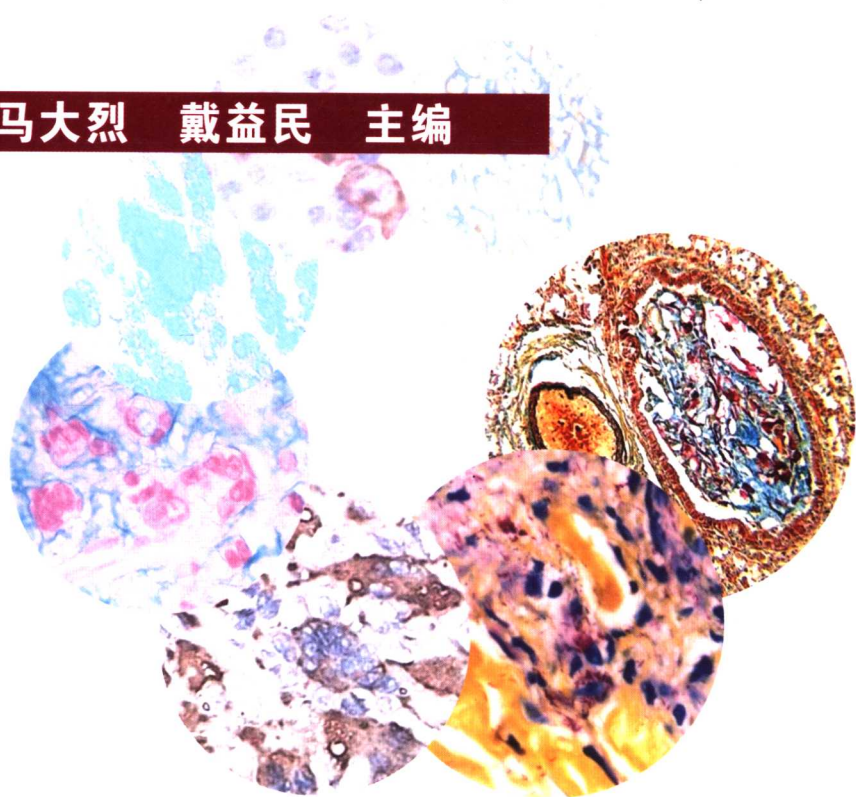


生物实验室系列

免疫组织化学 实验技术及应用

倪灿荣 马大烈 戴益民 主编



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

免疫组织化学实验技术及应用

倪灿荣 马大烈 戴益民 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫组织化学实验技术及应用/倪灿荣, 马大烈,
戴益民主编. —北京: 化学工业出版社, 2006. 5
(生物实验室系列)
ISBN 7-5025-8626-1

I. 免… II. ①倪…②马…③戴… III. 免疫化
学: 组织化学-实验 IV. R392.11-93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 040807 号

生物实验室系列
免疫组织化学实验技术及应用

倪灿荣 马大烈 戴益民 主编
责任编辑: 郎红旗 李植峰
责任校对: 王素芹
封面设计: 关 飞

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市万龙印装有限责任公司装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 23½ 插页 5 字数 584 千字

2006 年 6 月第 1 版 2006 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8626-1

定 价: 60.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

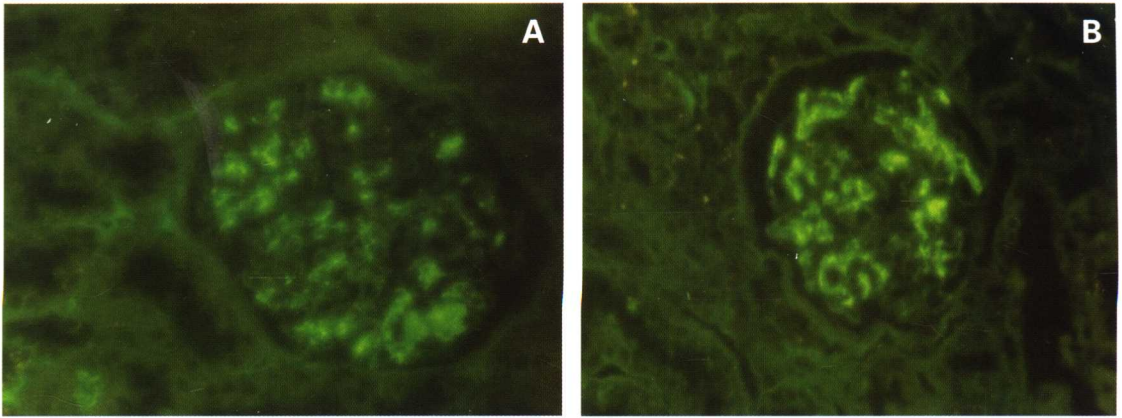


图 3-7 肾穿刺免疫荧光直接法和间接法
(FITC) IgA呈翠绿色荧光 (A为+++; B为++)

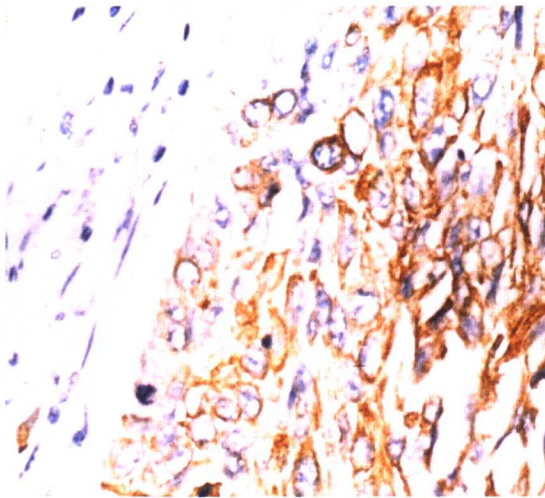


图 5-2 ABC 法检测肺肿瘤组织中的
CD44, $\times 150$

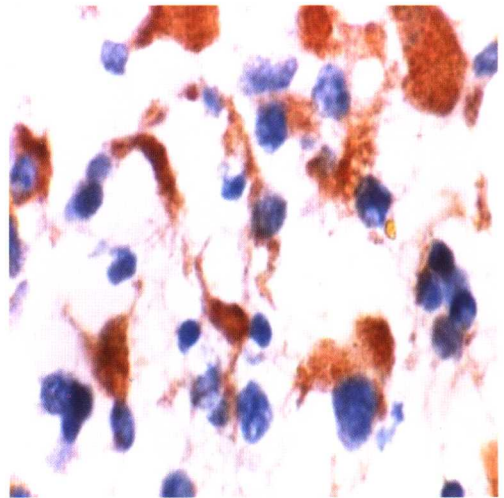


图 5-5 CSA 法检测胶质瘤组织中
CD44v6, $\times 400$

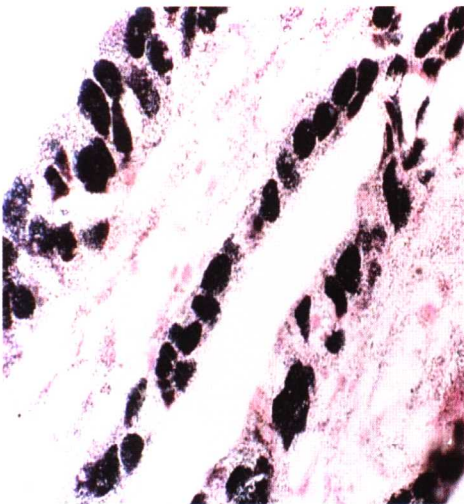


图 6-7 胃未分化癌 IGSS-P53
核内呈黑色阳性表达, 背景为红色, $\times 400$

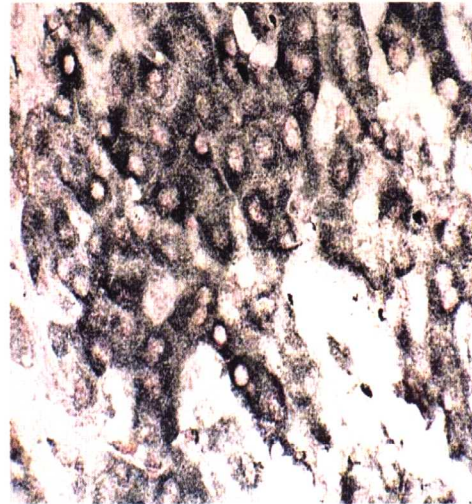


图 6-8 HCC IGSS-HBsAg
细胞浆内呈黑色阳性, $\times 200$.

