



XIANDAI ZUZHI HUAXUE YUANLI JI JISHU

现代组织化学 原理及技术

(第三版)

刘颖 朱虹光◎主编

 复旦大学出版社

XIANDAI ZUZHI HUAXUE YUANLI JI JISHU

现代组织化学 原理及技术

(第三版)

刘颖 朱虹光◎主编

 復旦大學出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代组织化学原理及技术/刘颖,朱虹光主编. —上海: 复旦大学出版社, 2017. 8
ISBN 978-7-309-13181-9

I. 现… II. ①刘…②朱… III. 组织化学 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 194108 号

现代组织化学原理及技术

刘颖 朱虹光 主编
责任编辑/王 瀛

复旦大学出版社有限公司出版发行
上海市国权路 579 号 邮编: 200433
网址: fupnet@fudanpress.com <http://www.fudanpress.com>
门市零售: 86-21-65642857 团体订购: 86-21-65118853
外埠邮购: 86-21-65109143 出版部电话: 86-21-65642845
上海华业装潢印刷厂有限公司

开本 787 × 1092 1/16 印张 19.5 字数 439 千
2017 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

ISBN 978-7-309-13181-9/Q · 105
定价: 88.00 元

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社有限公司出版部调换。
版权所有 侵权必究

编 委 会

主 编

刘 颖 朱虹光

编写人员

(按姓氏笔画排序)

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 王文娟 | 卢韶华 | 包 芸 | 刘国元 |
| 刘秀萍 | 刘学光 | 杜尊国 | 李海霞 |
| 李 慧 | 李清泉 | 吴慧娟 | 张志刚 |
| 陈忠清 | 周仲文 | 赵仲华 | 唐 峰 |
| 曾文姣 | 曾海英 | 熊 佶 | |

组织化学技术是以化学反应为主的染色方法区分胞质、胞核和细胞外基质,清晰地显示正常或病理状态下的组织和细胞形态,并借此作出诊断。随着生物科学技术的发展,在组织、细胞标本上引入生物化学的酶—底物反应、免疫化学的抗原—抗体反应及分子生物学的DNA或RNA基因片段杂交反应,它们与组织形态学技术相结合分别形成酶组织化学、免疫组织化学和杂交组织化学,统称现代组织化学。通过光学或电子显微镜观察,人们能够在组织、细胞及核酸水平对细胞的蛋白合成、免疫反应做出定性、定位和定量的判断,使细胞的形态与功能有机地结合。在当前精准医学的时代背景下,现代组织化学技术已成为生命科学和医学研究及临床病理诊断中不可或缺的重要手段。

为了让研究生在短时间内能掌握常用的形态学研究新技术,我系从1986年起开设了免疫组织化学技术课程,1994年又发展成现代组织化学课程,自编了相应教材,因内容新颖、实用,受到研究生和其他实验室工作人员的欢迎。如今,在以往教材的基础上,结合近几年的新发展,进行了改编、扩充,并且请临床医院的病理科医师将常见肿瘤的免疫标记加以整理。希望本书能在教学、科研及临床病理检验中起到有益的作用。

本书作为医科研究生教材兼顾临床使用实践性,编写中特别注意了3条原则:①在顾及内容系统性和完整性的同时,更突出其先进性,尽可能包括近年来发展的、行之有效的新技术,如免疫组织化学、杂交组织化学技术的新进展,形态定量技术,细胞凋亡的检测等。②对各种技术的介绍,既有精辟的原理讲解,又有最常用的实验操作步骤,使读者不仅能照着做,还能根据其原理作某些调整或创新。③在应用方面,注意专业覆盖面,使各个专业的读者都能从中找到对应点,从而引起学习兴趣,并应用于自己的工作中。由于本书涉及的原理和方法有一定普遍性,故适用范围并不局限于医科,同样也适用于生物学乃至其他生命学科;读者也不仅是研究生,实验室各级工作人员也能从本书获益。

