



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校医学研究生规划教材

组织化学与 免疫组织化学

主 编 李 和 周 莉



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

策划编辑 鲁志强
李向东
刘 盛
责任编辑 刘 盛
成丽丽
封面设计 尹 岩
版式设计 魏红波
责任校对 吴小翠



ISBN 978-7-117-10361-9



9 787117 103619 >

定 价: 45.00 元



卫生部“十一五”规划教材 全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校医学研究生规划教材

组织化学与 免疫组织化学

主 编 李 和 周 莉

编者 (以姓名拼音为序)

金连弘 (哈尔滨医科大学)

吴 强 (安徽医科大学)

李 和 (华中科技大学同济医学院)

张钦宪 (郑州大学基础医学院)

刘慧雯 (哈尔滨医科大学)

周 莉 (吉林大学白求恩医学院)

苏红星 (首都医科大学)

周德山 (第三军医大学)

唐 勇 (重庆医科大学)

周国民 (复旦大学医学院)



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

资源知识
PDG

图书在版编目 (CIP) 数据

组织化学与免疫组织化学/李和等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2008. 9

ISBN 978-7-117-10361-9

I. 组… II. 李… III. ①组织化学-研究生-教材
②免疫学-组织化学-研究生-教材 IV. Q5 R392.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 095393 号

组织化学与免疫组织化学

主 编: 李 和 周 莉

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15.75

字 数: 368 千字

版 次: 2008 年 9 月第 1 版 2008 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-10361-9/R·10362

定 价: 45.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)



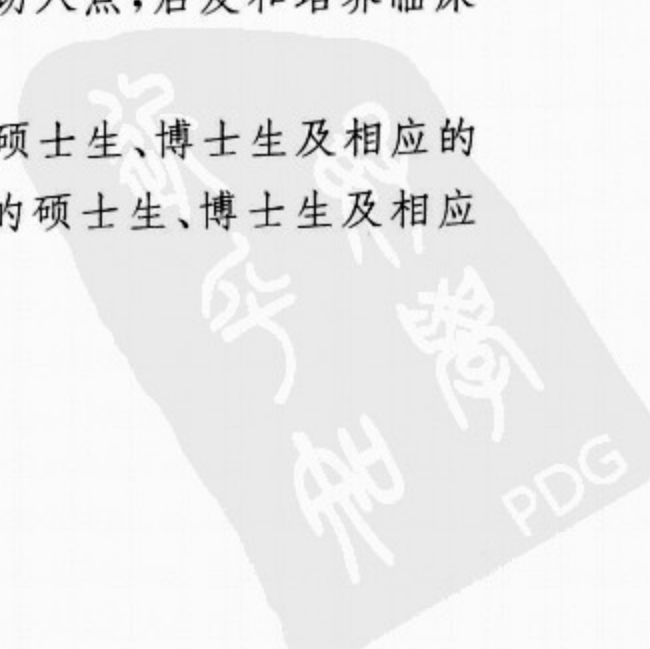
出版说明

随着医学研究生培养规模的不断壮大,国内研究生培养硬件及软件水平的相对落后与培养高素质研究生之间的矛盾日益突出,如何解决这一矛盾成为我们国家医学研究生培养迫切需要解决的问题。

为了适应新时期国内研究生教育和教学的需要,全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室自2004年开始,针对各高校研究生院(处)、研究生导师、在校和毕业后研究生有计划、分期分批地进行了大量、大规模的调研和专家论证工作。在深入探讨“研究生规划教材在研究生培养过程中应该发挥的作用;研究生教材与五年制教材、八年制教材、专科医师培训教材、专著之间的区别与联系”的基础上,根据我国医学研究生教育的实际需要,率先组织策划了这套全国高等学校医学研究生规划教材。

在内容的组织上,该套教材突破传统应试教育教材系统全面的特点,紧扣研究生培养目标,着眼于学生进一步获取知识、挖掘知识和实践创新能力的培养。全套教材包括公共基础课和临床专业课两个系列:公共基础课系列主要围绕研究生科研过程中,从最初的科研设计到最终论文发表的各个环节可能遇到的实际问题展开。临床专业课系列以临床诊疗的回顾·现状·展望为线索,通过对具有转折点意义的诊疗理论、技术或方法探索过程的回顾,目前诊疗中的困惑、局限与不足以及诊疗实践中应注意问题等现状的分析,以及所在学科领域研究热点及发展趋势的展望来探讨新的解决问题的切入点,启发和培养临床创新思维。

该套教材的临床专业课系列主要适用于临床型的硕士生、博士生及相应的临床工作者;公共基础课系列适用于医药卫生各专业的硕士生、博士生及相应的医药卫生工作者。



教材目录

一、公共基础课系列

医学科研课题的设计、申报与实施	主编 李卓娅 龚非力	中英文医学科研论文的撰写与投稿	主编 张学军
医学信息搜集的途径与方法	主编 聂绍平	医学免疫学实验技术	主编 柳忠辉
医学实验技术的原理与选择	主编 李幼平	组织化学与免疫组织化学	主编 李 和 周 莉
医学实验动物学	主编 秦 川	断层解剖学	主编 刘树伟
人类疾病动物模型	主编 施新猷 苏 卫	医学免疫学	主编 曹雪涛
统计分析在医学课题中的应用	主编 蒋知俭	实验室生物安全	主编 叶冬青

二、临床专业课系列

呼吸内科学	主编 钟南山 王 辰	泌尿外科学	主编 杨 勇 李 虹
心血管内科学	主编 胡大一 马长生	妇产科学	主编 曹泽毅
消化内科学	主编 胡品津 刘新光	儿科学	主编 桂永浩 申昆玲
肾内科学	主编 谌贻璞	神经内科学	主编 刘 鸣 谢 鹏
血液内科学	主编 周 晋 黄 河	精神病学	主编 江开达
内分泌内科学	主编 陆召麟 宁 光	眼科学	主编 崔 浩 王宁利
风湿内科学	主编 陈顺乐 邹和健	耳鼻咽喉头颈外科学	主编 孔维佳
普通外科学	主编 赵玉佩 姜洪池	传染病学	主编 李兰娟
骨科学	主编 田 伟 陈安民	急诊医学	主编 黄子通
胸心外科学	主编 胡盛寿	老年医学	主编 张 建 范 利
神经外科学	主编 王忠诚		
血管淋巴外科学	主编 汪忠镐		

前言

本教材是在卫生部全国高等院校医学研究生教材建设研究会组织领导下,为临床医学、基础医学、预防医学、药学和护理等专业的硕士生、博士生及相应的医药工作者而编写的。它以实用、简明、理论与实践紧密结合为特点,以培养研究生基本实验技能、提高科研能力和启发创新为目的,力争在研究生培养中起导航作用。

组织化学与免疫组织化学技术是医学与生命科学研究中重要研究手段之一,其研究方法种类繁多。为使研究生能够掌握基本方法,并在实际工作中触类旁通,灵活运用所学技能,我们在各章内容中均选择常用研究方法,并结合研究工作中常遇到的问题尽可能详细描述和深入讨论,因而不同于同类参考书。由于这门技术实践性颇强,仅学习理论犹如纸上谈兵,故我们专为研究生实验课设计了十个基本技能实验,可供各院校根据不同情况选择使用。为便于学生自学,采用图解和图片的形式帮助学生理解和体会其重要内容。我们还在大多数章的后面以插入科学史话和应用举例的方式讲述科学家和编者们的亲身科研经历,以引导学生学会如何设计和实施选题,希望读者不但能从中得到启迪,而且能感悟到科学研究所需要热情、好奇、勤奋和科学家所具有的坚忍不拔的信念和百折不挠的品格。

本教材在编写过程中,得到同行专家徐辉、苏学今和王芯蕊的帮助,也得到了许多博士、硕士研究生的支持和帮助,如第三军医大学肖岚和于彬;重庆医科大学李琛、卢伟、徐瑜、杨姝和陈林;安徽医科大学胡向阳等,在此向他们表示衷心地感谢。

由于本教材编写时间较短,难免会出现疏漏和不妥,真诚欢迎同行专家和广大师生批评指正,并由衷地期待这本教材能为广大研究生的创新提供探索、挖掘新知识的工具与技能,能为提高研究生的科研能力作出贡献。

李和 周莉

2008年4月



目录

第一章 绪论	1
第一节 组织化学发展的基础	1
一、细胞生物学发展与组织化学	1
二、生物化学发展与组织化学	2
三、免疫学发展与组织化学	2
四、分子生物学发展与组织化学	3
第二节 组织化学发展简史	3
一、组织化学的兴起	3
二、现代组织化学的发展	4
三、我国组织化学发展概况	5
第三节 组织化学技术基本要求	6
一、组织化学的分支和分类	6
二、组织化学技术的基本要求	7
第二章 组织化学与免疫组织化学染色样品制备	8
第一节 取材	8
一、组织标本取材	8
二、细胞标本取材	9
(一) 培养细胞	9
(二) 涂片法	9
第二节 固定	9
一、组织和细胞的固定方法	9
(一) 浸润法	9
(二) 灌流固定法	9
二、常用固定剂和固定方法	10
(一) 组织常用固定剂和固定方法	10
(二) 培养细胞常用固定剂和固定方法	11
第三节 包埋和切片	11
一、石蜡包埋	11
(一) 包埋前脱水	12
(二) 透明	12
(三) 浸蜡	12

(四) 包埋	12
(五) 修块	12
二、切片	12
(一) 石蜡切片	12
(二) 冰冻切片	13
(三) 振动切片	14
三、防脱片处理步骤	14
(一) 载玻片和盖玻片的处理	14
(二) 黏附剂的使用	14
(三) 免疫组织化学染色中常见脱片原因	15
科学史话	
——幽门螺杆菌与胃溃疡	15
第三章 组织化学	18
第一节 核酸组织化学	18
一、Feulgen 反应	18
(一) 原理	18
(二) Schiff 液的配制	19
(三) Feulgen 反应步骤	19
二、吖啶橙染色	20
(一) 吖啶橙区分活细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法	20
(二) 吖啶橙原位区分组织细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法	21
三、Hoechst 33258 染色	22
四、DAPI 染色	23
五、溴化乙啶和碘化丙啶染色法	24
(一) 溴化乙啶染色	24
(二) 碘化丙啶染色	25
第二节 脂类组织化学	25
一、乙醇苏丹黑 B 染色法	26
(一) 染色程序	26
(二) 注意事项	26
二、油红 O 染色法	26
(一) 油红 O 染液的配制	27
(二) 染色程序	27
第三节 酶组织化学	27
一、酶组织化学的基本原理及一般原则	27
(一) 酶组织化学的基本原理	27
(二) 酶显示方法	28

(三) 酶组织化学对组织处理的基本要求	29
二、常用酶组织化学染色方法	30
(一) 磷酸酶	30
(二) 三磷酸腺苷酶	34
(三) 羧酸酯水解酶	35
(四) 氧化酶和脱氢酶	37
(五) 一氧化氮合酶	40
第四节 凝集素组织化学	41
一、凝集素的标记物	42
二、染色程序	42
(一) FITC 标记凝集素的组织化学染色程序	42
(二) 辣根过氧化物酶标记凝集素的组织化学染色程序	42
(三) 生物素标记凝集素的组织化学染色程序	43
第五节 荧光组织化学	43
一、组织细胞荧光分类	44
(一) 自发荧光	44
(二) 诱发荧光	44
(三) 酶促荧光	44
(四) 荧光染色	44
(五) 免疫荧光	44
二、生物胺荧光组织化学	44
(一) Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法	45
(二) 乙醛酸诱发生物单胺荧光法	45
(三) 邻苯二醛显示组胺荧光法	46
科学史话	
——周期蛋白的发现	47
第四章 免疫组织化学技术	50
第一节 免疫组织化学基本原理	50
一、直接法	50
二、间接法	51
三、亲和免疫组织化学	51
(一) 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法	52
(二) 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法	53
第二节 免疫组织化学染色步骤	54
一、SABC 法免疫组织化学染色步骤	54
(一) 石蜡切片免疫组织化学染色	54
(二) 冰冻切片免疫组织化学染色	57

(三) 培养细胞免疫细胞化学染色	57
二、SABC法与其他免疫组织化学染色方法比较	58
(一) SP法或SAP法	58
(二) EnVision TM Systems	58
(三) MaxVision法	58
三、免疫组织化学染色结果评价	59
(一) 以抗原表达模式定位	59
(二) 阳性染色结果定量	59
四、讨论	59
(一) 实验计划	59
(二) 抗体的稀释度	60
(三) 滴加抗体注意事项	60
(四) 抗体的保存	60
(五) 对照实验	61
(六) 免疫组织化学技术应用的基本原则	61
(七) 疑难问题剖析	62
第三节 免疫组织化学双重染色	64
第四节 免疫荧光组织化学技术	65
一、荧光的基本知识	65
(一) 荧光	65
(二) 荧光物质的特性和种类	65
二、免疫荧光组织化学基本原理及方法	69
(一) 基本原理	69
(二) 基本方法	69
三、免疫荧光组织化学染色步骤	71
(一) 直接法	71
(二) 间接法	71
(三) SABC-Cy3法	72
(四) 双重染色法	72
(五) 膜抗原荧光抗体染色法	73
(六) 补体法	73
(七) 荧光抗体再染色法	74
四、非特异性荧光染色的消除	74
五、生物荧光显微镜	75
(一) 荧光显微镜的分类及主要组成	75
(二) 荧光显微镜的基本操作及注意事项	77
六、激光扫描共聚焦显微镜	78
(一) 激光扫描共聚焦显微镜基本原理	78

(二) 激光扫描共聚焦显微镜操作步骤及注意事项	79
(三) 组织芯片中免疫荧光染色的定量分析	81
应用举例	
——免疫荧光组织化学双重染色在神经元发生研究中的应用	82
第五章 原位杂交组织化学	84
第一节 原位杂交组织化学基本原理	84
一、核酸的化学组成与基本结构	84
二、DNA 变性与复性	85
(一) 变性	85
(二) 复性	86
第二节 核酸分子杂交	86
第三节 核酸分子探针	87
一、探针的种类	87
(一) 基因组 DNA 探针	88
(二) cDNA 探针	88
(三) cRNA 探针	88
(四) 寡核苷酸探针	88
二、探针的标记	90
(一) 探针标记物	90
(二) 探针标记方法	90
第四节 原位杂交组织化学基本程序	93
一、标本制备	94
(一) 取材	94
(二) 固定	94
(三) 切片	95
二、杂交前处理	96
(一) 增强组织通透性和核酸探针穿透性	96
(二) 减低背景染色	96
三、杂交反应	97
(一) 双链 DNA 探针和靶 DNA 变性	97
(二) 杂交液	97
(三) 探针长度	97
(四) 探针浓度	97
(五) 杂交温度和时间	98
(六) 杂交严格度	98
四、杂交后处理	98
五、杂交体检测	99

(一) 放射性核素标记探针的检测	99
(二) 非放射性标记探针的检测	99
六、对照实验	100
(一) 组织对照	100
(二) 探针对照	100
(三) 杂交反应对照	101
(四) 检测系统对照	101
第五节 原位杂交组织化学技术进展	101
一、原位 PCR 技术	101
二、荧光原位杂交技术	103
三、胚胎原位杂交技术	104
四、双重和多重原位杂交技术	104
(一) 放射性核素和非放射性标记探针的双重标记原位杂交	105
(二) 非放射性标记探针的双重标记原位杂交	105
(三) 两种放射性核素标记探针的双重标记原位杂交	106
五、原位杂交结合免疫组织化学技术	106
六、电镜原位杂交技术	107
(一) 电镜原位杂交的特点	108
(二) 常用电镜原位杂交技术的基本程序	109
七、肽核酸原位杂交	109
科学史话	
——割裂基因的发现	110
第六章 电镜组织化学与免疫电镜技术	113
第一节 电镜技术	113
一、透射电子显微镜基本原理	113
二、超薄切片技术	113
(一) 固定	113
(二) 脱水	116
(三) 浸透与包埋	116
(四) 超薄切片制作	118
三、观察与记录	120
第二节 电镜组织化学技术	122
一、基本原理	122
(一) 酶组织化学反应过程	122
(二) 酶反应底物的特异性	122
(三) 捕捉反应	122
二、样品制备	122

三、结果观察	123
第三节 免疫电镜技术	124
一、免疫电镜技术的特点	124
(一) 组织取材与固定	124
(二) 染色方法	124
(三) 包埋	126
(四) 对照实验	127
二、几种常用电镜免疫染色技术	127
(一) 免疫铁蛋白电镜技术	127
(二) 免疫酶电镜技术	128
(三) 免疫胶体金电镜技术	130
(四) 免疫纳米金电镜技术	132
第七章 组织化学与免疫组织化学定量分析技术	135
第一节 显微图像分析	135
一、显微图像分析系统组成	136
二、基本术语和常用测量参数	136
(一) 像素与灰度	136
(二) 色彩	136
(三) 光密度	137
(四) 长度	137
(五) 面积	137
三、吸光和发光组织样品的常用测量参数	137
(一) 吸光组织细胞样品的测量	137
(二) 发光组织细胞样品的测量	137
四、显微图像分析处理程序	138
(一) 制作切片样品	138
(二) 获取图像	138
(三) 图像分割	138
(四) 测量	139
(五) 统计分析	139
(六) 结果输出	139
五、显微图像分析应用中的注意事项	139
(一) 设计在先,测试在后	139
(二) 测试样本的代表性	139
(三) 实验操作过程的一致性	140
(四) 图像分析系统输入条件的一致性	140
(五) 图像分析系统现有参数的局限性	140

(六) 二维定量信息的局限性	140
第二节 流式细胞术	140
一、流式细胞仪的工作原理	140
二、流式细胞术在组织化学与免疫组织化学中的应用	141
(一) 流式细胞术的常用样品制备方法	142
(二) 免疫荧光标记样品	143
(三) 流式细胞术数据处理与分析	144
(四) 运用流式细胞仪计数细胞应注意的问题	145
第三节 激光扫描共聚焦显微镜技术	146
一、激光扫描共聚焦显微镜在组织化学和免疫组织化学中的应用	146
(一) 光学切片	147
(二) 三维图像重建	147
(三) 荧光标记物的定位和定量分析	148
二、激光扫描共聚焦显微镜定量分析的优势	150
三、注意事项	150
(一) 制备高特异性和高效价的荧光抗体	150
(二) 标本制作要求	151
(三) 定量研究的要求	151
第四节 体视学	151
一、体视学的基本概念及基本原则	152
(一) 二维图像与三维结构之间的关系	152
(二) 几何探针	152
(三) 卡瓦列里原理	154
(四) 随机抽样	157
二、常用体视学方法在免疫组织化学中的应用	161
(一) 特征物断面计数与轮廓密度	161
(二) 长度密度和总长度	163
(三) 面积分数、平均面积、体积分数和总体积	165
(四) 交叉点密度、边线密度、表面积密度和总表面积	167
(五) 数目测量	168
应用举例	
——体视学在雌激素替代治疗改善老年大脑功能研究的应用	176
第八章 显微摄影技术	178
第一节 摄影基础	178
一、照相机镜头	179
(一) 照相机镜头口径	179
(二) 照相机镜头种类与焦距	179

二、控制曝光	180
(一) 光圈	180
(二) 快门	181
(三) 胶片的感光度	182
三、景深	182
(一) 光圈口径对景深的影响	182
(二) 镜头焦距对景深的影响	182
(三) 物距对景深的影响	182
四、感光片	182
(一) 彩色负片	182
(二) 彩色反转片	182
(三) 感光度	183
(四) 反差	183
五、常用滤色镜的作用	183
(一) 原色光和补色光	183
(二) 滤色镜的特性	183
(三) 滤色镜在摄影中的应用	184
六、色温	184
第二节 显微摄影基础	185
一、显微镜的几何光学成像原理	185
二、分辨率与放大率	185
三、显微镜的主要部件	187
(一) 视场光阑和孔径光阑	187
(二) 聚光镜	188
(三) 物镜	188
(四) 目镜	189
四、柯勒照明	190
五、几种常用特殊显微镜的结构与原理	190
(一) 相差显微镜	190
(二) 微分干涉显微镜	193
第三节 显微摄影技术应用	195
一、普通显微摄影技术应用	195
(一) 显微镜的使用环境	195
(二) 摄影前准备	195
(三) 显微照相的操作步骤	196
(四) 胶卷的选用	197
(五) 显微照片放大倍数的标注方法	197
二、特殊显微摄影技术应用	197

三、数码显微摄影技术	198
(一) 数码摄影的基本原理	198
(二) 数码显微摄影技术应用	202
参考文献	204
第九章 组织化学与免疫组织化学实验指导	206
实验一 组织标本石蜡切片和冰冻切片的制备	206
(一) 石蜡切片和 HE 染色标本制备	206
(二) 冰冻切片标本制备	209
实验二 DNA 的 Hoechst 33258 和 DAPI 荧光组织化学染色	210
(一) DNA 的 Hoechst 33258 荧光组织化学染色	210
(二) DNA 的 DAPI 荧光组织化学染色	211
实验三 脂类的异丙醇油红 O 法染色	212
实验四 钙-钴法显示碱性磷酸酶	213
实验五 偶氮偶联法显示酸性磷酸酶	214
实验六 胆碱酯酶染色——Karnovsky-Roots 法	215
实验七 还原型辅酶 II-黄递酶(NADPH-d)染色	216
实验八 免疫组织化学实验——SABC 法	217
实验九 免疫荧光细胞化学染色(间接法)	219
实验十 半抗原标记 cRNA 探针原位杂交组织化学染色	220
附录一 免疫组织化学染色常用试剂配制	223
(一) 固定液	223
(二) 缓冲液	225
(三) 常用消化液	227
(四) 显色液	227
(五) 黏附剂	228
(六) 封固剂	229
(七) 其他	229
附录二 原位杂交试剂配制	231



第一章 绪 论

组织化学(histochemistry)也称细胞化学(cytochemistry),是运用物理学、化学、免疫学和分子生物学等原理与技术,对组织与细胞的化学成分或酶活性进行定性、定位和定量研究的科学。

传统的组织化学只是利用物理或化学反应显示组织或细胞内的化学成分或酶活性而对其进行定性、定位和定量研究。随着电镜技术、免疫学和分子生物学技术的发展,在传统组织化学的基础上逐渐形成免疫组织化学、免疫电镜组织化学和原位杂交等技术。因此,广义的组织化学则包括传统的组织化学、免疫组织化学、电镜组织化学、免疫电镜组织化学和原位杂交组织化学。

第一节 组织化学发展的基础

组织化学基于并源于组织学、细胞学和生物化学,又有别于这些学科。组织化学与组织学和细胞学的不同在于,前者的着眼点是研究组织细胞内的化学组成及其含量和酶的存在及其活性,而后者的着眼点是研究组织细胞的形态结构及其与功能的关系。组织化学与生物化学的不同在于,虽然两者均着眼于组织细胞内的化学组成及其含量和酶的存在及其活性,但是,生物化学技术中通常是将组织和细胞破坏,制成匀浆,然后进行化学测定,而不考虑定位;在组织化学技术中,是尽可能在组织或细胞内原位显示各种化学成分,故定位性能好。生物化学技术中的化学反应是在试管内进行,而组织化学技术中的化学反应通常是在组织切片或细胞涂片中进行。组织化学要求一定在显微镜下能观察到所检测的化学物质,但在大多数情况下,所见到的并不是某种化学物质本身,而是该物质在其存在部位经过化学反应的产物,这种产物在镜下可直接或间接被观察到,它所在的位置和数量能够代表该物质的位置和数量。组织化学自出现以来,已取得长足的发展,这些发展以细胞生物学、生物化学、免疫学和分子生物学的快速发展为基础。

一、细胞生物学发展与组织化学

细胞生物学是从细胞、亚细胞和分子三个水平研究生命活动规律的科学,组织化学以细胞生物学为基础发展而来。显微镜的发明与细胞的发现将人类对机体的认识从宏观世界引向微观世界的广阔领域,由此人们从肉眼所见的大体结构开始探索光学显微镜下组织细胞的微细结构,正因为有了对机体微细结构的充分认识,才有可能产生对组织细胞的化学成分进行定性、定位和定量研究的渴求。然而,光学显微镜的分辨率有限,仅能观察到细胞膜、细胞质和细胞核,对于亚细胞结构,即超微结构的观察无能为力。1932年,德国科学家 Knoll 和 Ruska 在西门子(Siemens)公司设计研制了世界上第一台透射电子显微镜,又

把人类对机体的认识带入了超微结构领域。人们只有对机体结构深入了解,才可能透彻阐明其功能。著名生物学家 Wilson 的名言“一切生物学关键问题必须在细胞中寻找”,至今还有着很深的内涵。细胞生物学的发展历程为组织化学的产生和发展奠定了形态学基础。

