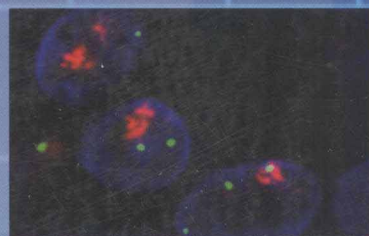
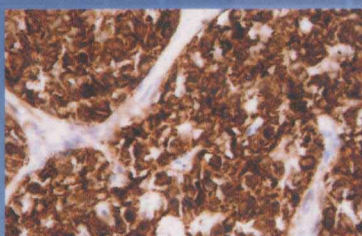


免疫细胞(组织)化学 和分子病理学技术

TECHNIQUES OF IMMUNOCYTOCHEMISTRY
(IMMUNOHISTOCHEMISTRY) AND MOLECULAR PATHOLOGY



主 审 王伯运
主 编 王文勇



第四军医大学出版社

免疫细胞(组织)化学 和分子病理学技术

主 审 王伯沅

主 编 王文勇

编 者 (按姓氏笔画排序)

马福成 王 哲 王文勇

王伯沅 叶 菁 李 青

李玉松 李增山 张 静

范林妮 赵一岭 黄晓峰

黄高昇

第四军医大学出版社. 西安

图书在版编目(CIP)数据

免疫细胞(组织)化学和分子病理学技术/王文勇主编.
—西安:第四军医大学出版社,2010.11
ISBN 978-7-81086-884-6

I. 免… II. 王… III. 免疫学:细胞学:病理生理学—研究 IV. R392.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 204787 号

免疫细胞(组织)化学和分子病理学技术

主 编 王文勇
责任编辑 土丽艳
执行编辑 李俊功
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)
电 话 029-83376765
传 真 029-83376764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 人民日报社西安印务中心
版 次 2010 年 11 月第 1 版 2010 年 11 月第 1 次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 黑白 20.75 彩色 0.25
字 数 280 千字
书 号 ISBN 978-7-81086-884-6/R·764
定 价 42.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

前 言

免疫细胞化学(immunocytochemistry)又称免疫组织化学(immunohistochemistry),是利用抗原抗体反应原理,标记抗体技术和细胞化学的原位呈色反应方法,检测细胞或组织的成分(具有抗原或半抗原的成分),在显微镜下(如光学显微镜,荧光显微镜,激光共聚焦显微镜或电子显微镜)观察细胞的呈色反应,进行定位、定性和定量。免疫细胞化学与免疫组织化学的不同之处在于前者是以完整细胞的标本进行的免疫染色。在大多数情况下,所指的完整细胞是去除了细胞外基质的细胞,包括培养细胞、悬液沉淀物或细胞涂片等。免疫组织化学所使用的标本是组织切片,有特定的组织结构,包括完整组织内的不同细胞和细胞间质成分。

自从 Coons 等(1941 或 1950)发明了荧光免疫细胞化学以来,Nakane(1968)创立酶标记抗体技术,Sternberger(1970)等发明了辣根过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)技术,许世明(1981)创建了亲和组织化学方法-亲和素和生物素(ABC)方法。Danscher(1981)建立了免疫金银染色方法(IGSS),免疫电镜技术以及定量免疫细胞化学方法等相继创立。近年来多聚螯合物酶方法的问世,是免疫细胞技术又一个创新。原位分子杂交技术与免疫细胞化学的结合,使该技术发展为原位检测基因(核酸)和其表达产物(肽和蛋白质)的系列分子原位检测技术,把细胞形态,基因及其表达产物的分子水平联系了起来。因此免疫细胞化学技术不断发展进步,已发展成为生命科学的一门学科。

免疫细胞化学具有很高的特异性和敏感性,方法统一,简便易行。它能够将形态学的改变与功能代谢结合起来,技术不断创新,应用更加广阔,显示了其强大的生命力,在生命科学和医学等诸多领域的应用取得了惊人的成绩(在 Google 用 Immunocytochemistry 检索,可获得约 531 000 条结果,用 Immunohistochemistry 检索,获得约 5 790 000 条结果,截至 2010 年 8 月 10 日 10:23)。目前,单克隆抗体技术已给免疫细胞化学提供大量的特异性抗体,基因工程制造了各种用于分子杂交检测的核酸探针,在探索生命和疾病的分子机理,尤其是在病理的分子诊断,对疾病的治疗如靶向性治疗,以及科学研究中发挥着十分重要的作用。