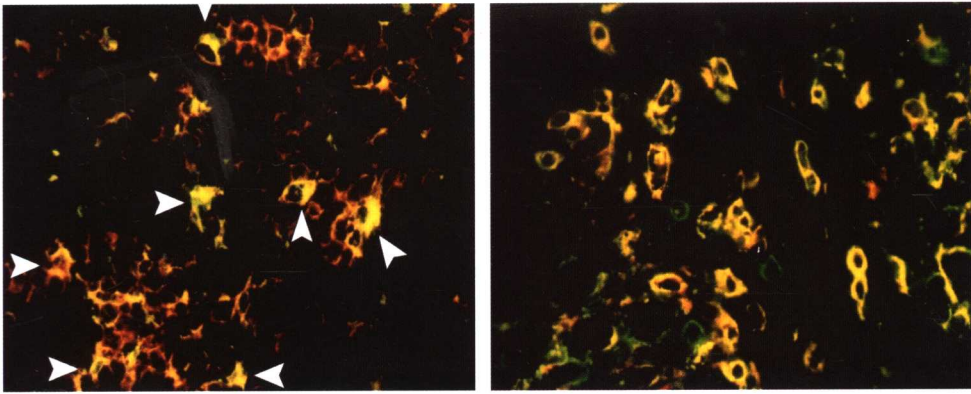


图 7-1 炎症皮肤组织 FITC- PE双荧光免疫标记 (间接法), ×100

左图示部分浸润于真皮层内的CD4 (+) 细胞同时表达有Lag抗原, 导致后者标记Lag抗原的绿色荧光 (FITC) 与前者标记CD4抗原的红色荧光 (TRITC) 呈色重叠, 变色为黄色荧光 (短箭头标示)。右图示真皮层内浸润的大多CD4 (+) T细胞(红色)同时表达有CD45RO抗原(绿色), 结果两者呈色重叠, 变色为黄色荧光 (Katou F 2000)

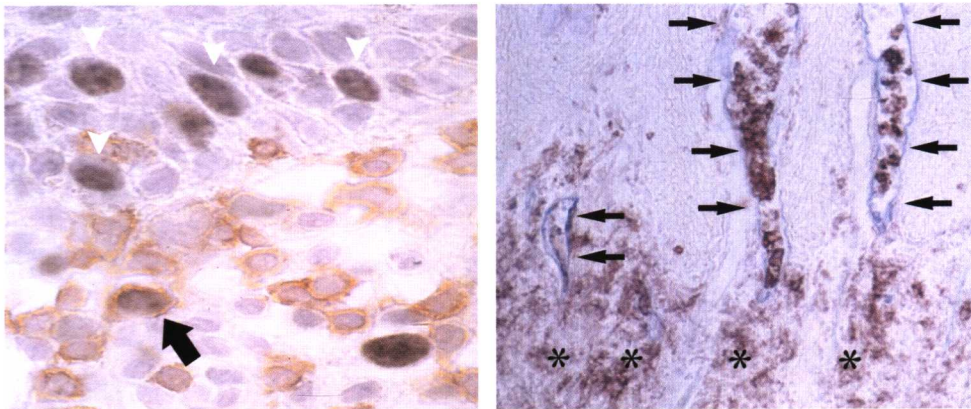


图 7-3 炎症皮肤组织单酶双底物免疫标记 (间接法); HRP-DAB (棕色) / 镍-钴DAB (黑) ×330 (苏木精衬染)

左图示真皮层内浸润的CD4 (+) T细胞(棕色,胞质)中,仅个别同时表达有 Ki-67核抗原 (核,黑色,粗箭头标示), 而表皮层内的角化上皮细胞则只表达Ki-67核抗原 (黑色,短箭头标示); 右图示皮内B7-2 (+) 朗格汉斯细胞 (棕黑色, 胞质) 成簇积聚在VEGFR-3 (+) 内皮细胞围绕的皮淋巴管内(蓝色, 箭头标示), 与真皮层内B7-2 (+) 朗格汉斯细胞 (棕黑色, 星状标示) 相对照 (Katou F 2000)

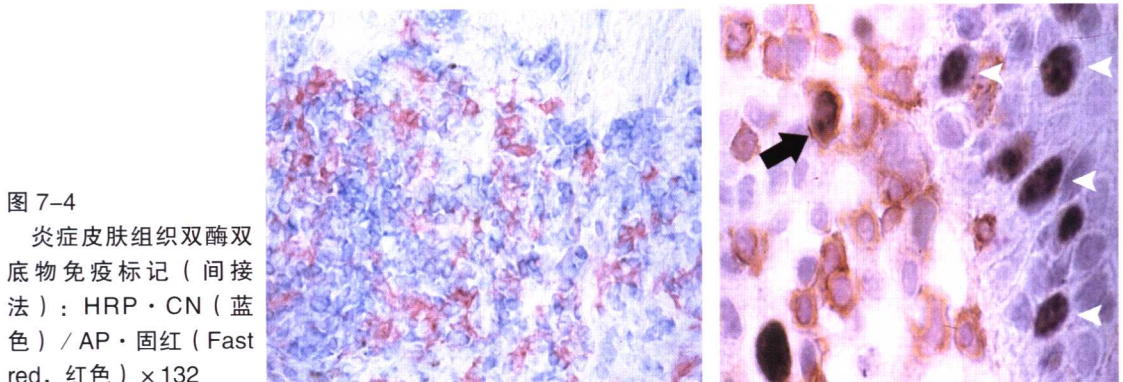


图 7-4 炎症皮肤组织双酶双底物免疫标记 (间接法): HRP · CN (蓝色) / AP · 固红 (Fast red, 红色) ×132

图示真皮层内浸润的CD4 (+) T细胞(CN, 蓝色)与表达有CD1a抗原的单核细胞 (固红, 红色) 混杂 (此图引自Katou 2000)