二、生物化学发展与组织化学

生物化学是一门运用化学原理及方法研究生命的科学,它一方面是进行细胞组成成分的化学分析,另一方面是对这些成分在生命过程中所发生的化学反应进行分析,而组织化学正是利用这些化学反应原理来实现对组织细胞化学成分的定性、定位和定量研究。20 世纪初,人类已经认识到组成蛋白质的 20 个标准氨基酸中的 19 种。E. Fischer 提出蛋白质是由相邻氨基酸之间的肽链连接而成,并推论这些肽链是由一个氨基酸的 α -氨基和相邻的羟基连接时脱去水而形成。到 19 世纪末,其他细胞成分,如脂肪、碳水化合物与核酸也被认知,甚至能被部分提纯。例如, Friedrich Miescher(1871 年)在其细胞成分研究中,从死的白细胞核中分离出脱氧核糖核酸(DNA)。但是,当时这一重要发现并没有与遗传联系起来,几乎过了 50 年之后,才开始认识到 DNA 在遗传中所起的重要作用。因此,在生物化学的发展中对生物体大分子物质结构和功能的认识为组织化学奠定了基础。例如,在组织化学中对组织细胞成分中酶的检测,是将组织切片置于含有特异性底物的溶液中,溶液中的底物经组织切片中酶水解、氧化等作用形成反应产物,即初级反应产物。初级反应产物再与某种捕捉剂结合,形成有色的终产物使组织切片中的酶变成在显微镜下可见物,从而在原位检测酶活性,了解它的存在、分布和功能。

三、免疫学发展与组织化学

18 世纪 70 年代英国医生 Edward Jenner 研究出用牛痘菌预防天花的方法,为免疫学对传染病的预防开辟了广阔前景。19 世纪末,法国化学家、微生物学家 Louis Pasteur 在研究人和动物传染病时,分析了免疫现象,并在琴纳的启发下发明用减毒炭疽杆菌菌株制成疫苗,预防动物炭疽病,用减毒狂犬病毒株制成疫苗,预防人类狂犬病。德国细菌学家、免疫学家 Emil Adolf von Behring 于 1890 年发现免疫血清中有抗白喉毒素的抗毒素存在,日本细菌学家北里柴三郎也发现抗破伤风毒素的抗毒素,两人共同研究血清疗法成功。从此,人们开始探讨免疫机制,把细胞的吞噬作用和抗毒素的中和作用看成是特异性免疫的根据,并逐步展开了细胞免疫和体液免疫两大学派的争鸣。体液免疫学派代表是德国细菌学家 Ehrlich Paul。他用生物化学方法研究免疫现象,特别是以蛋白质化学和糖化学作为基础,探讨抗原和抗体的本质及其相互作用,于 1896 年提出抗体形成的侧链学说。到 20 世纪 60 年代,对体液免疫研究已经达到分子水平,即揭示了抗体的分子结构和功能。同时,对细胞免疫研究也有明显进展,特别是在杂交瘤技术方面的突破性进展,这不仅丰富了细胞学内容,而且为获得单克隆抗体或介质物质开辟了一条新道路。将抗原、抗体的特异性与组织化学的可见性巧妙地结合起来,借助显微镜(包括荧光显微镜、电子显微镜)的放大作用,在细胞、亚细胞水平检测各种抗原物质(如蛋白质、多肽、酶、激素、病原体以及受体等),形成了一项新技术——免疫组织化学技术。因此,免疫组织化学技术比组织化学技术对细胞成分的检测范围更为广泛,特异性也更强。

四、分子生物学发展与组织化学

在 20 世纪前半叶,细胞生物学家和生物化学家在细胞破碎超速离心、蛋白质分离、提纯和生化分析、细胞内生化反应和能量转换以及对酶的功能和维生素方面均积累了大量资料,并在此基础上发展成为当今的分子生物学。1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 分子双股螺旋结构学说。根据碱基配对的原则,DNA 的信息精确地传递给蛋白质。这一划时代的发现带动了分子生物学的迅速发展。1961 年两名法国学者 Francois Jacob 和 Jacques Monod 发表了他们对基因调控方面的研究成果,获得了重大突破:一是证实了信使核糖核酸(mRNA)携带着 DNA 合成蛋白质所需要的信息;二是发现了遗传密码,证明了信息贮存于核酸之中;三是发现了蛋白质是靠传递 tRNA 和核糖体的帮助翻译合成。20 世纪 70 年代后,由于新兴生物技术的迅速发展,相继出现了蛋白质与核酸序列分析与人工合成、基因重组等。这些研究成果的不断涌现,无疑为组织化学的发展带来了生机。将碱基配对的分子杂交原理与组织化学相结合便产生了在核酸原有位置上进行细胞内核酸定性、定位的分子原位杂交组织化学技术。

第二节 组织化学发展简史

一、组织化学的兴起

19 世纪初期,法国植物学家 Raspail 在研究植物的受精作用时,首次发现了碘对淀粉的反应,此后还发现了蛋白质和糖的显色反应,利用指示剂显色测定细胞原生质的 pH 值等。1830 年 Raspail 发表了《在生理学中使用显微镜观察化学物质》的论著,从此标志着组织化学技术的开端,Raspail 也因此被认为是组织化学技术的创始者。此后,许多学者的大量研究陆续发现了许多其他组织化学反应,如 Vogel(1845 年)和 Perls(1867 年)分别用硫化物和普鲁士蓝法显示铁;Millon 的米伦法显示蛋白质(1849 年);Bencke(1862 年)将甲苯胺蓝等苯胺染料用于组织学研究;Heidenhain 发现细胞的嗜铬反应(1870 年);Miescher 用甲基绿显示细胞核的染色质(1873 年);Weigert(1884 年)和 Marchi(1892 年)提出髓鞘染色法;Daddi(1896 年)首次应用苏丹 III(sudan III)进行离体脂肪染色;Klebs(1868 年)和 Stuve(1872 年)的过氧化物酶显示法;Ehrlich(1885 年)发现细胞色素氧化酶。Mann 自 1902 年起,逐渐建立了完善的组织冷冻切片技术,弥补了一般化学固定及石蜡包埋的缺点,可防止酶活性丧失,脂类、多糖类和无机盐的丢失等,推动了脂类、黏多糖及酶组织化学研究的发展。在此阶段,积累了大量的组织化学染色方法。直到 20 世纪 30 年代组织化学才真正作为一门学科发展起来。该时期出版了多部组织化学代表性专著,其中有 Macallum 在 1908 年出版的《组织化学的方法和结果》,1929 年 Hertwig 的《组织化学方法》,1949 年 Glick 的《组织化学和细胞化学技术》,1954 年 Pearse 的《组织化学·理论与应用》等。

二、现代组织化学的发展

近半个世纪是现代组织化学蓬勃发展时期。组织(细胞)化学新方法的建立,使其技术手段更精细,内容更丰富,如 Mann 自 1902 年起及此后许多学者的研究,逐渐建立了完善的组织冷冻切片技术,弥补了一般化学固定及石蜡包埋的缺点,可防止脂类、多糖类和无机盐的丢失,防止酶活性丧失等,推动了脂类、黏多糖及酶的组织化学研究。

在蛋白质和氨基酸组织化学显色法的研究中, Danielli(1947 年)建立了显示蛋白质(酪氨酸、色氨酸和组氨酸)的四氮盐反应,还有坂口(1925 年)建立并经其他学者改进的精氨酸(组蛋白中富含)显色法, Danielli(1950 年)和 Pearse(1951 年)等建立的 SS 基和 SH 基反应(显示胱氨酸和半胱氨酸,与角蛋白检测相关), van Gieson 的胶原显示法, Foot(1925 年)显示网状纤维的银浸法, Weigert、Verhoeff(1908)和 Gomori(1950 年)等的弹性纤维染色法, Mallory(1938 年)的纤维蛋白染色法等。

在核酸组织化学显色法的研究中,最著名的是 Feulgen 和 Rossenbeck(1924 年)建立的 Feulgen-Schiff 反应,用以显示细胞核内的 DNA。另一个是 Brachet 于 1940~1944 年建立的甲基绿-焦宁(pyronine)染色法显示细胞内的 RNA,此法使胞质和核仁内的 RNA 显红色,核内的 DNA 显绿色,标本色彩鲜艳,为研究者所乐用。

碳水化合物组织化学显色法中,最著名的是 McManus(1946 年)和 Hotchkiss(1948 年)建立的过碘酸-Schiff 反应(PAS 反应),可使细胞和组织内的多糖、黏多糖、糖蛋白呈红色; Steedman(1950 年)建立了用 alcian 蓝显示酸性黏多糖和透明质酸的方法; Michaelis 等(1945 年)发现用甲苯胺蓝染色,可使组织中的肝素等酸性黏多糖呈异染性。

脂类的组织化学显色法中,除用苏丹Ⅲ外, Michaelis(1901 年)、Lison(1930 年)和 Lillie(1944 年)等还发现用苏丹Ⅳ、油红 O、苏丹黑等脂溶性染料的染色法。此外,还有用钼酸浸染显示脂类的方法。

有关酶组织化学的研究从 20 世纪 40 年代兴起,至 20 世纪 50 年代初已建立了 18 类酶的数十种显色方法。Takamatsu(高松英雄)和 Gomori 于 1939 年同时证明了碱性磷酸酶的组织化学方法,这一年标志着酶组织化学真正开始,以后相继出现了许多酶的显示方法。此时,随着电子显微镜的问世和超薄切片技术的发展, Scheldon 等(1955 年)首先将超薄切片技术应用到酶组织化学中,在电镜下观察酸性磷酸酶的分布, Brand 等(1956 年)又用此法观察到碱性磷酸酶存在于溶酶体内,他们的成就使组织化学技术与电镜技术结合起来,从而开创了电镜组织化学的新领域,使酶在细胞中的定位进入到亚细胞水平。

1941 年 Coons 和他的同事首次用荧光素标记抗体检测肺组织内肺炎双球菌而获得成功,开创了免疫细胞化学的新篇章。为在荧光显微镜下能够对酶进行观察, Coons 等人(1950 年)提出了荧光抗体法。但是,荧光标本不能长期保存以及需要价格昂贵的荧光显微镜才能观察。为此, Nakane 等人(1966 年)尝试用酶代替荧光素来标记抗体的方法,从而成功地开创了酶标记抗体的新技术(酶标抗体法)。Sternberger 等人(1970 年)又将非标记抗体过氧化物酶法成功地引入,建立了过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)法,使免疫酶法有了很大的进步。Geoghegan(1978 年)建立了胶体金标记术, Hsu 等于 20 世纪 80 年代发明了亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(ABC 法)。在此之后,免疫金-银染色法、半抗原标记法、

免疫电镜技术等相继问世。随着抗原的提纯和抗体标记技术的改进,特别是德国人 Kohler 和英国人 Milstein(1975 年)建立杂交瘤制备单克隆抗体技术以来,使免疫组织化学发展到一个新的水平,使免疫组织化学技术在生命科学研究中日益显示出巨大的实用价值。

近二十年来,相继发现了多种亲和物质,如植物凝集素(lectin)与糖结合物(glycol conjugate)、葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A)与 IgG、生物素(biotin)与卵白素(avidin)(亲和素)、激素、脂质与受体等。这些物质是一些有多价结合能力的物质,不但亲和物质之间有高度亲和力,而且可以与标记物如荧光素、酶、放射性核素、铁蛋白等相结合。Bayer(1976 年)将这种利用两种物质之间的高度亲和力而相互结合的反应进行细胞化学检测的技术称为亲和细胞化学(affinity cytochemistry)。亲和细胞化学技术的建立,提高和增加了免疫细胞化学的敏感性和检测范围,是免疫细胞化学的新发展。

分子杂交(in situ hybridization)技术引入免疫细胞化学,是现代免疫细胞化学向基因水平深入发展的重要标志。Hall(1961 年)首先建立了液相核酸杂交技术,开创了核酸杂交技术的研究和应用。Bolton(1962 年)设计了较简单的固相核酸杂交术。Gall 和 Pardue(1969 年)应用蟾蜍核糖体基因探针与卵母细胞杂交,确定该基因位于细胞核的核仁内,开创了原位杂交组织化学技术的应用。Bauman(1981 年)发明了用荧光素标记 cRNA 探针做原位杂交(FISH 术),Brigat(1983 年)建立了生物素标记探针术。Boeringer 等(1987 年)发明了地高辛标记探针,并将药盒投放市场,使原位杂交的应用更安全和简便。

1998 年,Kononen 等首次提出组织芯片(tissue chip)的概念,并很快证实了其应用价值。组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray, TMA),它是将数十个乃至数以千计不同来源的组织样品黏贴到同一张固相载体如玻璃片或硅片上,形成组织微阵列。在同一反应条件下对组织芯片进行免疫组织化学染色、原位杂交、FISH 或原位 PCR 等,以了解病变组织与相应正常组织内靶基因或蛋白质的细胞来源、分布特征和表达差异等。它的最大便利之处在于可以对大量组织标本同时进行检测,缩短了检测时间,减少了不同染色玻片间人为造成的差异,使得各组织或穿刺标本间对某一生物分子的测定更具有可比性。组织芯片虽说是一种快速、高通量获取生物信息的好方法,但是由于使用石蜡切片,对那些只能应用于冷冻组织切片的抗体或核酸分子杂交方法则不适合。为了弥补这一缺陷,最近美国又发展了冷冻细胞阵列(frozen cell array),其基本原理与组织芯片相似,但使用的材料是新鲜的细胞系而不是经固定剂固定、石蜡包埋的组织。

三、我国组织化学发展概况

我国的组织化学研究工作起步于 20 世纪 50 年代,组织化学家李肇特、张作干、汪堃仁教授等人作为我国组织化学发展的奠基者,积极从事组织化学方面的科研和教学工作,并培养出一大批组织化学的专门研究人才。他们在 20 世纪 50 年代末率先应用并在全国范围内推广“组织化学”技术,举办组织化学培训班,招收全国各医学院校青年教师和科研人员进修学习,自编组织化学教材,为研究生开办组织化学课程。随后,我国从事组织化学研究的专家还有张保真、王启民、马仲魁和艾民康等,他们为我国组织化学事业的发展作出了突出贡献。

中国解剖学会于 1988 年 3 月在广州成立了“组织化学与细胞化学学组”,并决定筹办

《中国组织化学与细胞化学杂志》，这标志着中国组织化学与细胞化学的研究进入了一个崭新阶段。国际组织化学与细胞化学学会联合会(International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, IFSHC)是全世界组织化学与细胞化学工作者的学术组织,于1960年9月成立于法国巴黎,每4年召开一次大会。我国组织细胞化学家艾民康教授代表中国组织细胞化学工作者于1980年首次参加了第6届IFSHC大会,并在第8届IFSHC大会上当选为联盟理事,中国被正式接纳为会员,从此我国成为IFSHC的成员和理事国。此后,苏慧慈、成令忠、蔡文琴教授先后当选为IFSHC的理事。中日组织化学与细胞化学研讨会由我国艾民康、朴英杰教授和日本组织细胞化学家小川和郎教授组织发起,继1989年第一届研讨会在广州召开以来,先后在我国西安、沈阳、重庆、上海、日本东京、中国武汉和日本甲府召开了第2~8届会议。这些会议展现了中日两国组织化学与细胞化学领域内的最新研究成果、新理论、新技术方法的进展,并加强和促进了我国组织细胞化学界的国际学术交流。

综上所述,现代组织化学是50年来迅速发展的一门边缘学科,它的发展与细胞生物学、生物化学、免疫学和分子生物学的发展密切相关,在生物医学和临床医学领域中发挥着巨大的作用。

第三节 组织化学技术基本要求

一、组织化学的分支和分类

近几十年来,组织化学的发展,突飞猛进,日新月异,产生了许多分支,如核酸与核蛋白、蛋白质与氨基酸、脂类与脂蛋白、碳水化合物与黏蛋白及黏多糖、无机物组织化学、酶组织化学、电镜细胞化学、荧光组织化学、免疫组织化学、同工酶组织化学、定量组织化学、原位杂交组织化学、放射自显影技术、流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术等。故现代组织化学的概念已远远超过了原有的范围,理论、内容、技术手段和研究范围都比过去更广泛、更深入。包括经典组织化学、免疫组织化学和原位杂交组织化学在内的广义组织化学是介于细胞学、组织学、生物化学以及分子生物学之间的新兴边缘学科,已成为医学生物学科研工作的重要手段。定量组织化学技术主要用于组织化学的原位定量研究,是组织化学从定性、定位研究进入定量研究的重要手段,流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术使组织化学的定性、定位和定量研究又有了新的突破,特别是激光扫描共聚焦显微术可在三维立体结构层面上对细胞内化学物质进行更深层次的研究,并在各种细胞的微型手术切割以及细胞膜流动性、膜电位、膜通透性、高分子物质扩散和受体移动等的检测方面有了越来越广泛的应用。然而各类组织化学虽有其特定的概念和范围,但都是源于组织化学,且其实验技术也有其共同点,或是在原组织化学基础上进一步发展而成型。

根据显示原理,组织化学技术大致可分为以下几种类型:①化学方法:根据化学反应原理,在组织切片上生成沉淀以表示其定性定位的存在,绝大部分的组织化学方法都属于此类,如检测磷酸酶的组织化学方法等;②类化学方法:如best 胭脂红显示糖原,Mayer 胭脂

红显示糖蛋白,虽然染色反应有特异性,但机制尚未完全阐明;③物理学方法:荧光分析法、组织吸收光谱法、X射线显微分析法、放射自显影技术、图像分析、电镜细胞化学、能谱分析等;④显微烧灰法:对组织中无机物质和微量元素的测定;⑤免疫学方法:利用免疫学原理与技术研究细胞的化学成分,如免疫组织化学、免疫电镜等;⑥分子生物学法:原位杂交组织化学技术等。

二、组织化学技术的基本要求

在应用组织化学技术显示组织和细胞内化学物质及其定位和定量以及代谢状态时,必须满足以下要求:

1. 保持良好的组织和细胞的形态结构,保持组织和细胞生前的化学成分和酶的活性,防止组织自溶,使反应的产物不易位、不弥散,保证反应产物定位精确。
2. 反应产物具有可视性,即反应产物必须呈现颜色,而且必须是颗粒微细的有色沉淀,不被溶解,定位于原位。反应产物具有定量的可能性,即反应物沉淀的颜色深度与相应物质含量或酶的活性具有一定的量效关系。
3. 所用组织化学方法必须具备一定的特异性,即仅与某种化学成分发生反应,以便获取正确的实验结果。倘若组织化学试剂同时能与两种以上物质反应,则必须有进一步的分析方法。此外还要具备一定的灵敏性,以便含量极微的物质也能被显示出来。
4. 所用方法稳定并能重复,以利于重复观察和验证。
5. 设置必要的对照实验,否则难以判断其结果的可靠性。

(刘慧雯 金连弘)



第二章 组织化学与免疫组织 化学染色样品制备

无论组织化学还是免疫组织化学技术在染色前均需进行样品制备,不同染色方法样品制备的过程基本相同。本章主要介绍其样品制备的基本过程,有关其特殊性将在各章节中加以介绍。

组织和细胞中的待检物质是否能客观地在显微镜下显示和准确定位,与组织和细胞标本制备质量的好坏密切相关,因此,掌握标本制备技术是各种染色之前的关键。

第一节 取材

一、组织标本取材

在组织细胞材料准备过程中,要求尽可能保持生活状态下组织细胞形态结构的完整性,尽量保持其化学成分和酶的活性,更要保持组织细胞的抗原性不受损。如果抗原性被破坏或组织坏死自溶,被检物质已经丢失,即使用高超的技术也很难检出,而且往往由于组织的坏死或制片时的刀痕挤压,出现假阳性结果。取材应尽可能迅速,所用的刀应锐利,不可反复切拉组织,以免造成组织的挤压。标本离体后应立即用固定剂进行固定,或立即速冻进行冷冻切片,或保存于 -80°C 冰箱备用。组织块大小要适中,一般为 $2.5\text{cm}\times 2.5\text{cm}\times 0.2\text{cm}$,切记取材时组织块宁可面积大,不能厚的原则,保证固定液快速渗透到组织内部,使组织蛋白迅速凝固,从而完好地保存被检物质和组织细胞形态。对于病理标本,取材部位应包括主要病变区和病灶与正常组织交界区,必要时取远离病灶区的正常组织作对照。

动物取材时应先将动物麻醉再处死,其方法如下:

1. 乙醚吸入麻醉法 将动物放入有浸透乙醚棉花的玻璃缸内,盖上盖子,待动物麻醉后再取材。该法常用于大白鼠和豚鼠的取材,但易引起内脏淤血。

2. 戊巴比妥钠和乌拉坦麻醉法 对较大的动物如兔、猫、狗和猴,乙醚吸入麻醉效果不好,一般用3%戊巴比妥钠水溶液或用20%乌拉坦,腹腔或静脉注射进行麻醉,注射剂量约为 $1\sim 2\text{ml/kg}$ 。麻醉后再放血,以免内脏淤血。

3. 空气栓塞法 用注射器回抽空气于管内,将空气注入动物静脉内,可立即使动物死亡,但因此法使血液内产生空气栓塞,致使血管和内脏易产生淤血,故应尽快切断主动脉放血,再行取材。

二、细胞标本取材

(一) 培养细胞

1. 贴壁生长的细胞 在细胞培养接种前,把涂有黏附剂的小盖片放入培养板中,接种后的细胞自然爬在小盖片上生长。取材时,把小盖片用预热的磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗、沥干后即可加入固定液。

2. 悬浮生长的细胞 制备细胞浓度为 $2 \times 10^5 \sim 6$ 细胞/ml 悬液,取 $50 \sim 100 \mu\text{l}$,加入离心涂片机内,1000r/min 离心 2 分钟,细胞即可均匀分布于已涂黏附剂的载玻片上。

3. 印片法 主要应用于活组织标本检查和剖检标本取材。新鲜标本做一剖面,充分暴露病变区,将载玻片轻轻压于病变区,脱落的细胞便黏附在玻片上。随后立即将载玻片浸入细胞固定液内 $5 \sim 10$ 分钟,取出后自然干燥,低温保存备用。其优点是简便省时,细胞抗原保存较好;缺点是细胞分布不均匀,玻片上细胞有重叠,影响观察效果。

(二) 涂片法

临床穿刺获取含有细胞的液体(腹水,胸水和心包液)或气管、宫颈等分泌物可直接涂片,如果液体太多,可加入 $1 \sim 2\text{ml}$ Hanks 液(或细胞培养液)轻轻混匀,500r/min 离心 $5 \sim 10$ 分钟,弃上清液,制成细胞悬液(2×10^6 细胞/ml),使用细胞离心涂片机或吸一滴于载玻片上,轻涂,干燥后固定。

第二节 固 定

固定(fixation)的目的是用人为的方法尽可能使组织细胞的形态结构和化学成分保持生活状态,防止组织细胞死后发生自溶和组织腐败。固定还能增加组织块硬度,使其更容易切片,使不同的结构更容易染色。

一、组织和细胞的固定方法

固定方法有物理固定和化学固定两类,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)和灌注法(perfusion method)。灌注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。容器内放入记录组织类型的纸条,以便包埋时辨认。固定液的用量应是样品的 40 倍,以保证组织充分固定。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,应在 4°C 短时间固定,固定时间长会导致酶活性减弱,甚至消失。

(二) 灌注固定法

此法是经血管途径,将固定液灌注到欲固定的器官内,使生活的细胞在原位及时迅速固

定,取下组织之后再浸入相同的固定液内继续固定。灌注固定时大动物多采用输液方式,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,即 500~2000ml 不等。小动物多采用心脏主动脉灌注,如大鼠和小鼠,在吸入乙醚深度麻醉情况下,打开胸腔,纵向切开心包膜,并用纱线在动脉弓下打一松结,然后用静脉输液针从左心室向主动脉方向刺入,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℃ 生理盐水灌注,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 40mg/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 5~10ml/min,应在 30 分钟内结束灌注并取材,而后将组织浸入相同的固定液中 1~3 小时。灌注固定对组织结构和酶活性保存较好。

二、常用固定剂和固定方法

(一) 组织常用固定剂和固定方法

1. 甲醛 是常用的醛类固定剂,甲醛(formaldehyde)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($-\text{CH}_2-$),蛋白质不再发生改变,保存原位。其特点是组织形态结构保存好,穿透性强,组织收缩少。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和完全遮盖抗原决定簇,使之不能完全暴露,因此,在免疫组织化学染色时产生假阴性结果。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℃)。由于上述缺点可以通过一定处理加以纠正,因此甲醛是首选固定剂。

(1) 10% 中性缓冲福尔马林:商品试剂常为 37%~40% 甲醛水溶液,常按 1:9 比例使用,但甲醛的实际浓度为 4% [配方:甲醛原液 10ml, 0.1mol/L 磷酸缓冲液(PB, pH7.4)90ml 混匀]。

(2) 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(多聚甲醛 40g, 0.1mol/L PBS 500ml, 两者混合加热至 60℃, 搅拌并滴加 1N NaOH 至清澈为止,冷却后加 PB 至总量 1000ml)。

2. 丙酮 为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. 醇类 性能与丙酮基本相同,有固定和脱水的双重作用,穿透力快,组织块收缩明显,硬化力强。用冷液能较好地保存酶和抗原的免疫活性,但醇类对低分子蛋白质、多肽及细胞质内蛋白质保存效果较差,解决的办法是与其他试剂混合使用。

4. 混合固定剂

(1) Bouin 液:先将饱和苦味酸 750ml 过滤,加入 40% 甲醛 250ml,混合后存于 4℃ 冰箱备用,临用前加入冰醋酸 50ml。组织通常在 4℃ 下固定 6~8 小时。此固定剂对肾脏结构保存不利。

(2) Zamboni 液:称取多聚甲醛 20g,加入饱和苦味酸 150ml,加热至 60℃左右,持续搅拌,使之完全溶解,过滤、冷却后加 Karasson-Schwlt 磷酸缓冲液($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.31g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33.77g,加双蒸水至 1000ml)。该固定液可用于光镜、电镜免疫细胞化学观察。固定时间以 6~18 小时为宜。

