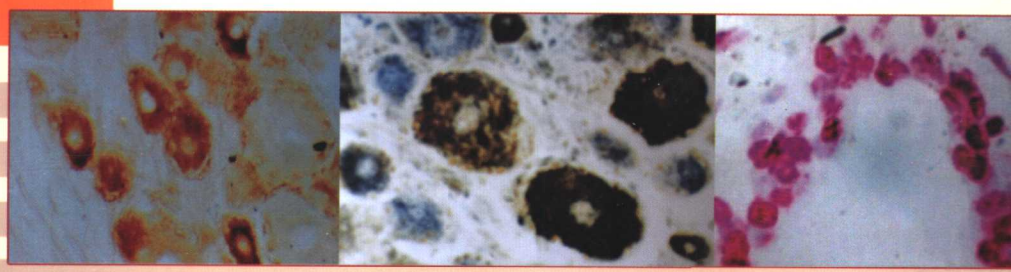
21世纪生物技术丛书

组织细胞化学理论与技术

王廷华 齐建国 Leong Seng Kee 黄秀琴 主编



科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

组织细胞化学理论与技术

主　编　王廷华　齐建国　Leong Seng Kee　黄秀琴

科学出版社

北　京

内 容 简 介

本书是21世纪生物技术丛书的一个分册，是科学领域一本较全、较新的全面阐述组织细胞化学理论与技术的专著。全书分上、下篇，共13章。上篇系统介绍了组织细胞化学的基本理论知识，包括组织、细胞的结构与功能，免疫组织细胞化学基础，组织细胞化学的免疫学与酶学基础，免疫组织化学基本理论，酶组织化学，原位杂交组织化学，神经形态示踪方法学，形态定量技术及其应用以及细胞凋亡。下篇介绍了一些具体的组织、细胞化学实验方法及其应用，并给出了免疫组织化学、酶组织化学、原位杂交组织化学的一些实例。

本书可供研究生、五年制和七年制本科生以及从事生物学的科研人员阅读和作为实验参考用书，有较大的参考价值和实用性。

图书在版编目(CIP)数据

组织细胞化学理论与技术/王廷华等主编. —北京：科学出版社，2005.3
(21世纪生物技术丛书)
ISBN 7-03-014671-9

Ⅰ.组… Ⅱ.①王… Ⅲ.组织化学 Ⅳ.Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第000106号

责任编辑：李国红 吴茵杰 / 责任校对：李奕萱
责任印制：刘士平 / 封面设计：卢秋红

版权所有，违者必究。未经本社许可，数字图书馆不得使用

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com
双青印刷厂 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2005年3月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2005年3月第一次印刷 印张：16 插页：4
印数：1—3 000 字数：353 000

定价：48.00元
(如有印装质量问题，我社负责调换<环伟>)

《21世纪生物技术丛书》编审委员会

主　审　蔡文琴　吴良芳　余　哲

委　员　（按姓氏笔画为序）

王廷华	昆明医学院神经科学研究所	教授
	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
羊惠君	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学解剖教研室	教授
李建国	复旦大学医学院	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学齐鲁医院	教授
余　哲	四川大学华西医学中心	教授
应大君	第三军医大学基础医学院	教授
沈馨亚	复旦大学医学院	教授
胡长林	重庆医科大学附属医院	教授
施　静	华中科技大学同济医学院	教授
徐群渊	首都医科大学神经科学研究所	教授
姜保国	北京大学人民医院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
蔡文琴	第三军医大学神经科学中心	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学医学院	教授
John W. McDonald	美国华盛顿大学	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Eng-Ang Ling	新加坡国立大学	教授
Petrik X Lee	英国伦敦大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚 Flinders 大学	教授

《组织细胞化学理论与技术》编委名单

主　编　王廷华　齐建国　Leong Seng Kee
黄秀琴

副主编　李力燕　张新胜　李　明　张　作

编　委　（按姓氏笔画为序）

王廷华　巴迎春　甘　平　齐建国
李力燕　李永红　李官成　苏吉春
吴林艳　邹晓莉　张　作　张连双
张新胜　陈　辉　金立德　柯　青
黄秀琴　徐振波　康　燕　章　为
董　坚　Leong Seng Kee

