



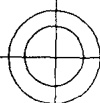
新世纪全国高等中医药院校教材

组织细胞分子学 实验原理与方法

(供研究生及七年制学生用)

主编 赵宗江

中国中医药出版社



新世纪全国高等中医药院校教材

组织细胞分子学实验 原理与方法

(供研究生及七年制学生用)

主 编 赵宗江 (北京中医药大学)

副主编 周忠光 (黑龙江中医药大学)

周坤福 (南京中医药大学)

王世军 (山东中医药大学)

王望九 (安徽中医学院)

主 审 牛建昭 (北京中医药大学)

中国中医药出版社

• 北 京 •

图书在版编目 (CIP) 数据

组织细胞分子学实验原理与方法/赵宗江主编. —北京: 中国中医药出版社, 2003.9

新世纪全国高等中医药院校教材

ISBN 7-80156-539-8

I. 组… II. 赵… III. 组织细胞 - 分子结构 - 实验 - 中医学院 - 教材
IV. R329.2 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 074707 号

中国中医药出版社出版

发行者: 中国中医药出版社

(北京市朝阳区东兴路 7 号 电话: 64151553 邮编: 100027)

(邮购联系电话: 64166060 64174307)

印刷者: 北京市松源印刷有限公司

经销者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 850×1168 毫米 16 开

字 数: 603 千字

印 张: 27.25

版 次: 2003 年 9 月第 1 版

印 次: 2003 年 9 月第 1 次印刷

册 数: 4000

书 号: ISBN 7-80156-539-8/R·539

定 价: 35.00 元

如有质量问题, 请与出版社发行部调换。

序 言

我国自 1978 年恢复研究生教育制度，1981 年实行学位制度以及 1991 年建立本硕连读七年制教育制度以来，随着现代科学研究技术和方法的发展，尤其是组织、细胞分子学实验方法的引入和应用，不但提高了研究生的科学素质和能力，也提高了中医药科学研究的质量和水平。然而十几年来，各高等中医药院校虽为研究生开设了相似的课程，但均不够系统、全面，更无较为适用的教材，这就必然影响研究生的实验操作能力和培养质量。

本书概括了组织、细胞学实验方法，组织化学、荧光组织化学、免疫组织化学、原位杂交组织化学、原位 PCR 技术以及定量组织化学等，它涵盖了组织细胞形态学方面的经典方法和现代最新实验技术，必将成为研究细胞生物学、组织学、解剖学、病理学和中医药学不可缺少的技术手段。《组织细胞分子学实验原理与方法》一书已被列入“新世纪全国高等中医药院校教材”，其出版发行，必将为提高研究生科研实际操作技术打下良好的基础，必将为提高研究生采用现代科研（含医学科研）手段开展中医药研究提供有力的技术方法，必将为提高高等中医药院校研究生教学质量起到推动作用和做出应有的贡献。本书不失为一本难得的有价值的教材和参考书。

欣值本书行将出版之际，谨志数语向本书的著者和读者致以由衷的祝贺！

贲长恩

2003 年 7 月 28 日

注：贲长恩系北京中医药大学教授、博士生导师，我国著名的组织化学专家，获“全国优秀科技工作者”称号，原中国解剖学会名誉理事长，曾任国务院学位委员会评议委员。

前 言

本书被全国高等中医药教材建设研究会列入“新世纪全国高等中医药院校教材”，供高等中医药院校博士研究生、硕士研究生和七年制学生使用。

本教材是由北京中医药大学牵头，中国中医研究院及上海、南京、成都、广州、黑龙江、山东、天津、湖北、湖南、长春、河南、安徽、江西、甘肃、浙江等 17 所中医药大学（学院）参加编写，系统、全面地向高等中医院校博士研究生、硕士研究生及七年制学生讲授在科研课题中涉及的组织、细胞学实验方法，以及组织化学、荧光组织化学、免疫组织化学、原位杂交组织化学、原位 PCR 方法、定量组织化学等组织细胞形态学方面的经典方法和现代最新实验技术，是国内第一部全国统编教材。