图 7-7 免疫组化双酶双重标记
小箭头示Ki67 (AKP/NBT) 呈紫蓝色;
大箭头示CK20 (HRP/AEC), ×200

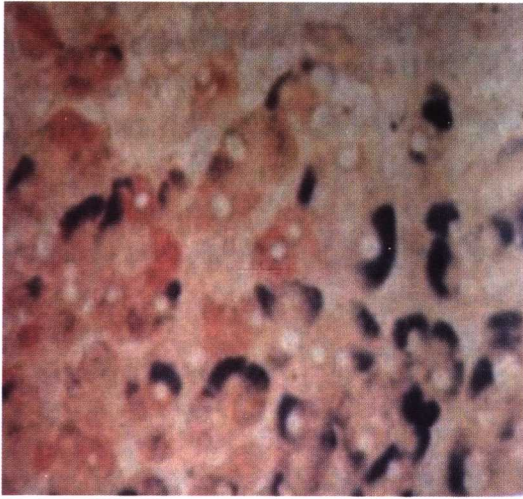


图 7-8 IHC 和 ISH 双重标记

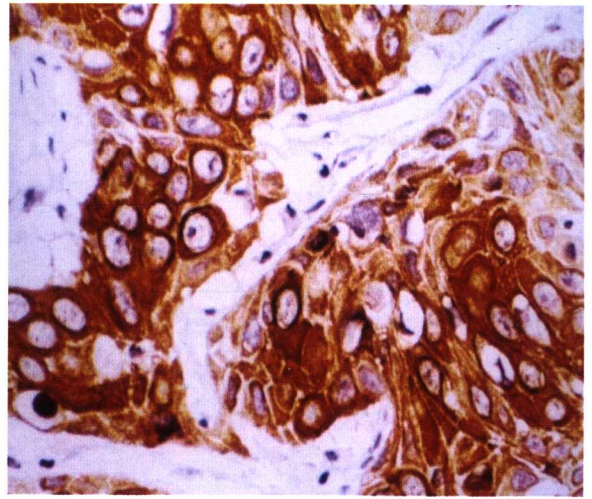


图 8-1 肝鳞状细胞癌，PAP法-CK19 胞浆表达 × 400

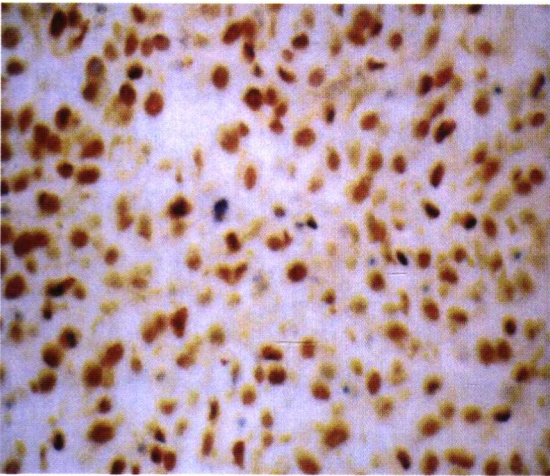


图 8-2 高度恶性肉瘤中 PcNA 阳性表达，× 200

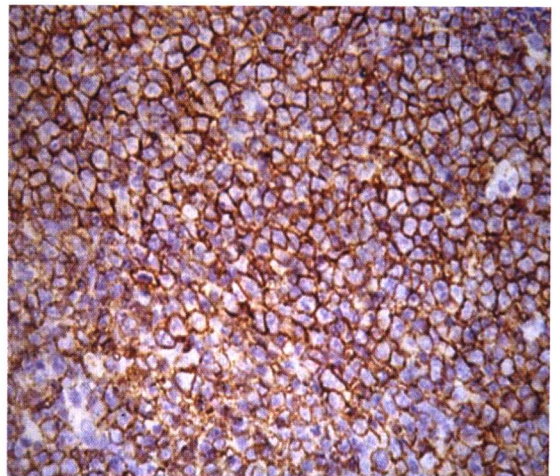


图 9-3 滤泡型非霍奇金淋巴瘤 LCA 阳性表达 (LsAB法)，× 400

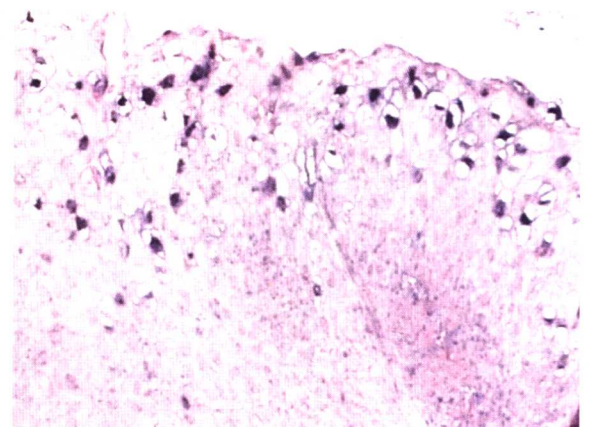
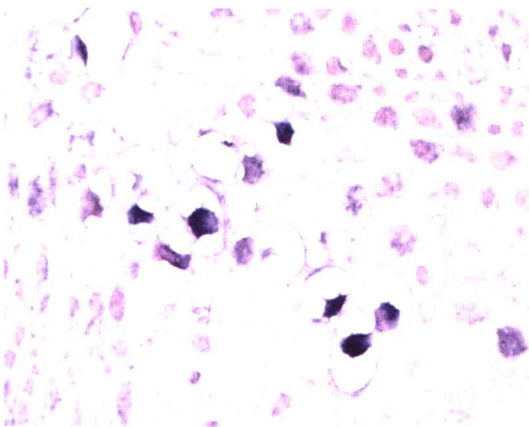


图 10-2 HPV6 / 11原位杂交检测

紫蓝色为阳性，背景为淡红色。左 × 200，右 × 100

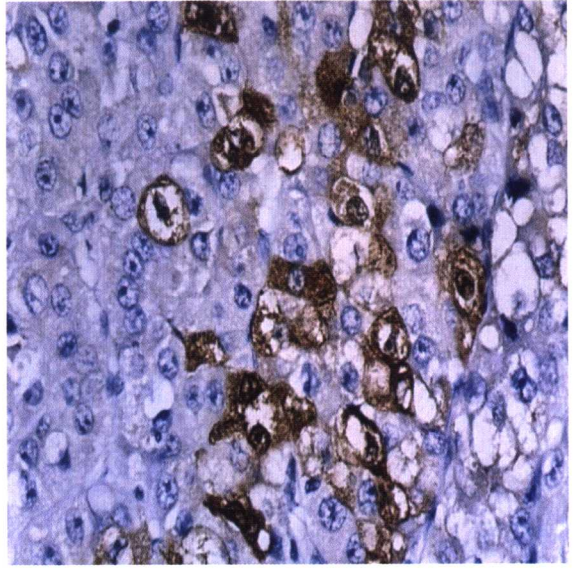
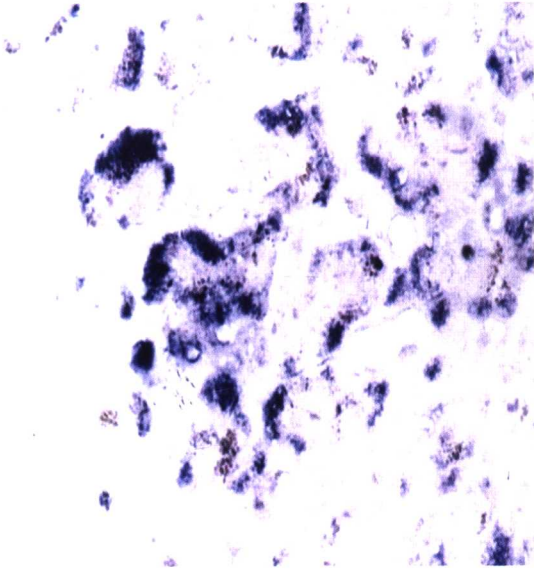