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

总　序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代，那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨，生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下，科学出版社组织了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本，包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了 21 世纪常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发，以实用性和可操作性为目的，面向我国日益扩大的研究生招生规模和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会，使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面，力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述，基本反映了 21 世纪常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头，邀请国内、外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结，对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限，加之科学技术发展迅猛，错误、不足之处在所难免，恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际，感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家，是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础，并为本套丛书提供了参考。感谢国内、外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们所付出的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励和关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 月 8 日

目　录

上篇　组织细胞化学理论

第一章　免疫组织细胞化学基础 …… (3)
第一节　细胞 …… (3)
一、细胞的发现及细胞学说的建立 …… (3)
二、细胞的形态 …… (3)
三、细胞的结构和功能 …… (4)
第二节　组织概述 …… (7)
一、组织的基本概念 …… (7)
二、组织的分类及结构特点 …… (7)
第三节　显示细胞和组织成分、结构的方法 …… (14)
一、光学显微镜技术 …… (14)
二、电子显微镜技术 …… (15)
三、组织化学技术 …… (15)
四、放射自显影技术 …… (16)
五、细胞培养技术与组织工程 …… (16)
六、形态计量分析技术 …… (16)
第二章　组织细胞化学的免疫学与酶学基础 …… (17)
第一节　抗体的发现及其特性 …… (17)
一、抗体的发现 …… (17)
二、抗体的理化性质 …… (17)
三、抗体的生物学活性 …… (18)
四、抗体的分类 …… (18)
五、抗体的特性 …… (19)
第二节　免疫球蛋白分子 …… (21)
一、免疫球蛋白分子的基本结构 …… (21)
二、免疫球蛋白分子的功能 …… (26)
三、免疫球蛋白分子的抗原性 …… (29)
四、免疫球蛋白分子的超家族特点 …… (31)
第三节　组织细胞化学的酶学基础 …… (33)
一、酶的概念及本质 …… (33)

二、酶的分类及特性 …… (33)
三、酶促反应的影响因素 …… (34)
第三章 免疫组织化学基本理论 …… (38)
第一节 免疫组织化学的基本原理、发展及展望 …… (38)
一、免疫组织化学的基本原理 …… (38)
二、免疫组织化学技术的发展与应用 …… (39)
第二节 免疫组织化学技术的分类 …… (41)
一、根据标记物是否与特异性第一抗体结合分类 …… (41)
二、根据标记物或呈色物的不同分类 …… (42)
三、标记抗原法 …… (48)
第三节 免疫组织化学技术常用仪器设备、器皿准备及试剂配制 …… (48)
一、实验仪器 …… (48)
二、器皿准备 …… (48)
三、器皿的清洗 …… (49)
四、玻片的处理 …… (49)
五、主要试剂及配制 …… (50)
第四节 免疫组织化学标本的获取及处理 …… (52)
一、冰冻切片标本的获取与处理 …… (52)
二、石蜡切片标本的获取与处理 …… (52)
三、细胞标本的获取与处理 …… (59)
第五节 免疫组织化学染色后的观测 …… (60)
一、观察仪器设备 …… (60)
二、检测方法 …… (60)
第六节 常用免疫组织化学技术的注意事项 …… (60)
一、常规注意事项 …… (60)
二、免疫荧光化学技术的注意事项 …… (61)
三、免疫酶化学技术的注意事项 …… (61)
第四章 酶组织化学 …… (62)
第一节 福尔根显示 DNA 的方法 …… (62)
第二节 高碘酸-雪夫反应显示糖原和其他多糖 …… (64)
第三节 异丙醇油红 O 法 …… (65)
第四节 碱性磷酸酶显示法 …… (66)
第五节 碱性磷酸酶与 PAS 反应合并染色法 …… (68)
第六节 酸性磷酸酶显示法 …… (69)
第七节 腺苷三磷酸酶显示法 …… (71)
第八节 葡萄糖-6-磷酸酶铅法显示 …… (73)
第九节 偶氮耦联法显示非特异性酯酶 …… (74)
第十节 乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶显示法 …… (75)