既往研究生课题所涉及的研究方法，主要源于《组织学与胚胎学》、《病理学》、《分子生物学》及相关技术方法的参考书，但对学生来说，缺乏系统性和全面性，既严重影响了中医院校的整体教学水平，又严重影响了研究生和七年制学生的培养计划。为适应新世纪研究生教学的需要，根据研究生对细胞生物学新技术、新方法的需求，设置课程内容，拓宽科研思路，为进行科研工作和撰写科研论文打下良好的基础。《组织细胞分子学实验原理与方法》正是基于这一主导思想而编写的。

《组织细胞分子学实验原理与方法》作为一门实践性很强的实验学科，是博士研究生、硕士研究生、七年制学生教学的基础课程，也是实现专业人才培养目标的重要环节。课程内容设置，从以往以教师为中心的课堂教学方式，过渡到以研究生为中心的自主学习方式，注重培养研究生创造性思维和独立操作的实践能力，以及运用所学理论解决、分析问题的综合能力。力求缩短理论教学时间，加大实验操作的比重，使研究生掌握并能熟练应用组织、细胞分子学实验方法，课程结束时能够设计出一项与毕业论文相关的研究课题。

总之，该课程是适应新世纪研究生教学需要而产生的。要求任课教师具有宽广而深厚的组织、细胞学理论和实验知识底蕴，灵活和创新性的教学方法，非凡和娴熟的实验操作能力；同时也要求学生适应新形势的需要，从以往枯燥的纯理论教学，走进斑斓缤纷的理论与实践相结合的学习生活中，走进令人神往的实验室，独立完成一份“意义非凡”的科研工作。发研究生涯的肇始，开课程建设之先河，使该课程能为研究生完成毕业科研论文奠定良好而扎实的基

础。因此，开设《组织细胞分子学实验原理与方法》课程，是适应新形势的需要，势在必行、刻不容缓。

《组织细胞分子学实验原理与方法》一书的出版刊行，得到了全国高等中医药教材建设研究会、中国中医药出版社领导诚心关爱，得到了北京中医药大学领导，北京中医药大学教学管理处、研究生部以及各参编单位相关领导的大力支持，共致谢忱。我的研究生魏晨、谷海英、李相辉、马建岭、刘兰群、胥丽霞、于波、夏桂选、杨丽平、张改华等同学在本书的稿件组织、文字处理、图片编辑中做了大量而繁杂的工作，付出了辛勤的劳动，在此也向他们表示感谢。

我们希望本书能有助于推动高等中医药院校研究生教育的发展，有助于促进中医药科研工作的广泛开展。本书既是博士研究生、硕士研究生和七年制学生的教材和参考书，也是广大科研工作者，尤其是中医药科研工作者的得力助手。由于时间仓促和水平所限，教材中错谬之处在所难免，恳请广大读者批评指正。

北京中医药大学 赵宗江
2003年7月29日于北京

目 录

第一章 组织学实验方法 (1)	
第一节 组织学制片概述 (1)	
一、组织学制片方法..... (1)	
(一) 切片法..... (1)	
(二) 非切片法..... (1)	
二、组织切片标本制作程序..... (2)	
(一) 切片制作中的各种操作..... (2)	
(二) 切片的主要程序..... (2)	
第二节 取材 (3)	
一、动物的处死方法..... (3)	
二、取材注意事项..... (4)	
三、取材的方法..... (4)	
(一) 肌组织取材..... (4)	
(二) 消化系统取材..... (5)	
(三) 泌尿系统取材..... (6)	
(四) 呼吸系统取材..... (7)	
(五) 循环系统取材..... (7)	
(六) 淋巴器官取材..... (8)	
(七) 生殖系统取材..... (8)	
(八) 神经系统取材..... (8)	
第三节 固定和固定液 (9)	
一、固定及固定的方法..... (9)	
(一) 固定..... (9)	
(二) 目的和意义..... (9)	
(三) 对象和方法..... (10)	
(四) 固定剂的性质和条件..... (11)	
(五) 固定剂的作用、穿透率和媒染效果..... (11)	
(六) 注意事项..... (12)	
二、固定液..... (13)	
(一) 单纯固定液..... (13)	
(二) 混合固定液..... (18)	
第四节 固定后的处理 (20)	
一、洗涤..... (20)	
(一) 洗涤的目的..... (20)	
(二) 洗涤的方法..... (20)	
二、脱水..... (21)	
(一) 脱水的目的和原则..... (21)	
(二) 脱水剂的种类和效果..... (21)	
(三) 常用脱水剂..... (22)	
(四) 脱水时间..... (22)	
三、透明..... (23)	
(一) 透明的目的..... (23)	
(二) 透明剂的种类和使用方法..... (23)	
四、浸蜡与包埋..... (24)	
(一) 浸蜡的目的和方法..... (24)	
(二) 浸蜡剂的种类..... (24)	
五、包埋..... (25)	
(一) 石蜡包埋法..... (25)	
(二) 体液石蜡包埋法..... (25)	
(三) 快速石蜡包埋法..... (25)	
(四) 火棉胶包埋法..... (26)	
(五) 明胶包埋法..... (26)	
六、脱水、透明和浸蜡时间..... (27)	
七、石蜡包埋注意事项..... (30)	
第五节 组织制片(切片)法 (30)	
一、组织切片机..... (30)	
(一) 石蜡切片机..... (30)	