本书的顺利出版首先要感谢我校研究生院领导的大力支持。参加编写的人员除我校病理教研室的老师外,还特邀华山医院病理科唐峰教授、中山医院病理科卢韶华教授及其团队人员共同撰写。各位专家、教授都为之付出了辛勤的劳动,但由于各位编者均是在繁忙的教学、科研和临床病理工作中抽暇编撰而成,错误和不足难免,衷心希望读者指正、批评,不胜感激。我们要特别感谢承接本书出版的复旦大学出版社。最后,我们还将感谢读者们的关注和厚爱,并热诚欢迎对本书的不足之处提出批评指正。

刘颖 朱虹光

2017年6月

第一部分

| | | |
|------------|-----------------------------|----|
| 第一章 | 组织细胞标本的处理及制备 | 3 |
| | 第一节 组织和细胞标本的来源及取材 | 3 |
| | 第二节 标本的固定 | 4 |
| | 第三节 组织的脱水、透明、浸蜡及包埋 | 7 |
| | 第四节 组织切片 | 10 |
| | 第五节 组织衬染 | 12 |
| | 第六节 组织芯片技术 | 12 |
| 第二章 | 酶组织化学 | 15 |
| | 第一节 组织化学的原理及一般原则 | 15 |
| | 第二节 常用酶组织化学方法 | 16 |
| | 第三节 酶组织化学的应用 | 18 |
| 第三章 | 免疫组织化学中的抗原与抗体 | 20 |
| | 第一节 免疫组织化学中的抗原 | 20 |
| | 第二节 抗体的制备 | 24 |
| | 第三节 石蜡组织切片中抗原性的修复 | 29 |
| 第四章 | 免疫荧光组织(细胞)化学技术 | 33 |
| | 第一节 荧光的基本知识 | 33 |
| | 第二节 荧光组织化学的基本原理及方法 | 35 |
| | 第三节 免疫荧光的染色步骤 | 36 |
| | 第四节 免疫荧光非特异性染色 | 39 |
| | 第五节 多光谱荧光技术 | 40 |

| | | |
|------------|-----------------------------|----|
| 第五章 | 免疫组织化学染色 | 42 |
| | 第一节 免疫组织化学染色原理和方法 | 42 |
| | 第二节 免疫组织化学标记中的问题及解决方案 | 47 |
| | 第三节 双重或多重免疫组织化学 | 50 |
| 第六章 | 电子显微镜细胞化学技术 | 53 |
| | 第一节 透射电镜技术 | 53 |
| | 第二节 电镜酶细胞化学技术 | 55 |
| | 第三节 免疫电镜技术 | 58 |
| 第七章 | 杂交组织化学 | 62 |
| | 第一节 杂交组织化学的原理 | 62 |
| | 第二节 探针类型、制备及标记 | 63 |
| | 第三节 组织和细胞标本的准备 | 70 |
| | 第四节 原位杂交技术 | 71 |
| | 第五节 原位杂交组织化学技术的进展及应用 | 75 |
| 第八章 | 现代组织化学定量技术 | 78 |
| | 第一节 图像分析技术概述 | 78 |
| | 第二节 图像处理和分析的基本原理 | 78 |
| | 第三节 图像分析的基本方法 | 80 |
| | 第四节 图像分析和形态定量技术的应用前景 | 81 |

第二部分

| | | |
|-------------|-------------------------------|-----|
| 第九章 | 肺癌诊断常用免疫标记物 | 85 |
| 第十章 | 消化系统肿瘤诊断及常用免疫标记物 | 89 |
| | 第一节 胃肠常用免疫组织化学标记物 | 89 |
| | 第二节 消化系统常见肿瘤免疫标准物 | 92 |
| 第十一章 | 软组织肿瘤诊断及常用免疫标记物 | 99 |
| | 第一节 软组织肿瘤常用免疫标记物 | 100 |