第十一节 同时耦联法显示氨基肽酶 …… (76)
第十二节 细胞色素氧化酶显示法 …… (78)
第十三节 琥珀酸脱氢酶显示法(四唑盐法) …… (78)
第十四节 乳酸脱氢酶显示法 …… (79)
第十五节 3β-羟甾体脱氢酶显示法 …… (80)
第五章 原位杂交组织化学 …… (82)
第一节 探针制备 …… (82)
一、探针的来源 …… (82)
二、探针标记 …… (83)
第二节 原位杂交的组织标本制作 …… (83)
第三节 杂交组织化学反应 …… (84)
第四节 实验对照 …… (83)
第五节 生物素标记探针杂交方法 …… (85)
第六章 神经形态示踪方法学 …… (88)
第一节 辣根过氧化物酶示踪技术 …… (88)
一、动物麻醉及 HRP 的注入 …… (89)
二、动物存活期的确定 …… (91)
三、动物的灌注、取材 …… (91)
四、呈色反应 …… (92)
五、结果判定 …… (92)
第二节 荧光染料追踪技术 …… (93)
一、荧光染料溶液的配制 …… (94)
二、荧光染料的注射 …… (94)
三、动物存活期的确定 …… (94)
四、动物的灌注固定及取材 …… (94)
五、切片、贴片、封片 …… (95)
六、荧光显微镜观察 …… (95)
第三节 放射自显影神经示踪 …… (95)
第四节 顺行示踪技术 …… (97)
一、病毒示踪法 …… (97)
二、葡聚糖追踪法 …… (97)
三、凝集素追踪法 …… (98)
第七章 形态定量技术及其应用 …… (100)
第一节 概述 …… (100)
第二节 目前形态定量研究方法简介 …… (100)
一、显微分光光度计的应用 …… (100)
二、流式细胞计的应用 …… (100)
三、图像分析技术——体视学技术 …… (101)

第三节 体视学概述 …… (101)
一、体视学的发展历史 …… (101)
二、体视学的概念 …… (101)
三、体视学的基础理论 …… (102)
四、体视学技术的常用参数 …… (105)
第四节 体视学技术的基本方法 …… (106)
一、设计 …… (107)
二、抽样 …… (107)
三、测试 …… (111)
四、注意事项 …… (124)
第五节 体视学技术中各参数的计算 …… (126)
一、体积、体积分数与平均体积 …… (126)
二、表面积密度、表面积与表面积体积比 …… (129)
三、长度密度、总长度与厚度 …… (130)
四、粒子的大小、数密度与数目 …… (131)
第六节 图像分析仪在医学实验研究中的应用 …… (132)
一、图像分析仪 …… (132)
二、图像分析在医学实验研究结果分析中的应用 …… (133)
第八章 细胞凋亡 …… (139)
第一节 概述 …… (139)
一、细胞凋亡的概念 …… (139)
二、细胞凋亡与细胞坏死的区别 …… (139)
三、细胞凋亡与程序性细胞死亡 …… (142)
四、细胞凋亡的生物学意义 …… (142)
第二节 与细胞凋亡相关的酶类 …… (143)
一、Caspase 蛋白酶家族 …… (143)
二、介导细胞凋亡的其他酶类 …… (146)
第三节 细胞凋亡的信号转导途径 …… (146)
一、细胞外部信号触发的凋亡——死亡受体路径 …… (148)
二、细胞内部信号触发的凋亡——线粒体路径 …… (148)
三、粒酶 B 诱导细胞凋亡的途径 …… (150)
四、细胞凋亡的其他途径 …… (150)
第四节 细胞凋亡的调控 …… (151)
一、Bcl-2 家族蛋白的调控作用 …… (151)
二、p53 的调控作用 …… (152)
三、IAP 家族蛋白的调控作用 …… (153)
四、病毒蛋白的调控作用 …… (154)
第五节 细胞凋亡与疾病 …… (154)