(二) 火棉胶切片机····· (31)	····· (51)
(三) 冰冻切片机····· (31)	(十一) HE 染色的步骤 ····· (52)
(四) 切片机的保养····· (32)	(十二) 常规 HE 染色应注意
二、组织切片刀····· (32)	的问题····· (53)
(一) 切片刀的种类····· (32)	四、特殊染色····· (54)
(二) 磨切片刀的器具及磨	(一) 胶原纤维染色法····· (54)
刀法····· (32)	(二) 六胺银染色法····· (56)
三、切片方法····· (33)	第七节 神经组织的切片制备····· (58)
(一) 石蜡切片法····· (34)	一、固定····· (58)
(二) 冰冻切片法····· (37)	(一) 固定液的配制····· (59)
(三) 火棉胶切片法····· (38)	(二) 固定方法····· (60)
第六节 染料、染色及染色方法	二、石蜡包埋法····· (61)
····· (39)	(一) 浸蜡····· (61)
一、染料····· (39)	(二) 包埋····· (62)
(一) 天然染料····· (39)	三、恒冷切片机和切片法····· (62)
(二) 人工合成染料····· (40)	四、振动切片机切片法····· (63)
二、染色····· (43)	第二章 电镜标本制备方法····· (64)
(一) 染色历史····· (43)	第一节 超薄切片方法····· (64)
(二) 染色目的····· (44)	一、配制固定液····· (64)
(三) 染色原理····· (44)	二、取材与固定····· (66)
(四) 染色····· (45)	(一) 取材的要领····· (66)
(五) 染色术语····· (47)	(二) 固定的目的和要求····· (67)
三、苏木素 - 伊红染色····· (48)	三、脱水····· (69)
(一) 苏木素来源····· (48)	(一) 脱水损伤问题····· (69)
(二) 苏木素染核原理····· (48)	(二) 脱水方案····· (70)
(三) 苏木素染液化学性质	四、包埋····· (71)
····· (48)	五、超薄切片前的准备····· (72)
(四) 苏木红和媒染剂····· (49)	六、超薄切片····· (77)
(五) 各种染色液的配制····· (49)	(一) 超薄切片机和超薄切片
(六) 明矾苏木素液的蓝化	形成原理····· (77)
和分化····· (50)	(二) 刀口的选择····· (79)
(七) 明矾苏木素液的选用	(三) 水槽液及水槽液面的
····· (50)	调节····· (79)
(八) 伊红 Y 的化学性质 ····· (51)	(四) 标本块与刀刃的调整
(九) 伊红 Y 染色液和促进	····· (79)
剂····· (51)	(五) 切片····· (80)
(十) 伊红 Y 染色液的选用	(六) 切片的展开和切片的