第四军医大学病理学与病理生理学教研室从 20 世纪 60 年代初开始建立免疫细胞化学技术和创建全军重点建设免疫细胞化学实验室,具有较好的科研和教学条件。不断跟踪国际水平,相继建立了接近或达到国际水平的免疫荧光细胞化学技术,免疫酶细胞化学技术,亲和细胞化学技术,EnVision 技术以及 DNA 和 cDNA 分子探针的制备、HBV 分子杂交和原位分子杂交技术等,在科研和病理临床诊断中应用,获得许多成果和国家科技进步奖

(二等奖 2 个,三等奖 1 个)。研制了多种常用免疫细胞化学试剂(抗体和标记抗体)和分子探针(DNA、cDNA)供应全国使用。向全国、全军大力推广,培养了大批骨干人才,推动了全国免疫细胞化学的发展和广泛应用。

1978 年第四军医大学将免疫细胞化学列入硕士研究生课程,也是全国首次为研究生开设此门课程,每年有大量研究生选修。经几届研究生讲课和实验的教学实践,不断完善教学计划、教材和教学方法,提高教学质量,进一步得到了领导的重视,被列入硕士研究生重点建设课程,也得到全校许多学科硕士导师们和学员们的青睐,每届选课学员 80~120 人,30 年来近 3000 名硕士研究生和课程班学员获得本科目学分,学习了解免疫细胞化学和分子杂交的基本理论,学会了基本操作技术。30 年来,许多研究生在研究中应用了这一先进技术,为完成科研实验提供了先进实用的分子检测手段,有一些获得了国际先进水平的研究成果。

30 年来教研室的全体教授积极参加免疫细胞化学教学工作,教学内容不断丰富,教学方法不断改进,尤其是教材建设已形成全国通用教材,引起了国家卫生部的重视,对全国研究生教学内容的充实发展起到一定的作用。参加教学的各位教授作出很多贡献。他们都是相关领域的专家,具有丰富的经验和应用的体会,给学员讲历史回顾、原理、方法、应用、问题和展望;讲他们的思路 and 经历的成功和失败,启发研究生的自主思维和培养创新能力。

免疫细胞化学课程总学时为 40~60 学时,共 2 学分。课程负责人先后有王伯沅、李玉松、王文勇。授课人先后有王伯沅、刘彦仿、王文亮、隋延仿、黄高昇、李青、王瑞安、杨守京、王哲、叶菁、黄晓峰、李玉松、王文勇、闫庆国、郭双平、李增山、晏伟、张静、赵一岭。

免疫细胞化学教学目的是使硕士生认识免疫细胞化学的先进性、实用性,掌握或了解各种技术的基本原理、方法、结果、应用、最新发展动态、问题和展望,了解每种技术的优缺点和适用范围,知道自己如何选择。启发研究生的自主思维和培养创新能力,通过实验操作,培养动手能力和实验技能。

课程的教学要求为掌握免疫荧光技术、免疫酶及免疫胶体金与亲和细胞化学技术的基本原理和应用;掌握荧光素、酶及胶体金标记抗体的基本原理;掌握原位核酸分子杂交的原理和方法以及应用;掌握定量图像分析的原理和方法;了解细胞和组织切片技术和免疫电镜技术的常规标本处理和制备技术;掌握免疫荧光直接法和间接法、PAP、ABC、SP、EnVision、CSA、免疫金银的染色技术,对照实验,结果判断;了解常用试剂的配制和有关仪器的使用。

所使用的教材包括《实用免疫细胞化学》(1988 年,四川科技出版社,蔡文琴、王伯沅主编),《免疫组织化学》(1990 年,人民卫生出版社,刘彦仿主编,王伯沅参编),《实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术》(1994 年,四川科技出版社,蔡文琴、王伯沅主编),《病理学技术》(2000 年,人民卫生出版社,王伯沅、李玉松、黄高昇、张远强主编),《组织病理技术》(2002 年,人民卫生出版社,王伯沅主审,李甘地主编,李玉松参编),《免疫荧光细胞化

学示教影片》(1986年,王伯沅主编,四医大电教中心摄制)。

本书就是30年免疫细胞化学课程中的主要讲习内容。参加本书的编者都是担任本课程的主讲教授,他们都具有所讲内容深厚的理论基础和熟练的技术经验,以及应用获得的丰富成果。本书具有较高的科学性、先进性、启发性,实用性强,能指导操作和启发读者如何使用。本书既有基础理论又有国内外的最新进展,作为研究生教材,对生命科学,尤其是医学科学工作者具有重要参考价值。