(3) AAF 液:为较常用的固定液(95%~100%乙醇 85ml,冰醋酸 5ml,浓甲醛 10ml)。

(4) Clarke 改良固定剂(100%乙醇 75ml,冰醋酸 25ml),常用于冰冻切片的后固定。

(二) 培养细胞常用固定剂和固定方法

培养细胞常用固定剂有 4%多聚甲醛磷酸缓冲液、丙酮、甲醇和 95%乙醇。在固定之前需用 37℃预热的 PBS 轻洗细胞。

1. 4%多聚甲醛磷酸缓冲液 固定 10~20 分钟,干燥。

2. 甲醇 -10℃甲醇固定 5~20 分钟,自然干燥。

3. 丙酮 4℃冷丙酮固定组织穿透性和脱水性强,抗原保存好,很少用于组织切片,常用于培养细胞和细胞涂片的固定,平时丙酮 4℃低温保存备用,临用时,将载玻片插入冷丙酮内 5~10 分钟,取出后自然干燥。

4. 乙醇 95%乙醇脱水性强,易引起组织收缩、变硬,影响切片质量,因而固定时间不宜过长(2 小时内)。乙醇使蛋白变性程度轻,固定后蛋白可再溶解,在染色中孵育时间长的情况下,抗原可流失,并减弱反应强度。

5. 乙醚(或三氯甲烷) 与乙醇等量混合对组织穿透性极强,即使涂片上含较多的黏液,固定效果仍较好,是理想的细胞固定液。

培养细胞固定之后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。

用于免疫组织化学的固定剂种类很多,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:一是能最好地保持组织细胞的形态结构;二是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。

第三节 包埋和切片

组织化学与免疫组织化学染色标本常用石蜡切片和冰冻切片,对于柔软的胚胎组织或脑也可用琼脂包埋后振动切片机制片。下面着重介绍前两种切片方法。

一、石蜡包埋

用于免疫组织化学染色的石蜡切片(paraffin section)与常规 HE 染色的石蜡切片基本制片过程相同。石蜡切片的优点是组织结构保存良好,结构清晰,能连续切片,抗原定位准确,更适合回顾性研究。固定好的组织在切片前要先经石蜡包埋封存,而石蜡与水不相溶,故需用乙醇脱去组织内多余水分。脱去水分后组织中的乙醇仍与石蜡不相溶,故还需用二甲苯替换乙醇,并使组织透明,然后经透明的组织入熔化的石蜡中浸透,最终包埋和切片。其

基本步骤如下：

(一) 包埋前脱水

常用梯度乙醇溶液作为脱水剂,脱水的时间长短与组织块的大小和结构有关。用于 HE 染色的组织标本脱水时,可以在 70% 或 80% 乙醇中长期保存,90% 乙醇 4 小时→95% 乙醇 4 小时→100% 乙醇 I 2 小时→100% 乙醇 II 2 小时。用于免疫组织化学染色的组织块脱水和透明均应在 4℃ 下进行,以减少组织抗原的损失,此外不能在 70% 乙醇中长时间浸泡。脱水过程是:70% 乙醇 3~4 小时→80% 乙醇 3~4 小时→90% 乙醇 2~3 小时→95% 乙醇 2~3 小时→100% 乙醇 I 1.5~2 小时→100% 乙醇 II 1.5~2 小时。对于组织块小而柔软的组织还可适当缩短每一步脱水时间,如胚胎组织应从 30% 乙醇开始脱水,以防止组织变脆。

(二) 透明

常用的透明剂是二甲苯,透明的时间长短与组织的大小和结构有关。一般过程是:二甲苯 I 0.5~1 小时,二甲苯 II 0.5~1 小时。应注意脱水和透明的时间一定要充分,否则不利于浸蜡,易使石蜡与组织之间形成夹层而使切片困难。但时间也不能过长,否则组织变得过硬,不便于浸蜡,且易引起切片时脆裂。

(三) 浸蜡

经透明的组织入熔化的石蜡中浸透,一般需经 3 次,每次 0.5~1 小时,其时间的长短与组织大小和结构有关,可以灵活掌握。浸蜡时间不能过长或不足,其结果与脱水、透明不充分或过长结果相似。用于 HE 染色的标本浸蜡和包埋的温度可限于 65℃,而用于免疫组织化学的标本浸蜡和包埋温度不能高于 60℃,否则高温在非缓冲体系下会破坏组织中抗原。因此最好选择低熔点软蜡(56~58℃)。

(四) 包埋

浸透石蜡的组织块要入新的石蜡中冷却凝固,即包埋(embedding)。包埋时,包埋器中倒入熔化的新蜡,在其凝固之前迅速放入组织块,放入前要分清组织的各个面,将所需断面朝下。包埋有腔组织时,需平放或立放,以获得所需断面。

(五) 修块

石蜡凝固后,组织便包封在石蜡内。切片前需把包有组织的蜡块修成一定形状,并且把各个面修平,注意不能把蜡边与组织边靠得太近,也不能太远,近则不易连片,远则废刀。在修块时选适当的地方做标记,便于日后辨认。

二、切片

(一) 石蜡切片

把修好的蜡块装在旋转切片机上,即可进行切片(section)(图 2-1)。切片必须保持切片刀锐利,切片厚度通常为 5~7 μm ,也可根据染色需要切成不同厚度,一般不

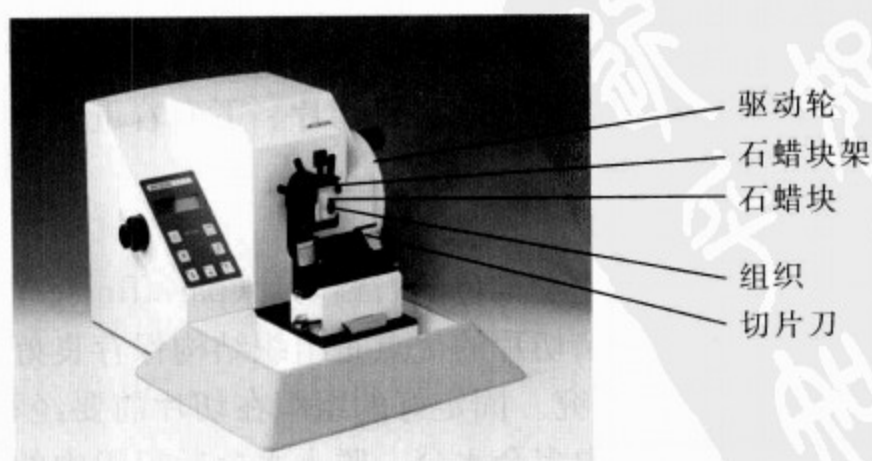


图 2-1 旋转式切片机

超过 $10\mu\text{m}$ 。切好的蜡带,放入 40°C 左右的温水中将蜡片展平。良好的切片应无刀痕、裂痕,切片厚度均一平整。切片如有上述问题,在进行免疫组织化学染色时会出现假阳性现象。为能得到平整无皱褶的组织切片,可采用两次展片,即先将组织切片漂浮在 30% 的乙醇溶液中进行第一次展片,然后将切片捞起,再次放入 $45\sim 50^\circ\text{C}$ 的水浴中进行第二次展片,乙醇的浓度和水温可视组织不同和石蜡熔点的高低自行调整。此过程是利用乙醇溶液与水之间的张力差展开切片的皱褶。为防止脱片,载玻片要涂黏片剂。对 HE 染色的切片,可在载玻片上涂抹薄层蛋白甘油,但蛋白甘油因含蛋白易导致非特异性免疫反应,故用于免疫组织化学染色的切片常用多聚赖氨酸、3-氨基丙基-乙氧基甲硅烷等处理。

(二) 冰冻切片

冰冻切片 (frozen section) 是酶组织化学和免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法,其最突出的优点是能够较完好地保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性以及抗原的免疫活性,尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜组织和已固定的组织均可作冰冻切片。为了得到高质量的冰冻切片,选择好的冰冻切片机是保证切片质量的关键。恒冷箱切片机 (cryostat) 是目前最常用的冰冻切片机,可得到 $3\sim 5\mu\text{m}$ 的连续薄片。组织在切片前需要冰冻,而冰冻过程容易使组织中的水分形成冰晶,从而影响抗原定位。一般认为,冰晶体积大而量少时,影响较小;冰晶体积小而量多时,对组织结构损害较大。含水量较多的组织中较易出现冰晶。

1. 防止组织中冰晶形成的方法

(1) 速冻:使组织温度骤降,减少冰晶的形成。方法包括:

1) 干冰-丙酮(乙醇)法:将 $150\sim 200\text{ml}$ 丙酮(无水乙醇)装入小保温杯内,逐渐加入干冰,直至饱和呈黏稠状,再加干冰不再冒泡时,温度可达 -70°C ,用一小烧杯内装异戊烷约 50ml ,将此烧杯缓慢置入干冰-丙酮(或无水乙醇)饱和液内,至异戊烷温度 -70°C 时即可使用。将组织(大小为 $1\text{cm}\times 0.8\text{cm}\times 0.5\text{cm}$)投入异戊烷内速冻 $30\sim 60$ 秒后取出,置恒冷箱内以备切片,或置 -80°C 低温冰箱内贮存。

2) 液氮法:将组织块平放于软塑瓶盖或特制锡纸小盒(直径约 2cm),可适量加 OCT 包埋剂浸没组织,然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内,当盒底部接触液氮时即开始汽化沸腾,此时小盒保持原位,切勿浸入液氮中,大约 $10\sim 20$ 秒后组织即迅速冰结成块。取出冷冻的组织块立即置入恒冷箱切片机冷冻切片或置入 -80°C 冰箱贮存备用。

(2) 应用蔗糖溶液:将组织置于 20%~30% 蔗糖溶液 1~3 天,利用高渗吸收组织中水分,减少组织含水量,可防止或减少冰晶的形成。

2. 恒冷箱切片法

冷冻后的组织块即可用于恒冷箱切片,其过程包括以下步骤:

(1) 组织包埋根据研究目的取所需组织(如切取小鼠肝脏 $1.0\text{cm}\times 1.0\text{cm}\times 0.5\text{cm}$ 大小的组织块),用滤纸吸去多余水分,将组织块平放于用特制锡纸小盒(直径约 2cm)或软塑瓶盖内。加适量 OCT 包埋剂浸没组织, 4°C 浸透 $20\sim 30$ 分钟。为防止冰晶形成,包埋前可进行蔗糖处理。

(2) 组织冷冻:按上述干冰-丙酮(乙醇)法或液氮法冷冻组织。

(3) 切片:切片前 1 小时将恒冷箱切片机的温度设定为 -18°C 左右,以备切片。切片时

温度以 $-15\sim-18^{\circ}\text{C}$ 为宜,温度过低组织易破碎。刀的角度要适当,否则不易连片。用载玻片贴附组织切片时,勿上下移动。未经固定的新鲜组织在冰冻切片后应使用相应的固定剂固定 10 分钟。冰冻切片后如不立即染色,必须用电风扇吹干,贮存于 -70°C 低温冰箱内或进行短暂预固定后低温冰箱保存。染色前从冰箱内取出切片,置室温干燥 10 分钟,再经冷丙酮固定 5~10 分钟(未固定者),PBS 漂洗 3 次后即可进入染色程序(HE 染色可用甲醛、冰醋酸和 95%乙醇快速固定 1~2 分钟)。

(4) 冰冻切片的保存:冰冻切片后如不能及时染色,可在干燥后装入密封的标本盒内,外包塑料袋,贮存于低温冰箱,或进行短暂预固定后于低温冰箱保存。

(三) 振动切片

用振动切片机(vibratome)可以把新鲜组织(不固定、不冷冻)切成 $20\sim 400\mu\text{m}$ 的厚片,以漂浮法在反应板内进行组织化学或免疫组织化学染色。因组织不冷冻,无冰晶形成也无组织抗原破坏,染色前又避免了组织脱水、透明、包埋等步骤对抗原的损害,故能较好地保留组织内脂溶性物质和细胞膜抗原。振动切片主要用于显示神经系统抗原分布的研究。对于柔软的胚胎脑组织,可用低熔点($45\sim 55^{\circ}\text{C}$)10%琼脂糖包埋,振动切片机切成厚片($40\sim 100\mu\text{m}$),采用漂浮法在反应板内进行免疫荧光组织化学染色,激光扫描共聚焦显微镜观察。

三、防脱片处理步骤

(一) 载玻片和盖玻片的处理

将载玻片或培养用的小盖片浸泡在重铬酸钾浓硫酸清洁液中 24 小时,然后流水充分冲洗,再用蒸馏水冲洗 3 遍以上,而后置 95%乙醇中 12 小时。取出擦干或烤干,贮放于玻片盒内备用。盖玻片很薄,以上处理程序必须缩短时间,清洁液浸泡只需 2 小时,流水冲洗注意勿损伤玻片。

(二) 黏附剂的使用

1. 多聚左旋赖氨酸(poly-l-lysine) 首先配制 0.1%(w/v)多聚左旋赖氨酸浓缩液(配方见附录一),室温下($18\sim 26^{\circ}\text{C}$)可保存 1 年。使用时,将试剂 10 倍稀释成工作液,浓度为 0.01%(w/v), $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,有效期 3 个月。使用方法是将充分洗净和预先干燥的玻片浸泡于稀释后的多聚左旋赖氨酸溶液数十秒或提拉十次,沥干,于室温下晾干 12~24 小时或在 45°C 以下烤箱内烘干。处理后的玻片避光干燥可长期保存。

2. 3-氨基丙基-乙氧基甲硅烷(3-amino propyltriethoxy silane, APES) APES 必须现用现配。用此方法黏合的玻片应垂直烤片而不能水平烤片,否则,组织片中易出现气泡。APES 的使用方法:用丙酮 50 倍稀释(APES 1 份、丙酮 49 份混合),将洗净的玻片放入稀释好的 APES 中,停留 20~30 秒,取出稍停,再入纯丙酮或蒸馏水中涮去未结合的 APES,置通风橱中晾干即可。注意用 APES 防脱片处理的载玻片捞片时组织应一步到位,并尽量减少气泡存在,以免影响染色结果。注意不要将 APES 与其他防脱片剂混合使用。

多聚左旋赖氨酸为目前免疫组织化学染色中最常用的防脱片剂,适合于需要酶消化、微波、高温高压的防脱片处理。如效果不佳,可用双重处理(APES 和 poly-l-lysine)的切片。在以上两种方法均无效的情况下,可用如下方法:切片在脱蜡前放在 APES 1:50 丙酮溶液

中浸泡 3 分钟,晾干后即可进行下一步骤。

(三) 免疫组织化学染色中常见脱片原因

1. 组织固定、脱水、透明不充分。
2. 组织切片过厚。
3. 组织切片有折叠。
4. 过度的热抗原修复(高压、微波、水煮)处理或抗原修复液的 pH 偏高。
5. 操作过程中,冲洗方法不正确等。

(周莉 苏红星)



科学史话

——幽门螺杆菌与胃溃疡

胃溃疡是一种常见病。几年前美国的一个统计结果显示,每年约有 400 万人患胃溃疡(包括新发和复发),美国每年有 1.5 万人左右死于溃疡病的并发症。对于这样一个常见病,一百多年来,生物医学科学家们进行了大量研究。早在 1910 年,德国医生 Schwarz 经大量胃液分析研究之后,提出一个著名观点:“无胃酸则无溃疡病”,这是溃疡病研究中的第一个病因。1915 年, Sippy 医生在《美国医学杂志》发表了中和胃酸治疗溃疡病方案。直到 1970 年,溃疡病治疗的基本药物是抗酸剂,病人控制胃痛最简单有效的办法则是吃几片苏打饼干。20 世纪 70 年代以后,基于这个观点,通过对胃酸分泌调控机制的大量研究,发现组胺(histamine)在胃酸分泌调节中起重要作用。1972 年,英国学者 James Black 证实组胺的调节作用是通过刺激胃底腺壁细胞分泌盐酸而实现的。这一划时代的进步促使产生了一代新药,即 H_2 受体阻断剂,如 Cimetidine。80 年代这类药物很快成为溃疡病的基本治疗药物。1979 年,氢离子泵抑制剂 Prilosec 在瑞典 Hassle 研究所诞生。这类药物阻断了盐酸分泌的最后环节,成为 20 世纪 90 年代治疗溃疡病的中流砥柱。然而,很早就有人怀疑胃炎和溃疡病可能与细菌感染有关。早在 1875 年,一位波兰医生报道,他曾在胃里检测到螺旋状细菌。但是,胃中盐酸浓度如此之高,有谁会相信还有细菌能生活在这种环境中呢?

20 世纪 80 年代初,澳大利亚皇家佩思医院(Royal Perth Hospital)的病理医生 J. R. Warren 在电子显微镜下观察到人胃中有螺旋状细菌,这些细菌位于胃炎性部位或溃疡所在之处,对此发现他兴奋不已,于是,在医院中宣传自己所见,并且在医院内部刊物发表文章,认为胃炎和溃疡病与螺旋杆菌感染有关。据说,当时他被许多同事甚至实习学生嘲笑。1982 年,消化内科来了位 30 岁的年轻医生 Barry J. Marshall 研修临床胃肠病,当时他还不是主治医师。一个偶然的的机会,他的一位溃疡病患者因为其他原因服用四环素一段时间后,居然发现溃疡病痊愈了,这使他颇为震惊,他相信了 Warren 医生的观点。于是,Marshall 医生找到医院微生物部的 Goodwin 教授,提出准备在微生物实验室做溃疡病细菌培养研究,Goodwin 教授毫不在意地说:“准备 100 个病人吧”,也没有安排

技术员帮忙。Marshall 医生在临床看病之余,收集 34 例病人胃黏膜标本到微生物实验室做细菌培养,结果均未见任何细菌生长。接着,1982 年复活节长周末来临,Marshall 医生已培养 48 小时的样品仍然没有结果,无奈之下,只好回家过节。6 天之后的一个早晨,他回到医院不自觉地取出细菌培养板,见到的情景使他激动得差点把培养板掉在地上,“My God!”长出一个菌斑!那是 1982 年 4 月 14 日,历史性的突破如此产生了。人类第一次成功地从胃中培养出幽门螺杆菌。奥秘何在呢?菌斑在标准培养时间 48 小时内未能出现,因为复活节长周末,多培养了几天,菌斑奇迹般地出现了。Marshall 医生机警地收集这些细菌,并且用最可靠的方法作长期保存,菌株编号为 NCTC11637。此后,Marshall 医生很顺利地继续培养细菌,并兴致勃勃地把他们的研究结果和观点送到 1982 年澳大利亚消化学会年会,不幸的是论文摘要直接被退回,Marshall 医生只好把文章转投肠弯曲菌(campylobacter)感染国际学会,文章虽然被勉强接收,但他们的观点却被很多微生物学家嘲笑,不过,有几位专家半信半疑,他们回去后很快重复了 Marshall 医生的实验。第二年,Marshall 和 Warren 医生颇为谨慎地各自撰写一篇文稿,投给英国医学杂志 Lancet(《柳叶刀》),编辑把他们的文稿作为 Letter 发表。不管别人怎么看,Marshall 医生深信自己研究结果的可靠性。为进一步证明他和 Warren 医生关于溃疡病感染病因的观点,还需符合“Koch 法则”的所有条件,“Koch 法则”其中有一条,即“纯化以后的细菌必须能够使健康、易感动物罹患同样疾病”。Marshall 医生首先设计了动物实验,试图用该菌使猪胃产生溃疡病,但是实验没有成功。1984 年 7 月,Marshall 医生决定用他自己的胃来试验。他先做胃镜,以证明自己是正常状态的胃,然后培养了一瓶来自 66 岁溃疡病人胃中分离的螺旋杆菌,当饮料喝了下去。14 天后,Marshall 医生出现严重恶心、呕吐症状,又过 10 天,再次做胃镜检查,发现确实出现了胃炎,随之取一小块胃组织检验,结果证实有螺旋杆菌感染。此后,跟他一起做临床研修的 Morris 医生也自告奋勇地参与他的临床实验,喝了另外一个菌株,出现了同样症状,也确认存在胃内螺旋杆菌感染。Marshall 医生的胃病十多天后自然痊愈,而 Morris 医生却花了整整五年的时间才把溃疡病彻底治愈。至此,Marshall 医生终于完成了“Koch 法则”的全部要求,证明了他发现的螺旋杆菌是引起胃内炎症、溃疡的病因。1984 年,Marshall 和 Warren 医生合著的正式论文在 Lancet 杂志发表,标志着这一研究成果终于得到主流医学界的认可。此后,Marshall 获得了许多国际大奖。幽门螺杆菌及其作用的发现,打破了当时已经流行多年的人们对胃炎和消化性溃疡发病机制的认识,被誉为消化病学研究领域的里程碑。由于他们的发现,溃疡病从原先难以治愈和反复发作的慢性病,变成了一种采用短疗程的抗生素和抑酸剂则能治愈的疾病,大幅度提高了胃溃疡等患者获得彻底治愈的机会,为改善人类生活质量作出了贡献。2005 年皇家科学院诺贝尔奖委员会在瑞典宣布,将该年度诺贝尔生理学 and 医学奖授予 Marshall 和 Warren 医生,以表彰“他们发现了幽门螺杆菌以及该细菌对消化溃疡病的致病机制”。诺贝尔生理学 and 医学奖评审委员会主席在发布会现场向新华社记者介绍该发现的经过时说,“为证实幽门螺杆菌是导致胃炎和胃溃疡的罪魁祸首,Marshall 医生自己吞下了含有螺旋杆菌的溶液,今天的诺贝尔奖可以说是他们冒着生命危险换来的”。

(周 莉)

参考文献

1. Marshall BJ. The Lasker Awards, celebrating scientific discovery. *JAMA*, 2005, 294(11):1420-1421.
2. Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, et al. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, 1988, 2(8626-8627):1437-1442.