| | | |
|-------------|-----------------------------------|------------|
| | 第二节 特殊形态软组织恶性肿瘤的免疫组织化学鉴别诊断 | 110 |
| | 第三节 其他软组织肿瘤的免疫组织化学诊断 | 115 |
| 第十二章 | 女性生殖系统疾病诊断及常用免疫标记物 | 120 |
| | 第一节 乳腺常用免疫组织化学标记 | 120 |
| | 第二节 乳腺疾病鉴别诊断的免疫标记物 | 127 |
| | 第三节 与乳腺癌治疗和预后评估有关的免疫组织化学检测 | 132 |
| 第十三章 | 女性生殖系统肿瘤诊断常用免疫标记物 | 136 |
| 第十四章 | 男性生殖系统及肾脏肿瘤的免疫组织化学诊断 | 140 |
| | 第一节 前列腺病变的免疫组织化学诊断 | 140 |
| | 第二节 膀胱病变的免疫组织化学诊断 | 144 |
| | 第三节 睾丸肿瘤的免疫组织化学 | 147 |
| | 第四节 肾肿瘤的免疫组织化学 | 149 |
| 第十五章 | 常见淋巴造血系统肿瘤的免疫标记 | 153 |
| | 第一节 血液系统肿瘤 | 160 |
| | 第二节 淋巴系统肿瘤 | 161 |
| 第十六章 | 头颈部肿瘤 | 175 |
| | 第一节 头颈部肿瘤常用抗体 | 175 |
| | 第二节 头颈部肿瘤的免疫表型 | 177 |
| | 第三节 鼻咽部肿瘤 | 181 |
| | 第四节 口腔及口咽部肿瘤 | 182 |
| | 第五节 涎腺肿瘤 | 182 |
| | 第六节 牙源性肿瘤 | 185 |
| | 第七节 耳部肿瘤 | 186 |
| | 第八节 副神经节瘤 | 186 |
| 第十七章 | 内分泌器官肿瘤诊断免疫标记物 | 188 |
| | 第一节 内分泌细胞来源肿瘤免疫组织化学检测常用抗原 | 188 |
| | 第二节 垂体肿瘤免疫诊断指标 | 190 |
| | 第三节 甲状腺肿瘤免疫诊断 | 193 |
| | 第四节 甲状旁腺肿瘤诊断及免疫标记 | 196 |
| | 第五节 肾上腺肿瘤 | 197 |

| | | |
|--------------|----------------------|-----|
| 第六节 | 胰腺内分泌部肿瘤 | 199 |
| 第七节 | 其他部位的神经内分泌肿瘤 | 201 |
| 第十八章 | 神经系统疾病诊断及免疫标记 | 203 |
| 第十九章 | 免疫性疾病的免疫标记物 | 217 |
| 第二十章 | 细胞外基质的研究 | 223 |
| 第二十一章 | 病原生物体的检测 | 232 |
| 第二十二章 | 细胞增殖、凋亡及其检测 | 244 |

第三部分 实验

| | | |
|-------------|-------------------------|-----|
| 实验 1 | 组织取材、固定、包埋和切片 | 253 |
| 实验 2 | HE 染色及常用衬染方法 | 256 |
| 实验 3 | 酶组织化学常用酶组织化学染色方法 | 258 |
| 实验 4 | 免疫荧光法实验 | 260 |
| 实验 5 | 免疫组织化学染色 | 262 |
| 实验 6 | 免疫电镜实验 | 265 |
| 实验 7 | 杂交组织化学 | 267 |

第四部分 附录

| | | |
|-------------|-----------------------|-----|
| 附录 1 | 常用生物显微镜简介 | 273 |
| 附录 2 | 常用特殊染色方法介绍 | 279 |
| 附录 3 | 常用固定液的配制 | 290 |
| 附录 4 | 常用缓冲液的配制 | 293 |
| 附录 5 | 常用酶消化液的配制 | 297 |
| 附录 6 | 免疫组织化学常用显色液 | 298 |
| 附录 7 | 常用组织切片黏附剂及使用方法 | 300 |
| 附录 8 | 水溶性封固剂 | 301 |