本书承蒙王伯沅教授审阅,并提出了宝贵意见。编写过程中,得到各位编者的积极支持和参与,黄晓峰教授给予了更多协助。研究生院、基础部和教研室领导给予宝贵的指导和支持,在此深表谢意。书中参考了一些网络资料,未能一一注明出处,特此致歉,并向原作者表示感谢。

本书中难免有不正之处,望读者批评指正。

王文勇 王伯沅
2010年8月11日

目 录

第一章 病理学组织制片常用技术	(1)
第一节 组织标本取材	(1)
第二节 组织标本固定	(3)
第三节 组织脱钙	(10)
第四节 组织冰冻切片	(13)
第五节 常规 HE 染色	(18)
第二章 免疫细胞化学及其进展	(24)
第一节 免疫细胞化学概述	(24)
第二节 免疫组织化学的特点	(25)
第三节 免疫组织化学在我国的推广应用	(26)
第四节 免疫组织化学的新进展	(27)
第五节 在肿瘤靶向性用药筛选检测中的应用	(29)
第三章 免疫细胞化学基础理论	(31)
第一节 抗 原	(31)
第二节 抗 体	(34)
第三节 补体系统	(39)
第四节 免疫细胞化学的有关基本技术方法	(40)
第五节 抗原修复	(44)
第四章 免疫荧光组织化学技术	(50)
第一节 免疫荧光组织化学技术的发展史概述	(50)
第二节 免疫荧光组织化学的原理	(50)
第三节 荧光抗体的制备	(53)
第四节 免疫荧光组织化学染色方法	(57)
第五节 荧光显微镜检查方法	(59)
第六节 非特异性染色的消除方法	(60)
第七节 现状与展望	(61)
第五章 自身抗体免疫荧光组织化学检测	(64)
第一节 自身抗体的免疫组织化学检测方法	(64)
第二节 用免疫荧光组织化学方法可检查的主要自身抗体	(67)

第三节 自身抗体产生的机制	(81)
第六章 免疫酶细胞化学技术	(85)
第一节 酶的标记与染色方法	(85)
第二节 新的多聚螯合物酶免疫组织化学方法	(97)
第三节 染色结果及判断	(101)
第七章 亲和免疫细胞化学技术	(108)
第一节 生物素-抗生物素免疫细胞化学技术	(108)
第二节 葡萄球菌蛋白 A(SPA)	(114)
第三节 凝集素	(118)
第四节 其他亲和细胞化学	(126)
第八章 免疫金标记细胞化学技术	(129)
第一节 免疫金技术的基本原理	(129)
第二节 溶胶的基本概念	(130)
第三节 胶体金的制备	(132)
第四节 胶体金标记	(136)
第五节 光镜免疫金组织化学技术	(141)
第六节 光镜免疫金银组织化学技术	(143)
第七节 免疫胶体金快速诊断技术	(147)
第九章 免疫电镜技术	(155)
第一节 基本原理和主要标记技术的特点	(155)
第二节 铁蛋白标记免疫电镜技术	(156)
第三节 酶标记免疫电镜技术	(158)
第四节 胶体金标记免疫电镜技术	(162)
第五节 其他免疫电镜技术	(166)
第六节 免疫电镜技术实验步骤	(170)
第七节 免疫电镜的影响因素	(177)
第十章 免疫组织化学双标和多标记技术	(180)
第一节 双标和多标的意义	(180)
第二节 双标和多标的基本原理和方法	(180)
第三节 双重免疫荧光标记	(184)
第四节 双重免疫酶染色	(186)
第五节 其他双重免疫染色方法	(190)
第六节 电镜下的双重及多重免疫标记	(191)

第十一章	核酸分子杂交技术	(197)
第一节	核酸分子杂交技术原理	(197)
第二节	探针的种类和标记及制备	(197)
第三节	核酸分子杂交的种类和方法	(198)
第四节	原位核酸分子杂交技术	(203)
第五节	荧光原位杂交技术	(219)
第六节	原位 PCR 检测技术	(220)
第七节	电镜原位核酸分子杂交技术	(222)
第八节	双重原位杂交方法	(223)
第九节	原位杂交结合免疫细胞化学双标记法	(224)
第十节	生物芯片技术	(225)
第十二章	细胞凋亡检测	(227)
第一节	凋亡的形态学改变	(228)
第二节	凋亡的 DNA 断裂检测	(230)
第三节	凋亡的细胞膜结构改变检测	(234)
第四节	凋亡的线粒体膜电位检测	(235)
第五节	凋亡相关蛋白的检测	(236)
第十三章	计算机图像分析方法及应用	(238)
第一节	基本概念	(238)
第二节	计算机图像分析系统	(239)
第三节	计算机图像分析方法	(239)
第四节	DNA 倍体的计算机图像分析原理和方法	(240)
第五节	计算机图像分析在病理学中的应用	(241)
第十四章	荧光原位杂交技术	(248)
第一节	荧光原位杂交的原理	(248)
第二节	荧光原位杂交的特点	(249)
第三节	荧光原位杂交实验方法	(249)
第四节	FISH 的临床应用	(251)
第十五章	激光扫描共聚焦显微镜技术	(256)
第一节	激光扫描共聚焦显微镜技术的发展简史	(256)
第二节	激光扫描共聚焦显微镜的基本原理	(258)
第三节	共聚焦显微镜图像模式	(259)
第四节	激光扫描共聚焦显微镜的标本制备和图像采集	(263)
第五节	激光扫描共聚焦显微镜的应用	(269)