图 10-3 肝穿 ISH cDNA 探针检测 HBV

左图：阳性呈紫蓝色（AKP），背景为红色，×400；右图：呈棕褐色（HRP），背景为紫蓝色，×400

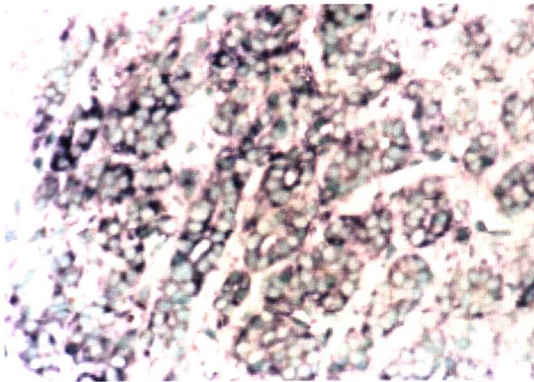


图 10-4 HCC中，弥漫癌细胞 hTERT mRNA 呈阳性表达，原位杂交 ×200

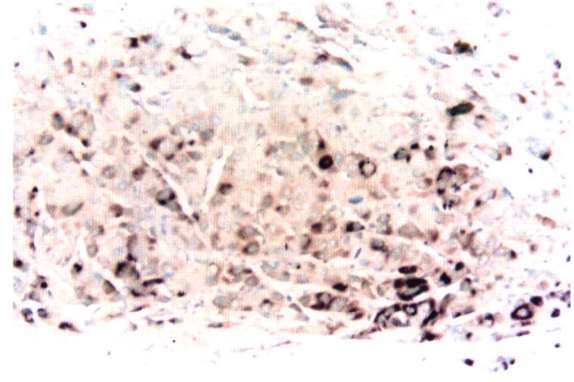


图 10-5 癌内单核性细胞 hTERT mRNA阳性表达，原位杂交，×200

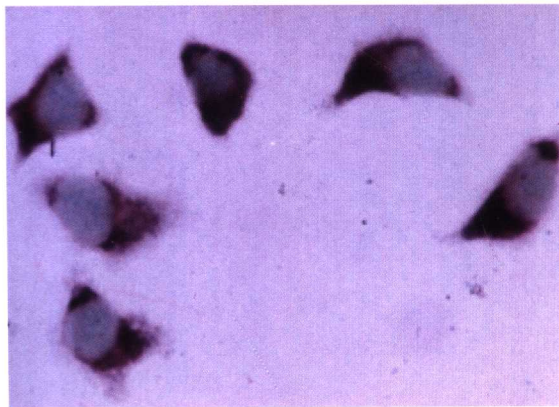


图 10-7 HCC 细胞 hTERT mRNA 呈阳性表达，原位杂交，×400

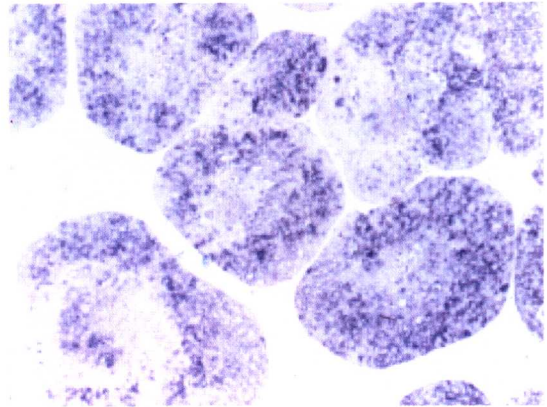


图 10-8 原位PCR杂交检测 HCV基因-2a，在癌区广泛表达，×200

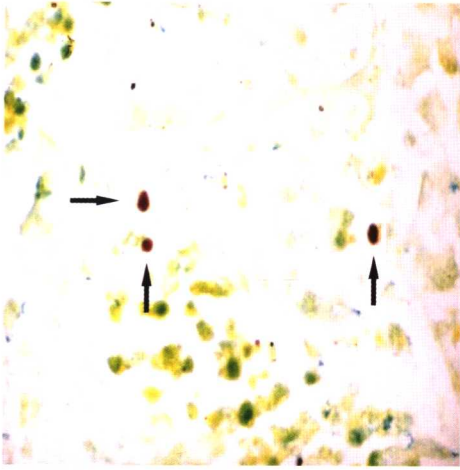


图 12-3 甲基绿-派诺宁染色，胞质呈红紫色为凋亡细胞，黄绿色荧光染色

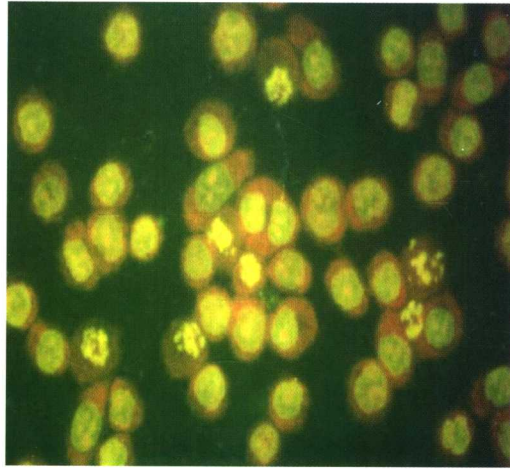


图 12-4 吡啶橙染色，凋亡细胞核可见致密浓染的黄绿色荧光碎片

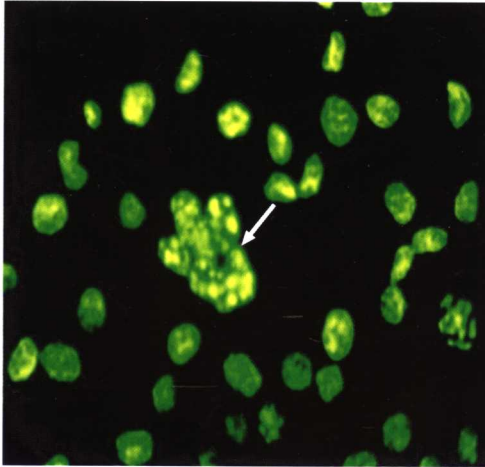


图 12-5 Hoechst 33258 荧光染色
凋亡细胞（箭头所指）染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光，非凋亡细胞呈均匀荧光染色