捞取方法····· (81)	应用····· (107)
(七) 制备优良的超薄切片 的条件····· (81)	(七) 检测材料的生物相容性 ····· (108)
(八) 切片的缺陷及其排除法 ····· (82)	第二节 普通细胞培养方法····· (109)
七、超薄切片的常规染色····· (83)	一、培养的基本概念····· (109)
(一) 染液的配制····· (84)	(一) 细胞培养及组织培养 ····· (109)
(二) 染色操作····· (84)	(二) 细胞的形态分类与分化 ····· (110)
第二节 扫描电镜标本制备方法 ····· (86)	(三) 细胞的生长与增殖特点 ····· (112)
一、取材和固定····· (86)	(四) 细胞增殖及生理功能的 测定····· (116)
二、脱水和干燥····· (87)	(五) 污染的防治····· (121)
三、喷镀····· (88)	附一 支原体的检测与去除 ····· (125)
第三章 细胞学实验方法····· (90)	附二 内毒素污染的检测与 去除····· (130)
第一节 细胞概述····· (90)	附三 细胞培养室无菌制度 ····· (133)
一、细胞的特点····· (90)	二、细胞培养的条件····· (133)
二、细胞的结构及生理功能····· (93)	(一) 细胞培养室设施····· (133)
(一) 细胞膜结构及生理功能 ····· (93)	(二) 生长环境····· (135)
(二) 细胞内膜系统及生理 功能····· (94)	(三) 培养试剂····· (136)
(三) 细胞核结构及生理功能 ····· (97)	(四) 培养用品的清洗与消毒 ····· (139)
(四) 细胞膜上的特化结构 ····· (98)	三、原代分离细胞培养····· (141)
(五) 细胞连接····· (99)	(一) 原理和应用····· (141)
(六) 细胞外基质····· (100)	(二) 实验步骤····· (143)
三、细胞的研究方法和应用····· (100)	(三) 注意事项····· (143)
(一) 细胞的研究方法····· (100)	四、传代培养及细胞的冻存复苏 ····· (144)
(二) 细胞的选择····· (103)	(一) 支持物培养贴壁细胞 ····· (144)
(三) 在毒理学研究中的应用 ····· (104)	(二) 细胞冻存····· (145)
(四) 在测定血药浓度中的应 用····· (106)	(三) 细胞复苏····· (145)
(五) 在疫苗研制方面的应用 ····· (107)	第三节 特殊细胞培养方法····· (146)
(六) 在病毒分离和培养中的	

一、贮脂细胞的分离与培养····· (146)	二、核酸的消化反应····· (165)
(一) 原理与应用····· (146)	(一) 核糖核酸酶的消化反应
(二) 细胞的分离与培养····· (147)	····· (165)
(三) FSC 细胞的分离纯化	(二) 脱氧核糖核酸酶的消
····· (148)	化反应····· (166)
(四) FSC 细胞的鉴定及活	三、显示核蛋白的方法····· (167)
力判断····· (148)	(一) 碱性固绿反应····· (167)
(五) FSC 细胞的原代培养	(二) 肝素 - 阿尔新蓝反应
····· (149)	····· (168)
(六) 功能检测····· (149)	第二节 蛋白质····· (169)
(七) 注意事项····· (149)	一、显示氨基的方法····· (169)
二、肾小球系膜细胞的分离与	(一) 二硝基氟苯法····· (169)
培养····· (149)	(二) 汞 - 溴酚蓝法····· (171)
(一) 原理和应用····· (149)	二、显示酪氨酸的方法····· (172)
(二) 细胞的分离与培养····· (150)	(一) 米伦反应····· (172)
(三) 注意事项····· (151)	(二) 酪氨酸重氮化偶联反应
三、内皮细胞的分离与培养····· (151)	····· (172)
(一) 原理与应用····· (152)	三、显示半胱氨酸和胱氨酸
(二) 细胞的分离与培养····· (152)	的方法····· (174)
(三) 细胞的鉴定····· (153)	(一) 汞橙反应····· (174)
(四) 注意事项····· (153)	(二) DDD 重氮蓝 - B 反应
四、神经细胞培养····· (154)	····· (175)
(一) 原理和应用····· (154)	第三节 碳水化合物····· (177)
(二) 细胞的分离与培养····· (154)	一、碳水化合物的化学····· (177)
(三) 注意事项····· (157)	(一) 单糖····· (177)
第四章 一般组织化学····· (158)	(二) 寡糖和多糖····· (181)
第一节 核酸与核蛋白····· (159)	(三) 糖蛋白和蛋白聚糖····· (183)
一、显示 DNA 和 RNA 的方法	二、碳水化合物的组织化学分类
····· (160)	····· (184)
(一) 福尔根反应····· (160)	三、显示糖原的方法····· (185)
(二) 甲基绿 - 派络宁 (Kurnick	(一) 高碘酸 - 雪夫反应····· (185)
法) 反应····· (161)	(二) 胭脂红染色法····· (187)
(三) 甲基绿 - 派络宁	四、显示酸性糖共轭物的方法
(Elias 法) 反应 ····· (163)	····· (188)
(四) 甲基绿 - 派络宁	阿尔新蓝染色····· (188)
(张作干法) 反应····· (164)	第四节 脂类····· (189)
(五) 吖啶橙反应····· (164)	一、显示脂类的脂溶性染料染