数字图书馆
PDG

第三章 组织化学

组织化学(histochemistry)是应用化学、物理学、生物化学、免疫学和分子生物学原理研究组织和细胞内某种物质的存在,并且对这种物质进行定性、定位和定量研究的一门技术。但是,由于这种广义的组织化学又可分为若干门类如免疫组织化学和分子原位杂交等,因此,一般所谓组织化学仅指应用化学和物理学原理在组织切片上加入某种试剂使其与组织切片中欲检测的物质发生反应,最终形成有色沉淀,在光镜和电镜下进行观察,以研究组织细胞结构与功能之间的关系。这种技术可用于检测细胞内核酸、脂类、糖类和酶类等,应用颇为广泛。

第一节 核酸组织化学

核酸(nucleic acid)是生物遗传的物质基础,是生命重要的生物大分子。包括两类,即核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)。RNA 分布于核仁和胞质的核糖体内, DNA 主要分布于核内的染色质或染色体。显示核酸的方法有许多种,本节介绍较常用的几种方法。

一、Feulgen 反应

Feulgen 反应是显示 DNA 的经典而特异的染色方法,由 Feulgen(孚尔根)在 1924 年提出,因而得名。

(一) 原理

DNA 可在酸性条件下水解,嘌呤-脱氧核糖之间的糖苷键断开,形成醛基($-CHO$),再用显示醛基的特异性试剂 Schiff 试剂处理,形成光镜下所见的细胞核内紫红色反应产物。DNA 经稀盐酸处理而水解,除可破坏脱氧核糖与嘌呤碱外,还可水解嘧啶碱。酸水解核酸的程度与水解时间长短有关,随着水解时间的延长,嘌呤碱基增多,形成的醛基也随之增多,Feulgen 反应加强。如果水解时间过长, DNA 将完全水解,反而使 Feulgen 反应减弱。DNA 水解时间因组织种类和固定液不同而异,需通过预实验找到合适的水解温度和时间。由于 Schiff 试剂能与醛基结合,故不能用含醛的固定液固定组织,常用 Carnoy 固定液。Bouin 液不适用于 Feulgen 反应,因为固定液中含较多的酸,可将 DNA 水解,影响染色反应。

Schiff 试剂是显示醛基的特异试剂,其反应原理是碱性品红(为红紫色)经亚硫酸处理后变为无色 Schiff 液, Schiff 液遇到醛基时,则被还原形成原有的颜色,即红紫色。碱性品红结构中的醌基是碱性品红中具有紫红色的核心结构,经亚硫酸处理后,则醌基两端的双键打开,形成无色品红-硫酸复合物为 Schiff 试剂(图 3-1)。如果加热使 SO_2 逸出,则恢复品红原来的颜色而失去对 DNA 的染色效果,故配好的 Schiff 试剂应避免 SO_2 逸出。

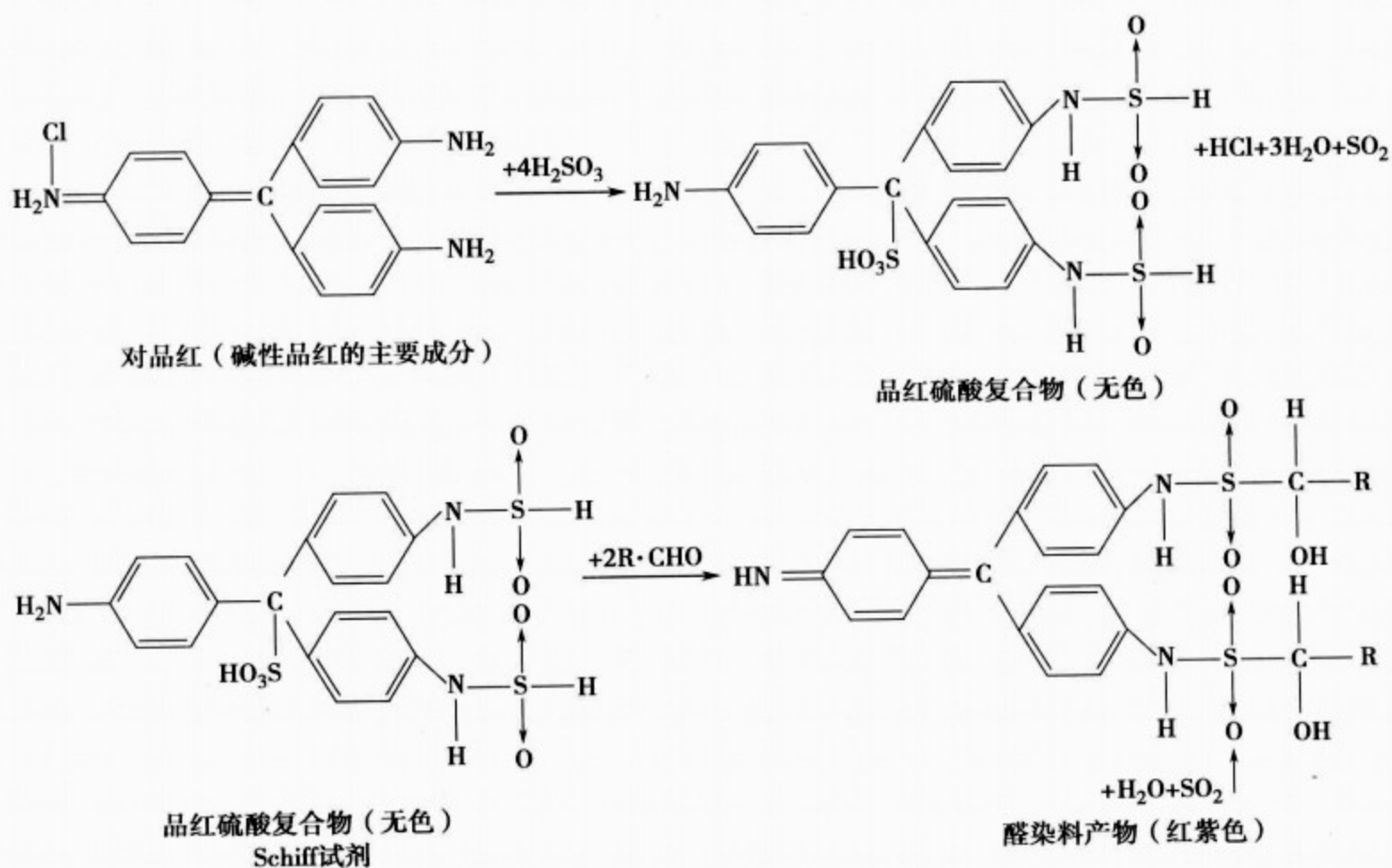


图 3-1 Feulgen 反应原理

(二) Schiff 液的配制

将 1g 碱性品红溶于 200ml 煮沸的蒸馏水中,使其完全溶解,然后冷却到 60℃ 过滤,加入 30ml 1N HCl 和 3g 焦亚硫酸钾($K_2S_2O_5$)或亚硫酸钠,塞紧瓶塞,置于暗处或外包黑纸 24 小时。1N HCl 与焦亚硫酸盐生成的 SO_2 将溶液中碱性品红脱色成为无色碱性品红(即白亚磺酸)。如溶液尚有浅黄色,可用 0.5g 活性炭脱色,摇动几分钟后迅速用粗滤纸过滤,滤液应为清亮无色。制成的 Schiff 试剂应置于棕色瓶中,瓶塞需拧紧并用黑纸包裹,避光保存于 4℃,保质期可达半年。若暴露于空气,或加热则使 Schiff 试剂中的 SO_2 逸出,变性的 Schiff 试剂则不能使用。除碱性品红外,其他碱性染料也可制成能与醛基反应的类似 Schiff 反应液,但是,不能达到无色。在染色时可用 1% 盐酸乙醇洗去不起反应的余色。Schiff 试剂在不同的 pH 条件下可显示不同的物质,如 Schiff 试剂在 pH 3.0~4.3 时,对 Feulgen 反应效果好,而 pH 2.4 时,对 PAS(糖原)反应效果好。

注意:Schiff 试剂虽无色,但氧化后为紫红色。同时要防止污染环境,用后要回收。

(三) Feulgen 反应步骤

标本需经固定后方可染色,Carnoy 固定液可按无水乙醇:三氯甲烷:冰醋酸为 6:3:1 比例配制。固定后石蜡切片即可。尽量不用新鲜组织恒冷箱切片,因胞质中存在的缩醛磷脂会出现非特异染色。若必须使用恒冷箱切片,需做切片后固定。用已固定的组织石蜡切片可消除缩醛磷脂,减少非特异染色,具体操作如下:

1. 切片脱蜡入水;
2. 用 1mol/L HCl 浸洗;
3. 切片放入预热到 60℃ 1mol/L HCl 内 6 分钟,(固定的标本为 10~15 分钟,Susa 固

定的标本为 18 分钟,水解时间因固定液不同而有差异);

4. 入室温 1mol/L HCl 洗;
5. 蒸馏水洗;
6. 入 Schiff 液,于室温暗处(或外包黑纸)30~60 分钟;
7. 入亚硫酸钠水溶液漂洗 3 次,每次 1~2 分钟;

亚硫酸钠水溶液配法:

10% NaHSO ₃	5ml
1mol/L HCl	5ml
加蒸馏水至	100ml

8. 蒸馏水洗;
9. 脱水、透明、封固。

结果:细胞核内 DNA 染成紫红色(图 3-2)。

对照实验:虽然 Feulgen 法是 DNA 的特异染色方法,但如果延长水解时间并在室温下进行反应, Schiff 试剂也与醛、酮、醇和缩醛磷脂起反应,因此用 Feulgen 法检测 DNA 时必须严格控制盐酸水解的时间和温度。为减少假阳性和非特异性染色必须做对照实验。可按上述步骤做平行对照实验,仅将第 3 步,即 60℃ 1mol/L HCl 水解改为室温 15 分钟,其余与上述步骤相同,结果 DNA 应为 Feulgen 阴性反应。

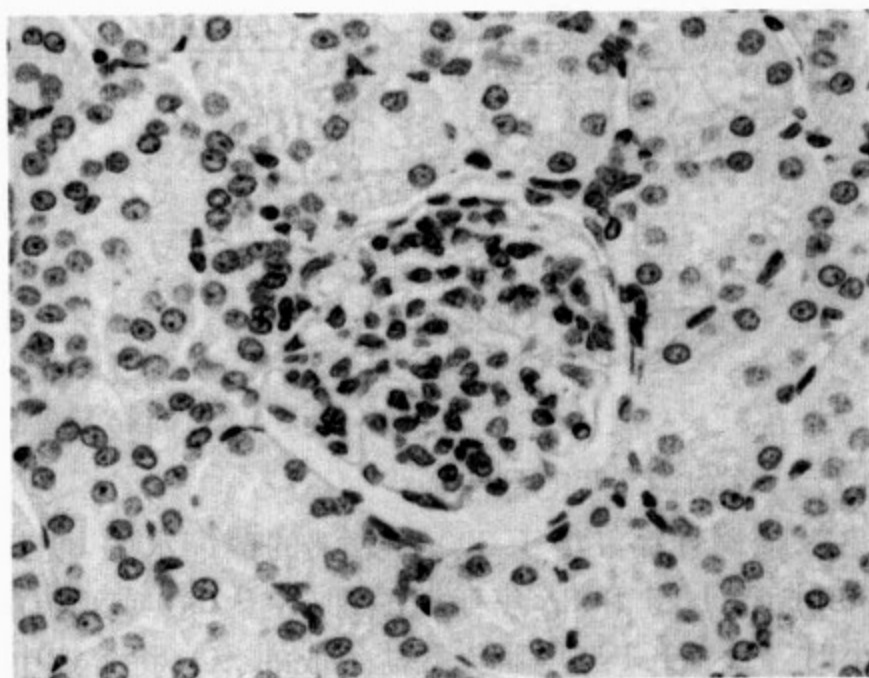


图 3-2 Feulgen 反应图

大鼠肾小体和肾小管细胞核呈 Feulgen 阳性反应,含紫红色反应产物(苏红星供图)

二、吖啶橙染色

吖啶橙(acridine orange, AO)属于三环杂芳香类异嗜性阳离子荧光染料,主要以两种方式与核酸结合,一是嵌入核酸双链的碱基对之间;二是与单链核酸的磷酸发生静电相互作用。当吖啶橙与 DNA 或 RNA 结合时,最大发射波长分别为 525nm 或 650nm,产生绿色荧光或橙红色荧光,因此,吖啶橙是研究核酸的一种常用荧光组织化学染料。下面介绍应用吖啶橙区分活细胞和原位组织细胞 DNA 和 RNA 荧光组织化学染色法。

(一) 吖啶橙区分活细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法

1. 溶液配制

(1) 吖啶橙浓缩液(4℃、避光,可保存数月)

双蒸水	50ml
吖啶橙	50mg

- (2) 甲液
- | | |
|--------------|-------|
| 双蒸水 | 200ml |
| HCl | 16ml |
| NaCl | 1.74g |
| Triton X-100 | 0.2ml |
- (3) 乙液
- 0.2mol/L Na_2HPO_4 /0.1mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)
- | | |
|--|-------|
| 双蒸水 | 100ml |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 4.51g |
| 枸橼酸(无水柠檬酸) | 0.71g |
- 溶解后,依次加入以下试剂和吖啶橙浓缩液
- | | |
|------------------|--------|
| NaCl (0.15mol/L) | 0.87g |
| EDTA-Na(1mmol/L) | 0.037g |
| 吖啶橙浓缩液 | 0.6ml |

注意:加入吖啶橙浓缩液后,应尽早使用。

2. 操作程序

- (1) 取 0.2ml 含 10% 小牛血清的细胞悬液,再与 0.4ml 冷“甲液”混合,振荡 15 秒;
- (2) 加入 1.2ml “乙液”,充分混匀;
- (3) 于 10 分钟内,荧光显微镜观察,激发波长为 488nm。

结果:DNA 为黄绿色荧光,而 RNA 为橘红色荧光。如果同时进行 DNA 和 RNA 染色时,需用螯合剂处理,使双链 RNA 变性,确保所有的 RNA 均为单链,而双链 DNA 不受影响,增加结果的可信性。螯合剂以乙二胺四乙酸(EDTA)为佳。

(二) 吖啶橙原位区分组织细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法

1. 溶液制备

- (1) 0.1% 吖啶橙浓缩液(避光,4℃保存)

吖啶橙	0.1g
双蒸水	100ml

- (2) 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)

双蒸水	90ml
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.34g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.78g
NaCl	0.89g

完全溶解后加双蒸水至 100ml;

- (3) 固定液:选用 Carnoy 或乙醇固定液;
- (4) 吖啶橙工作液:用前配制,吖啶橙浓缩液与 PBS 比为 1:9;
- (5) 0.1mol/L 氯化钙;
- (6) 1% 醋酸。

2. 操作程序



- (1) 石蜡切片按常规脱蜡处理,冰冻切片直接进行步骤(2);
- (2) 1%醋酸液中轻轻洗 6~30 秒;
- (3) 蒸馏水洗 2 次,每次 2~3 分钟;
- (4) PBS 漂洗 2 分钟;
- (5) 吖啶橙工作液染色 3~15 分钟;
- (6) PBS 漂洗 2 次,每次 3~5 分钟;
- (7) 0.1mol/L 氯化钙液中分化 30 秒,若切片厚,分化时间可延长至核界限清晰为止;
- (8) 用 PBS 彻底漂洗,除去氯化钙;
- (9) 水溶性封片剂封片,荧光

显微镜观察分析。

结果:细胞核或 DNA 病毒包涵体呈绿色荧光,而核仁和细胞质内 RNA 或 RNA 病毒包涵体呈橘红色荧光。另外,可见组织中肥大细胞的颗粒和软骨基质中的酸性粘多糖以及嗜碱性和嗜酸性颗粒等发红色荧光,中性颗粒呈橘红色荧光,血管弹性纤维发黄色荧光,角蛋白呈绿色荧光,观察时应注意区别(图 3-3)。

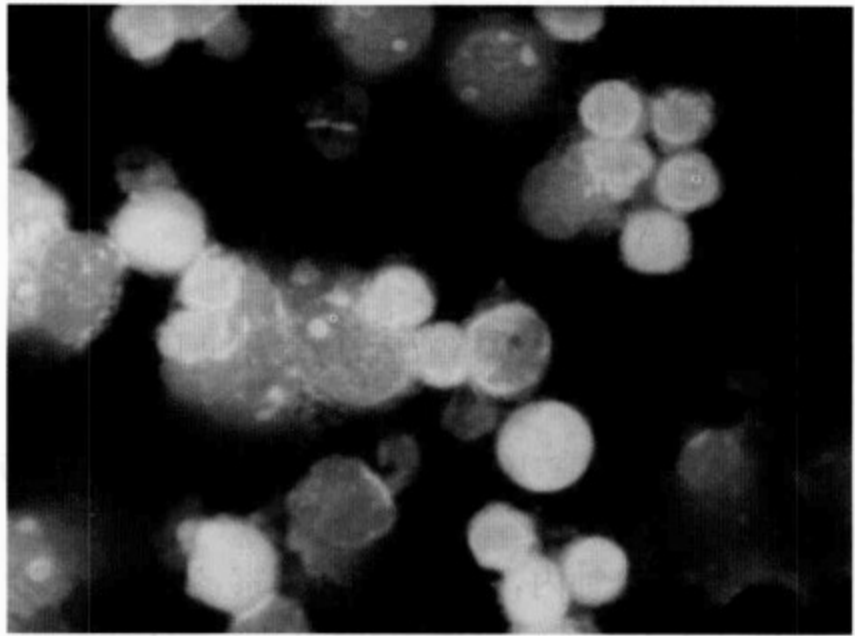


图 3-3 吖啶橙染色法

胚胎小鼠肝脏血涂片吖啶橙染色,示幼红细胞核呈橙黄色荧光,胞质呈绿色荧光,其中 RNA 和多糖呈红色荧光(周莉供图)

3. 注意事项

(1) 通过改变吖啶橙工作液的 pH 可以区分 DNA 和 RNA 两种核酸产生的荧光,pH 6.0 时,DNA 结合染料的聚合加速,而 pH 低于 3.8 时,染料聚合将受到抑制,RNA 则在两种 pH 下均能聚合。

(2) 该方法可用于恶性肿瘤如宫颈癌脱落细胞普查等,非典型增生细胞呈现荧光增强,增生的细胞胞质呈强荧光,恶性肿瘤细胞呈火焰或橘红色荧光。

(3) 在荧光显微镜下区分活细胞和死细胞时,可直接将少量细胞悬液与 0.01% 吖啶橙工作液混合,镜下观察,活细胞的核呈黄绿色荧光,而死细胞呈红色荧光,后者系溶酶体酶释放所致。吖啶橙浓度过高如 1:500,或过低如 1:100 000 时,均影响结果的准确性和可信性。

(4) 上述染色条件对甲醛固定的组织石蜡切片染色效果不理想,据报道用 pH 4.2 醋酸盐缓冲液代替 pH 6.0 的 PBS,可较好地地区分两种核酸的颜色。

三、Hoechst 33258 染色

1. 原理 Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 均为非嵌入性荧光染料,它们在活细胞中 DNA 聚 AT 序列富集区域的小沟处与 DNA 结合,活细胞或固定细胞均可从低浓度溶液中摄取该染料,从而使细胞核着色,故又把此类染料称为 DNA 探针。Hoechst 33342 和 Ho-

echst 33258 均可溶于水并在水溶液中保持稳定。Hoechst-DNA 的激发和发射波长分别为 350nm 和 460nm。在荧光显微镜紫外光激发时, Hoechst-DNA 发出亮蓝色荧光。

2. 溶液的配制

(1) Hoechst 33258 储存液

Hoechst 33258	1mg
0.01mol/L PBS(pH 7.4)	5ml

(2) Hoechst 33258 工作液(终浓度为 0.5 μ g/ml)

Hoechst 33258 浓缩液	125 μ l
0.01mol/L PBS(pH 7.4)	50ml

3. 操作程序

(1) 细胞悬液或培养单层细胞等标本,用醋酸-乙醇或 Carnoy 固定液固定;

(2) 0.01mol/L PBS 漂洗 5 分钟;

(3) Hoechst 33258 工作液染色,室温 15 分钟;

(4) 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;

(5) 用甘油与 PBS 比例为 1:

9 的混合液或水溶性封片剂封片,荧光显微镜观察。

结果:该染料为 DNA 的特异性荧光探针,细胞核呈亮蓝色荧光(图 3-4)。

四、DAPI 染色

1. 原理 DAPI 为 4',6 二脒基-2-苯吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole)能与双链 DNA 小槽,特别是 AT 碱基结合,也可插入少于 3 个连续 AT 碱基对的 DNA 序列中。当它与双链 DNA 结合时,荧光强度增强 20 倍,而与单链 DNA

结合则无荧光增强现象,因此是一种简易、快速和敏感地检测 DNA 的方法。DAPI 的荧光强度虽较 Hoechst 低,但荧光稳定性优于 Hoechst;其特异性较溴化乙啶(ethidium bromide, EB)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)高。

2. 溶液配制

(1) 0.01mol/L PBS (pH7.0): 取 0.1mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 34ml、0.1mol/L Na_2HPO_4 66ml、NaCl 0.9g,溶于 900ml 双蒸水;

(2) DAPI 储存液:将 0.5mg DAPI 溶于 5.0ml PBS 中,分装,低温长期保存;

(3) DAPI 工作液:用 PBS 稀释 DAPI 储存液,终浓度为 0.1 μ g/ml。

3. 染色程序

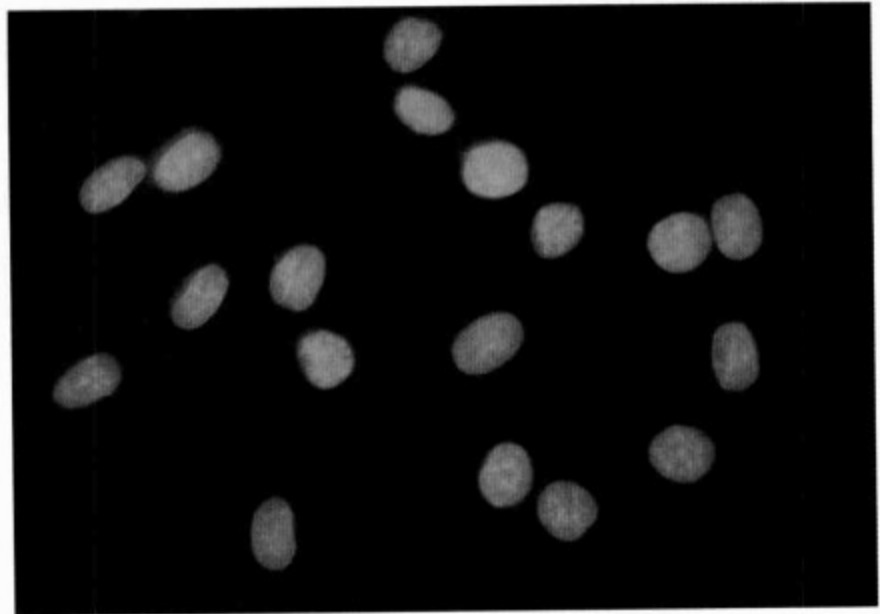


图 3-4 Hoechst 33258 染色法

Hoechst 33258 染色示胶质瘤细胞(C6 细胞株)
核呈亮蓝色荧光(周莉供图)

- (1) 培养的单层细胞(未固定)或新鲜组织的冰冻切片等, PBS 漂洗 5 分钟;
- (2) DAPI 工作液室温染色 5~20 分钟(可根据实验材料的染色结果而定);
- (3) PBS 漂洗;
- (4) 水溶性封片剂封片, 游离细胞也可直接用含 DAPI 的 PBS 封片;
- (5) 荧光显微镜观察。

结果: 正常的细胞核呈强荧光, 细胞质无荧光; 固定的组织细胞同样处理, 亦可得到相似的染色结果。在有支原体污染的细胞质和细胞表面可见孤立的点状荧光, 在感染痘苗病毒的细胞质中存在独特的“星状”荧光簇(star-like fluorescent clusters), 腺病毒感染早期胞质中也可出现荧光。

五、溴化乙啶和碘化丙啶染色法

(一) 溴化乙啶染色

1. 原理 溴化乙啶(ethidium bromide, EB)是最常用的嵌入性荧光染料, 活细胞或固定细胞均能从极稀溶液中摄取 EB 染料, DNA 螺旋暂时弯曲允许 EB 荧光染料嵌入大分子疏水中心的碱基对之间。标本经强酸(0.25mol/L HCl, pH 0.6)水解破坏 RNA 后, 可特异地显示 DNA, 而标本经 0.1mol/L 盐酸的无水甲醇处理(55℃, 3 小时), 使 DNA 甲基化, 则可阻止 DNA 染色, 此时 EB 仅与 RNA 结合, 可特异地显示 RNA。

2. 溶液配制

(1) EB 储存液

EB	2.0mg
0.01mol/L PBS(pH 7.2)	5.0ml

(2) EB 工作液(终浓度为 1 μ g/ml)

EB 储存液	125 μ l
0.01mol/L PBS (pH 7.2)	50ml

3. 操作程序

(1) DNA 染色操作程序

- 1) 单层细胞培养标本, 用醋酸-乙醇或 Carnoy 固定液固定;
- 2) 0.25mol/L HCl 处理;
- 3) 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 3~5 分钟;
- 4) 将标本置 EB 工作液中, 室温染色 15 分钟;
- 5) 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 3~5 分钟;
- 6) 用甘油与 PBS(1:9)混合液或水溶性封片剂封片, 荧光显微镜观察分析。

结果: 最大激发波长和最大发射波长分别为 520nm 和 610nm, DNA 呈橘红色荧光。

(2) RNA 染色操作程序

- 1) 组织细胞固定同上;
- 2) 甲基化处理, 阻止 DNA 染色: 0.1mol/L HCl 纯甲醇中, 55℃, 3 小时;
- 3) 漂洗同上;
- 4) 标本置 EB 工作液中室温染色 15 分钟;

5) 漂洗同前;

6) 封片、荧光显微镜观察条件同前。

结果:使 DNA 甲基化后染色被阻止,此时 RNA 呈现橘红色荧光。

(二) 碘化丙啶染色

1. 原理 碘化丙啶(propidium iodide, PI)不能穿入完整的活细胞膜中,即正常细胞和凋亡细胞在不固定的情况下对 PI 拒染,而坏死细胞由于失去膜的完整性,PI 可进入细胞内与 DNA 结合,根据此特点,使用 PI 染色可鉴别死细胞。如果对活细胞染色必须在染色前进行固定,以增加细胞膜对染料的通透性。

2. 溶液配制 使用 0.01mol/L PBS(pH 7.4)配制终浓度为 0.5mg/ml 的 PI 工作液。

3. 染色程序

(1) 单层细胞培养标本经预冷 70%乙醇固定 1 小时,4℃;

(2) 0.01mol/L PBS(pH 7.4)冲洗;

(3) 沥干后加入 PI 工作液,室温孵育 15 分钟;

(4) 冲洗后封片。

结果:PI 最大激发波长和最大发射波长分别为 488nm 和 630nm,荧光显微镜观察, DNA 呈红色荧光。

第二节 脂类组织化学

脂类(lipid)是构成细胞结构的成分之一,可分为脂肪(fat)和类脂(lipoid)两大类。脂肪系指甘油三酯,以脂滴形式存在于细胞质内。类脂是一些与脂肪酸结合可形成酯的物质,包括胆固醇、固醇酯、磷脂和糖脂等。在组织化学上,根据染色性质不同可把脂类分为酸性脂类和中性脂类。酸性脂类包括脂肪酸和磷脂等,中性脂类包括甘油三酯、胆固醇、固醇酯、类固醇及某些糖脂等。

显示脂类时常用甲醛作为固定剂。甲醛虽不能直接固定脂类,但能凝固脂类周边的蛋白质,使脂类保持在原位。钙离子有利于保存磷脂,故常用甲醛钙固定组织。但固定时间不宜太长,一般切片在染色前固定 10 分钟。组织块在室温下固定 4 小时或 4℃ 24 小时即可。如果固定时间过长,可使脂类水解,脂肪酸增加,甲醛也将被氧化而产生甲酸,固定液因此变酸而使脂类溶解。另外,含重铬酸钾和升汞等氧化剂均不宜作为脂类的固定液,以免脂类变性。

显示脂类需采用冰冻切片,但是,已固定组织在冰冻切片时,其脂滴可被切片刀带离原位,移位到其他细胞的表面或者组织间隙内,观察时需要调节显微镜的焦距识别原位或移位脂滴。显示脂类不用石蜡切片的原因是因为制片过程中的有机溶剂可将脂类溶解。

显示脂类最常用染料为脂溶性,可以溶于细胞脂滴内而显色。由于大部分为偶氮染料,具有 β -羟基,能重排形成醌型结构使脂类呈现相应颜色。这类染料有苏丹黑 B、苏丹 III 和油红 O 等。如果标本在染色前用丙酮、苯或三氯甲烷等溶剂提取脂类,此类染料则失去染色特性,由此可以证实这些染料显示脂类的特异性。

