记抗体的提纯 66

(五) 荧光抗体染色方法 72

1. 直接染色法 72

2. 间接染色法 72

3. 补体染色法 73

4. 双重染色法 73

(六) 染色标本的保存和封片介质的制备 74

1. 染色标本的保存 74

2. 封片介质的制备 74

三、免疫荧光技术在医学中的应用 74

(一) 荧光抗体染色方法在组织细胞学研究方面的应用 74

1. 激素和酶的定位 74

2. 组织和细胞内抗原性物质的示踪 75

► 4 荧光和免疫荧光染色技术及应用

3. 细胞膜抗原和膜受体的观察	77
4. 有关免疫细胞学研究	79
(二) 荧光抗体染色方法在细菌学和病毒学中的应用	80
(三) 荧光抗体染色方法在自身免疫病研究与诊断中的应用	82
1. 肾脏疾病	84
2. 肝脏疾病	85
3. 重症肌无力	85
4. 系统性红斑狼疮	86
5. 类风湿性关节炎	87
6. 各种皮肤病	87
(四) 荧光抗体染色方法在寄生虫学中的应用	88
1. 阿米巴病	90
2. 锥虫病	90
3. 疟疾	91
4. 弓浆虫病	92
5. 丝虫病	92
6. 旋毛虫病	93
7. 血吸虫病	93
8. 棘球蚴病	94
9. 其他原虫病	95
10. 其他蠕虫病	97

第五章 荧光和免疫荧光染色在流式细胞术中的应用 101

一、流式细胞仪的基本结构和主要原理	101
(一) 基本结构	101
(二) 主要原理	102
二、光信号及意义	103
(一) 前向散射光	103
(二) 侧向散射光	103
(三) 荧光讯号	103
三、数据显示及分析	104
(一) 直方图	104
(二) 二维点图	104

(三) 三维图	105
四、流式细胞术可测量的主要参数	106
(一) 结构性参数	106
(二) 功能性参数	106
五、样本准备	106
(一) 单细胞悬液制备	107
1. 脱落细胞等标本	107
2. 单层培养细胞标本	107
3. 实体组织标本	108
4. 石蜡包埋标本	109
(二) 染色方法	109
1. 溴化乙啶或碘化丙啶荧光染色法	110
2. 派若宁 Y 荧光染色法	110
3. 吖啶橙荧光染色法	111
4. 异硫氰酸荧光素免疫荧光染色法	112
六、流式细胞术的主要应用	112
(一) 细胞周期和 DNA 倍体分析	112
(二) 染色体分析	115
(三) 细胞表面标志的检测	115
(四) 细胞分选	116

第六章 荧光显微摄影方法

一、自动摄影装置的组成部件	118
(一) 目镜取景器	118
(二) 聚焦望远镜	119
(三) 自动摄影装置的快门箱和曝光表	120
(四) 自动摄影装置暗盒	120
(五) 自动摄影装置的控制箱	120
二、显微摄影方法和步骤	122
(一) 自动曝光方法	122
(二) 手控曝光方法	123
三、显微摄影过程中易发生的问题和纠正方法	124
(一) 影像模糊	124

▶ 6 荧光和免疫荧光染色技术及应用

(二) 影像亮度不均匀	124
(三) 影像明暗反差小	124
(四) 影像画面中出现阴影	125
(五) 影像色调失真	125
四、常用黑白和彩色正负片及彩色相纸冲洗过程和配方.....	125
(一) 冲洗印放黑白片常用配方	126
(二) 冲洗印放彩色片常用配方和冲洗过程	127
五、冲洗彩色正负片和彩色相纸时的注意事项.....	135

参考文献	137
------------	-----

第一章



光、荧光和荧光色素

Stokes 1902 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，由于荧光染色方法和荧光装置的改进，特别是荧光抗体技术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棱镜后，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（800nm），折射率最小。紫光的波长最短（400nm），折射率最大。波长长于800nm的红外光和短于400nm的紫外光均为非可见光。