色法····· (190)	第一节 免疫组织化学的基本原理····· (244)
(一) 油红 O 示脂类法 ····· (191)	一、抗原的提取····· (244)
(二) 苏丹黑 - B 示脂类法 ····· (192)	二、抗体的制备····· (245)
二、显示脂类的化学方法····· (193)	(一) 单克隆抗体的制备····· (246)
(一) 四氧化钼示脂类法····· (193)	(二) 多克隆抗体的制备····· (247)
(二) 脂肪酶 - 硝酸铅反应法 ····· (194)	三、抗体的纯化····· (248)
第五节 酶····· (195)	四、抗体标记····· (249)
一、磷酸酶····· (198)	第二节 组织细胞材料的制备····· (250)
(一) 碱性磷酸酶····· (198)	一、取材与贮存····· (251)
(二) 酸性磷酸酶····· (201)	(一) 组织标本····· (251)
(三) 三磷酸腺苷酶····· (204)	(二) 细胞标本····· (251)
(四) 葡萄糖 - 6 - 磷酸酶 ··· (208)	二、固定····· (252)
(五) 5' - 核苷酸酶 ····· (209)	(一) 固定液····· (252)
二、羧酸酯水解酶····· (210)	(二) 固定方法····· (253)
(一) 非特异性酯酶····· (210)	三、脱水、包埋····· (253)
(二) 脂酶····· (213)	(一) 脱水、包埋程序····· (253)
(三) 乙酰胆碱酯酶和胆碱 酯酶····· (216)	(二) 包埋方法····· (254)
三、焦磷酸酶····· (219)	四、切片····· (254)
(一) 硫胺素焦磷酸酶····· (219)	(一) 载玻片和盖玻片的处理 ····· (254)
(二) 硫胺素单磷酸酶····· (221)	(二) 石蜡切片····· (254)
(三) 硫胺素三磷酸酶····· (222)	(三) 冰冻切片····· (255)
四、氧化酶····· (223)	第三节 免疫组织化学染色法····· (255)
(一) 细胞色素氧化酶····· (223)	一、免疫过氧化物酶组织化学 染色法····· (256)
(二) 过氧化物酶····· (227)	(一) 直接法····· (257)
(三) 过氧化氢酶····· (228)	(二) 间接法····· (257)
(四) 单胺氧化酶····· (229)	(三) 过氧化物酶抗过氧化物 酶法····· (258)
五、脱氢酶····· (232)	(四) 亲和素 - 生物素复合 物法····· (259)
(一) 琥珀酸脱氢酶····· (232)	(五) 标记链霉亲和素 - 生物素法····· (260)
(二) 乳酸脱氢酶····· (235)	二、非过氧化物酶免疫组织化 学染色法····· (261)
(三) 谷氨酸脱氢酶····· (238)	(一) 免疫胶体金方法····· (261)
(四) 葡萄糖 - 6 - 磷酸脱 氢酶····· (240)	
六、碳酸酐酶····· (241)	
第五章 免疫组织化学····· (244)	