一、乙醇苏丹黑 B 染色法

苏丹染色法常用染料有苏丹黑 B(Sudan black-B)、苏丹Ⅲ和苏丹Ⅳ。这类染料均可使中性脂肪着色。苏丹黑 B 为重氮染料,能使中性脂肪呈蓝黑色,显示磷脂效果最好;苏丹Ⅲ、苏丹Ⅳ为红色染料,后者比前者显色更强。

当组织切片置于染料时,苏丹黑 B 离开染液而溶于组织内的脂滴中,使组织内的脂类着色。由于苏丹黑 B 可与大多数脂类高度结合,故在组织化学上常用此法作为脂类存在的依据。此法常用 70%乙醇配制苏丹黑 B 的饱和液作为染剂,也可用 70%乙醇与丙酮各半的混合液作为溶剂。

(一) 染色程序

1. 冰冻切片,厚 8~15 μm ;
2. 蒸馏水洗后,入 70%的乙醇浸洗;
3. 置入苏丹黑 B 染液(70%乙醇配制苏丹黑 B 的饱和液)中染色 10~35 分钟;
4. 入 50%乙醇分色;
5. 蒸馏水洗;
6. 苏木精复染,1% HCl 分色;
7. 自来水冲洗;
8. 甘油明胶封片。

结果:组织细胞中脂类呈蓝黑色,核呈蓝色(图 3-5)。

(二) 注意事项

当苏丹黑 B 溶于丙酮、壬烷和癸烷中会发生颜色变化,即由黑色变为紫红色,此现象称异染性,表明脂类染料需选择合适的溶剂。原则是染料在脂肪中的溶解度必须大于它在溶剂中的溶解度。在染色过程中不能使用溶解被检组织脂类的试剂,染料应容易配制,并能长期保存。配制染料的常用溶剂是 70%乙醇,有轻微溶解脂类的作用。为避免脂滴被溶解。可将乙醇浓度降低,用低浓度乙醇溶液作长时间染色。用饱和异丙醇或丙二醇配制成不溶解脂类的染料溶液,能保留极小的脂滴,显色效果较好。

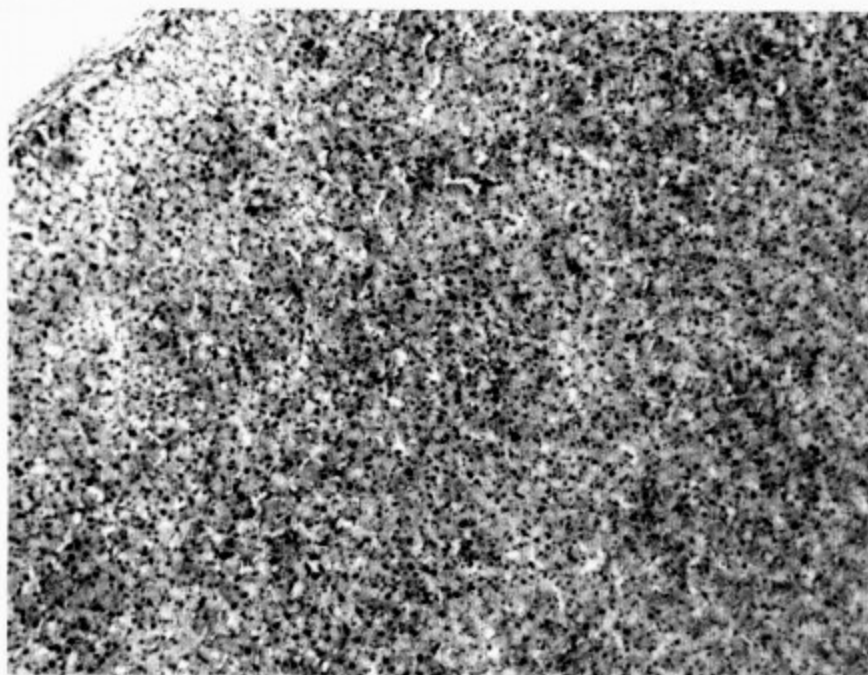


图 3-5 苏丹黑 B 脂类染色法

示肾上腺皮质细胞内呈蓝黑色的细小脂滴(苏红星供图)

二、油红 O 染色法

油红 O 属于偶氮染料,是很强的脂溶剂和染脂剂,与甘油三酯结合呈小脂滴状。脂溶性染料能溶于组织和细胞中的脂类,它在脂类中的溶解度比在溶剂中大。当组织切片置入染液时,染料则离开染液而溶于组织内的脂质(如脂滴)中,使组织内的脂滴呈橘红色。

(一) 油红 O 染液的配制

- | | |
|---------|-------|
| 1. 油红 O | 1g |
| 异丙醇 | 100ml |
| 2. 油红 O | 足量 |
| 异丙醇 | 100ml |

配成油红 O 饱和溶液,使用时以油红 O 饱和液一份加蒸馏水两份,过滤后使用。

(二) 染色程序

1. 切片用甲醛-钙固定 10 分钟;
2. 蒸馏水洗;
3. 60%异丙醇浸洗;
4. 油红 O 染液 10 分钟(染液可回收再利用);
5. 60%异丙醇分色至背景无色;
6. 蒸馏水洗;
7. Mayer 苏木精复染;
8. 自来水洗(蓝化)1~3 分钟;
9. 蒸馏水洗;
10. 甘油明胶封片。

结果:组织细胞中脂滴呈橘红色,核呈蓝色(图 3-6)。

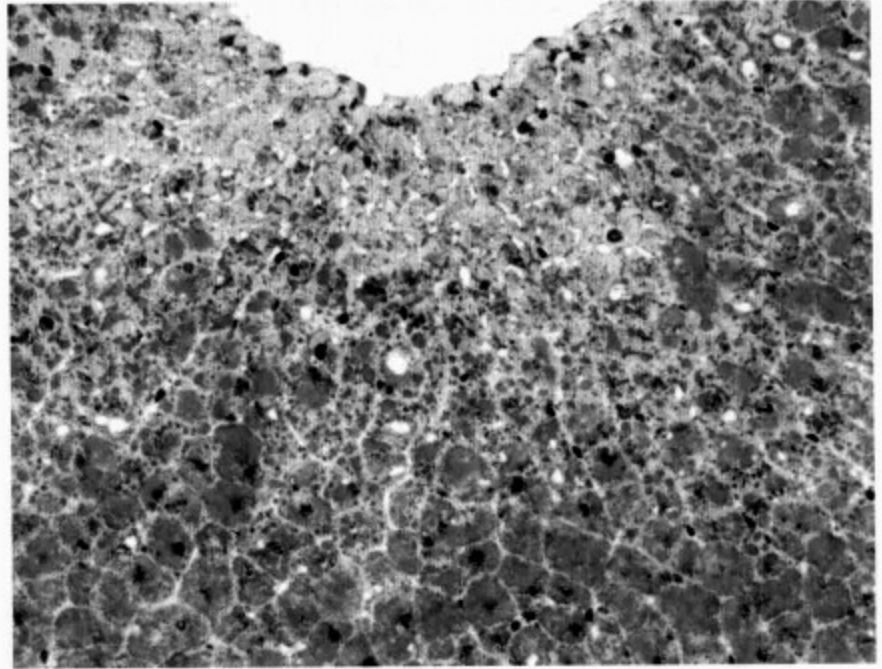


图 3-6 油红 O 脂类染色法

示大鼠脂肪肝中肝细胞内染为红色大脂滴(苏红星供图)

第三节 酶组织化学

酶是生物体内具有催化作用的特殊蛋白质,存在于机体组织细胞的各个部位。人和动物体内的各种化学反应均由酶来催化。组织细胞中含有多种多样的酶类,但是所有这些酶类均不具有使其本身直接可见的特性,需要用某些组织化学方法在一定条件下将酶作用于底物,以底物分解产物作为反应物质,在原作用部位进行进一步反应,从而形成可见反应产物。这种通过显示酶催化活性,以验证酶的存在,同时进行定性、定位和定量研究的组织化学方法称酶组织化学(enzyme histochemistry)。酶的种类繁多,目前组织化学所能显示的酶有 200 多种。本节仅介绍几种常用酶的检测方法。

一、酶组织化学的基本原理及一般原则

(一) 酶组织化学的基本原理

酶组织化学是显示酶的活性,即显示酶的催化作用,而不是酶本身,酶本身并不发生反应。在一定 pH 和适宜温度条件下,组织或细胞中的酶与孵育液中的特异性酶作用底物反应,催化底物形成无色初级反应产物,后者再与某种捕捉剂结合,形成有色的终产物沉淀于酶所在部位,使组织切片中的酶变成显微镜下的可见物。倘若此反应产物仍然无色,则需再

经置换剂处理,使无色的反应产物沉淀被置换为有色的最终反应产物。组织细胞内的各种酶仅有少数酶能用于组织化学染色,大部分要通过上述基本原理间接证明酶的存在。

1. 初级反应产物(initial reaction product, IRP) 是指底物被酶直接分解产生的物质。理想的初级反应产物应是既不溶于水,也不溶于脂类的,以免发生扩散。

2. 最终反应产物(final reaction product, FRP) 是指不溶性初级反应产物可经偶联和捕捉反应而呈色。

3. 偶联和捕捉(coupling and capture) 是指生物合成中,在同一时间内进行两种在性质上完全相反的化学反应,如一个放能反应和一个吸能反应同时进行,即为偶联。放出的能量,常不是直接被利用,而是先被某些化合物捕获(吸能)。机体内最为重要的偶联反应和捕捉活动是氧化磷酸化。

酶具有只作用于该酶底物的性质,称为底物特异性(substrate specificity)。但是,偶尔也有一种底物可以被两种或两种以上酶分解的情况,这样,在底物混合液中孵育组织切片时,一个底物可能同时发生几种酶反应,为获得特异酶反应,必须使用酶抑制剂或酶激活剂进行鉴别。

(二) 酶显示方法

1. 偶联偶氮色素法 此法又称偶氮色素法(coupling azo dye method),是指用某种人工合成底物在酶作用下产生分解产物,分解产物与重氮盐结合,引起偶联偶氮反应,形成不溶性偶氮色素,以此对酶定位。常用的底物是萘酚系列化合物,如1-萘酚、2-萘酚、6-溴-2-萘酚、萘酚 AS、萘酚 AS 衍生物等。由于重氮盐的种类不同,偶氮色素的颜色也不同,可显示出紫色、蓝色、红色、褐色、棕色和黑色等各种颜色。

重氮盐有不同程度的抑制酶活性作用,因此必须选择抑制作用最弱的种类使用。根据重氮盐抑制作用的有无和强弱,可将偶氮色素法分为两种:

(1) 同时偶联法:是在底物混合液中,通过酶分解作用所得到的沉着物立即与重氮盐偶联形成偶氮色素。

(2) 后偶联法:为防止重氮盐对酶的抑制作用,先使酶与底物发生作用,使分解产物沉着,然后再浸渍于重氮盐液中,使其形成偶氮色素。

偶联偶氮色素法具有作用时间较短、不容易发生酶丢失、正常组织细胞中无内源性底物和最终反应产物不易褪色等优点。但该法所用底物的分解产物有不同程度扩散,故定位欠准确,且人工合成底物价格较贵。

2. 金属-金属盐法 一般是指金、银、铜、铁、铅和钴等金属,金属本身或其盐的化合物都具有颜色,容易发生呈色反应。而且酶的分解产物容易与金属结合。因此,捕捉酶反应的分解产物,使其与金属结合,利用呈色反应,再现酶反应部位,可以证明某种酶的存在。故称为金属-金属盐法或金属沉着法(metal precipitation method),此法大致分三种:

(1) 酶作用于底物时,其分解产物与底物混合液中某种物质结合,沉着在作用部位,然后结合物被金属置换,通过金属显色来证明酶的存在。把上述反应过程归纳为三个阶段,即酶反应阶段、金属置换阶段和显色阶段。

(2) 与第一种方法相比,省略了金属置换步骤。酶作用于底物后生成的分解产物与底物孵育液中的金属离子相结合,直接沉着于酶反应部位,使其显色。

(3) 此法特点是使用人工底物(前两种方法使用天然底物)。在酶的作用下,人工底物的分解产物与特定金属结合,立即显色,或通过显色操作使其显色。此法包括硫代胆碱铜法和羟喹啉铁法。其优点是:底物、捕捉剂价格便宜;金属离子容易反应,沉着颗粒微细,反应色调鲜明。缺点是易褪色,组织细胞中有些成分可吸附金属离子,产生假阳性反应。

3. 色素形成法 在酶作用下使无色化学物质在局部形成色素沉着。以下主要介绍三种类型:

(1) 四唑盐法(tetrazolium method):此法主要显示各种脱氢酶。在脱氢酶作用下,组织切片在含有四唑盐或双四唑盐的底物混合液中,使底物分离出的氢原子与无色四唑盐或双四唑盐结合形成红色或蓝色甲臍(formazane)或二甲臍(difomazane)色素(图 3-7)。这种色素沉着于酶所在部位。

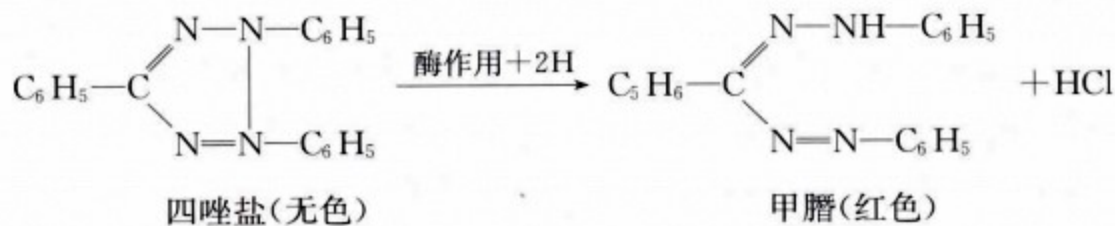


图 3-7 四唑盐法原理

(2) 靛酚蓝法(indophenol blue method):该法主要显示细胞色素氧化酶和过氧化物酶,是 Nadi 反应用于检测氧化酶的方法。把二甲基-对-苯二胺和 α -萘酚加入底物混合液中,由酶作用而释放的氧与此两者结合,形成靛酚蓝而显示酶的部位。也可以用 4-氨基-N,N-二甲基萘胺(AND)代替二甲基-对-苯二胺图 3-8。

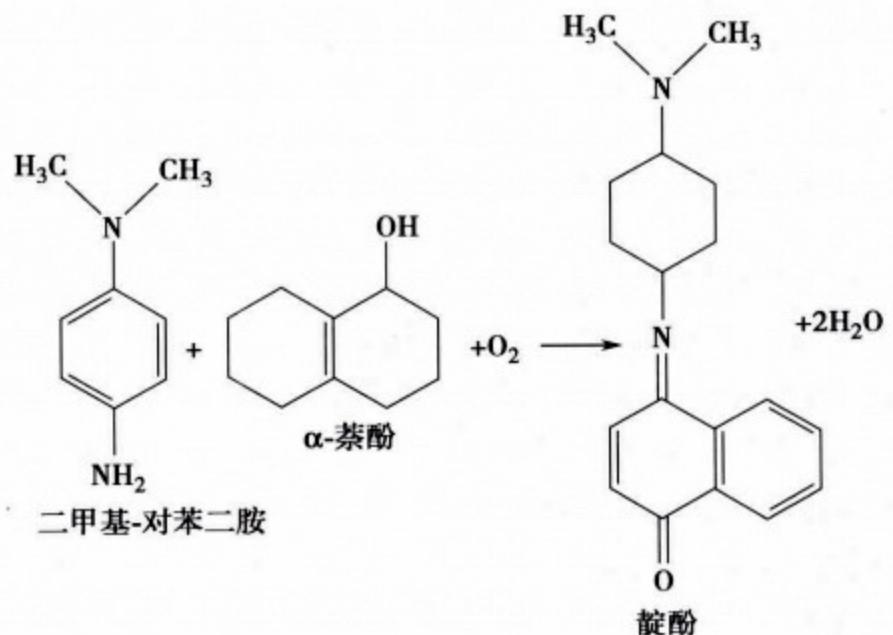


图 3-8 靛酚蓝法原理

(3) 靛蓝形成法(indigo formation method):又称靛蓝法或吡啶酚法,在酶作用下,分解底物酯型吡啶酚化合物,产生出吡啶酚,在氧存在的情况下形成蓝色靛蓝,使酶存在部位显色。

(三) 酶组织化学对组织处理的基本要求

在酶组织化学研究中,仍需遵循标本制作五大基本步骤,即固定或不固定的标本、切片(冷冻或不冷冻)、孵育、显色和显微镜下观察。

根据组织化学酶检出的基本步骤,主要有以下 5 方面影响酶活性:

1. 选择最适温度、pH 及缓冲液。
2. 固定和切片标本制作 由于固定液易使酶丧失酶活性,因此最好用不固定的冰冻切片显示酶活性。切片厚度一般为 $8\sim 12\mu\text{m}$,不超过 $40\mu\text{m}$,因为切片在 $60\mu\text{m}$ 以上时,浸透速度减慢,易出现人工假象。

3. 捕捉剂和激活剂 捕捉剂是形成最终产物的基本条件,有 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ba^{2+} 等,其中 Pb^{2+} 广泛应用于磷酸酶、酯酶和转移酶等酶反应。凡能提高酶活性的物质,称为激活剂。激活剂分为三大类:

(1) 离子:多为金属离子。一种激活剂对某种酶能起激活作用,但是可能对另一种酶起抑制作用;有时离子间也有拮抗现象,如 Na^+ 抑制 K^+ 的激活作用, Ca^{2+} 抑制 Mg^{2+} 的激活作用等。

(2) 小分子化合物:某些还原剂可提高酶活性,例如半胱氨酸和还原型谷胱甘肽等能使酶分子中的双硫键还原成巯基。

(3) 激活酶:指可使某些无活性的酶原变为有活性的酶。

4. 抑制剂 指某些物质在不引起酶蛋白变性的情况下,使酶活性减弱,甚至使酶活性消失。

5. 对照实验 为确定被检酶是否具有特异性,以避免发生假阳性或假阴性结果,同时要对照实验。酶的性质是指对其相应的底物发生作用。如果有两种或更多酶作用于同一底物时,需要用以下方法进行酶反应特异性的对照实验。

(1) 用酶的抑制剂确认酶活性的对照实验。

(2) 除去底物对照实验:用去底物的孵育液进行反应,确认反应消失或明显减弱。

(3) 阳性对照实验:用已确定有某种酶存在的组织细胞与待测组织同时进行反应,两者相互对照,以确认酶活性的存在。

二、常用酶组织化学染色方法

(一) 磷酸酶

磷酸酶(phosphatase)是水解磷酸酯酶的总称。磷酸酶不仅参与磷酸酯化合物的水解反应,而且也参与其逆反应及磷酸转移反应。

1. 碱性磷酸酶 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在碱性环境下可催化各种酚和醇的磷酸酯水解,还具有磷酸转移作用,在细胞膜上运输作用较为活跃,如肾近端小管的刷状缘、小肠上皮的微绒毛、肝脏的胆小管、毛细血管内皮细胞及神经元的突触膜均可显示此酶活性。

(1) 钙-钴法:在碱性环境(pH 9.2~9.4)中,碱性磷酸酶将磷酸盐的底物(如 β -甘油磷酸钠, α -萘酚磷酸钠)分解,产生的磷酸离子被孵育液中的钙离子捕获生成磷酸钙沉淀,因磷酸钙不能显色,需加入硝酸钴,用钴离子置换钙离子,形成磷酸钴沉淀后用硫化铵处理,形成棕黑色硫化钴颗粒沉淀,从而显示酶活性部位,硫化钴沉淀的多少与碱性磷酸酶含量成正比,其反应通式如图 3-9。

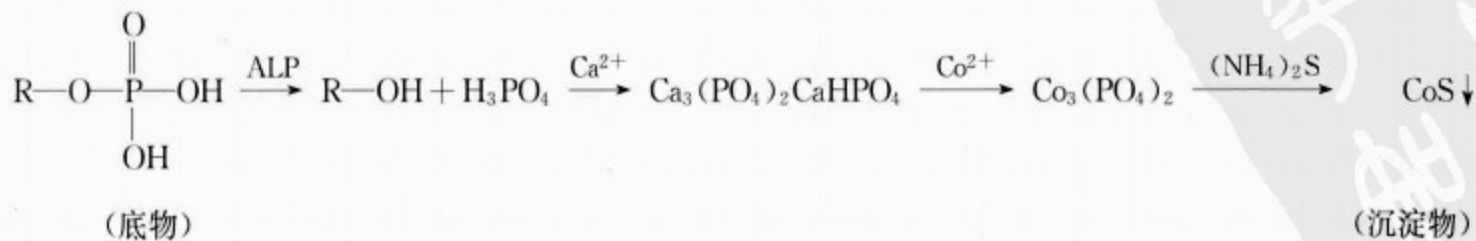


图 3-9 碱性磷酸酶钙-钴法反应原理

1) 孵育液配制

2%氯化钙	20ml
2%巴比妥钠	10ml
3%β-甘油磷酸钠	10ml
5%硫酸镁	5ml
蒸馏水	5ml

孵育液最终 pH 9.4, 置于冰箱内保存。

2) 染色程序: ①新鲜组织恒冷箱切片(可用 10%福尔马林固定 10 分钟, 或不固定); ②入孵育液, 37°C 孵育 10 分钟(肾)至 60 分钟(肝); ③流水冲洗 5 分钟; ④入 2%硝酸钴溶液 2 分钟; ⑤蒸馏水浸洗; ⑥入 1%硫化铵溶液内 1 分钟; ⑦蒸馏水洗; ⑧甘油明胶封固。

3) 结果与评价: 酶活性部位显示棕黑色为硫化钴沉淀(图 3-10)。该法的反应产物可发生扩散, 定位欠准确, 应加以注意。

4) 对照实验: 加入抑制剂 L-四咪唑等结果为阴性; 去底物(孵育液中用 10ml 蒸馏水代替底物)结果为阴性。



图 3-10 碱性磷酸酶钙-钴法染色
大鼠小肠绒毛吸收细胞呈深棕色为碱性磷酸酶阳性反应(苏红星供图)

(2) 偶氮-偶联法: 人工合成的磷酸萘酚盐经碱性磷酸酶水解后释放出萘酚, 后者立即与重氮盐偶联生成不溶性偶氮色素。

1) 孵育液配制

萘酚 AS(或萘酚 AS-MX)	10~25mg
N,N-二甲基甲酰胺液	0.5ml
0.2mol/L Tris 盐酸缓冲液(pH 8.2~9.2)	50ml
坚牢蓝 B(或 BB、RR, 或坚牢红 TR、坚牢蓝 VRT)	50mg
混合、搅拌及过滤, 必要时可使用氢氧化钠调整 pH。	

2) 操作程序: ①新鲜组织冰冻切片; ②入孵育液, 37°C(或室温下)孵育 5~60 分钟; ③双蒸水洗 3~5 分钟; ④4%甲醛, 室温下固定 10~15 分钟; ⑤蒸馏水洗 3~5 分钟; ⑥甘油明胶封固。

3) 结果与评价: 采用不同的重氮盐, 酶的活性显色也不同, 用坚牢蓝 B(或 BB、RR)酶活性呈蓝紫色, 用坚牢红 TR(或坚牢紫 B)酶活性呈红色。萘酚法有三个优点: ①反应产物溶解度小, 局部比较明显; ②萘酚化合物能较快地被水解, 可缩短孵育时间; ③反应产物立即可见, 并显示出颜色。

4) 对照实验:方法与钙-钴法相同。

2. 酸性磷酸酶 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)广泛分布于机体各种组织细胞内,主要存在于细胞的溶酶体内,常作为溶酶体标志酶,此外,还存在于内质网和胞质内。在组织退行性变、核酸和蛋白质代谢活动增加时,酸性磷酸酶活性增强。酸性磷酸酶还参与酯类代谢。因此,它在疾病、免疫反应和细胞损伤与修复过程中具有一定生物学意义。

(1) 金属盐-铅法:其基本原理是在酸性环境下,底物 β -甘油磷酸钠被酸性磷酸酶水解,释放出磷酸,磷酸遇铅离子则生成磷酸铅沉淀,最后与硫化铵作用形成棕褐色硫化铅沉淀。其反应式如图 3-11。

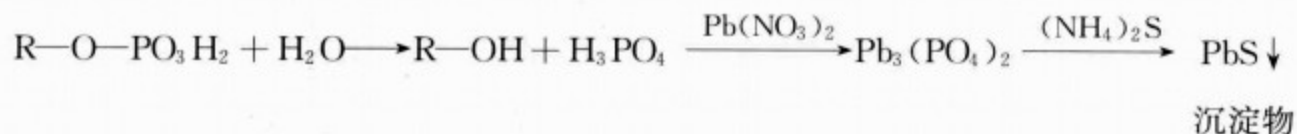


图 3-11 酸性磷酸酶金属盐—铅法反应原理

1) 孵育液配制

0.05mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)	10ml
蔗糖	0.8mg
硝酸铅	10mg
3% β -甘油磷酸钠	1ml