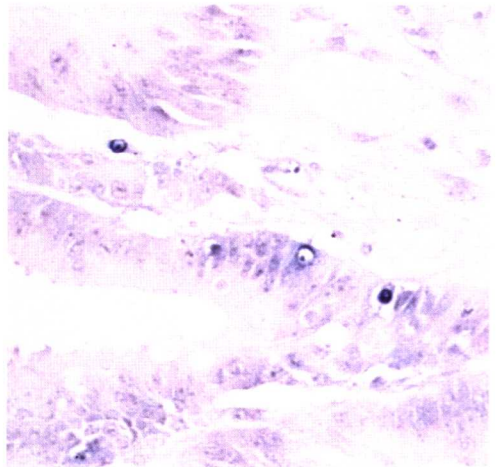


图 12-7 TUNEL 法检测胃癌组织中的凋亡细胞（AKP显示），凋亡细胞为紫蓝染色

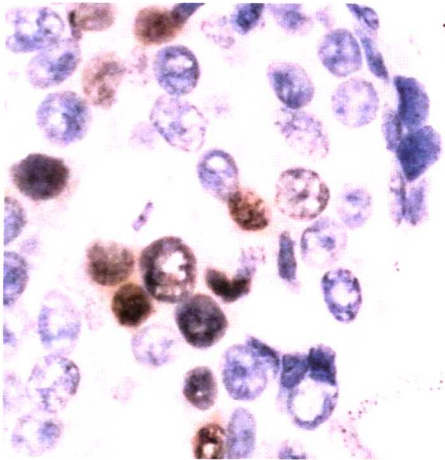


图 12-8 TUNEL 法检测胃癌组织中的凋亡细胞（HRP 显示），凋亡细胞为棕褐色， $\times 200$

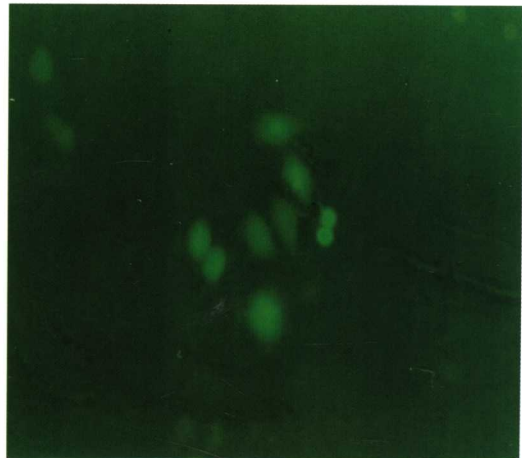


图 12-9 TUNEL 法检测胃癌细胞（FITC显示），爬片中的凋亡细胞为亮绿色荧光， $\times 150$

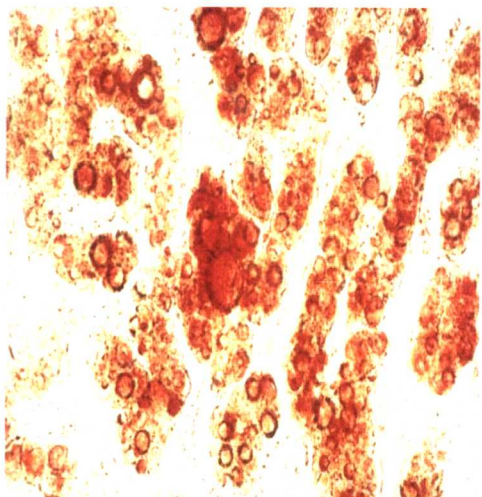


图 15-1 肝组织的油红 O-乙醇染色

脂质呈红色，背景无色，3.3×40

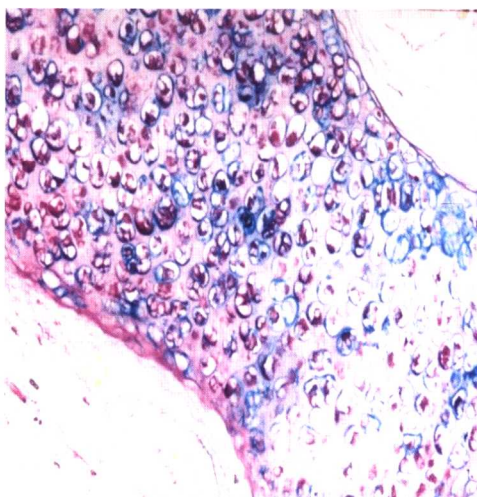


图 15-2 肺组织的阿尔辛蓝-Schiff 染色

中性黏液物质呈红色，酸性黏液物质呈蓝色，中性和酸性混合物质呈紫红色。3.3×20

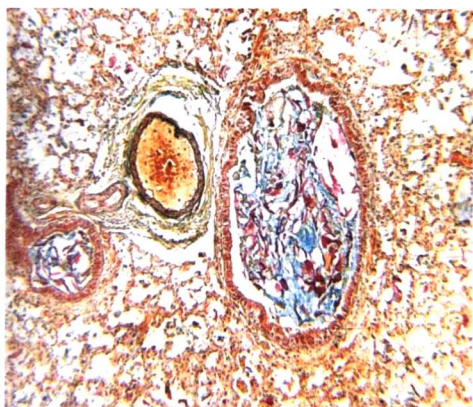


图 15-3 肺组织的阿尔辛蓝-荧光桃红染色

角化鳞状上皮呈红色，黏液物质呈蓝绿色，背景呈黄色。3.3×20

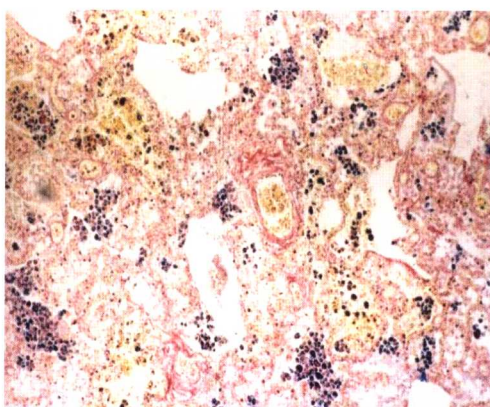


图 15-4 肺组织的 Perls (普鲁士) 蓝染色

含铁血黄素呈蓝色，胶原纤维呈红色，背景呈黄色。3.3×20

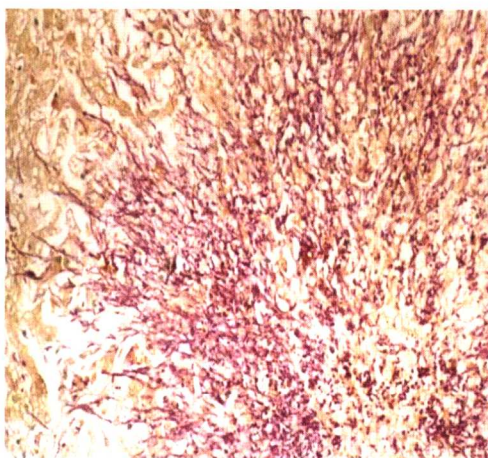


图 15-5 肝组织的高碘酸-复红染色

真菌呈紫红色，红细胞呈黄色。3.3×20



图 15-6 皮肤组织 Ziehl-Neelsen 抗酸杆菌染色

抗酸杆菌呈红色，细胞核呈蓝色。3.3×100

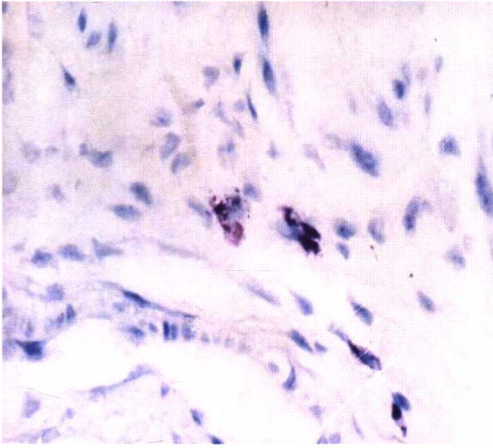


图 15-7 肺组织的甲苯胺蓝染色
肥大细胞颗粒呈紫红色，细胞核呈蓝色。3.3×40

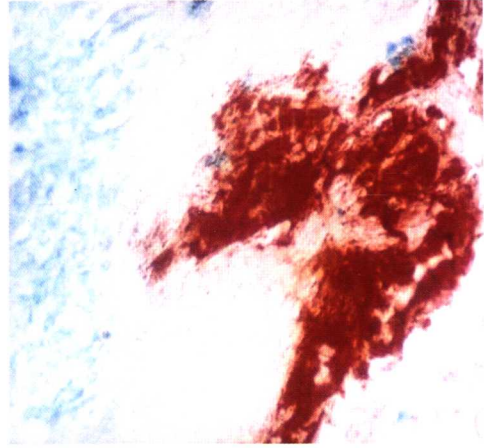


图 15-8 胃组织的茜素红染色
钙质物质呈红色，细胞核呈绿色。3.3×20

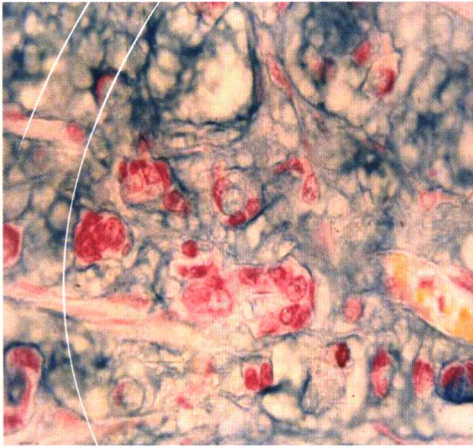


图 15-9 胃组织的 Feulgen-Rossenbeck 染色
DNA呈紫红色，黏液物质呈绿色，红细胞呈黄色。3.3×40

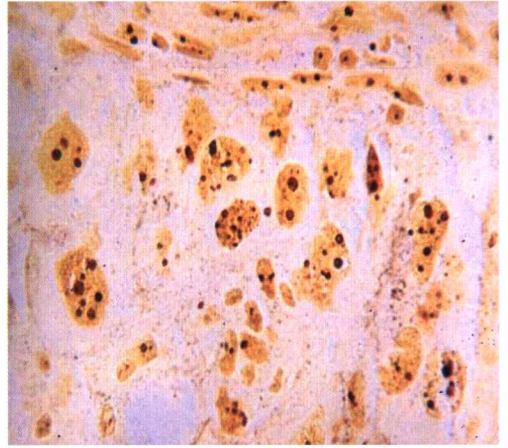


图 15-10 乳腺组织的 AgNOR 银染色
AgNOR颗粒呈黑色，背景呈黄色。3.3×40