(二) 免疫碱性磷酸酶染色法 (263)	四、荧光显微镜照相..... (273)
(三) 免疫双重或多重标记法 (263)	第二节 组织和细胞荧光分类..... (273)
第四节 免疫组织化学染色的非特 性着色对策、对照设计及结 果判断..... (264)	一、自发荧光..... (273)
一、免疫组织化学非特异性着 色及对策..... (264)	二、诱发荧光..... (273)
(一) 内源性过氧化物酶..... (264)	三、酶促荧光..... (273)
(二) 内源性生物素..... (264)	四、荧光染色..... (273)
(三) 电荷吸附..... (265)	五、免疫荧光..... (274)
(四) 一抗与二抗..... (265)	第三节 生物单胺荧光组织化学 方法..... (274)
(五) 切片制备..... (265)	一、乙醛酸诱发生物单胺荧光法 (274)
(六) 切片洗涤..... (265)	二、邻苯二醛显示组织胺荧光法 (276)
(七) DAB 显色 (266)	第四节 一般荧光组织化学方法 (277)
二、对照设计及染色结果判断 (266)	一、吖啶橙区分活细胞 DNA 和 RNA 荧光染色法 (277)
(一) 对照设计..... (266)	二、溴化乙啶荧光显示脱氧核 糖核酸法..... (279)
(二) 染色结果判断..... (266)	三、溴化乙啶荧光显示核糖核 酸法..... (279)
第五节 免疫电镜方法..... (267)	附：绿色荧光蛋白..... (280)
一、标本制备..... (267)	第五节 免疫荧光组织化学方法 (281)
(一) 取材与固定..... (267)	一、免疫荧光化学染色法原理 (281)
(二) 免疫染色..... (268)	二、免疫荧光化学染色方法..... (282)
(三) 包埋..... (268)	(一) 荧光素标记抗体的制备 (282)
二、透射免疫电镜方法..... (268)	(二) 荧光标记抗体的纯化 (287)
(一) 免疫铁蛋白方法..... (268)	(三) 荧光抗体的染色..... (287)
(二) 过氧化物酶方法..... (269)	(四) 染色标本的保存及封 片介质的制备..... (290)
(三) 胶体金标记免疫电镜 技术..... (269)	三、免疫荧光方法的应用..... (290)
三、扫描免疫电镜方法..... (269)	第七章 原位杂交组织化学..... (292)
四、冷冻蚀刻免疫电镜方法..... (270)	第一节 原位杂交的基本方法..... (292)
第六章 荧光组织化学..... (271)	
第一节 荧光显微镜..... (271)	
一、光源..... (271)	
二、滤光片系统..... (272)	
三、聚光器..... (273)	

一、组织与细胞的固定····· (293)	(二) 操作步骤····· (306)
(一) 多聚甲醛固定····· (293)	(三) 显示····· (306)
(二) 固定液评价····· (293)	五、电镜原位杂交法····· (307)
(三) 4%多聚甲醛配制 ····· (293)	(一) 生物素标记 DNA 探针
二、玻片和组织切片的处理····· (294)	- PA - gold 电镜原位
(一) 玻片的处理····· (295)	杂交法····· (307)
(二) 粘附剂的使用····· (295)	(二) 地高辛标记 rRNA 探针
(三) 切片及细胞标本制作	电镜原位杂交法····· (309)
····· (296)	第三节 原位杂交结合免疫组织
(四) 增强组织通透性及探	化学方法····· (310)
针的穿透性····· (297)	一、同位素原位杂交联合免疫
三、杂交反应····· (298)	组织化学 PAP 法 ····· (311)
(一) 探针的浓度与长度····· (298)	(一) 基本原理····· (311)
(二) 杂交的温度与时间····· (298)	(二) 操作步骤····· (311)
(三) 杂交液····· (298)	二、地高辛标记联合 PAP 法 ··· (312)
四、杂交后处理····· (299)	(一) 基本原理····· (312)
五、杂交后显示····· (299)	(二) 操作步骤····· (312)
六、对照实验和结果判断····· (299)	第八章 定量组织化学····· (314)
第二节 常用原位杂交方法····· (301)	第一节 显微分光光度术····· (314)
一、同位素标记探针原位杂交法	一、显微分光光度计的原理和
····· (302)	结构····· (314)
(一) 组织细胞处理····· (302)	(一) 原理····· (315)
(二) 杂交反应····· (303)	(二) 结构····· (315)
(三) 杂交后漂洗····· (303)	二、显微分光光度计测量的基
(四) 放射自显影和复染····· (303)	本方法····· (316)
二、生物素标记探针原位杂交法	(一) 标本的制备和染色····· (316)
····· (304)	(二) 测量方法····· (317)
(一) 组织细胞处理····· (304)	(三) 注意事项····· (318)
(二) 杂交反应····· (304)	三、显微分光光度计的应用····· (318)
(三) 显示····· (304)	(一) 细胞生物学研究中的
三、地高辛标记探针原位杂交法	应用····· (318)
····· (305)	(二) 肿瘤作用机制研究中
(一) 组织细胞处理····· (305)	的应用····· (321)
(二) 杂交反应····· (305)	(三) 肿瘤细胞 DNA 定量研
(三) 显示····· (305)	究中的应用····· (322)
四、PCR 与原位杂交结合法 ··· (306)	第二节 流式细胞术····· (324)
(一) 基本原理····· (306)	一、流式细胞仪的原理和结构