孵育液最终 pH 5.0,新鲜配制尽快使用。

按上述顺序加入后待硝酸铅完全溶解,逐次少量加入底物时,孵育液则变得完全透明。醋酸盐缓冲液需新鲜配制,立即使用。

2) 染色程序:①新鲜组织恒冷箱切片;②10%福尔马林固定 10 分钟;③蒸馏水洗;④入孵育液,37℃孵育 2~4 小时;⑤双蒸水洗 2~3 分钟;⑥入 1%硫化铵液(新鲜配制)1~2 分钟;⑦蒸馏水冲洗;⑧甘油明胶封固。

3) 结果与评价:阳性反应部位呈棕褐色硫化铅颗粒(图 3-12)。该酶为可溶性酶,以冷固定效果较好,一般溶酶体膜为不通透性膜,但经冰冻融化或福尔马林固定处理后,孵育液内的作用底物则进入溶酶体而被酶作用。

4) 注意事项:孵育液内铅离子浓度是反应的关键因素,必须新鲜配制,立即使用。因为当铅离子浓度过低时,产生的磷酸离子未能完全被结合而发生弥散,并可进入胞核内造成染色假阳性。孵育时间过长也可发生酶扩散和胞核染色现象。

5) 对照实验:①去底物实验:从孵育液中除去底物(3% β -甘油磷酸钠),通常反应为阴



图 3-12 酸性磷酸酶铅法染色
大鼠肾小管上皮细胞呈棕色为酸性磷酸酶阳性反应(苏红星供图)

性;②抑制剂实验:氟化钠是 ACP 的抑制剂,在孵育液中加入氟化钠(10mmol/L 或 4.2mg/10ml),ACP 反应呈阴性。但某些部位如脊髓背角浅层和初级感觉神经节中小细胞内的 ACP 活性不能被一定浓度的 NaF 所抑制,称抗氟化钠 ACP。

(2) 重氮盐后偶联法:与碱性磷酸酶相同。重氮化和偶联反应多在碱性溶液中和低温条件下进行,在酸性溶液中容易分解。所以酶作用与偶联反应分两步进行。

1) 孵育液配制

磷酸-6-苯酰-2-萘钠	25mg
蒸馏水	80ml
Wapoll 醋酸缓冲液(pH 5.0)	20ml
氯化钠	2g

重氮盐溶液配制:

坚牢蓝 B 盐	50mg
蒸馏水	50ml

加碳酸氢钠使之碱化。

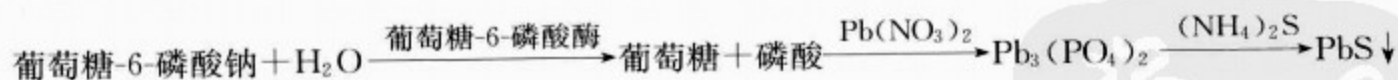
2) 染色程序:①用新鲜或冷福尔马林固定的组织进行恒冷箱切片;②切片入孵育液中,室温孵育 10~60 分钟(新鲜组织切片),或 1~2 小时(固定后组织切片);③新鲜组织切片用冷生理盐水洗 3 次,固定后的组织切片用蒸馏水洗 3 次;④放入新鲜配制的冷重氮液中,搅动 3~5 分钟;⑤用冷生理盐水或蒸馏水洗 3 次,每次 5 分钟;⑥甘油明胶封固。

3) 结果:酶活性部位显示蓝色。

4) 对照实验:与铅法相同。

3. 葡萄糖-6-磷酸酶 葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-P)定位于肝、肾、肠黏膜的微体及内质网内,主要有两方面的生理功能:一方面通过水解葡萄糖-6-磷酸释放葡萄糖来控制葡萄糖释放入血的量;另一方面,在一定条件下通过其磷酸转移酶活性合成葡萄糖-6-磷酸。糖尿病患者血糖浓度增高的同时,伴有葡萄糖-6-磷酸酶的磷酸转移酶活性增高,其作用是取代肝内的葡萄糖激酶,使葡萄糖转向糖原合成。

铅法:葡萄糖-6-磷酸水解后所释放出磷酸,为硝酸铅所捕获,经硫化铵处理,最终反应产物为颗粒状的硫化铅沉淀。反应通式如下:



1) 孵育液配制(新鲜配制)

0.125% 葡萄糖-6-磷酸钠	4ml
0.2mol/L Tris-顺丁烯二酸盐缓冲液(pH 7.4)	4ml
2% Pb(NO ₃) ₂ (2.5%)	0.6ml
蒸馏水	1.4ml

充分混合后使用

2) 染色程序:①新鲜组织冰冻切片;②10%福尔马林固定 5 分钟后水洗;③切片入孵育液中,37℃孵育 20 分钟水洗;④入 1%硫化铵水溶液中 1 分钟水冲洗;⑤3%福尔马林

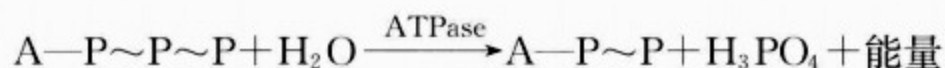
后固定 10 分钟；⑥甘油明胶封固。

3) 结果:酶活性处显棕色。

4) 对照实验:①除去底物;②以 β -甘油磷酸钠代替底物;③以 0.01mol/L 氟化钠作为抑制剂。

(二) 三磷酸腺苷酶

三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)可水解磷酸与磷酸之间的高能键,而释放大能量,而磷酸酶是酯酶,能水解磷酸与碳酸之间的键。反应式如下:



在生物膜上,ATP 酶的功能是参与离子泵的主动运输,因此细胞膜呈强阳性,ATP 酶可作为肝细胞早期受损的敏感指标。此酶活性在心肌最高,其次为骨骼肌、肺、肾脏、脑和胰腺。由于各种 ATP 酶的最适 pH 值不同,故所用显示方法也不同。下面仅介绍显示 Ca^{2+} -ATPase 的钙-钴法。

三磷酸腺苷酶钙-钴法 此法类似碱性磷酸酶的钙-钴法,但底物改用三磷酸腺苷钠盐,最适 pH 9.4,对 ATP 酶型 Mg^{2+} 具有抑制作用。

1. 孵育液配制

0.1mol/L 巴比妥钠(pH 9.4)	2.0ml
三磷酸腺苷二钠盐	30mg
蒸馏水	1.0ml
0.18mol/L 氯化钙	1.0ml
0.1mol/L NaOH 调至 pH 9.4,蒸馏水加至	10ml

2. 染色程序

- (1) 新鲜组织冷丙酮固定 30 分钟,冰冻切片;
- (2) 入孵育液(新鲜配制)37℃孵育 3 小时后蒸馏水漂洗;
- (3) 1% $CaCl_2$ 溶液洗 2 分钟;
- (4) 蒸馏水洗;
- (5) 1% $CaCl_2$ 溶液洗 2 分钟;
- (6) 流水洗;
- (7) 入 1%硫化铵 1 分钟;
- (8) 流水洗;
- (9) 干燥后梯度乙醇脱水,二甲苯透明;
- (10) 甘油明胶封固。

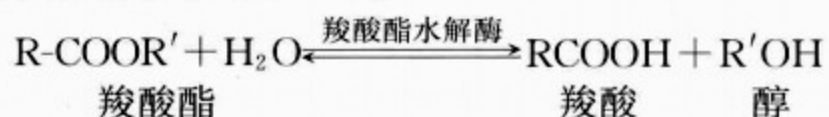
3. 结果 酶活性处显示黑棕色。

4. 对照实验 ①用 β -甘油磷酸钠代替 ATP 钠盐应为阴性;②孵育液中加入 *l*-四咪唑抑制碱性磷酸酶排除假阳性;③去底物。

5. 注意事项 此法要求 Ca^{2+} 浓度在孵育前后不能降低,否则产生的磷酸根离子不能被完全捕获而影响准确定位。如染色效果不好可在孵育前将切片放入 1% $CaCl_2$ 溶液中,37℃作用 5 分钟。

(三) 羧酸酯水解酶

羧酸酯水解酶(carboxylaster-hydrolases)或称酯酶(esterase),是一类水解酯的酶,其作用是水解脂肪族酯和芳香族酯,催化反应式如下:



一般所指的酯酶是非特异性酯酶,无底物特异性。广义的酯酶包括特异性酯酶,有底物特异性。各种酯酶水解的底物和最适 pH 不尽相同。

1. 非特异性酯酶 主要定位于内质网和溶酶体,也可少量存在于线粒体和胞液内。它主要参与酯类代谢,也与蛋白质代谢有关。非特异性酯酶在胰腺外分泌部腺细胞、横纹肌运动终板及小肠上皮细胞呈强阳性反应;在肝细胞、肾近端小管上皮细胞及结肠上皮细胞呈阳性反应。常用偶氮色素法显示非特异性酯酶活性,其原理如下:在酶的作用下,底物分解游离出来 α -萘酚,后者与重氮盐偶联形成偶氮色素,同时沉着于酶存在部位,通过偶氮色素的显色,间接证明酶存在部位。 α -萘酚系统的物质可用重氮盐中坚牢蓝 B、监牢蓝 RR、监牢红 RC 盐,而萘酚 AS 系统的物质则用石榴石、可林思 LB 盐、固蓝 B、固红 RC、固红紫 LC 等。反应式如图 3-13。

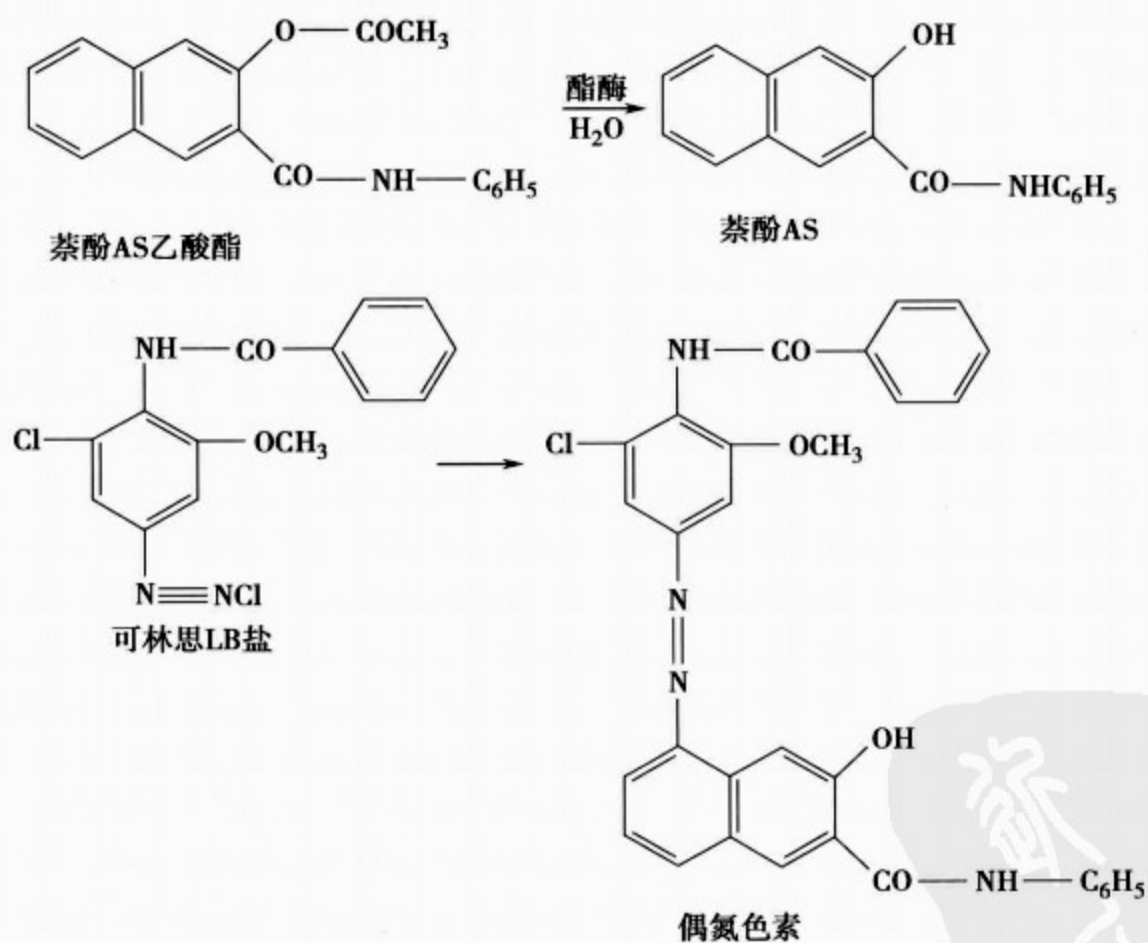


图 3-13 偶氮色素法显示非特异性酯酶反应原理

(1) 孵育液配制

α -醋酸萘酚	10mg
丙酮	0.25ml
0.1mol/L PBS(pH 7.4)	20ml

固蓝 B 盐

30mg

先将 α -醋酸萘酚与丙酮混合并完全溶解后加入 PBS, 充分搅拌至液体清亮后加入固蓝 B 盐, 搅拌后过滤, 立即使用。

(2) 染色程序: ①冰冻切片入孵育液中, 室温 10~60 分钟或 37°C 10~15 分钟; ②蒸馏水洗; ③4% 甲醛室温固定 10 分钟; ④自来水冲洗, 蒸馏水浸洗; ⑤甘油明胶封固。

(3) 结果: 酶活性处呈砖红色, 如用固红 TR 则为紫红色, 用固红 RC 为暗红色, 用固蓝 RR 则为青铜色(图 3-14)。

(4) 对照实验: 去底物反应结果为阴性。

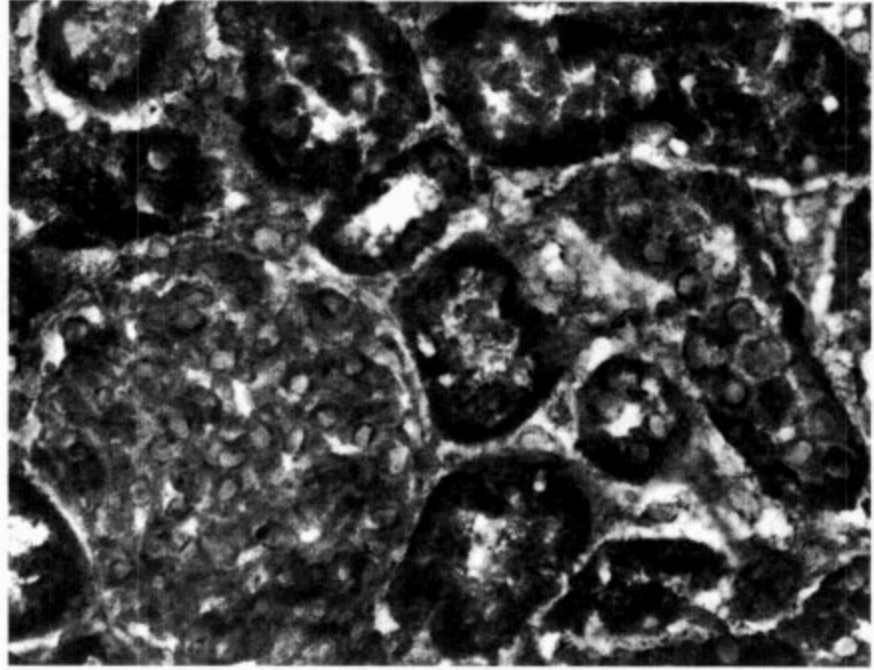
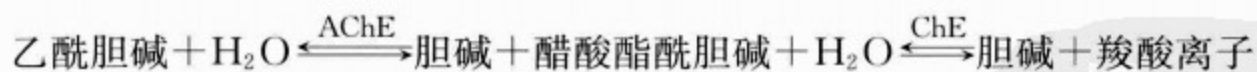


图 3-14 非特异性酯酶醋酸萘酚同时偶联法染色
大鼠肾皮质呈砖红色为非特异性
酯酶阳性反应(苏红星供图)

2. 乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶
胆碱酯酶属于特异性酯酶, 分为乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE) 和胆碱酯酶(cholinesterase, ChE) 两类。其活性中心是丝氨酸。乙酰胆碱酯酶具有水解乙酰胆碱的作用, 广泛分布于神经细胞的粗面内质网、线粒体、核周膜和突触前膜, 尤以胆碱能神经元的含量为高, 其活性是神经细胞性质

和功能的重要参考指标, 也是神经系统发育过程中神经细胞分化的一个指标。乙酰胆碱酯酶亦存在于运动终板、肌细胞、红细胞和肝内。胆碱酯酶主要分布于血清、胰腺及唾液腺。乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶两者的化学性质不同, 用酶来检测底物特异性时, 乙酰胆碱酯酶能最快地促使乙酰胆碱分解, 也能分解乙酰基- β -甲基胆碱, 但不能分解苯甲酰基胆碱。同时, 乙酰胆碱酯酶能被高浓度乙酰胆碱所抑制。但是胆碱酯酶则不同, 乙酰胆碱浓度越高, 越能被胆碱酯酶所分解。具体反应式如下:



亚铁氰化铜法: 乙酰胆碱酯酶能将乙酰硫胆碱盐水解产生硫胆碱, 硫胆碱使铁氰化物还原为亚铁氰化物, 后者与铜离子结合成亚铁氰化铜而呈棕色沉淀, 以此证明酶活性的存在。若用四异丙基焦磷酰胺 ISO-OMPA 抑制非特异性胆碱酯酶, 则可单独显示乙酰胆碱酯酶。

1) 孵育液配制

乙酰硫代胆碱碘盐	5mg
0.1mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)	6.5ml
完全溶解后依次加入以下溶液:	
0.1mol/L (2.94%) 枸橼酸钠	0.5ml

30mol/L (0.75%)硫酸铜 1ml

5mol/L (0.164%)铁氰化钾 1ml

充分混匀,至溶液呈亮绿色,最终 pH 5.5~5.6。临用前 30 分钟内配制。

2) 染色程序:①新鲜组织冰冻切片后用丙酮或 10%福尔马林固定 20~25 分钟或经冷福尔马林钙溶液固定 20 分钟后冰冻切片;②蒸馏水洗;③入孵育液中,室温 2~6 小时或 37°C 1~2 小时;④蒸馏水洗;⑤乙醇脱水,二甲苯透明;⑥甘油明胶封固。

3) 结果:乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶活性部位均显示棕色(红褐色)沉淀。本法孵育液内各成分比例关系很重要,如 Cu^{2+} 浓度太小,易造成弥散假象。pH 以 5~5.5 最好,pH 大于 6 易发生扩散现象。

4) 对照实验:在孵育液中加入 4mmol/L 四异丙基焦磷酸胺(ISO-OMPA)0.2ml 抑制非特异性胆碱酯酶而显示乙酰胆碱酯酶(AchE);用毒扁豆碱硫酸酯 3×10^{-5} mol/L 代替蒸馏水,先将切片处理 30 分钟,水洗后再入孵育液内,两种酶均被抑制而呈阴性。

(四) 氧化酶和脱氢酶

氧化酶(oxidase)和脱氢酶(dehydrogenase)均使底物脱氢“氧化”,所不同的是氧化酶将氢与氧结合,而脱氢酶则把氢传给其他物质即受氢体,如辅酶 I (NAD),辅酶 II (NADP)或黄素蛋白。

1. 细胞色素氧化酶 细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase,CCO)在细胞有氧呼吸中起重要作用,为线粒体膜固有酶,是线粒体标志酶之一,常作为细胞内氧化代谢指标。在含有大量线粒体的细胞内均有高强度细胞色素氧化酶活性。

二氨基联苯胺显示法(DAB 法) 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)在细胞色素氧化酶的催化下,其侧链氨基被氧化,并进行反复氧化性聚合和氧化性环化,形成不溶性褐色吩嗪(phenazine)聚合物,DAB 将氧化型细胞色素 C 还原,还原型细胞色素 C 又被细胞色素 a 再氧化。通过该循环的反复进行,DAB 不断被氧化,反应氧化物沉积。DAB 氧化物含有活性游离基,该游离基能使四氧化钼还原形成钼黑,故可在电镜下观察。

(1) 孵育液配制

蒸馏水	5ml
3,3'-二氨基联苯胺-4-盐酸盐	5mg
0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)	5ml
过氧化氢酶 C-100	1mg
细胞色素 CⅢ型	10mg

(2) 操作程序

- ① 新鲜或固定组织冰冻切片,厚 5~10 μm ;
- ② 孵育液中 37°C 孵育 40~60 分钟,充分洗涤;
- ③ 复染:亚甲蓝染核;
- ④ 甘油明胶封片。

(3) 结果:酶活性部位呈棕褐色沉淀(图 3-15),细胞内线粒体数目多者酶活性强。

(4) 对照实验:孵育液内加 1mmol/L KCN 或 10mmol/L NaN_3 ,反应完全呈阴性。抑制剂

为氰化物、叠氮化钠(NaN_3)、硫化氢(H_2S)和一氧化碳,原因是这些物质均能与细胞色素氧化酶的三价铁结合而抑制酶活性。从反应液中去掉底物 DAB 不能成为对照,因为 DAB 同时也是成色剂。

2. 过氧化物酶 过氧化物酶(peroxidase)与细胞色素氧化酶具有相似的化学本质,是一类氧化还原酶,可使过氧化氢(H_2O_2)分解生成水和释放氧。过氧化物酶广泛分布于乳腺、甲状腺、唾液腺、肠上皮、血细胞和肥大细胞等。存在于细胞过氧化物酶体中,是机体的抗氧化酶,在防止氧代谢物损伤中具有重要作用。

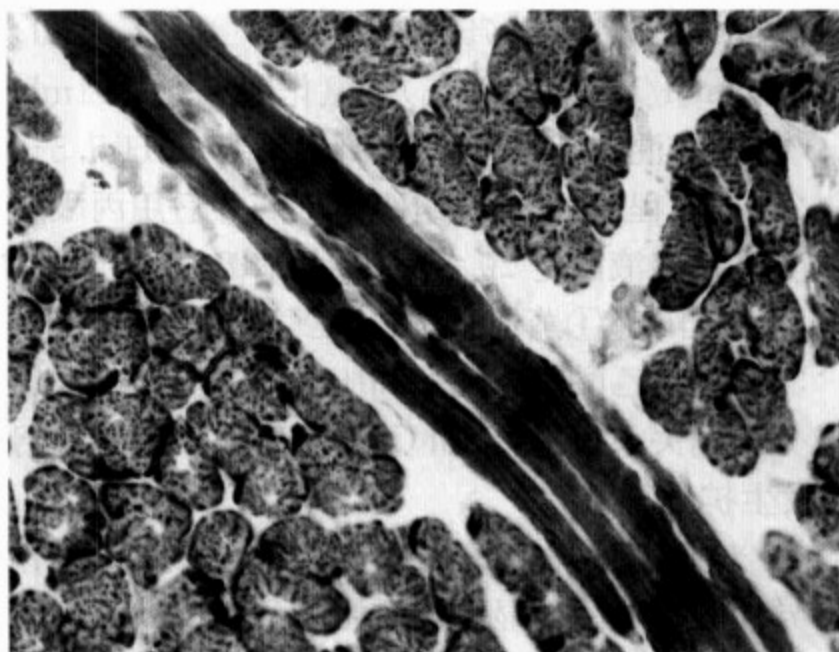


图 3-15 细胞色素氧化酶 DAB 法
大鼠骨骼肌纤维横断和纵断面中呈棕色为
细胞色素氧化酶阳性反应(苏红星供图)

显示过氧化物酶常用联苯胺法。联苯胺如 DAB 和四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, TMB)能被过氧化物酶分解过氧化氢产生的氧所氧化,形成有色多聚体沉淀,其中 DAB 被氧化为棕褐色沉淀, TMB 被氧化为深蓝色沉淀。

(1) DAB 法:过氧化物酶与过氧化氢作用产生游离氧,后者使无色的供氢体 DAB 氧化为棕褐色沉淀定位于过氧化物酶所在部位。

1) 孵育液配制

DAB	5mg
0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(TNB, pH 7.6)	10ml
1% H_2O_2	0.1ml

2) 染色程序:①组织固定于 0.1mol/L PBS 配制的 3%戊二醛固定液中 37℃ 30 分钟;②浸洗:用 0.1mol/L PBS 浸洗 3 次以上,每次 15 分钟或浸洗过夜,以除去内源性细胞色素 C,抑制细胞色素氧化酶的夹杂反应;③冰冻切片:厚 5~15 μm ;④预孵育:切片入预孵育液(DAB10mg 溶于 5ml 蒸馏水后,加 0.2mol/L、pH 6.5~7.0 的 PBS 5ml)室温孵育 10~30 分钟;⑤孵育:切片入孵育液室温孵育 5~10 分钟;⑥水洗:蒸馏水漂洗,亚甲蓝染核;⑦封片:甘油明胶封片。

3) 结果:酶活性部位呈棕褐色沉淀。

(2) TMB 法:原理同 DAB 法,但反应产物呈深蓝色沉淀。

1) 孵育液配制

A 液:亚硝基铁氰化钠(硝普钠)	100mg
H_2O	92.5ml
0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH 3.3)	5ml
B 液:TMB	5mg
无水乙醇	2~4ml

临用前将 A 液和 B 液混合即为预孵育液,在每 100ml 预孵育液中加 0.3% H_2O_2 1~5ml 即为孵育液。

2) 染色程序:①~③步同 DAB 法;④预孵育:切片入预孵育液中室温避光孵育 20 分钟,不断晃动切片;⑤孵育:切片入孵育液中室温避光孵育 10~20 分钟,不断晃动切片;⑥浸洗:将切片转移到 0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH 3.3)中,0~4℃浸洗 6 次,每次 30 分钟;⑦封片:甘油明胶封片。