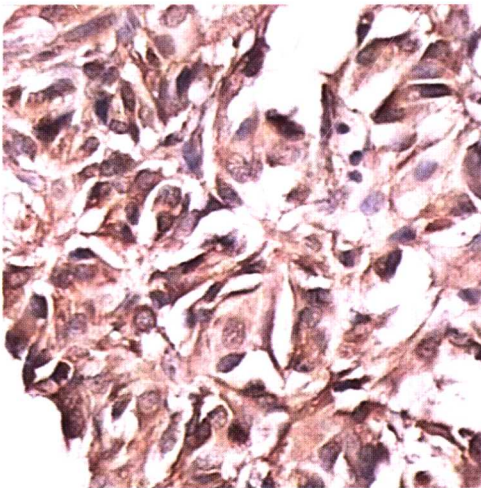


图 18-1 神经内分泌肿瘤 NSE 呈暗棕色胞质阳性

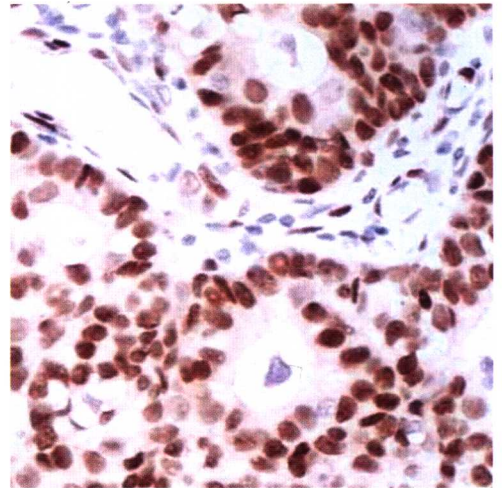


图 18-2 乳腺癌 ER>80%，呈亮棕色核阳性

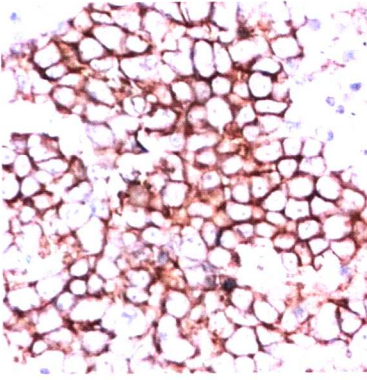


图 18-3 B 细胞淋巴瘤 CD20 胞膜阳性，呈网格状

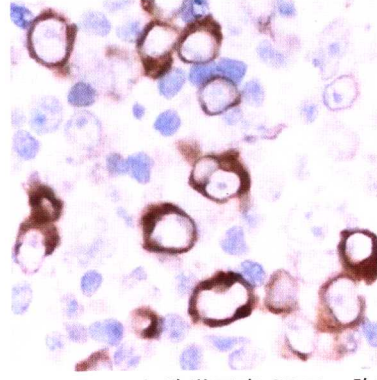


图 18-4 B 细胞淋巴瘤 CD79 α 胞膜阳性

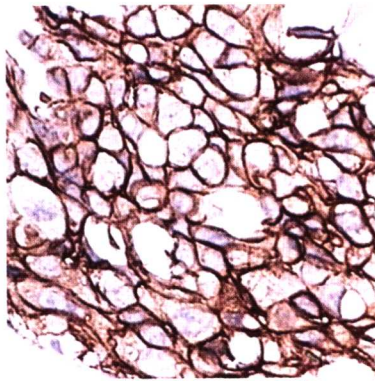


图 18-5 乳腺癌 C-erbB-2 胞膜强阳性

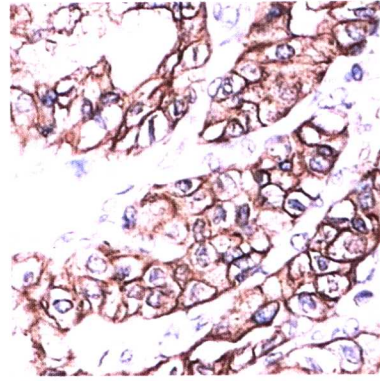


图 18-6 腺癌 EMA 胞膜阳性，胞质弱阳性

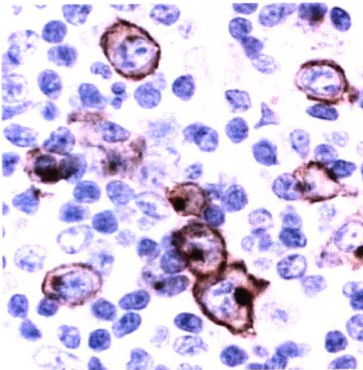


图 18-7 霍奇金细胞 CD30 胞膜和核周点状阳性

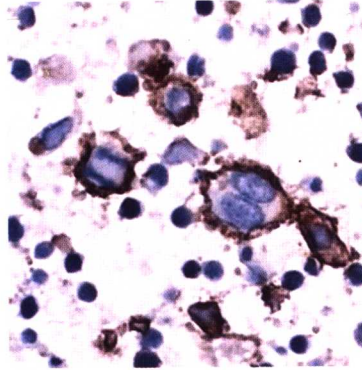


图 18-8 霍奇金淋巴瘤 R-S 细胞 CD30 胞膜阳性

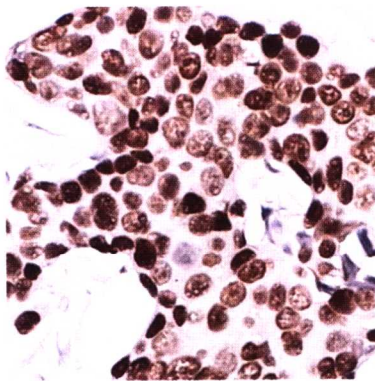


图 18-9 乳腺癌 Ki-67 胞核阳性，呈粗颗粒



图 18-10 腺癌 P53 胞核阳性，正常腺上皮阴性

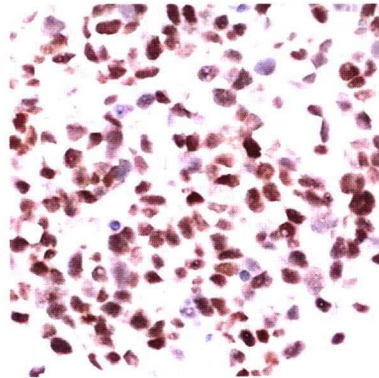


图 18-11 横纹肌肉瘤细胞生成素胞核阳性

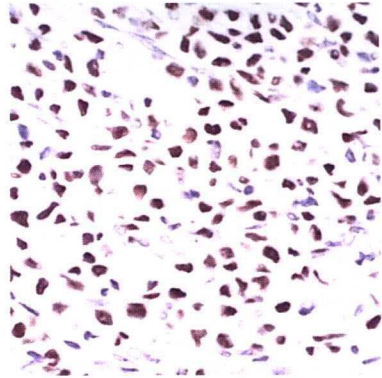


图 18-12 B 细胞淋巴瘤 Oct-2 胞核阳性

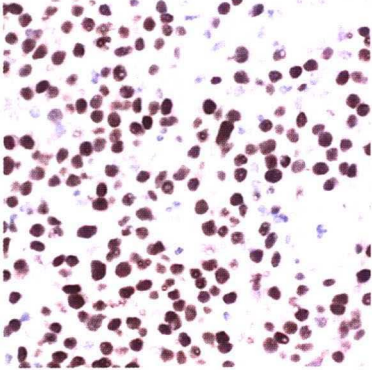


图 18-13 B 细胞淋巴瘤 MUM-1 胞核阳性

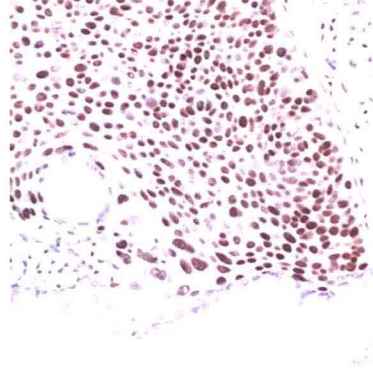


图 18-14 宫颈鳞癌 P63 胞核阳性，腺上皮阴性

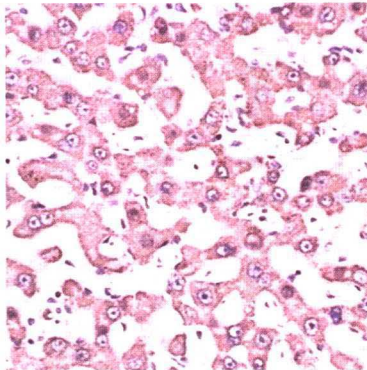


图 18-15 正常肝细胞 HPC 阳性，均匀细颗粒状

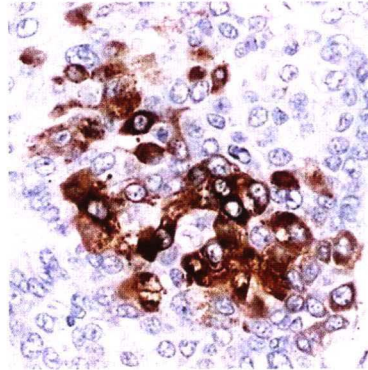


图 18-16 肝细胞癌部分细胞HPC阳性，粗颗粒状

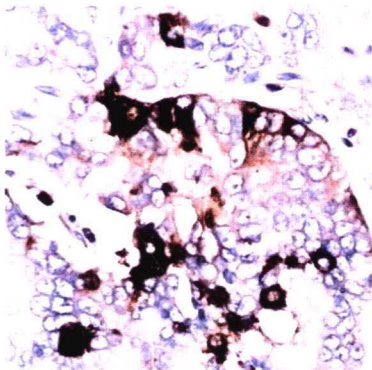


图 18-17 腺癌伴神经内分泌表达 CnA 阳性

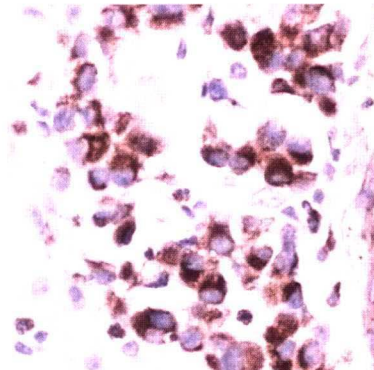