..... (324)	(二) 激光扫描共聚焦显微镜的动态观察..... (347)
(一) 流式细胞仪组成..... (324)	三、激光扫描共聚焦显微镜的应用..... (348)
(二) 工作原理..... (326)	(一) 细胞内 Ca^{2+} 、pH 值的测定..... (348)
(三) 流式细胞仪测量信号获取与显示..... (327)	(二) 细胞酶活性的测定..... (350)
(四) 流式细胞仪的主要技术指标..... (331)	(三) 细胞物质转运的测定..... (350)
二、流式细胞仪样品制备..... (331)	(四) 细胞受体的测定..... (350)
(一) 实体组织..... (331)	(五) 在细胞凋亡研究中的应用..... (351)
(二) 培养细胞..... (333)	(六) 在神经学研究中的应用..... (351)
(三) 脱落细胞悬液..... (333)	(七) 在中药抗肿瘤研究中的应用..... (352)
(四) 石蜡包埋样品..... (334)	(八) 在针灸经络研究中的应用..... (353)
三、染色方法..... (334)	第四节 图像分析仪..... (353)
(一) DNA 染色方法..... (334)	一、图像分析仪的原理和结构..... (355)
(二) RNA 染色方法..... (334)	(一) 原理..... (355)
(三) DNA 与 RNA 同时染色法..... (335)	(二) 结构..... (355)
(四) 同时分析细胞的 DNA 和总蛋白..... (335)	二、图像分析仪的工作程序..... (356)
(五) 免疫荧光法标记细胞表面抗原及细胞内特异蛋白..... (335)	(一) 图像的形成..... (357)
三、流式细胞仪的应用..... (337)	(二) 图像的获取..... (357)
(一) 肿瘤学方面的应用..... (337)	(三) 图像的检测..... (358)
(二) 免疫学方面的应用..... (338)	(四) 图像的分析..... (359)
(三) 药物抗肿瘤方面的应用..... (338)	(五) 图像的修正..... (361)
第三节 激光扫描共聚焦显微术..... (339)	(六) 图像系统的误差分析..... (362)
一、激光扫描共聚焦显微镜的原理和结构..... (340)	三、图像分析仪在生物医学方面的应用..... (364)
(一) 原理..... (340)	第九章 显微摄影技术..... (365)
(二) 结构..... (342)	第一节 显微摄影基础知识要点..... (366)
二、激光扫描共聚焦显微镜的功能..... (345)	
(一) 激光扫描共聚焦显微镜的静态观察..... (345)	

一、显微摄影系统的常用组件		四、拍摄中曝光不准确	(374)
.....	(366)	第五节 显微摄影照片放大倍数	
二、显微摄影常见技术指标	(366)	计算方法	(374)
第二节 显微摄影的一般步骤和		一、显微镜放大倍数	(374)
拍摄技巧	(367)	二、显微镜底片上的图像放大倍数	
一、摄影前的准备工作	(367)		(374)
二、显微摄影技术要领	(368)	三、放大或扩印照片的放大倍数	
第三节 显微摄影的技巧	(370)		(374)
一、黑白显微摄影的技巧	(370)	第六节 显微摄影技术展望	(375)
二、彩色显微摄影的技巧	(372)	附录一 常用试剂的配制	(376)
第四节 显微摄影技术中常见问		附录二 常用缓冲溶液及其配制	
题与纠正	(373)		(381)
一、显微成像不清	(373)	附录三 英汉名词对照	(397)
二、图像反差过低	(373)	附录四 汉英名词对照	(406)
三、图像亮度不均匀	(373)	主要参考文献	(415)

第一章

组织学实验方法

第一节 组织学制片概述

组织学是研究机体微细结构及其相关功能关系的学科。组织学的发展与组织学实验方法的不断发展密切相关。而促进当代组织学进展的主要因素之一是显微镜技术的应用、发展和不断改进。组织学技术的内容很多,如组织学制片技术、胚胎学制片技术、组织化学技术、荧光组织化学和免疫组织化学技术、组织细胞培养技术及各种显微镜的应用技术。自 1665 年 Hook 发现细胞到 1811 年改进了显微镜,为组织学的发展创立了基础,但由于当时其他科学尚无长足进步,故组织学也仅限于检查新鲜组织,也就是新鲜分离法,从徒手切片和简单机械切片,直到切片机逐渐完善和较高倍的显微镜的发现,组织学建立了比较完善的操作技术,如固定、脱水、包埋、切片和染色方法。20 世纪 30 年代相差显微镜及其他特殊显微镜相继问世和电子显微镜的发明,特别是 20 世纪 50 年代,组织化学、生物化学和电子显微镜技术的迅猛发展,使组织学进入一个崭新的发展时期。