第一章

组织、细胞标本的处理及制备

本书涉及组织原位进行的酶化学反应、免疫组织化学和杂交组织化学等方法,对组织和细胞的恰当处理,使组织和细胞中的待检物质能客观地在显微镜下显示和准确定位至关重要,其关系到:①组织、细胞的结构和形态能否很好保存。②生物大分子的活性(如酶活性)或抗原性能否尽可能保存。③能否顺利并重复地获得高质量的组织切片,好的切片表现为:完整而无裂缝,无皱褶,无碎裂;冷冻切片时无冰结晶;染色鲜艳,对比性好。如果组织、细胞处理不当,不仅会影响实验的成功,而且即使获得了阳性结果,也无法记录下来获得令人信服的、清晰的高质量照片,这常常是一件令人懊恼的事情。因此,组织和细胞的恰当处理及优质标本的制成是一系列现代组织化学方法成功的首要条件。本章就组织及细胞标本的处理及制备过程进行详细介绍,有助现代组织化学实验顺利完成。

第一节 组织和细胞标本的来源及取材

一、组织标本的取材

现代组织化学中所用组织来自手术切除、钳取活检、穿刺活检标本,也可取自尸体剖验或穿刺及实验动物标本。但杂交组织化学,尤其是检测 mRNA 时,尸检材料常较难取得满意的结果。尸体组织最好在死亡后立即取材,否则发生自溶将导致抗原丧失或弥散,核酸分子被降解破坏。

取材是指从大体标本上切除适量的组织材料进行研究。在取材过程中应注意以下几个问题:①用于免疫组织化学的组织一般取材大小为 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ 。②具有代表性的不同病灶都应取材,包括病灶与正常交界处。③应尽量避免坏死区,因坏死组织不仅抗原和核酸破坏殆尽,而且会引起很强的非特异性着色。④剔除脂肪和钙化,否则会影响切片,出现假阳性或假阴性结果。⑤操作应尽可能迅速,使用的刀刃要锋利,避免来回挫动组织;镊取时动作要轻柔,尽量避免组织受挤压引起组织细胞变形,因其会引起染色加深造成非特异性着色。

动物标本取材时,应先将动物麻醉后处死。处死的主要方法如下。

1. 空气栓塞法 向动物静脉内注入一定量的空气,使动物很快死亡。一般适用于大动物,如兔、犬、猫等动物。

2. 乙醚吸入麻醉法 可将浸有乙醚或氯仿(三氯甲烷)的棉球连同动物一起放入密闭容器内进行麻醉,适用于鼠等小动物的取材,但容易引起动物内脏淤血。

3. 戊巴比妥钠和乌拉坦麻醉法 用4%的戊巴比妥钠水溶液或20%乌拉坦,进行静脉或腹腔注射完成麻醉,注射剂量为1~2 ml/kg。若出现乙醚吸入麻醉效果不好的情况,麻醉后宜放血,以免动物内脏淤血。

4. 断头法 用剪刀剪去动物的头部,待血液流出后立即取材,适用于小动物。

二、细胞标本取材(制备)

细胞片的制备因所取细胞的来源不同,可采取下列不同的方法。

1. 组织印片 将洁净载玻片轻压于已暴露病灶的新鲜组织切面,细胞即黏附于玻片,晾干后浸入冷丙酮或醋酸-乙醇固定10 min,自然干燥后进行染片或放入-20℃冰箱内保存。该法操作简便、省时;缺点是细胞分布不均,有重叠,影响观察效果。此标本适合于检测上皮性恶性肿瘤的细胞核上的一些指标的检查,如DNA含量、染色体倍率等。因为癌细胞之间的粘连性降低,比正常细胞更容易黏附到玻片上。

2. 细胞培养片 进行贴壁细胞培养时,置小玻片于培养瓶中,使细胞在小玻片上生长,达到适当密度后取出固定,供染色。也可将细胞培养在多格培养片(slide chamber)上,然后同上方法处理。多格培养可在同一玻片上同时检测多种细胞,既保证了染色条件一致,又能大大节省时间。