图 18-18 胰岛细胞瘤 CAM5.2 胞质一侧阳性



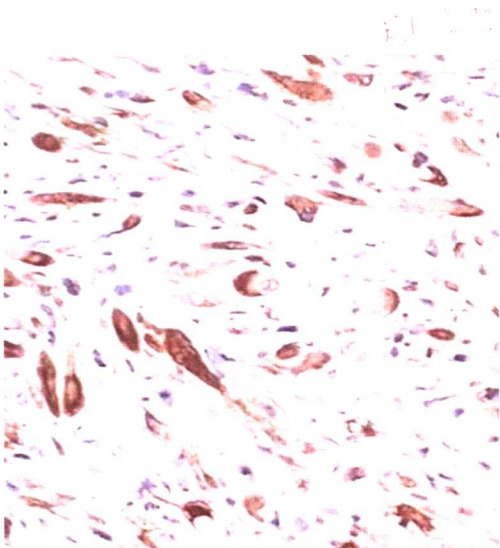


图 18-19 横纹肌肉瘤部分瘤细胞 Des 阳性

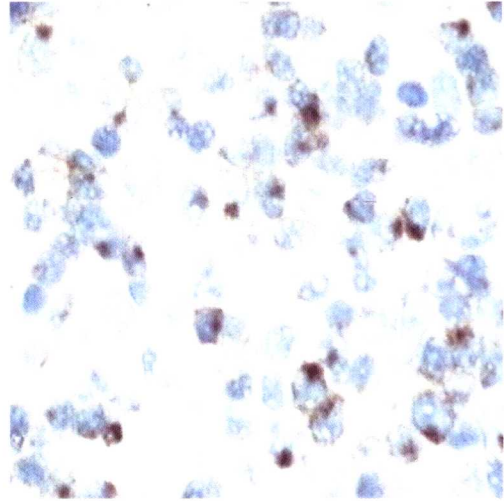


图 18-20 NK 细胞淋巴瘤 CD2 核周点状阳性

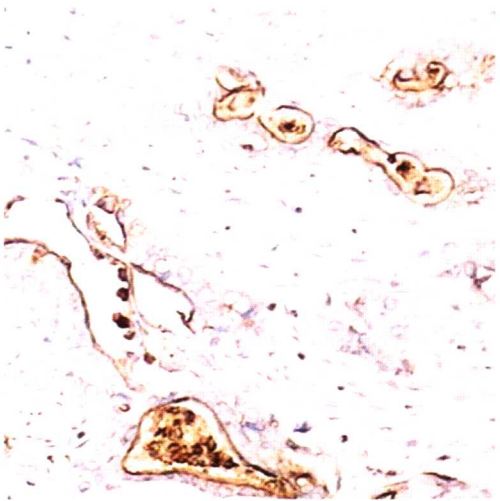


图 18-21 腺癌 CA19-9 腔缘阳性

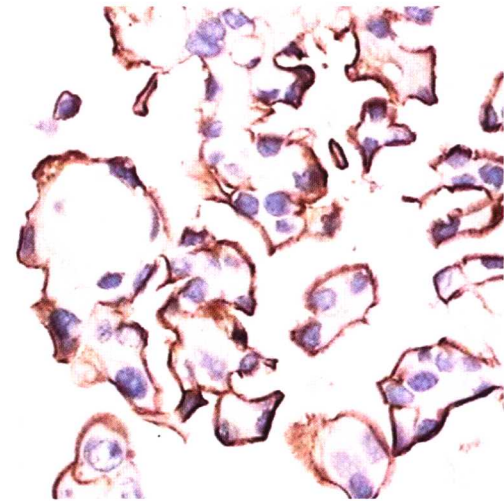


图 18-22 卵巢癌 CA125 腔缘阳性

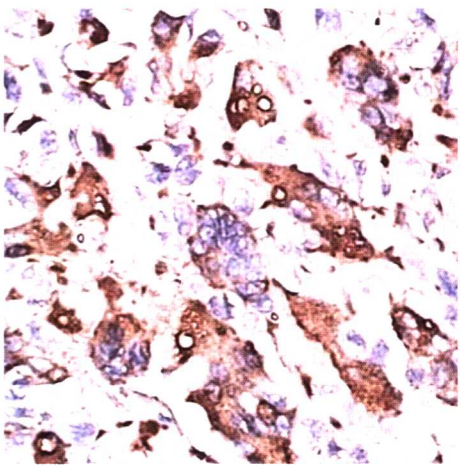
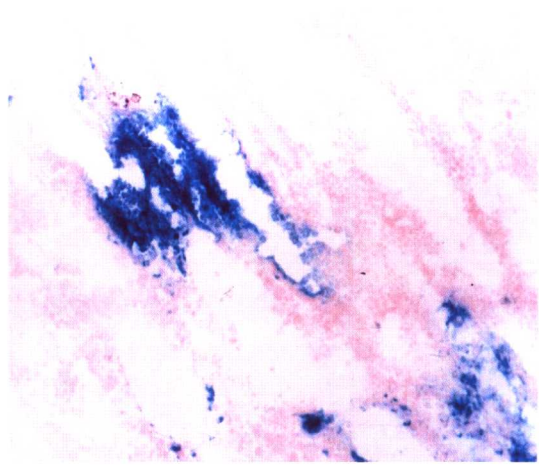


图 18-23 恶性纤维组织细胞瘤 CD68 阳性



附录图-1 肿瘤组织 X-gal 染色, 蓝色核为阳性, $\times 100$

免疫组织化学实验技术及应用

主 编 倪灿荣 (第二军医大学附属长海医院)
马大烈 (第二军医大学附属长海医院)
戴益民 (第二军医大学附属长海医院)

编 者 (按姓氏笔画排列)

于 军 (第二军医大学中心仪器室)
马大烈 (第二军医大学附属长海医院)
叶煦亭 (第二军医大学中心仪器室)
白辰光 (第二军医大学附属长海医院)
朱腾方 (复旦大学医学院)
何 金 (第二军医大学附属长征医院)
沙继宏 (第二军医大学中心仪器室)
张太明 (复旦大学附属肿瘤医院)
张顺民 (第二军医大学附属长海医院)
倪灿荣 (第二军医大学附属长海医院)
龚志锦 (第二军医大学附属长海医院)
谢志芳 (第二军医大学中心仪器室)
戴益民 (第二军医大学附属长海医院)

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世纪后半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，理论指导和促进了实验技术”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

前 言

免疫组织化学技术由著名的微生物学专家 Coons 创建, 经过 60 余年的不断发展, 由最初直接免疫荧光标记法, 逐步发展出现了间接法、免疫酶法、免疫胶体金法、以多聚物为骨架的酶标记复合法等, 敏感性和特异性不断得到提高, 使其成为医学和生命科学领域中研究组织形态、功能和代谢的一项有力工具。虽然目前大部分技术方法都有商品化的试剂盒, 但要完成一次高质量的免疫组织化学实验, 单凭试剂盒的说明书是远远不够的, 需要有扎实的相关理论基础, 才能正确合理地使用这一技术, 正确地判断结果, 正确地解决实验中出现的各种问题, 保证结果的科学性和可重复性。