第十六章	显微组织(细胞)切割技术	(285)
第一节	激光捕获显微切割发展简史	(285)
第二节	激光捕获显微切割的分类和原理	(286)
第三节	激光捕获显微切割的应用	(288)
第四节	激光捕获显微切割的优点和存在的问题	(290)
第五节	激光捕获显微切割的展望	(291)
第十七章	组织芯片技术及其应用	(295)
第一节	组织芯片的发展历史与展望	(295)
第二节	组织芯片的分类	(296)
第三节	组织芯片的制作	(296)
第四节	组织芯片技术的应用	(299)
第五节	组织芯片技术存在的问题	(300)
第十八章	淋巴造血组织及其肿瘤的免疫组织(细胞)化学	(303)
第十九章	免疫组化在神经系统肿瘤诊断中的应用	(311)
第二十章	免疫病理技术在肾活检组织中的应用	(315)
第一节	免疫病理技术在肾小球疾病中的应用	(315)
第二节	免疫病理技术在肾移植中的应用	(319)

第一章

病理学组织制片常用技术

第一节 组织标本取材

一、组织取材的一般要求

1. 标本的大体检查及取材应按编号顺序进行,检查前应阅读申请单上各项主要内容,然后取出全部标本,核对无误后再进行检查(不透明的标本瓶应仔细查看,防止小块标本遗留在瓶内)。

2. 扼要地描写标本大小、形状、表面和切面的颜色、硬度、病变部位、大小、形状、特点和周围组织的关系等。某些器官如甲状腺、肾脏、脾脏及某些肿瘤如甲状腺肿瘤等必须记录重量,先描写主要病变,后描写次要病变,必要时以绘图或摄影说明。

3. 剖检标本时,应注意暴露标本的最大面积,以便全面检查,并应保留其特点,以备诊断、研究使用。

4. 结合病情、手术所见和大体检查的结果,选择性切取组织,例如,肿瘤组织,切取瘤体或包括瘤体交界处一起切取;肠道组织,为了寻找病变所在部位,通常剖开肠管检查后切一长条肠道组织。切取时最好保留病变和病变交界处的组织,可作为病变组织的对照。根据研究需要一般取材原则如下。

(1)小件标本:每块检查完之后全部取材作为包埋和切片,可能时一半作为包埋和切片,一半保存备用,以便重复检查或做特殊检查时使用。若标本太小,应该选用细孔组织脱水包埋盒脱水或用拭镜纸包裹后放入组织脱水包埋盒中脱水,以防组织脱水处理时遗失(图 1-1)。

(2)肿瘤:尤其是恶性肿瘤标本,除了在肿瘤部位取组织块之外,还要在被手术切除的标本断端及病变边缘等部位取组织块做检查。局部淋巴结必须逐个取材切片进行显微镜检查,以便明确肿瘤侵犯范围和转移情况。

二、组织标本取材方法

1. 组织块取材厚度 2~4mm 为宜,一般不超过 5mm。取材刀要锋利,切面要平整。不能用剪刀剪取组织,防止出现人为的组织挤压现象。须注明其形状、数目、切取部位(如左、

右、上、下等),如有特殊要求,应向技术人员交代清楚(图 1-2)。

2. 在标本取材时,每一例标本取好之后,剩余的标本,应放回原送检容器中妥善保存,直到发出病理报告之后再行处理。取材所用的工具必须用流水和纱布擦洗干净后再取下一例标本,以免互相污染,造成误诊。

3. 标本取好之后必须附上标本来源编号,每一例都要有标本来源编号。需要特殊标记时可在来源号末尾缀加英文字母或汉字。末尾缀加英文字母表示的内容要记录在病理送检申请单的记录项目中。例如,肠切除的标本取材,来源号为 0900001,上切缘以 0900001A 表示,下切缘标为 0900001B,并分别放于组织脱水包埋盒中(图 1-3)。