一、细胞凋亡与自身免疫性疾病……（155）
二、细胞凋亡与肿瘤……（156）
三、细胞凋亡与病毒感染……（156）
四、细胞凋亡与神经系统疾病……（156）
五、细胞凋亡与缺血性损伤……（157）
六、细胞凋亡与心血管疾病……（157）
第六节 细胞凋亡的研究方法 ……（158）
一、细胞凋亡的形态学观察……（158）
二、流式细胞仪检测细胞凋亡……（160）
三、细胞凋亡的生物化学研究方法……（164）
四、细胞凋亡的免疫化学分析方法……（165）
五、细胞凋亡的分子生物学研究方法……（166）
六、凋亡蛋白质酶及其底物的检测……（173）
七、其他检测方法……（174）

下篇 组织细胞化学技术

第九章 组织化学技术的应用 ……（179）
第一节 免疫组织化学 ABC 法检测猫背根节 c-jun、c-fos 的表达 ……（179）
一、材料和方法……（180）
二、结果……（182）
三、结果分析……（182）
第二节 免疫组织化学 SP 法在检测成年猴脑 BDNF、NT_4 和 NGF 中的应用 ……（184）
一、材料和方法……（184）
二、结果……（185）
三、结果分析与体会……（192）
第十章 用酶组化技术显示猫脊髓Ⅱ板层一氧化氮合酶的表达 ……（194）
一、材料和方法……（194）
二、结果……（194）
三、结果分析与注意事项……（195）
第十一章 原位杂交组织化学技术检测猫背根节 BDNF 和 NT_3 的 mRNA 的表达……（197）
第一节 材料和方法 ……（197）
一、实验仪器、试剂及其配制 ……（197）
二、实验方法……（200）
第二节 结果 ……（206）
一、BDNF mRNA 杂交信号在 DRG 的分布 ……（206）
二、NT_3 mRNA 杂交信号在 DRG 的分布 ……（207）
三、对照实验……（207）
第三节 结果分析与经验体会 ……（207）

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

一、结果分析……（207）
二、经验体会与注意事项……（207）
第十二章　组织化学双标技术……（209）
第一节　脊髓Ⅱ板层 NOS、BDNF 样神经膨体的免疫组化与酶组化双标技术……（209）
一、材料和方法……（209）
二、结果……（210）
三、结果分析与讨论……（210）
第二节　免疫组织化学和原位杂交双标技术检测猫背根节 BDNF、NT_3 及其 mRNA 的表达……（210）
一、仪器与试剂……（211）
二、实验方法……（211）
三、实验结果……（212）
四、结果分析……（213）
五、经验体会与注意事项……（214）
第十三章　组织化学技术的关键与要点……（215）
第一节　高压控制免疫组化非特异性反应……（215）
一、材料和方法……（215）
二、结果……（215）
三、结果分析……（215）
第二节　组织化学标本处理要点……（216）
第三节　组织化学实验步骤操作中注意事项……（216）
第四节　组织化学结果显色要点……（216）
附录……（217）
附录一　组织化学的常用试剂及处理……（217）
一、溶液的浓度……（217）
二、缓冲液表……（217）
三、常用封固剂……（222）
四、灌注固定……（222）
附录二　原位杂交组织化学常用试剂及处理……（223）
一、杂交前准备……（223）
二、关于探针的标记……（227）
三、固定剂……（230）
四、LB 培养……（232）
五、小量质粒提取的主要试剂……（232）
六、杂交前处理……（233）
七、杂交用液……（234）
八、杂交后漂洗溶液……（236）
九、原位杂交信号显示……（237）
彩图

上　　篇

组织细胞化学理论

第一章　免疫组织细胞化学基础

第一节　细　　胞

细胞是生物体形态结构、生理功能和生长发育的基本单位。

一、细胞的发现及细胞学说的建立

细胞(cell)概念的提出,是随16世纪末光学显微镜(light microscope,简称光镜)的发明而提出的。1665年,英国人胡克(Hooke)用光镜观察了软木塞薄片后,将所发现的蜂窝状的小室命名为"细胞"。其实,他所见到的仅是植物的细胞壁。但该工作却无意中开创了用显微镜研究生物构造的先河。此后,许多学者对显微镜的使用投入了极大的热情,并陆续发现了各种各样的细胞,如意大利人马尔比基(Malpighi)观察了脾、肺、肾、表皮;荷兰人列文虎克(Leeuwenhook)发现了红细胞、精子、肌纤维;格拉夫(Graaf)发现了卵泡。1801年,法国人比沙(Bichat)提出"组织"一词,并认为是组织构成了各种器官。