随着后基因组时代的来临, 基因研究的重点已由结构转向功能。初步认定人类约有 3 万个左右的基因, 由于一个基因可以编码不同的蛋白, 所以基因编码产物的数量要多于基因数。对于数万个基因的功能研究, 分析其复杂的表达方式以及基因间相互作用、相互调节的关系, 其艰巨性和对阐明生命活动过程的重要意义将超过人类基因组计划。面对如此艰巨、复杂的工作, 传统的基因功能研究方法已无法满足实际需要, 由此出现了一系列的新技术、新方法, 这些技术均需实验者具有一定的免疫组织化学技术基础。另一方面, 随着新技术、新方法的引入, 也促进了免疫组织化学向定量化和分子水平发展, 极大地扩展了其应用领域, 使其在病理学、生理学、神经生物学、免疫学、发育生物学、细胞生物学、遗传学、微生物学、肿瘤学、临床检验等基础研究和临床研究中体现出越来越重要的实用价值。

时下反映当前国内外医学研究成果, 尤其是体现现代病理学研究进展的教材和专著不断涌现, 涉及生物大分子定性、定位、定量的实验方法类书籍也已见有多本。然而, 具有较强系统性、实用性, 且能与病理形态学紧密联系的实验工具书并不多。为此, 我们深感有责任编写此方面的书籍, 以便能及时、准确地反映当前国内外有关免疫组化和原位分子杂交等实验应用研究的新成果, 将一些新理论、新知识、新技术以及作者的实践应用经验传授给生命科学和医学领域高等院校的广大学生及专业研究人员。这些先进的实验技术的普及和掌握, 对于生命科学和医学研究、临床诊断和治疗水平的提高势必会起到有力的促进作用。从某种意义上说, 谁掌握了先进实验技术, 谁就有可能在科研上争取主动, 甚至创新和领先。基于此, 我们联合兄弟单位有实践经验的专家编写了本书。

本书共有十八章及七个附录, 内容包括组织细胞材料的准备、免疫组织化学的前处理技术、免疫荧光染色、免疫酶染色、免疫金银染色、双重及多重免疫标记、免疫组化结果的分析判断、原位杂交组化技术、组织芯片技术、细胞凋亡的检测技术、免疫组化中常用抗体谱和免疫组化在病理诊断及研究中的应用, 以及免疫组化标记物的形态特点、电镜细胞化学技术、常用的 30 余种特殊染色等。附录中主要归纳了一些常用的、经典的实验方法的操作流程、试剂配方和实验器皿的处理技术, 以便于查阅。

在各种实验技术方法和流程的选择上, 本书尽可能选择常用的实验技术方法和流程, 且根据编写者的实践经验和国内实际条件加以改进, 并阐明该技术方法的优缺点和应用注意事项, 以及结果不理想时的改进处置办法等, 强化了实用性和可操作性, 力求使读者在阅读本书和熟悉所介绍的相关技术方法基础上, 能较娴熟地应用这些技术或方法并获得满意的实验结果。另外, 本书还附有一定数量的彩图, 以显示各种标记技术的正确染色结果, 便于读者