组织学技术不但应用于组织学学科,而且还是生物学、动物学、解剖学、病理学、微生物学、肿瘤学、法医学、遗传工程学等学科用以研究、观察细胞组织生理、病理形态变化的主要方法,而组织学制片技术已广泛地应用于众多的学科中。

一、组织学制片方法

组织学制片方法可归纳为两大类:即切片法和非切片法。

(一) 切片法

切片标本是研究组织学的基本方法。根据所用支持物质的不同,切片方法分石蜡切片、火棉胶切片、电镜技术的超薄切片、振颤切片等。

(二) 非切片法

1. **分离标本** 小块组织浸于化学药品内,溶去细胞间质,经振荡使细胞分离,即可观察单个完整的细胞。如分离三种肌细胞、神经纤维、脊髓前角神经细胞等。
2. **活体标本观察** 蛙口腔粘膜的纤毛运动、精子运动及细胞吞噬等。
3. **涂片标本** 涂片法应用于血液、骨髓、腹水及宫颈上皮等。经染色作临床诊断。
4. **磨片标本** 不经脱钙的骨组织或牙齿,用砂轮和磨石磨成薄片,观察其结构。

5. **整体封藏标本** 无脊椎动物的水螅、草履虫等, 脊椎动物的胚胎材料如鸡胚、蛙胚、猪胚等。经固定、脱水、染色等方法就可以封藏于盖片和载片内。

6. **铺片标本** 经活体注射台盼蓝后, 取下动物的肠系膜作成铺片, 经固定、染色等方法, 可观察吞噬细胞吞噬的蓝颗粒, 肥大细胞、弹力纤维、胶原纤维等。兔的大网膜铺片, 经固定染色后, 可观察毛细血管网。

7. **组织印片** 将未经固定的新鲜组织小块 (如手术后或尸体解剖时将肝、脾等软组织), 压印载玻片上, 经固定后再行染色。据麦兆煌早年介绍用 Schaudian 液 (二氯化汞饱和溶液 2 份加无水乙醇 1 份混合) 作固定以备染色, 能使涂在玻片上的压印组织在 2~3min 内完全固定, 但对组织有强烈收缩作用, 故不作一般组织固定。

二、组织切片标本制作程序

(一) 切片制作中的各种操作

1. **取材与固定** 固定是用化学药品把组织原来的结构保存下来, 以便观察研究之用, 固定剂同时具有硬化细胞组织的作用, 使制片便于进行。取材是根据实验的目的和要求及病变程度而合理取得组织材料。

2. **洗涤与脱水** 洗涤是把渗入组织中的固定剂洗去, 防止染色中的结晶产生。脱水是驱除组织中的水分, 以利于透明和浸蜡。

3. **透明与浸蜡** 脱水后的组织中水分已被透明剂所代替, 而有利于切片和细胞组织保持一定的生活时状态。

4. **包埋与切片** 用石蜡和其他的包埋剂 (原用作组织填充剂者, 即用其作包埋剂) 将组织包绕一定的形状以便于切片。将包埋好的组织块用切片机切成一定的厚度 (以 μm 计)。

5. **贴片 (展片、捞片) 和染色** 将已切妥的切片在温水中展开平整后用载玻片贴上, 稍晾干后再烤片。染色可使细胞和组织被染上不同的颜色而产生一定的折射率, 便于显微镜观察。

6. **封片** 切片染色后用胶类物质将其封固, 以利于长期保存。

(二) 切片的主要程序

各种组织切片的目的各不相同, 所以制作切片的方法程序也不相同。也可根据本单位工作的实践, 增加和减少某个步骤, 仍能获得满意的结果。但对于初学者必须了解基本程序过程, 以便在工作中尽快掌握制片技术。现将制片程序流程列于图 1-1。