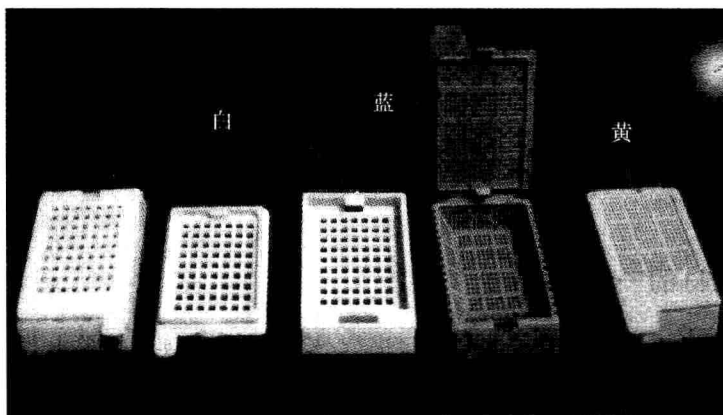


图 1-1 不同类型的脱水包埋盒

注:图片中白色为粗孔包埋盒,蓝色和黄色为细孔包埋盒。包埋盒有白色和彩色,一般常规使用白色,特殊目的为了区分选用不同颜色的包埋盒。包埋盒有粗孔和细孔之分,大块组织选用粗孔而细小的组织选用细孔包埋盒



图 1-2 切取组织

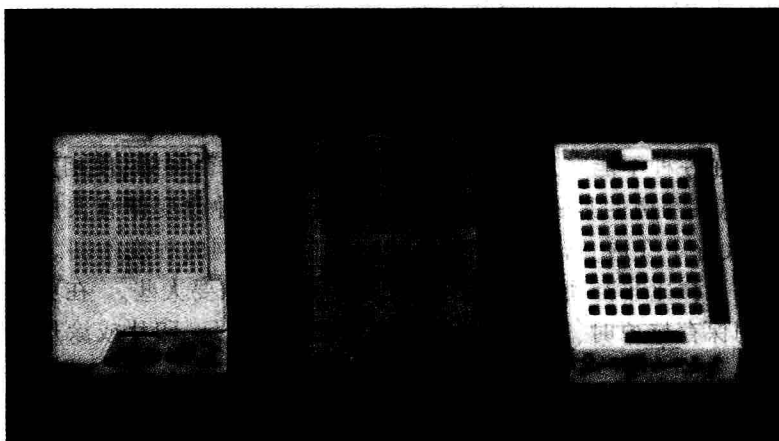


图 1-3 在脱水包埋盒上用铅笔标记病理检验号

4. 不同病例的组织绝对不能放到同一个脱水包埋盒中脱水处理。取材需要记录块数,特点及制片时注意事项,要认真与送检单核对,防止张冠李戴,然后放入组织脱水机中脱水。

5. 用特殊固定液固定的标本,制片过程有特殊处理要求时应向技术人员交代清楚。如含汞固定液固定的组织常需要脱汞处理后再进行脱水处理。

6. 骨组织和有钙化的组织应进行脱钙处理。

7. 除了冰冻切片之外组织切除后应及时固定,组织取材越新鲜越好,固定越及时越好。组织经过取材→固定→修切→组织装入脱水包埋盒里,然后再用铅笔或专用打号机把来源号标记在该组织的脱水包埋盒上。

8. 取材完成后将脱水包埋盒及标本继续放入固定液中固定,防止长时间暴露在空气中,以防影响组织制片。组织充分固定后应及时进行脱水处理。脱水完成后应及时包埋组织。一般包埋后组织在包埋块中非常稳定,组织包埋块可以常温长期存放,一般 1~2 年内对研究结果不会有影响。

9. 取材用的器械要用 1%新洁尔灭溶液浸泡消毒,工作台面和取材板可用 0.2%~0.4% 过氧乙酸溶液擦拭消毒,此外,还应用紫外线对取材室进行空气和物体表面消毒,室内用紫外线消毒时物品应保持清洁、干燥,温度不低于 20℃,相对湿度不超过 50%。照射剂量不应低于 90 000 μ W·s/cm²,一般照射 20~30min。

第二节 组织标本固定

一、目的和作用

固定是组织学和细胞学技术研究工作的基础。目的是使细胞和组织尽可能保存的和生活状态一样。因此,组织块、冰冻切片或细胞涂片通常需要放入固定剂中固定。固定剂的作用主要是阻止内源性溶酶体酶的自溶,抑制细菌和霉菌生长,防止组织腐败。总之,固定