1838年至1839年间,德国人施万(Schwann)和施莱登(Schleiden)在综合归纳了前人的研究成果的基础上提出了细胞学说,认为细胞是机体的基本结构单位和功能单位;细胞中进行着复杂的化学反应;新的细胞是由原有的细胞产生的。此后,随着显微镜制造技术的发展,组织切片机的发明与改进,各种生物标本固定和染色方法的出现,使19世纪下半叶成为组织学和细胞学发展的黄金时代。到19世纪末,人们已能较准确地描述细胞的结构,组织学已发展为一门独立而系统的学科。1906年,意大利神经组织学家高尔基(Golgi)和西班牙人拉蒙·卡哈尔(Ramony Cajal)因发明镀银染色法和对神经系统组织结构的开创性研究而获得诺贝尔生理学医学奖。

二、细胞的形态

根据显微镜的观察结果,细胞大小不一,形态各异,有梭形、扁平形、立方形、圆柱形、多边形、球形和星形多突起状等。细胞的形态与其执行的生理功能和所处的部位密切相关。例如,接受刺激、传导冲动的神经细胞具有很多长突起;流动的血细胞呈球形;紧密排列的上皮细胞呈方形、柱形、扁平形和多边形。有些细胞为了特殊功能的需要,具有纤毛、鞭毛、微绒毛等突起,如精子等。

人体内各种不同类型的细胞,其大小差别也很大,有些细胞的大小可随功能而变化。大

多数细胞的直径只有几微米，肉眼看不见。最小的细胞（如小脑的颗粒细胞）直径只有4μm；较大的细胞（如成熟的卵细胞）直径可达100～140μm，肉眼勉强可见；最大的某些神经细胞，其突起最长可超过1m。肌细胞大小还可随生理需要发生变化。如骨骼肌可因锻炼使肌细胞变粗大；非妊娠子宫平滑肌的长度约为50μm，但在妊娠期可增大到500μm。

三、细胞的结构和功能

尽管人体细胞千差万别，但仍具有共同的基本结构，即细胞膜、细胞质和细胞核。

（一）细胞膜

细胞膜（cell membrane）结构不仅存在于细胞表面，而且也出现在细胞内部。因此，将位于细胞表面的膜称为细胞外膜，细胞内的膜结构称为细胞内膜或内膜系统，两者统称为生物膜（biological membrane）。

1. 生物膜的结构　生物膜主要由类脂、蛋白质和糖类组成，其分子结构为液态镶嵌模型，其基本内容为：膜的结构以液态的类脂双分子层为基架，其中镶嵌着各种不同生理功能的球状蛋白质。生物膜在光镜下难以辨出；在电镜下可见其呈两暗夹一明的三层结构，又称单位膜（unit membrane），总厚度约7.5nm（图1-1，彩图1）。

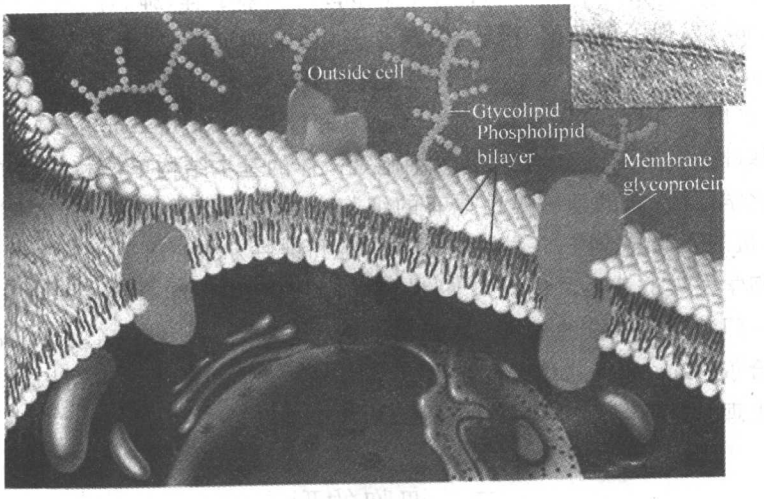


图1-1　生物膜的分子结构图

2. 细胞膜的功能　细胞膜具有多方面的功能：①维持细胞的一定构型。②构成细胞屏障。③选择性地进行物质交换。④构成细胞支架。⑤与细胞识别、细胞粘连和运动有关。⑥细胞膜内各种嵌入蛋白的功能也是细胞膜的功能。