3) 结果:酶活性部位呈深蓝色沉淀。

3. 脱氢酶 在生物代谢过程中,由氢的供体(donor)把氢原子转移到氢的受体(receptor)的酶促反应称脱氢酶反应,该反应由脱氢酶(dehydrogenases)催化。脱氢酶种类很多,其活性均可通过四唑盐显示。四唑盐作为脱氢酶反应中的受氢体,接受脱氢酶作用于底物所释放的氢而形成有色的甲臍(formazane),沉积于酶所在部位。

(1) 琥珀酸脱氢酶硝基蓝四唑盐法:琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)是线粒体呼吸链的第一个酶,存在于所有有氧呼吸的细胞中,与线粒体内膜紧密结合,其活性反映三羧酸循环情况,是三羧酸循环标志酶,也是线粒体标志酶。SDH 以黄素蛋白为辅基,能将琥珀酸氧化为延胡索酸并释放出氢,后者把硝基蓝四唑(NBT)还原为蓝色的甲臍。

1) 孵育液配制

NBT	5mg
二甲亚砜(DMSO)	5:0ml
0.1mol/L 琥珀酸钠	5.0ml
0.1mol/L PBS(pH 7.6)	5.0ml

注意:先用 DMSO 溶解 NBT,然后加入琥珀酸钠和 PBS。

2) 染色程序:①固定:固定剂很容易破坏 SDH 活性,故首选新鲜组织冰冻切片或用振动切片进行染色。对必须固定的组织,应降低固定剂浓度,如用 0.25%~0.3% 戊二醛或 0.5% 甲醛短时间固定(10~30 分钟),或用预冷的 2% 甲醛固定 5 分钟后再进行冰冻切片;②洗涤:固定后需充分洗涤;③切片:冰冻切片或振动切片;④孵育:暗处孵育,固定后的组织室温下孵育 10~40 分钟,未固定组织 4℃ 孵育 1~2 小时,组织最初为红色,以后显蓝色。⑤孵育后处理:水洗、晾干及油镜观察。

3) 结果:阳性反应产物呈细小的紫蓝色颗粒,定位于胞质线粒

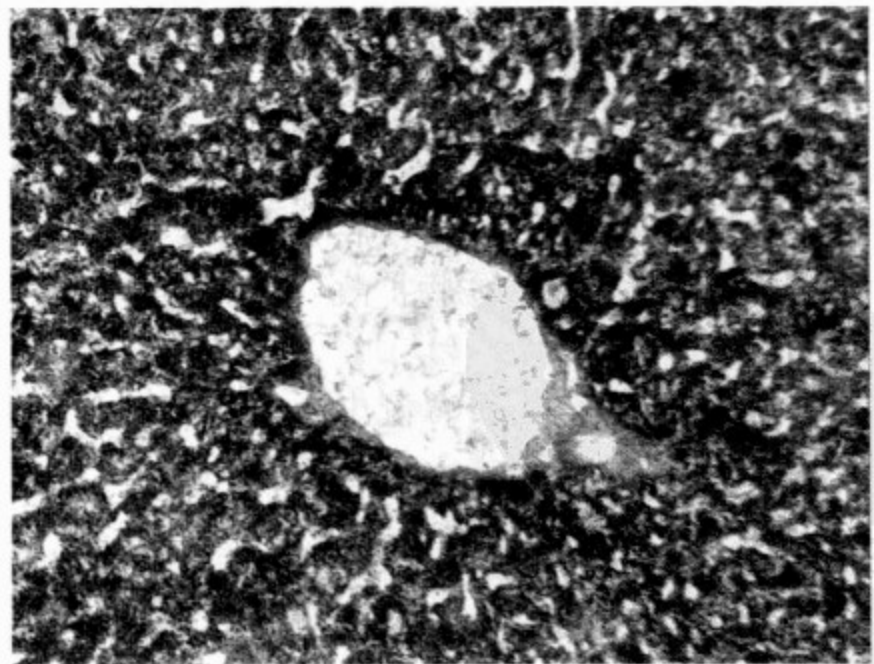


图 3-16 琥珀酸脱氢酶四唑盐法
大鼠肝细胞内充满呈深蓝色的琥珀酸
脱氢酶阳性反应颗粒(苏红星供图)

体。甲臈阳性反应与细胞内线粒体数目呈正相关(图 3-16)。

4) 对照实验:反应液中除去琥珀酸底物;在反应液中加入 0.1mol/L 丙二酸盐,琥珀酸脱氢酶可受到特异性抑制;加热处理使细胞内酶失活。

(2) 乳酸脱氢酶硝基蓝四唑盐法:乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是辅酶 I (NAD)依赖性脱氢酶,能氧化乳酸为丙酮酸,为无氧糖酵解途径的标志酶。硝基蓝四唑盐法显示 LDH 活性的原理与显示 SDH 活性的原理基本相同,只是需加用 NAD,氢从反应生成的还原型辅酶 I (NADH)传递给四唑盐,将其还原为甲臈。

1) 孵育液配制

0.06mol/L PBS	0.25ml
1.0mol/L D, l-乳酸钠	0.1ml
0.4% NAD	0.1ml
0.4% NBT	0.25ml
0.1mol/L KCN	0.1ml
0.5mol/L MgCl ₂	0.1ml
蒸馏水	10ml

2) 操作程序:①固定:用预冷的 2%多聚甲醛(0.1mol/L PBS, pH 7.4 配制)灌注固定 5 分钟;②洗涤:用冷 PBS 灌注冲洗固定液;③取材:取所需组织,用 PBS 洗 3 次;④切片:冰冻切片或振动切片,裱于涂有黏附剂的载玻片上;⑤孵育:在上述孵育液中,暗处反应 5 分钟,室温下反应 30 分钟;⑥封片:洗涤、脱水、甘油明胶封固和镜检。

3) 结果:酶反应阳性部位呈蓝色。该酶对固定剂的耐受性较好,采用先固定后孵育,可保存结构防止酶扩散。为了防止定位异常,在底物中加入聚乙烯醇(PVA)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP),可使底物黏稠度增加,防止反应产物扩散(图 3-17)。

4) 对照实验:除去孵育液中的底物,结果应为阴性。

(五) 一氧化氮合酶

一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是一种连接酶,能催化前体物质 L-精氨酸生成 L-瓜氨酸和一氧化氮(NO)。NO 是中枢和外周神经系统中的一种神经递质,活细胞间信使和内皮源性松弛血管的介质,在神经、心血管及免疫系统中有广泛的作用。NO 极不稳定,易于扩散游离,半衰期短,不易检测。因 NOS 是合成 NO 的关键酶,故通常通过检测 NOS 的活性来评估 NO 的分布和功能。NOS 有 3 种异构型,即神经型 NOS(neuronal

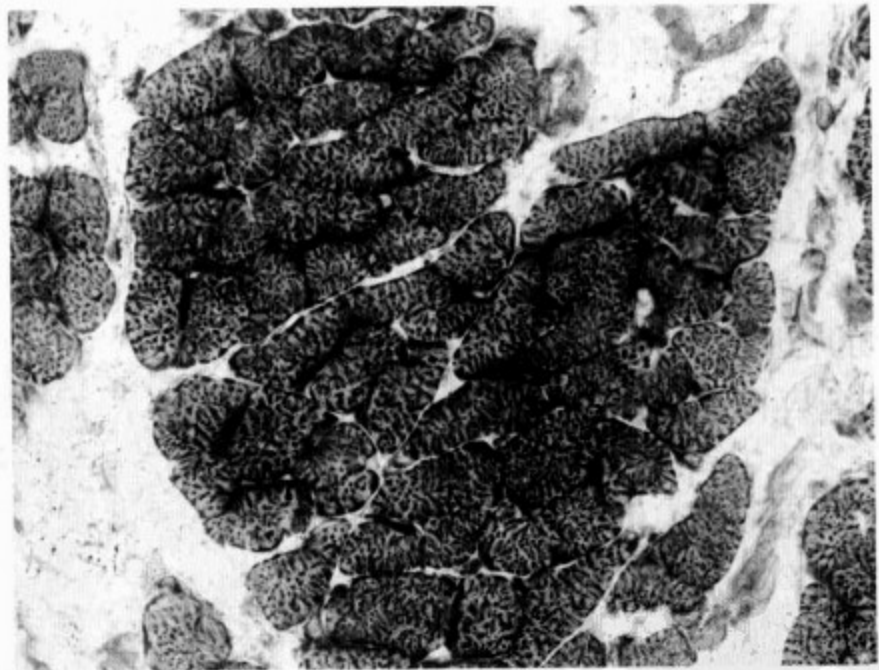


图 3-17 乳酸脱氢酶四唑盐法
大鼠骨骼肌(舌)纤维横断面呈蓝色为
乳酸脱氢酶阳性反应(苏红星供图)

NOS, nNOS)、内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)和细胞因子诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)。由于还原型辅酶 II-黄递酶(NADPH-d)与 NOS 在化学结构和组织定位上有极高的一致性,且也与 NO 生成密切相关,故人们常采用 NADPH-黄递酶法来显示 NOS 活性。

1. 原理 在 β -NADPH 存在下, NOS 的 C 末端能将 NADPH 电子转移到 NBT, 将 NBT 还原成不溶性蓝紫色甲臌沉淀产物。

2. 孵育液配制

β -NADPH	10mg
NBT	5mg
Triton X-100	0.03ml
0.05mol/L TB(pH 8.0)	9.97ml

临用前配制。

3. 染色程序

(1) 固定:4%多聚甲醛(0.1mol/L PBS 配制)灌注固定,取材后入同样固定液再固定 1 小时(4℃),20%蔗糖中 4℃过夜;

(2) 冰冻切片:厚 10~40 μ m;

(3) 孵育:切片入孵育液中 37℃孵育 30 分钟~1 小时;

(4) 终止反应:切片入 0.05mol/L TB 或蒸馏水中 5 分钟;

(5) 常规脱水、透明、封片或直接用甘油明胶封片。

4. 结果与评价 反应产物为蓝色或蓝紫色沉淀。NADPH-黄递酶法显示 NOS 活性,方法简便经济,应用广泛,但不能区分 NOS 亚型。

5. 对照实验 在孵育液中除去 β -NADPH 或用 0.1mol/L N-亚硝基精氨酸(NOS 抑制剂)预孵育切片 1 小时,结果应为阴性。

第四节 凝集素组织化学

凝集素(lectin)是一种无免疫原性蛋白质,分子量为 11 000~335 000 之间,可从植物或动物中提取,具有凝集红细胞的特性,故又称植物血凝素。凝集素能特异地与糖蛋白中的糖基反应。糖蛋白广泛分布在细胞衣、细胞表面、细胞内各种亚细胞膜囊的游离面以及上皮细胞之间,在生命活动中具有重要功能。由于凝集素能识别糖蛋白与糖多肽中的碳水化合物,且这种结合具有糖基特异性,因此,利用凝集素亲和层析已成为近年分离纯化糖蛋白的重要手段。凝集素具有多价结合能力,能与多种标记物结合,可作为组织化学的特异性探针,在光镜或电镜水平显示其结合部位,从而广泛用于糖蛋白的性质、分布以及正常细胞更新过程中糖蛋白变化的研究。目前已发现 100 余种凝集素,但能用于组织化学的仅有 40 种左右,其中大部分来源于植物细胞,少部分来自动物细胞。

一、凝集素的标记物

凝集素可作为组织化学的特异性探针广泛用于光镜的石蜡切片和冰冻切片、电镜树脂包埋超薄切片及冰冻超薄切片等标本的观察。为使结合在细胞膜上单糖的凝集素呈现可视性,通常采用荧光素、辣根过氧化物酶、铁蛋白、胶体金或生物素等对其进行标记。目前已有上述标记物标记的商品出售,应用时可直接购买。下面简要介绍荧光素异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、辣根过氧化物酶和生物素标记凝集素的组织化学染色程序。

二、染色程序

(一) FITC 标记凝集素的组织化学染色程序

1. 组织切片经脱蜡处理,若是 Bouin 液固定的组织,用 70%乙醇洗 3 次除去组织切片内的黄色后,再用蒸馏水漂洗;

2. PBS 漂洗(含 1%牛血清白蛋白)2 次,每次 5 分钟;

3. 加入 FITC-凝集素(PBS 适当稀释),置湿盒内孵育,室温 1 小时;

4. PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;

5. 水溶性封片剂封片,荧光显微镜观察。

6. 结果 FITC 标记的凝集素能直接与组织细胞内的糖基结合,从而显示糖基的位置,可用于检测组织细胞中的糖成分,阳性部位呈黄绿色荧光(图 3-18)。

7. 注意事项

(1) 固定液:以 Bouin 固定液为佳,也可用 70%乙醇固定;

(2) 与其他组织化学方法一样,染色过程中,应始终保持一定湿度,使切片保持湿润状态;

(3) 需经预实验确定 FITC-凝集素的最佳工作浓度;

(4) 凝集素的活性部位需重金属离子维持,故可用 TBS 作为缓冲液,加微量的金属(CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnCl_2 各 1.0mmol/L),可增强凝集素的结合能力。

(二) 辣根过氧化物酶标记凝集素的组织化学染色程序

1. 组织切片脱蜡处理等同前;

2. 流水冲洗 5 分钟,3% H_2O_2 孵育 10 分钟(阻断内源性过氧化物酶,避免假阳性);

3. PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;

4. 1%牛血清白蛋白孵育,室温 20 分钟,移去多余液体;

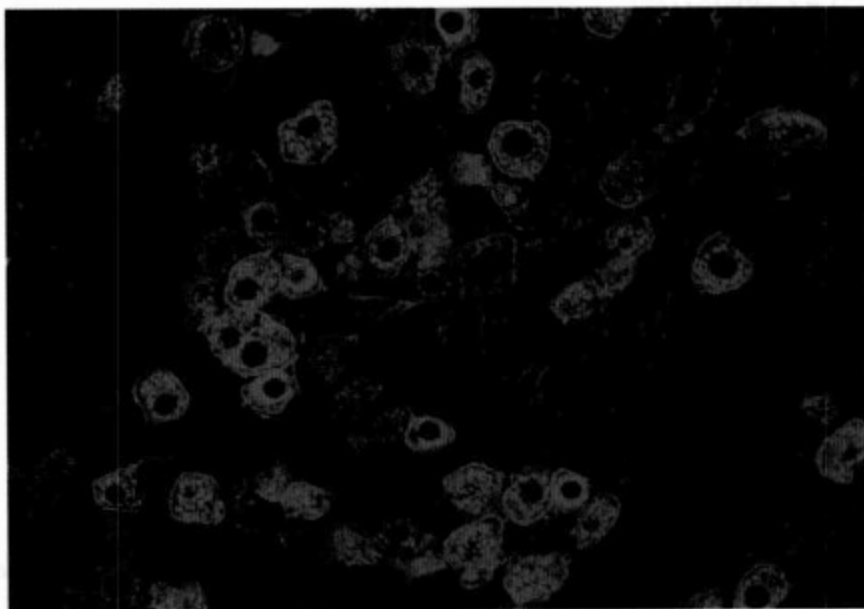


图 3-18 FITC 标记凝集素染色

FITC 标记的伴豆素 I-B4(*Griffonia simplicifolia* I-B4)染色示大鼠脊神经节中小型神经元中 *Griffonia simplicifolia* I-B4 结合位点(李和供图)

5. 加入 PBS 稀释的辣根过氧化物酶-凝集素,置湿盒内孵育,室温 1.5 小时;
6. PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;
7. 呈色 DAB 液(配制:DAB 5mg,pH 7.6 Tris-HCl 10ml,3% H_2O_2 40 μ l)室温暗处 10~15 分钟;
8. 蒸馏水洗 5 分钟,流水短暂冲洗后,常规乙醇脱水,二甲苯透明,封片;
9. 光镜观察,阳性反应部位呈棕褐色。

10. 注意事项

- (1) 为防止染色过程中切片脱落,载玻片可用铬矾/明胶或赖氨酸等黏片剂处理;
- (2) 脱水时与普通石蜡切片不同,70%乙醇时间不宜太长,以免阳性反应褪色;
- (3) 辣根过氧化物酶-凝集素的最佳工作浓度亦需经预实验确定;
- (4) H_2O_2 对碳水化合物有一定影响,可能改变凝集素的结合情况,但影响不显著。

(三) 生物素标记凝集素的组织化学染色程序

生物素(biotin)与亲和素(avidin)具有非常高的亲和性,1 分子亲和素可与 4 分子生物素结合,故可利用这一特点,先将生物素与辣根过氧化物酶(HRP)结合,再制备辣根过氧化物酶标记的亲和素-生物素复合物(avidin-biotin-peroxide complex,ABC),该复合物可含数个辣根过氧化物酶分子。又因复合物中的亲和素未被饱和,除与辣根过氧化物酶-生物素结合外,尚有一定的位点可与其他生物素结合,因此,实验中可通过生化反应将凝集素结合在另外的生物素上,当标记生物素的凝集素与组织细胞膜的单糖结合后,再用 ABC 复合物中亲和素与该生物素结合,在糖基的位置可形成一个较大的复合物,以增加检测的敏感性。其染色程序如下:

1. 切片脱蜡处理同前;
2. 小鼠肝粉(10 μ g/ml,PBS 配制)或生物素阻断剂孵育切片,室温 10 分钟,抑制组织中内源性生物素;
3. 3% H_2O_2 孵育 10 分钟(阻断内源性过氧化物酶,避免假阳性),PBS 漂洗 2 次,每次 5 分钟;
4. 用适当稀释度的生物素标记凝集素室温孵育切片 45 分钟;
5. PBS 漂洗 2 次,每次 5 分钟;
6. ABC 液孵育切片,室温 30 分钟,用前配制,可按试剂盒说明书操作,将 20 μ l 亲和素加 20 μ l HRP 标记的生物素,溶解在 1.0ml PBS 中;
7. PBS 漂洗 2 次,每次 5 分钟;
8. 呈色 加入 DAB 液暗处 10~15 分钟,室温;
9. 流水冲洗 5 分钟,必要时可用苏木精复染,光镜观察记录;
10. 结果 阳性部位呈黄棕色。

第五节 荧光组织化学

1852 年 Stokes 发现某些物质在短光波的照射下能发射出一种比激发光长的光波,将

这种光称为荧光(fluorescence)。物质(组织标本)被紫外光等短光波照射(激发)后,能发出比原来激发光波长更长的新光波性质(即荧光)称为荧光特性。当某种物质的电子从外界吸收能量后,由低能级的电子层(内层电子)跃迁到较高能级的电子层,这个过程为激发,跃迁到激发态的电子极不稳定,半衰期非常短,在短暂的时间(10^{-8} 秒)内将以各种方式释放其能量回到基态。若以电磁辐射的形式释放所吸收的能量,则会发射出光,这种发射光寿命较短,能为人眼所见,即为荧光;若以热能等形式释放出所吸收的能量则不发光。荧光是冷光,由于光的波长不同,可呈现不同颜色,多为紫色、蓝色、绿色、红色和黄色等。荧光组织化学技术是利用荧光来鉴定组织细胞内某些生物化学成分,探讨细胞功能状态的常用方法。

一、组织细胞荧光分类

(一) 自发荧光

自发荧光(autofluorescence)指不经任何处理的组织细胞成分在短波长光照射下发出荧光,如胶原纤维和弹性纤维呈蓝绿色荧光,卟啉呈红色荧光,维生素 A 发绿色荧光,细胞内的脂褐素呈棕黄色荧光,蓄积于组织内的某些药物如阿的平和四环素等也能产生荧光。

(二) 诱发荧光

诱发荧光(induced fluorescence)是指生物胺类物质,如去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺和组胺等与一些醛类物质在一定条件下发生环化或缩合反应,产生的缩合物可发出强荧光,称为诱发荧光。诱发荧光法的敏感性较高、特异性强,广泛应用于神经递质、神经内分泌以及神经生物学等研究。

(三) 酶促荧光

酶促荧光(enzymatically produced fluorescence)系指酶的反应产物能发荧光,如脱氢酶反应中的辅酶 I 变为还原型辅酶 I 后,发红色荧光,细胞内脂酶可将不发荧光的二醋酸荧光素转化成发荧光的荧光素,因此可根据产物荧光强度推测酶与酶促反应的情况。

(四) 荧光染色

荧光染色(fluorochrome stain)指某些荧光染料在极低浓度下可与组织细胞的某种成分结合,发出不同波长的荧光,如吖啶橙可与细胞核中 DNA 结合,发出黄绿色荧光。荧光染色的优点为敏感度高,所需染料浓度低,对细胞毒性小,可作活体染色,观察组织细胞的结构、组成和功能状态。

(五) 免疫荧光

免疫荧光(immunofluorescence)是基于免疫组织化学的基本原理将抗原抗体反应和荧光标记技术相结合的一种技术方法。

荧光染色技术已在本章第一节介绍,免疫荧光技术详见第四章相关内容,本节仅介绍生物胺荧光组织化学技术。

二、生物胺荧光组织化学

去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、组胺等生物单胺类物质在组织内的含量甚微,需用高敏感性的技术方法才能在细胞水平显示。生物胺荧光组织化学是在诱发荧光的基

基础上建立的一种特异性强、敏感性高的技术方法。常用醛类诱发生物胺荧光的方法有 Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法、乙醛酸诱发生物单胺类荧光以及邻苯二醛诱发组织胺荧光法。

(一) Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法

该法主要用于显示儿茶酚胺(catecholamine, CA), 如去甲肾上腺素、多巴胺及 5-羟色胺等。

1. 原理 甲醛与儿茶酚胺等生物胺冰冻干燥后, 先经过闭环作用, 再经脱氧反应, 形成 3,4-二氢异喹啉, 在适当 pH 下, 后者成为互变异构醌型结构而产生强荧光, 其最大激发波长和最大发射波长分别为 410nm 和 480nm。

2. 组织标本制备

(1) 铺片: 对于富含交感神经支配的去甲肾上腺素能纤维的虹膜、肠系膜和皮下结缔组织等可以制备铺片。以虹膜为例, 其铺片过程如下: 取出眼球, 在解剖显微镜下尽量除去周围结缔组织, 用虹膜剪沿眼球前部环形剪开, 剔除晶状体, 将角膜向下置于清洁的载玻片上, 再用钟表镊将虹膜从睫状体撕下, 将其在清洁的载玻片上铺展成虹膜原本的形状, 用滤纸将周边液体吸干后, 置于含 P_2O_5 的真空干燥器内过夜。其他组织亦可采用同样方法制作铺片。

(2) 脑组织涂片: 将小块脑组织置于清洁载玻片上, 用另外的载玻片呈锐角推过该脑组织, 制作均匀的脑涂片, 方法类似制作细胞涂片, 干燥同前。脑涂片的组织结构虽较紊乱, 但可通过荧光膨体测量儿茶酚胺含量, 作为药理学干预或损伤的一种快速普查法。

(3) 冰冻干燥法: 取脑组织(1.0cm×0.5cm×0.5cm)置于 OCT 包埋剂内(可按切片需要调整组织块方向), 用液氮速冻, 然后进行冷冻干燥, 组织块亦可在液氮中保存。已干燥的组织块置 P_2O_5 的干燥器内再继续干燥数天。

3. 甲醛处理 将已干燥的组织标本与含 5g 多聚甲醛的小器皿一同置入 80℃ 的烘箱内 1~3 小时, 肾上腺素的反应较慢, 需 3 小时左右, 而后移至暗处, 逐渐恢复至室温(一般为 25℃)后, 水溶性封片剂封片, 荧光显微镜观察。

4. 结果 儿茶酚胺中多巴胺、去甲肾上腺素神经元为黄绿色荧光, 轴突前末梢较细胞体和膨体更易显示; 5-羟色胺神经元为黄色荧光。

5. 注意事项

(1) 多聚甲醛试剂含水量的多少对结果影响较明显, 含水量太少, 所诱发的荧光弱, 则显示含单胺结构少, 而含水量多时, 荧光物质会发生弥散, 所以, 实验前最好先将多聚甲醛经含水量恒定处理, 即将一定量(如 50g)的多聚甲醛置于适当大小的培养皿内与 500ml 硫酸(相对湿度为 70%左右)共同置于干燥器中, 盖好干燥器盖, 室温下放置 7~10 天。

(2) 如显示 5-羟色胺神经元, 最好用单胺氧化酶抑制剂(如帕吉林, pargyline)预处理, 再经 5-羟色胺前体孵育, 将有利于 5-羟色胺神经元的显示。

(二) 乙醛酸诱发生物单胺荧光法

1. 原理 乙醛酸与儿茶酚胺、去甲肾上腺素、多巴胺及 5-羟色胺等生物胺的化学反应也是先经闭环, 再经脱氢, 与儿茶酚胺形成异喹啉类荧光产物或与 5-羟色胺形成咪啉类荧光产物。

2. 乙醛酸反应液配制(用前新鲜配制)

双蒸水	15.0ml
蔗糖(0.2mol/L)	1.37g

磷酸二氢钾(0.236mol/L) 0.642g

结晶乙醛酸(2%) 0.40g

2N NaOH 调至 pH 7.4, 约 2.4ml

最后总量为 20ml, 加双蒸水至所需量即可。

3. 染色程序

- (1) 取材: 铺片或冰冻切片, 经电扇或电吹风凉风吹干, 数秒至数分钟;
- (2) 浸染: 将组织标本反复浸入乙醛酸反应液 3 次, 每次数秒至数分, 室温;
- (3) 凉风吹干, 约 15~20 分钟, 此时标本表面呈磨玻璃状;
- (4) 将标本置于预先升温至 95℃ 的烘箱内处理 3~5 分钟;
- (5) 水溶性封片剂封片, 荧光显微镜观察。