剂能够保存细胞和组织形态。为细胞和组织的制备打基础。在细胞和组织研究过程中固定剂扮演着保护角色。固定剂通过凝固、生成添加化合物或两者结合,使蛋白质改变。在蛋白质结构内发生构造改变,引起酶的失活。

固定剂除了改变细胞和组织的化学性质外,对细胞和细胞外成分还可引起物理改变。活细胞被包在一种不能穿透的膜中。固定剂损坏了这个屏障,使相关大分子穿透和逸出。其实,细胞浆经历的是一种本质上溶胶冻改变,这种改变伴有大量多孔蛋白质网形成,进一步让大分子穿透。不同固定剂产生多孔蛋白质网的程度不同。凝固固定剂 B5 和甲醛,如福尔马林比非凝固固定剂形成蛋白质网的孔隙要大些。在免疫组织化学研究中选用固定剂保存抗原时,这种改变显得特别重要。但是,印片或涂片中多数表面抗原除外。

多数固定剂含有稳定蛋白质的化学物质,因此,细胞结构的保存最容易实现。一些液体被设计为保存糖或脂质,这种设计不作为常规使用。因为病理学家和解剖学家主要需要组织学的保存。

选择固定液对于免疫细胞化学技术是十分重要,例如,保存抗原选用甲醇固定不理想。尤其是白细胞表面抗原,通常选用无水丙酮固定。甲醛基础固定剂用于细胞浆抗原和膜结合的免疫球蛋白固定。福尔马林-丙酮混合应用于淋巴细胞标记物的固定。细胞涂片用 95%乙醇固定或聚乙二醇-乙醇液喷雾固定,对多数抗原的保存是满意的。乙醇不适用于淋巴瘤标记物固定,例如,T 和 B 细胞抗原。

一种固定液单独使用往往很难适应多种组织和细胞成分的保存,而且容易产生较大的副作用。因此,在实际工作中,通常将几种固定剂按一定比例配制复合固定液使用。复合固定液的种类很多,目前还没有一种标准的固定液适用于各种组织和细胞成分及抗原成分的保存。因此在具体使用时,必须对各种固定剂的性能有所了解。

二、固定剂类型

1. 醛类 包括甲醛(福尔马林)和戊二醛,经醛固定的组织在蛋白质内形成交联,在赖氨酸之间交联更明显。这种交联不会破坏蛋白质的整体结构,所以不丢失抗原性。因此,免疫酶组织化学染色选用甲醛固定效果比较好。标准液是 10%中性缓冲福尔马林。缓冲液能防止福尔马林变成酸性,酸性福尔马林液固定组织会促进福尔马林色素的形成。戊二醛引起蛋白质 α -螺旋结构变形,所以对免疫过氧化物酶染色不利。戊二醛通常用于电镜标本的固定,戊二醛的固定速度很快,渗透力差。但是,戊二醛对细胞浆和细胞核的细微结构固定效果较好。标准固定液使用 2%戊二醛。

2. 汞类 固定机制还不清楚,固定剂中含有氯化汞,最常用的是 Zenker 和 B-5 液,这类固定液穿透力差,并可引起一些组织变硬,对胞浆及细胞核的固定效果较好。Zenker 液是细胞学及病理学常用的固定液,对细胞核固定最好,最适合于造血和网状内皮组织的固定。由于 Zenker 和 B-5 固定液中含汞,所以,固定后必须进行脱汞。

3. 醇类 醇包括甲醇和乙醇,醇是一种蛋白质变性剂,经醇固定的组织容易引起收缩、变硬、变脆,所以,醇一般不作为常规组织固定剂。但是,乙醇对细胞学涂片固定效果非常好,固定作用快,对细胞核的细微结构固定效果较好。

4. 氧化剂类 包括高锰酸盐固定剂(高锰酸钾),重铬酸盐固定剂(重铬酸钾)和四

氧化铀。它们交联蛋白质而引起广泛的变性。此类固定剂不常用,其中的一部分有特殊的用途。

5. 苦味酸盐类 包括含有苦味酸的固定剂。这类固定剂中最重要的有 Bouin 液,作用机制不清楚,Bouin 液和汞固定剂一样对细胞核的成分保存较好,而不会引起组织变硬。苦味酸以干燥形式存放容易爆炸。苦味酸液为一种黄色液体,凡是液体接触到的东西均被染成黄色,也包括皮肤。