3. 细胞悬液涂片 大多数细胞片由细胞悬液制成,其来源包括:①血液、尿液、脑脊液;②体腔积液;③组织穿刺吸取,如骨髓、淋巴结或其他实质性组织;④悬浮培养的细胞或贴壁细胞经消化后形成的悬液。悬液中的细胞浓度为 10^6 /ml左右时,可直接涂于载玻片上,但要均匀、不重叠。若浓度过低,可经低速离心沉淀后再涂;反之,浓度过高,应予适当稀释。涂片的范围直径应小于1 cm,以节约试剂。若用细胞离心涂片器(cytospin)则涂片效果更好。在制备细胞悬液时,若经反复离心、洗涤,细胞黏性降低,染色时可能发生脱片,必要时载玻片需预涂黏附剂。细胞片制成后同样经干燥、固定、冷藏。

细胞片标本制备时未经过繁复的处理过程,故细胞表面抗原保存较好;但如要检测分泌性抗原,细胞应经充分洗涤以除去血液或组织液中抗原黏附所引起的干扰。此外,在显示胞质内抗原时,需预先用皂角苷(saponin)等处理,增加细胞膜的通透性,使抗体得以进入。值得提示的是,细胞片标本一定要经过短时间晾干后再放入固定液中,否则细胞会丢失。

第二节 标本固定

一、固定的目的和注意事项

凡需进行原位研究的标本均要进行固定(fixation),固定的目的和意义主要有:①抑制

细胞内容酶体酶的释放和活性,防止自溶;抑制组织中细菌的繁殖,防止组织腐败。②使细胞的蛋白质、脂肪、糖等各种成分凝固成不溶性物质,以防止物质扩散并维持原有的组织形态结构。③固定后的组织对染料有不同的亲和力,染色后可产生不同的折射率,颜色更为清晰、鲜明,便于观察。④固定剂往往兼有硬化作用,便于以后切片。

在完成组织和细胞标本固定时,应注意以下问题:①新鲜组织尽快取材,越早固定越好。②不同固定剂的性能不一,根据研究目的选用合适的固定剂。③固定要充分、彻底。固定液量要充足,其与组织的体积比最好在 20 倍以上。固定时间可根据所选固定液和组织类型而定。若进行酶组织化学染色或者免疫组织化学标记时,应在 4℃ 短时间固定,固定时间长会导致酶活性减弱、消失及蛋白抗原分子之间过多交联产生,影响免疫标记。为了使组织在短时间内获得均匀一致的固定效果,组织的厚度最好在 5 mm 以内,以 2~3 mm 为宜。有时为了很快地使组织得到均匀的固定,可采用整体动物或器官灌流的方法进行预固定。

二、固定的主要方法

固定的方法有物理固定和化学固定 2 类。物理固定可采用空气干燥(血涂片)、骤冷(在液氮中迅速冷冻)或微波固定等;化学固定有浸润法(immersion method)和灌流法(perfusion method)。灌流法适用于动物实验中对缺氧敏感的器官,如神经系统和胃肠等的取材。

(一) 浸润法

浸润法是组织化学和免疫组织化学常用的固定方法,一次要处理许多组织样品时也多用此法。预先需估计固定剂的用量,并在取材前配好固定液,分装于小容器内,在容器上标记组别和取材时间,容器内放入纪录组织类型的纸条,以便包埋时辨认。

(二) 灌流固定法

该法是经血管途径,把固定液灌注到需要固定的器官内,使生活的细胞在原位及时、迅速固定,取下组织后,再浸入相同的固定液内继续固定。灌流固定对组织结构和酶活性保存较好。

灌流固定大动物时多采用输液方式。将固定液从一侧颈总动脉或股动脉输入,从另一侧切开静脉放血,输入固定液与放血同时进行。固定液的输入量因个体不同而异。小动物(如大鼠和小鼠)多采用心脏灌流固定,动物在乙醚吸入深度麻醉情况下,打开胸腔,纵向切开心包膜,用静脉输液针从左心室(心尖处)刺入,针尖刺入后,随即将纱线扎紧固定,勿使其移动,再将右心耳剪开放血。在灌注固定液前,先用含抗凝剂的 37℃ 生理盐水灌流,冲洗血管内的血液,防止血液凝固阻塞血管。抗凝剂常用肝素,剂量为 40 mg/L 冲洗液。肝脏颜色由鲜红变为浅白色时,即可灌注固定液,灌注速度为 5~10 ml/min,应在 30 min 内结束灌注并取材,而后将组织浸入相同的固定液中 1~3 小时。