（二）细胞质

细胞质（cytoplasm）为细胞膜与细胞核之间的结构，是细胞新陈代谢与物质合成的重要

场所。生活状态为透明胶状物，在固定标本上常呈颗粒状、泡沫状或网络状，由基质、细胞器和内涵物组成。

1. 基质　为无定形的胶状物质。

2. 细胞器　为细胞质内有特定形态结构、执行一定生理功能的有形成分，观察其微细结构需在电镜下进行，光镜下通过特染，可见线粒体、高尔基复合体、中心体等细胞器（图 1-2，彩图 2）。

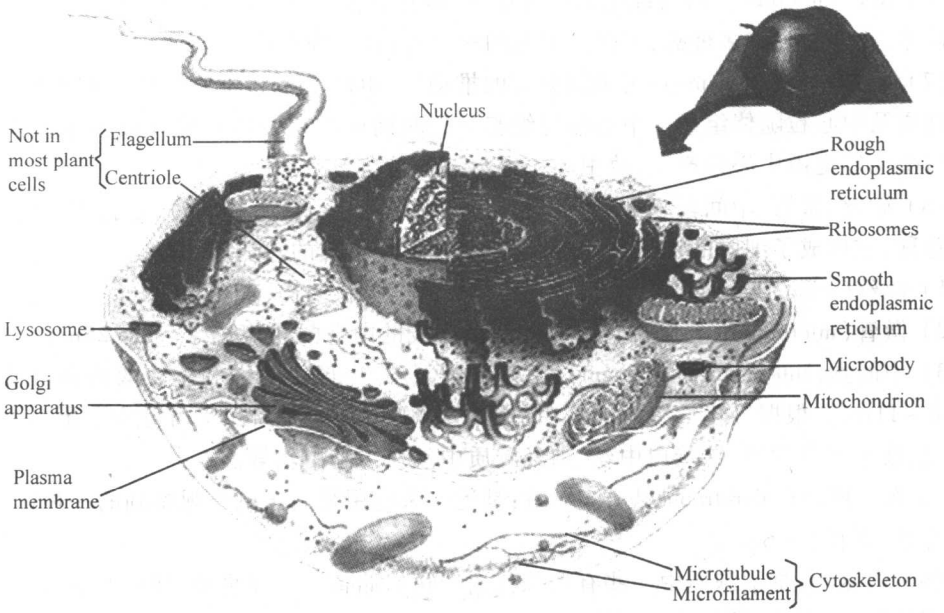


图 1-2　细胞模式图

（1）线粒体（mitochondria）：为细胞的供能站。光镜下呈线状或颗粒状。电镜下为双层单位膜构成的椭圆形小体，外膜光滑，内膜向内折叠形成板状或管状的线粒体嵴。线粒体的主要功能是通过氧化磷酸化作用产生能量，将能量储存于 ATP 中，以备细胞进行各种生命活动所用。

（2）核糖体（ribosome）：为细胞内合成蛋白质的基地，由核糖核酸（RNA）和蛋白质构成。电镜下呈近似球形的致密颗粒，由大亚基和小亚基结合而成，有游离核糖体和附着核糖体两种存在形式。核糖体易被碱性染料着色，故光镜下细胞质中核糖体丰富的部位呈嗜碱性。

（3）内质网（endoplasmic reticulum）：为多功能的膜性小管系统，是由一层单位膜围成的囊状或小管状结构，根据其表面有无核糖体附着而分为粗面内质网和滑面内质网。

1）粗面内质网（RER）：由平行排列的扁囊和附着在膜外表面的核糖体构成，是合成蛋白质的部位，易被碱性染料着色。

2）滑面内质网（SER）：为表面光滑的管网状结构，无核糖体附着。SER 为一多功能的

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com