三、影响固定的因素

组织固定可以受到影响,主要因素有以下几种。

例如,缓冲作用、穿透力、固定液的剂量、温度、浓度、时间间隔等。

缓冲液最好接近中性,pH 范围 6~8。pH 值低时组织的含氧量少,所以在固定剂中应该有一定的缓冲能力,防止 pH 值下降。酸性环境中有利于福尔马林色素形成,在组织中出现黑色沉积物。常用的缓冲液有磷酸盐、碳酸盐、二甲砷酸盐和巴比妥。但是,10%中性缓冲福尔马林液的配制,通常使用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液。

固定液对组织的渗透作用依赖于每一种固定剂不变的扩散率。甲醛和乙醇的渗透力相对较好,戊二醛的渗透力最差,其他固定液介于两者之间。组织块越薄固定液越容易渗透。常规活检组织取材比较合适的厚度为 0.2~0.4cm,一般不超过 0.5cm。对组织适当的选择取材有利于固定液的渗透,良好的固定是组织制片和诊断研究工作必要的基础。

固定剂的容量要大,固定液与组织块的比率应该大于 10:1,有时固定的组织没有达到这个标准,补救的办法是在组织固定期间更换 1~2 次固定液,避免固定剂耗尽失去固定作用。另外,固定时使用振荡器处于动态的固定液可以加快对组织的渗透作用,可以适当弥补渗透力差的固定液对组织渗透不足的缺陷。

温度对组织固定的影响很明显,只要不是煮组织,不管固定剂属于哪种化学物质,提高温度都会加速固定作用。

固定剂的浓度在保证固定作用的基础上,将固定液的浓度尽可能调到最低水平,这样会减少固定液的浪费。甲醛比较合适的浓度为 10%;戊二醛一般为 0.25%~4%。浓度太高反而会影响组织固定,在组织中产生类似温度过高的人为现象。

组织从切除到固定的间隔时间也很重要,组织固定的越及时越好。新鲜标本不宜长时间暴露在空气中,如果无法及时固定,可以先把组织保存在生理盐水中送检。组织在干燥的空气中等待的越久细胞器丢失的越多,细胞核就会出现明显的皱缩,凝集现象就会发生。

四、常用固定液的选择

根据固定液的性质、组织的类型和被证实的组织成分恰当地选用固定液。由固定剂配制的溶液称为固定液。固定液有单一固定液和复合固定液。在制作 HE 切片时,甲醛作为尸检和活检组织的常规固定液。在所有固定剂中甲醛的应用范围最广,与其他固定液相比它是一种相对完美的固定液。甲醛对组织不会有明显的损害。10%中性缓冲福尔马林是一种良好的常规固定液。此液是在低渗缓冲离子中 pH 6.8。另外,人们都非常熟悉甲醛,甲醛有一种令人难以忍受的气味,在操作时大家都注意小心处理。

醛基础固定剂包括甲醛和多聚甲醛,多聚甲醛是甲醛以聚合物形式存在的一种白色固体试剂。因为甲醛液中含有稳定剂甲醇对酶反应不利。在一些酶组织化学反应时多选用4%多聚甲醛固定。4%多聚甲醛常用于动物灌注固定及后固定(动物器官经该液灌注后取材,再用该液浸泡2~24h),多聚甲醛在组织形态学研究中被广泛应用。4%多聚甲醛也是免疫组织化学(原位杂交)研究时首选固定剂。多聚甲醛(甲醛)对于细胞浆抗原和膜结合的免疫球蛋白具有稳定的固定效果。厚度不超过0.3cm的小组织固定1~3h。大点的组织固定6~12h。甲醛和多聚甲醛长时间固定对组织抗原的保存不利。组织在醛基础固定液中停留的时间越长抗原遮蔽越明显抗原丢失的越多,在进行免疫组化染色时抗原性表达就越弱。为了克服醛类固定剂的弱点,可以采用抗原修复的办法适当弥补抗原表达较弱的缺点。

福尔马林-丙酮混合应用于淋巴细胞标记物的固定。白细胞表面抗原常选用无水丙酮固定。

Zenker液适用于网状内皮组织包括淋巴结、脾、胸腺和骨髓的固定。此固定液能使组织的胞核和胞浆得到良好的固定。Zenker液是一种良好的核固定剂。该液是细胞学及病理学常用的固定剂,最适合于造血和网状内皮组织的固定。也常作为三色染色的组织固定剂,在三色染色中还作为媒染剂使用。但对于含血量较多的组织尽量不要选Zenker液固定。含血量多的组织经Zenker液固定后会产生大量黑色的汞沉积物,不利于染色和观察。