三、常用固定液的种类和各自优缺点

1. 甲醛(formaldehyde) 甲醛是首选的、最常用的醛类固定剂。甲醛通过与蛋白多肽链氨基酸侧链的功能基团,如氨基、羟基、酰氨基等结合,使蛋白多肽分子间形成亚甲基桥(—CH₂—),蛋白质不再发生改变,保存原位。其特点是:①组织形态、结构保存好,对脂

肪、神经、髓鞘固定较好,对糖有保护作用,也可固定高尔基复合体和线粒体等;②穿透性强,组织收缩少;③价格低廉。但是,醛基与抗原蛋白氨基交联形成羧甲基,使抗原决定簇的空间构象发生改变,分子间交联形成的网络结构可能部分或完全遮盖抗原决定簇,使之不能完全暴露,引起免疫组织化学染色的假阴性结果的出现。如果固定后能够充分水洗,可减少分子间交联。在免疫组织化学染色之前切片通过抗原修复还可使抗原再现。为减少固定剂与抗原的交联,在使用醛类固定剂时,应缩短固定时间(8~24小时),降低固定温度(4℃)。

主要使用的甲醛固定剂有以下2种。

(1) 10%甲醛:市售的甲醛试剂为37%~40%甲醛水溶液,常按1:9比例使用,即是10%甲醛溶液,但实际上是4%的甲醛溶液(配法为甲醛原液10ml,蒸馏水90ml混匀)。由于甲醛易氧化为甲酸,使溶液变酸,影响核的染色,为克服此缺点,制成10%中性缓冲甲醛[配法:甲醛原液10ml,0.1mol/L磷酸缓冲液(PBS, pH7.4, 90ml混匀)]。这是目前最常用的固定剂。

(2) 4%多聚甲醛磷酸缓冲液[配法:多聚甲醛40g,0.1mol/L PBS 500ml,两者混合加热至60℃,搅拌并滴加1mol NaOH至清澈为止,冷却后加PBS至总量1000ml]。免疫组织化学前的组织固定用4%多聚甲醛较为多见,对组织抗原性损伤小,作用比较温和。然而这也是它的弱点,对于包膜很厚的组织,如睾丸,多聚甲醛效果不佳,难以渗透。

2. 丙酮 丙酮是无色极易挥发和易燃的液体,丙酮(acetone)渗透力很强,能使蛋白质沉淀凝固,但不影响蛋白质的功能基团而保存酶的活性,用于固定磷酸酶和氧化酶效果较好。缺点是固定快、渗透力强,易使组织细胞收缩,保持细胞结构欠佳。一般4℃下30~60分钟为宜。

3. 乙醇(酒精) 乙醇用于固定时以80%~95%的浓度为好,其优点有:固定兼有硬化和脱水的作用;能很好地保存尿酸结晶和糖类;对蛋白有沉淀作用,故对高分子蛋白的固定有良好效果,如浆细胞内的免疫球蛋白。缺点有:渗透力不如甲醛;能溶解脂肪、类脂和色素;核蛋白被乙醇沉淀后能溶于水,故核着色不良,不利于染色体的固定;高浓度酒精固定组织硬化明显,时间长可使组织变脆。另外,乙醇本身是还原剂,易被氧化,不能与铬酸、重铬酸钾、钨酸等混合。由于乙醇有上述诸多缺点,已很少单独使用于固定。