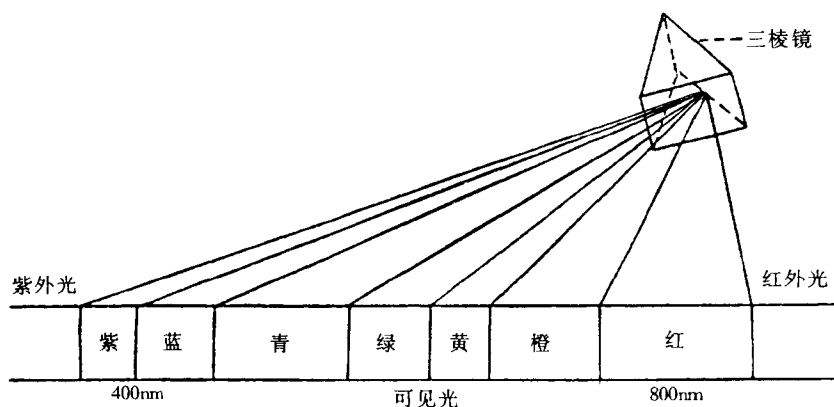


图1 光的色散

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或原子所吸收。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（即停止光照射），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，其发光机制都是相同的。

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）。

一般最容易被激发的电子是最外层的电子。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

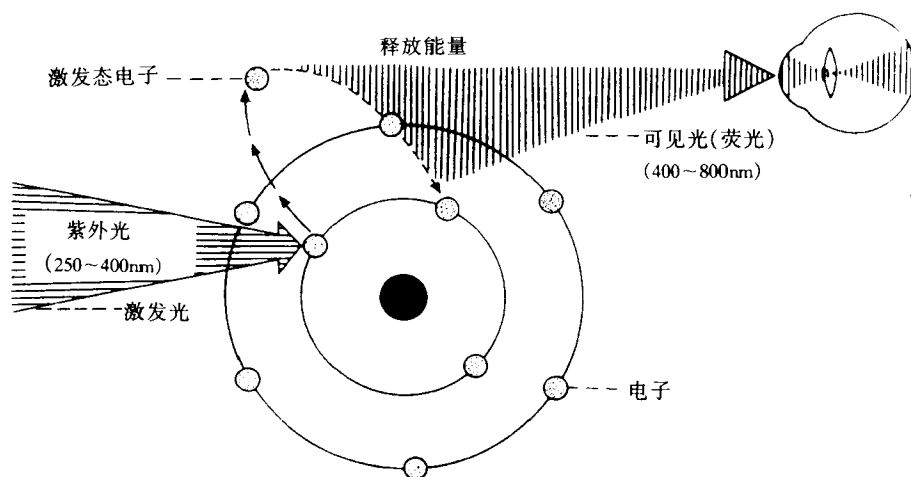


图2 紫外线激发荧光物质发射荧光示意图

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。这种以荧光标记的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，进行免疫细胞学的研究。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“免疫荧光技术”。

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出一定颜色的荧光。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。荧光色素一般在可见区域内，如吖啶橙的吸收光谱（最大吸收波长）是 455nm。其发射的荧光光谱是 450~700nm。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 380nm。它发射的荧光范围是 420~500nm。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。

一般，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 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首先配制成干液，可在低温中较长时间保存。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 (1/10mol 盐酸)：

盐酸 3.65 毫升
蒸馏水 1000 毫升

原液 II (1/15mol 磷酸二氢钾)：

磷酸二氢钾 9.08 克
蒸馏水 1000 毫升

原液 III (1/15mol 磷酸氢二钠)：

磷酸氢二钠 23.89 克
蒸馏水 1000 毫升

原液 IV (1/15mol 磷酸钠)：

磷酸钠 25.35 克
蒸馏水 1000 毫升

氢离子浓度	原液 I 毫升	原液 II 毫升	原液 III 毫升	原液 IV 毫升
pH 2.09	95	5	-	-
pH 3.51	5	95	-	-
pH 4.84	-	100	-	-
pH 5.81	-	90	10	-
pH 6.36	-	80	20	-
pH 7.11	-	40	60	-
pH 7.63	-	60	-	40
pH 8.22	-	55	-	45
pH 10.15	-	50	-	50
pH 11.14	-	40	-	60

(二) 荧光染色液的浓度

溶液的浓度对荧光染色的影响亦很大。绝大多数的荧光色素在固体状态不发荧光或荧光很弱，只有在溶液中才显示荧光。而在溶液中的荧光强度与荧光色素的浓度亦有密切关系。一般当荧光色素的溶液极淡时，增加浓度后