Bouin液被推荐用于睾丸、胃肠道和内分泌组织的固定。也常作为媒染剂使用。对脂肪组织的固定效果较好,适用于含脂肪较多的组织标本的固定。如含脂肪较多的淋巴结、脂肪瘤、乳腺组织等。有些资料表明Bouin液也常用于组织抗原的保存。肾组织活检和组织学制备常选用乙醇Bouin液(duboscq-brazil fluid)固定。该固定液不含汞,染色前不需要脱汞处理。

B-5固定液常作为骨髓活检常规固定液,并且对淋巴结的固定效果也比较好。

戊二醛用于电镜组织标本的固定。戊二醛要用缓冲液配制并在4℃冰箱保存,配制后一般保存3个月。电镜检查的组织更要及时固定,组织要新鲜,为了增强固定,组织块最好不超过1mm厚。

醇特别是乙醇主要用于细胞学涂片的固定,95%乙醇固定速度快而且便宜。因为涂片仅仅是细胞的厚度,涂片不是切片,在固定时不会发生组织收缩和变脆的问题。

冰冻切片的固定以甲醇和乙醇最好,可以任选。

五、常用固定液

1. 10%中性缓冲福尔马林

用途:10%中性缓冲福尔马林是一种良好的常规固定剂。此液是在低渗缓冲离子中pH 6.8。

试剂:磷酸二氢钠(monohydrate)4.0g,磷酸氢二钠(anhydrous)6.5g,37%甲醛100.0ml,蒸馏水900.0ml,充分混合,标记pH和日期。

注意:致癌(网上查阅安全数据表MSDS)。

安全措施:在通风好的地方操作,戴防护眼镜,戴手套并穿工作服。

甲醛:严重的刺激眼睛和皮肤,是皮肤和呼吸道的致敏剂,吸入和吸收有毒,受害目标

为呼吸器官;有腐蚀性,可致癌。

固定时间:标本固定 1~4h/mm,大标本应延长固定时间。

步骤:

- (1) 多数外科病理标本都能接受甲醛固定。
- (2) 组织脱水机前两个位置最好使用中性福尔马林固定液。
- (3) 标本保存可以无限期的保持在 10%福尔马林中或转移到 70%乙醇中。

2. Zenker液

用途:Zenker 液是一种核固定剂。该液是细胞学及病理学常用的固定剂,对细胞核固定最好,最适合于造血和网状内皮组织的固定。也常作为三色染色的组织固定剂,在三色染色中还作为媒染剂使用。但对于含血量较多的组织标本尽量不要选 Zenker 液固定。

试剂:

Zenker 贮备液:氯化汞 50.0g,重铬酸钾 25.0g,硫酸钠 10.0g,蒸馏水 1000.0ml,充分混合,稳定性 2 年。

Zenker 工作液:Zenker 贮备液 95.0ml,冰醋酸 5.0ml。

用前混合,丢弃时按有害废物管理处理。

注意:致癌,有腐蚀性。

安全措施:戴手套,防护眼镜,穿工作服,在通风好的地方操作,液体加热时应在通风柜内进行。

氯化汞:严重的刺激皮肤和眼睛,影响呼吸道、胃肠、生殖器官和胎儿生长发育。通过吸收吸入中毒。

重铬酸钾:通过粉尘吸收和吸入中毒,影响生殖器官和胎儿生长发育。固体形式损害眼睛、皮肤、和黏膜。

冰醋酸:刺激皮肤和眼睛,由吸入影响呼吸系统。

固定时间:12~36h。

处理:把使用过的 Zenker 液倒进玻璃瓶中,由安全服务机构处理,贴上有害废物标签,注明“含汞”。

步骤:

- (1) 由于 Zenker 液中含氯化汞,固定后必须脱去汞色素(脱蜡后:① Lugol's 碘:5min,水洗。② 5%硫代硫酸钠:5min,水洗并按照染色步骤要求进行染色)。
- (2) 组织必须用流水冲洗去除重铬酸钾否则乙醇脱水会引起铬色素。

3. B-5固定液

用途:B-5 固定液是骨髓活检常规固定液,并且在怀疑淋巴瘤时固定淋巴结。

试剂:

B-5 贮备液:氯化汞 12.0g,醋酸钠 2.5g,蒸馏水 200.0ml,充分混合,不使用任何金属用具或金属类盖子,贮备液自配制之日起稳定性 1 年。

工作液:贮备液 20.0ml,甲醛 2.0ml,使用前立即混合。丢弃时按有害废物管理处理。

注意:致癌,有刺激性,腐蚀剂。

安全措施:在通风好的地方操作,戴防护眼镜,手套,穿工作服。

氯化汞:严重的刺激皮肤和眼睛,影响呼吸道、胃肠、生殖器官和胎儿生长发育。通过