4. 混合固定液 ①A-F液(乙醇-甲醛液):是由无水乙醇或95%乙醇(A)90ml+甲醛原液(F)10ml配制而成。优点:有固定兼脱水作用,固定后可直接入95%乙醇继续脱水。缺点:同“乙醇”固定剂。②Bouin液:配制方法有2种。一种是用苦味酸饱和水溶液75ml+甲醛原液25ml+冰醋酸5ml;另一种是用80%乙醇150ml+甲醛原液60ml+冰醋酸15ml+结晶苦味酸1g。需要在用前配制。其优点是渗透力强,收缩小,染色鲜艳,且不会使组织变硬、变脆。缺点是固定后的组织必须经水或70%~80%的乙醇洗涤12小时以上,以清除组织块上苦味酸的黄色,而且配制较繁复,有时须新鲜配制。③Carnoy液:优点是穿透力很强,适合外膜致密的组织,对显示DNA和RNA的效果很好,也适用糖原和尼氏小体的固定,固定后无须水洗,可直接投入95%的乙醇进行梯度脱水。该固定液中的氯仿等有机溶剂对人体有害。④以重铬酸钾为主的固定液:如Zenker液、Helly液和Müller液等,各有优缺点。Zenker液固定的细胞核、胞质染色颇为清晰。Helly液对胞质固定好,尤其适用于显示各种胞质颗粒,对显示胰岛和脑垂体前叶各种细胞有良好效果。Müller液固定作

用缓慢,收缩很小,固定所需时间长。它们的共同缺点是配制繁复,有时需使用有毒物质(如升汞)。**⑤PLP 固定液:**配制方法见附录。优点:其固定的机制是先由过碘酸氧化糖蛋白的糖基产生醛基,再通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合,使糖之间发生交联,故对保存糖蛋白的抗原性有较好效果。缺点:配制烦琐,不经济。

5. 常用于冷冻切片的固定液 ①丙酮:常用于冷冻切片或细胞涂片的后固定,保存抗原较好,用前在4℃冰箱预冷,切片在冷丙酮中只需固定5~10 min。②AAA液:配法为无水乙醇85 ml+冰醋酸5 ml+甲醛原液10 ml及酒精冰醋酸固定液(无水乙醇95 ml+冰醋酸5 ml,多用于冷冻切片后固定。

对于冷冻切片或细胞涂片制成后要晾干后固定,固定后再晾干可使细胞牢固地黏附在载玻片上,故对于容易脱落的细胞应延长晾干时间。晾干之后PBS漂洗3次,然后进行组织化学或免疫组织化学染色。

6. (免疫)电镜组织的固定 ①戊二醛-多聚甲醛缓冲液:在4%多聚甲醛磷酸缓冲液中加入0.5%~1%戊二醛;②1%锇酸固定液:配好后应放置4℃冰箱可保存1~2周,变色后则不可再用。

以上2种固定液可用于(免疫)电镜组织的固定,也可用于光镜免疫组织化学组织的固定。

四、常见抗原所选择的组织细胞处理方法

用于免疫组织化学的固定剂种类很多,以上固定剂的选择仅供参考,不同的抗原和标本均可首选醛类固定液,如效果不佳,再试用其他固定液。选择最佳固定液的标准:①能最好地保持组织细胞的形态结构。②最大限度地保存抗原免疫活性和被检物不被丢失。一些含重金属固定液可用于组织化学标本的固定,但在免疫组织化学染色中禁用。在可能的条件下,在预实验时可针对不同的研究对象的最佳固定和切片方案进行摸索。如进行肝组织甲胎蛋白(AFP)免疫组织化学染色时,丙酮-甲醛固定,石油醚透明石蜡包埋的切片能较好地保存AFP的抗原性,阳性染色强,几乎没有背景染色;其次是高碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛(PLP)固定液和苦味酸-多聚甲醛固定液。

固定液的选择也与制片相关。如果需要制作冷冻切片,一般不固定或者采用乙醇、丙酮,多聚甲醛短时间固定,多用于免疫标记细胞表面抗原、神经多肽、胺类、酶等。内分泌多肽的免疫标记常用Bouin液固定,石蜡切片即可获得满意结果。免疫球蛋白类可用甲醛或Zenker液固定,冷冻切片或石蜡切片则根据所用抗体而定。肽类激素和肿瘤胚胎抗原均可用Bouin液固定,石蜡切片。如要进行免疫电镜研究,则以戊二醛-多聚甲醛缓冲液作前固定。

第三节 组织的脱水、透明、浸蜡及包埋

一、组织的脱水

(一) 脱水的目的

组织内的水分不能与苯或石蜡相融合,故石蜡包埋前(或透明前)必须脱去。使用不同