4. 结果 激发波长为 410nm, 发射波长为 480~520nm 时, 儿茶酚胺呈绿黄色荧光, 而 5-羟色胺呈橘黄色荧光。

5. 乙醛酸诱发荧光结合孔雀绿复染程序 醛类诱发荧光组织化学法显示结果中含儿茶酚胺的细胞和突起产生的荧光清晰, 易识别, 但周围组织结构不易辨别。如果将一种阳离子染料, 如孔雀绿(malachite green)等加入乙醛酸反应液内处理组织标本, 在儿茶酚胺激发波长条件下, 孔雀绿发橘红色荧光, 而醛诱发的儿茶酚胺细胞和突起发黄绿色荧光, 两者可形成鲜明的对比。其染色方法如下:

- (1) 在 40ml 乙醛酸反应液中, 加入 0.07g 孔雀绿, 完全溶解后离心, 取上清液;
- (2) 新鲜组织冰冻切片或铺片制作同前;
- (3) 将切片或铺片短暂浸入乙醛酸/孔雀绿染色液中, 约 5 秒, 拭去组织周围和载玻片背面多余的液体;
- (4) 入不含孔雀绿的乙醛酸反应液中, 不时摇动载玻片, 充分接触反应液;
- (5) 取出标本, 拭去多余液体, 并彻底吹干(约 10 分钟), 此时切片略变暗;
- (6) 滴加矿物油覆盖标本, 置预先升温至 95℃ 的烘箱中加热 3 分钟;
- (7) 将标本逐渐恢复室温, 封片, 荧光显微镜观察;
- (8) 结果: 在肾上腺髓质、小肠壁等部位可见很多含儿茶酚胺的细胞发出荧光。

6. 注意事项

- (1) 乙醛酸反应液必须临用前配制, 每次用量约 20ml;
- (2) 乙醛酸诱发荧光法对中枢和外周神经组织冰冻切片儿茶酚胺显示的较好, 而对中枢神经组织 5-羟色胺的显示不够理想, 但对胃肠 APUD 细胞的 5-羟色胺显示较好。

(三) 邻苯二醛显示组胺荧光法

组胺(HA)是一种血管活性物质和致痛物质, 存在于外周肥大细胞、嗜碱性粒细胞以及胃黏膜一些内分泌细胞的颗粒中, 也存在于中枢神经系统的一些神经元突触小泡内。

1. 原理 在一定温度和湿度下, 组织细胞内的组胺与邻苯二醛(OPT)发生聚合反应, 形成的聚合产物发出两种荧光, 一是组胺含量高时, 呈黄色荧光, 比较稳定, 最大激发波长为 405nm; 二是组胺含量低时, 呈蓝色荧光, 不稳定, 褪色较快, 最大激发波长为 365nm。

2. 操作程序

- (1) 标本制备: 新鲜组织冰冻切片或铺片, 风干后移至含 P₂O₅ 的干燥器中继续干燥 4

小时;固定的组织标本石蜡切片,脱蜡后风干;

(2) 邻苯二醛处理:将 40mg 结晶邻苯二醛加入已预热至 100℃ 的立式染色缸内,盖好,约 15 分钟后,取出染色缸,立即将干燥好的组织切片或铺片移入染色缸内 2~3 分钟;也可在室温下将 1% 邻苯二醛的乙基苯液直接滴加在切片或铺片上反应 4 分钟;

(3) 湿化:将标本移至湿盒内(但勿与水直接接触)2~4 分钟;

(4) 80℃ 烘箱中作用 5 分钟;

(5) 封片、荧光显微镜观察分析同前;

(6) 结果:含组胺较高的细胞呈黄色荧光;组胺含量较少的细胞呈蓝色荧光。

3. 注意事项

(1) 组胺含量低时,与邻苯二醛缩合反应的荧光团不稳定,荧光易淬灭,需尽快观察记录;

(2) 邻苯二醛与胰高血糖素等一些多肽的氨基末端组氨酸反应亦可形成较强荧光产物;

(3) 湿化处理较为关键,需严格控制;

(4) 对照实验:省略邻苯二醛液处理步骤,结果应为阴性。

(苏红星 周德山)

科学史话

——周期蛋白的发现

在加拿大多伦多大学工作的原日本籍学者 Yoshio Masui 教授于 1966 年利用教学年假的机会,以访问学者身份从日本来到美国耶鲁大学,加入当时生物学系主任 Clement Markert 教授的研究组。在用企鹅胚胎完成了一项研究之后, Masui 以精湛的胚胎学技能和敏锐的观察力很快证明,垂体激素和孕酮均不能直接诱导卵母细胞成熟。他推测,孕酮可能是通过作用于卵母细胞表面,诱导卵质中产生促进减数分裂因子。为证明这一论点,他首先设计了去掉卵核,再用孕酮处理这些去核的前期 I 卵母细胞,然后将这一无核的卵质转移到未成熟的卵母细胞中,结果发现,这一卵质和从成熟卵母细胞中抽提的卵质一样均能诱导胚泡破裂而导致成熟。 Masui 认为,卵母细胞在成熟过程中产生了促进卵母细胞成熟活性因子,这种活性因子被称为成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)。 Masui 的工作发表后,并没有很快引起细胞和分子生物学家的关注。然而,随着时间的推移,在 Masui 工作的启迪下,一批发育和细胞生物学家相继在海星卵母细胞、人 HeLa 细胞、酵母和小鼠卵母细胞中鉴定出成熟促进因子,并且认为成熟促进因子和促有丝分裂因子相同。该因子从酵母直到哺乳动物的真核细胞中是保守的(Minshull, 1993)。

20 世纪 80 年代初,英国剑桥大学 Timothy Hunt 教授作为蛋白质合成专家,来到美国位于 Woods hole(在马萨诸塞州)的海洋生物学实验室讲授夏季课程。在那里,丰富的海胆卵资源、装备精良的实验室和一批胚胎学家的研究成就吸引了他。1982 年 7 月 22 日,一个非常宁静的日子,纯属出于好奇, Timothy Hunt 教授作了一个简单实验。他将³⁵S

标记的蛋氨酸加入到受精的和单性发育已激活的海胆卵子,并在一定时间间隔取样,进行 SDS-PAGE 电泳,以比较受精卵和单性发育激活卵中蛋白合成的类型和速率。结果发现,当绝大多数蛋白带随着发育愈来愈强时,一个早期表现很强的蛋白带在 1 小时后消失了。这完全是预料之外的结果,但有很强的诱惑力。反复进一步实验表明,这一蛋白还可再出现和消失,其出现和消失呈现周期性,因而被命名为周期蛋白。它消失于细胞分裂前 10 分钟,当用秋水仙素或抑制 DNA 合成来抑制细胞分裂时,周期蛋白的降解则被延缓或不降解(Evans et al., 1983)。随着海胆卵母细胞中周期蛋白的发现,研究者先后在青蛤、海星、酵母、果蝇以及脊椎动物爪蟾中都发现和证实了周期蛋白的存在,并分离克隆出了周期蛋白 A 和周期蛋白 B 的基因。研究表明,这些蛋白的合成和降解与细胞周期同步,因此提示很可能是驱动细胞周期运转的动力蛋白。

与此同时,一批酵母遗传学家的工作从另一侧面敲开了细胞周期调控的大门。美国西雅图 Fred Hutchinson 癌症研究中心的 Leland Hartwell 以芽殖酵母为材料,利用遗传学方法,先后发现了上百个突变后会导致细胞周期异常的基因,其中一个被称作 *cdc28* 基因,对细胞周期的启动很关键,因此也被称为启动基因。英国伦敦皇家癌症研究基金的 Paul Nurse 博士则以另一种酵母,即裂殖酵母为实验材料,发现了功能及编码蛋白均与 *cdc28* 非常相似的基因 *cdc2*,并从高等生物中也克隆到类似的基因(Nurse, 1990),说明细胞周期的基本调节机制在进化过程中是保守的——从酵母到人,细胞周期均由 *cdc2* 这类基因控制。后来这类基因被统称为周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDK)基因。研究还发现,CDK 必须与周期蛋白(cyclin)结合形成复合体后才具有活性,从而导致细胞进入有丝分裂(Nurse, 1990)。

自成熟促进因子发现后,包括 Masui 在内的一批学者都想提纯它,但成效甚微。20 世纪 80 年代末, Masui 在加拿大的学生 Manfred Lohka 来到美国科罗拉多大学生物化学家 James Maller 的实验室从事博士后研究,他从爪蟾卵母细胞体外系统中提纯了促成熟因子(Lohka, et al, 1988)。几乎同时,一批英法学者从海星的卵母细胞体外系统中也提纯了成熟促进因子(Labbe, et al, 1989)。经过鉴定发现,成熟促进因子有两个蛋白组成,一个是 CDK,另一个是由英国学者 Timothy Hunt 等最先在海胆中发现的周期蛋白 B。至此,来自于不同领域和不同研究系统的生物学家才豁然开朗,20 年来令人广为困惑的成熟促进因子就是 CDK 和细胞周期蛋白 B 形成的复合体。是细胞周期调控的关键因子(Steinberg & Haglund, 1993)。不同领域的学者采用不同研究系统、从不同角度探讨同一问题,最终揭示一个共同谜底,这的确是科学发展史上一个协作研究的成功范例,是细胞周期调控研究的一次飞跃。此后,细胞周期调控研究的热潮陡然高涨。在短短的几年内,不但发现和克隆了一系列在不同时期推动细胞周期运转的因子,揭示出大量在细胞周期不同时相调控细胞周期运转的蛋白激酶(Doree & Galas, 1994),鉴定出调节这些激酶和因子的内源信号和外源信号,而且找到了一系列在不同时期阻止细胞周期运转的抑制因子和这些抑制因子与细胞癌变的关系。基于 Leland Hartwell, Paul Nurse 和 Timothy Hunt 在细胞周期调控方面的卓越贡献,他们三位共享了 2001 年度诺贝尔生理学 and 医学奖。

(周 莉)

参 考 文 献

1. Minshull J. Cyclin synthesis; who needs it? *BioEssays*, 1993, 15(3):149-155.
2. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983, 33(2):389-396.
3. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 1990, 344(6266):503-508.
4. Lohka MJ, Masui Y. Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes by amphibian ooplasmic components. *Science*, 1988, 220(4598):719-721.
5. Labbe JC, Picard A, Peaucellier G, et al. Purification of MPF from starfish; identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell*, 1989, 57(2):253-263.
6. Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J*, 1994, 8(14):1114-1121.

数字图书馆
PDG

第四章 免疫组织化学技术

应用免疫学及组织化学原理,对组织切片或细胞标本中的某些多肽和蛋白质等大分子物质进行原位定性、定位或定量研究的技术称为免疫组织化学技术(immunohistochemistry)或免疫细胞化学技术(immunocytochemistry)。抗原与抗体之间的结合具有高度特异性,免疫组织化学技术正是利用这一特性,首先将组织或细胞中的被检多肽或蛋白质提取出来,以其作为抗原或半抗原免疫小鼠等实验动物,制备特异性抗体,即第一抗体;其次,为显示抗原抗体反应部位,要对抗体进行标记,如果借助于组织化学方法利用酶标记抗体,其中酶又催化底物形成有色沉淀,在显微镜下观察显色部位,称为免疫酶组织化学;用荧光染料作为标记物标记抗体,在荧光显微镜下观察抗原抗体反应部位,称为免疫荧光组织化学;用胶体金作为标记物标记抗体,通过胶体金颗粒形成的高电子密度,在光镜或电镜下观察组织或细胞内的抗原抗体反应部位,称为免疫胶体金组织化学;为增加免疫组织化学检测的敏感度,利用某些物质间具有高度亲和力的特点,在免疫组织化学方法中建立有效的抗原信号放大系统,故产生了亲和免疫组织化学。总之,依据不同的标记物和不同种类的放大系统可把免疫组织化学技术分为不同类型。由于在生物医学研究中最常用的是亲和免疫组织化学和免疫荧光组织化学,因此,我们在这一章中着重介绍这两种类型。免疫组织化学方法特异性强,敏感度高,应用广泛,凡是组织或细胞中能作为抗原或半抗原的物质,如蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、磷脂、受体、酶、激素、核酸及病原体等都可利用相应的特异性抗体进行检测,因此成为生物医学各学科领域的重要研究手段。

第一节 免疫组织化学基本原理

免疫组织化学方法种类繁多,无论何种方法均涉及标记物是否直接与待检抗原的特异性抗体结合。由于直接或间接与特异性抗体结合后的抗原信号放大效率不同,因此产生了抗原检测的不同敏感性(图 4-1)。

一、直接法

直接法用酶或其他标记物标记的特异性抗体直接与标本中的相应抗原结合,再与酶的底物作用产生有色产物,沉积在抗原抗体反应的部位,即可对抗原进行定性、定位以至定量研究。直接法简便、快速且特异性强,非特异性背景反应低;其缺点是每种抗原必须分别用酶标记的特异性抗体,故很难获得各种市售标记特异性抗体。直接法敏感性较低,对组织或细胞内抗原量少的样品,难以达到检测目的。

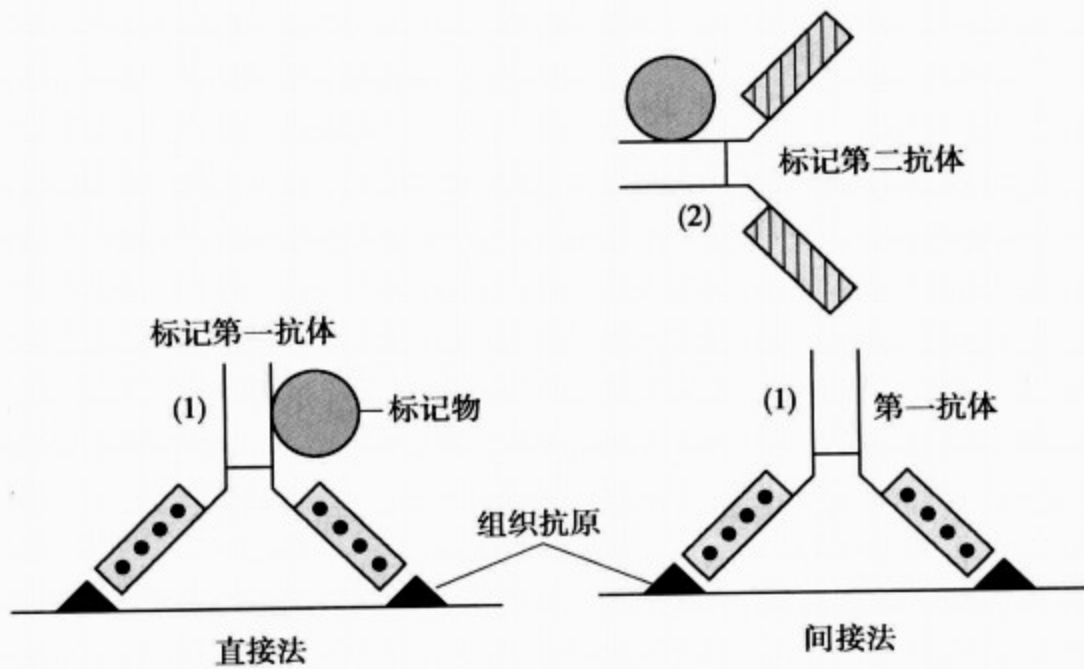


图 4-1 免疫组织化学直接法与间接法示意图

二、间接法

第一抗体不标记,使用与第一抗体种属相同的抗体 Fc 段(有种属特异性)作为抗原免疫动物,制备抗抗体,即第二抗体,并标记第二抗体。例如,第一次使用的特异性抗体(一抗)是由家兔产生,则第二次使用的抗体(二抗)用酶标记或其他标记物标记抗兔的免疫球蛋白(常用酶标记羊抗兔 IgG)。染色时,顺次以第一抗体和标记的第二抗体处理标本,在抗原存在部位形成抗原—第一抗体—标记的第二抗体复合物,以达到检测该抗原的目的。间接法因第二抗体的放大作用,敏感性大大提高。

三、亲和免疫组织化学

亲和免疫组织化学是从酶桥法和过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物法(peroxidase-anti-peroxidase complex method, PAP)发展而来。酶桥法的基本原理是将酶免疫动物,制备高效价且特异性强的抗酶抗体,然后用第二抗体作为桥,将抗酶抗体和特异性第一抗体(即连接在组织抗原上的抗体)连接起来,再将酶结合在抗酶抗体上,经过酶催化底物显色,从而显示出抗原所在的部位及含量。作为桥的第二抗体(即桥抗)必须对特异性抗体(一抗)和抗酶抗体均有特异性,这样才能将两者相连起来,因此,一抗和抗酶抗体应由同一种属动物产生。例如,特异性抗体和抗酶抗体均由兔产生,再用羊抗兔 IgG 作为桥抗将两者连接起来。PAP 法的基本原理与酶桥法相似,均是利用桥抗将酶连接在第一抗体结合的部位,所不同的是,先将酶(过氧化物酶)和抗酶(过氧化物酶)抗体(PAP)制成复合物,以代替酶桥法中的抗酶抗体和随后结合的酶,将两步合并为一步。这一重要的改进,不仅简化了操作步骤,而且大大提高了敏感性。PAP 法的不足之处是反应步骤多,需时长,在实际操作中,会带来非特异性放大效应。亲和免疫组织化学结合了免疫酶组织化学在待检抗原部位形成有色沉淀和亲和组织化学能产生有效抗原信号放大系统的特点,使其敏感性大大增加,操作过程省时,背景清晰,因而成为目前应用最广的免疫组织化学方法。

(一) 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法

亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法 (avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC 法) 的特点是将亲和素作为“桥”与生物素化的抗体和生物素结合的酶连接起来,使抗原与抗体反应信号放大,以增加敏感性。由于该法是以物质对某种组织成分具有高度亲和力为基础,一方面区别于古老的组织化学分解、置换、氧化和还原反应,另一方面本质上又是非抗原抗体反应,因此, Bayer(1976年)首次称之为亲和组织化学 (affinity histochemistry)。

1. 原理 生物素 (biotin) 为含硫的杂环单羧酸,分子量小,通过其羧基与蛋白质的氨基结合,从而可标记抗体和酶。亲和素 (avidin) 又称抗生物素蛋白,是一种糖蛋白,在鸡蛋白中被发现,分子量为 68 000。生物素与亲和素有很高的亲和力,1 个亲和素分子上有 4 个生物素结合位点。在 ABC 法中,不对特异性第一抗体进行标记,而用生物素标记第二抗体,染色前按一定比例将亲和素与生物素标记的过氧化物酶混合,制成 ABC 复合物,并使亲和素分子上至少空出 1 个生物素结合位点。染色时,标本中的抗原先与第一抗体结合,后者再与生物素标记的第二抗体结合,然后加入 ABC 复合物,结合到第二抗体的生物素上,最终形成的复合物网络了大量的酶分子,因此,敏感性更高。目前常用的亲和素从链霉菌 (streptomyces) 培养物中提取,因此称为链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术 (streptavidin-biotin-peroxidase complex method, SABC 法) (图 4-2)。

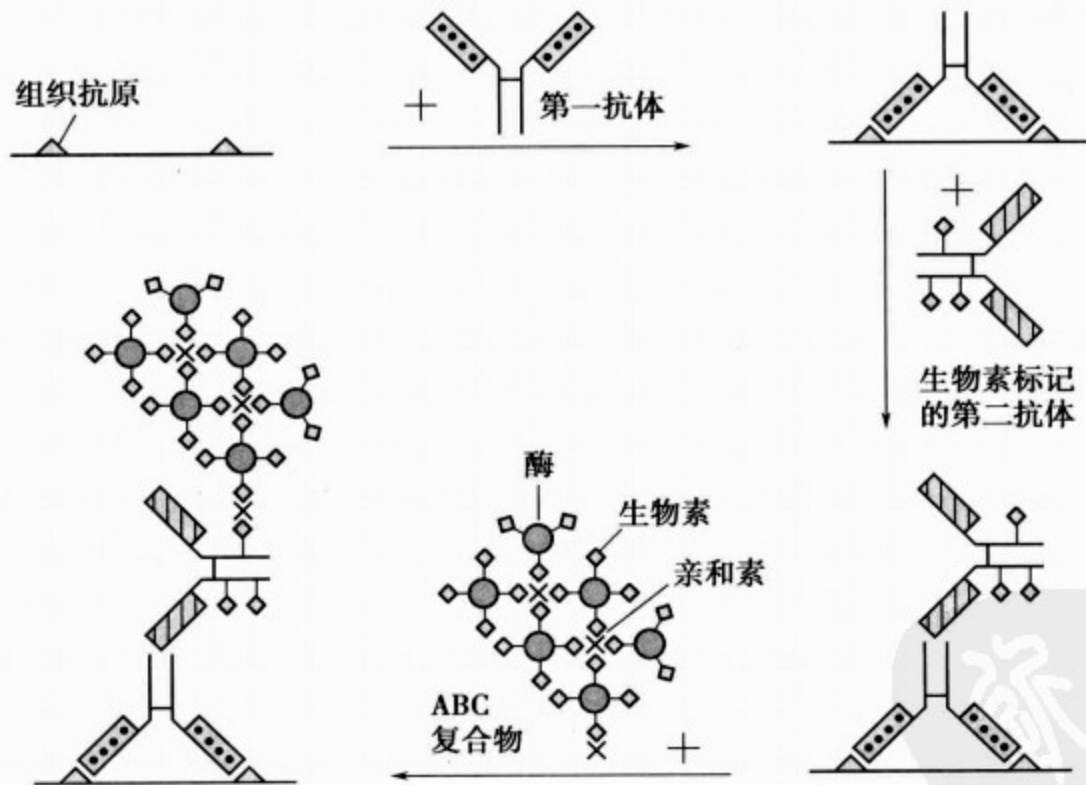


图 4-2 免疫组织化学 SABC 法原理示意图

2. 免疫组织化学酶类标记物 作为免疫酶组织化学标记物的酶以共价键的形式结合在抗体上,制成酶标抗体(SABC法是链霉亲和素-生物素与酶结合),再借助酶对底物的特异催化作用,生成有色不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒,光镜或电镜下进行细胞表面或细胞内部各种抗原成分的定性和定位研究。从理论上讲,用细胞化学方法能显示的酶均可用于免疫酶组织化学标记物,但实际上能用于免疫组织化学技术的酶并不多。一般来讲,

用于标记的酶应具备以下性质:

(1) 酶催化的底物必须是特异的,而且容易被显示,即催化反应所形成的产物易于在光镜和电镜下观察;

(2) 酶反应形成的终产物必须是稳定的沉淀,即终产物不能从酶活性部位向周围组织弥散而影响组织学定位;

(3) 较易获得纯的酶分子;

(4) 中性 pH 值时,酶分子应稳定;

(5) 在酶标过程中,酶连接在抗体上,不影响两者的活性。

符合上述要求的最为常用的酶是辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)。HRP 存在于植物辣根中,由无色酶蛋白和深棕色的铁卟啉结合成一种糖蛋白,分子量约 40kD,稳定性好,其底物为过氧化物和供氢体,前者常用过氧化氢和过氧化氢尿素,后者常用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)。DAB 是无色还原型染料,能被氧化生成不溶于水且不易褪色的棕色氧化性染料。AP 是磷酸酯的水解酶,可通过靛蓝四唑反应显色。靛蓝四唑反应底物为溴氯羟吲哚磷酸盐(BCIP),经酶水解并氧化形成靛蓝,而硝基蓝四唑(NBT)在氧化过程中被还原成不溶性紫蓝色沉淀。辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶在 SABC 法染色前均可与亲和素-生物素分别制成链霉亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物(SABC-POD)和链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物(SABC-AP)复合物。

(二) 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法

ABC 法虽然是一种很好的方法,但是在实际应用过程中,确实也存在许多问题,如亲和素中含有约 7% 的糖类,它可与组织中含糖基的物质起反应,造成背景着色。亲和素的等电点约为 10 左右,可带较多的负电荷,纤维组织可带较多的正电荷,这两种电荷可互相吸引,造成背景着色。亲和素中有 4 个结合点,其中一半与连接抗体结合,另一半与复合物结合,如此可降低其敏感性。为解决和克服存在的问题,20 世纪 90 年代初提出了用链霉亲和素(streptavidin)替代 ABC 法中的亲和素-生物素复合物(图 4-3),形成链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin-peroxidase method, SP 法)。链霉亲和素是从链霉菌中分离出的一种蛋白,含有四个亚基,每个亚基均具有与生物素亲和力极高的结合点。链霉亲和素的四个亚基可以全部和二抗上的生物素结合,故又称链霉菌抗生物素蛋白,它对组织穿透性强,反应速度快。链霉亲和素的等电点为 5.5~6.7,接近中性,所带的负电荷少,不容易与组织中的正电荷发生相互吸引,因而可降低背景着色。此外,链霉亲和素不含糖基,不存在与组织中含糖基类物质起反应的现象。该放大系统不含生物素,可以免除由内源性生物素所造成的背景着色,因此背景清晰,无非特异性染色,阳性反应物突出,明显易辨。从某种意义上讲,SP 法比 ABC 法的敏感性至少高一倍以上。由于它的敏感性强,效果好,因此更受研究者欢迎(图 4-3)。

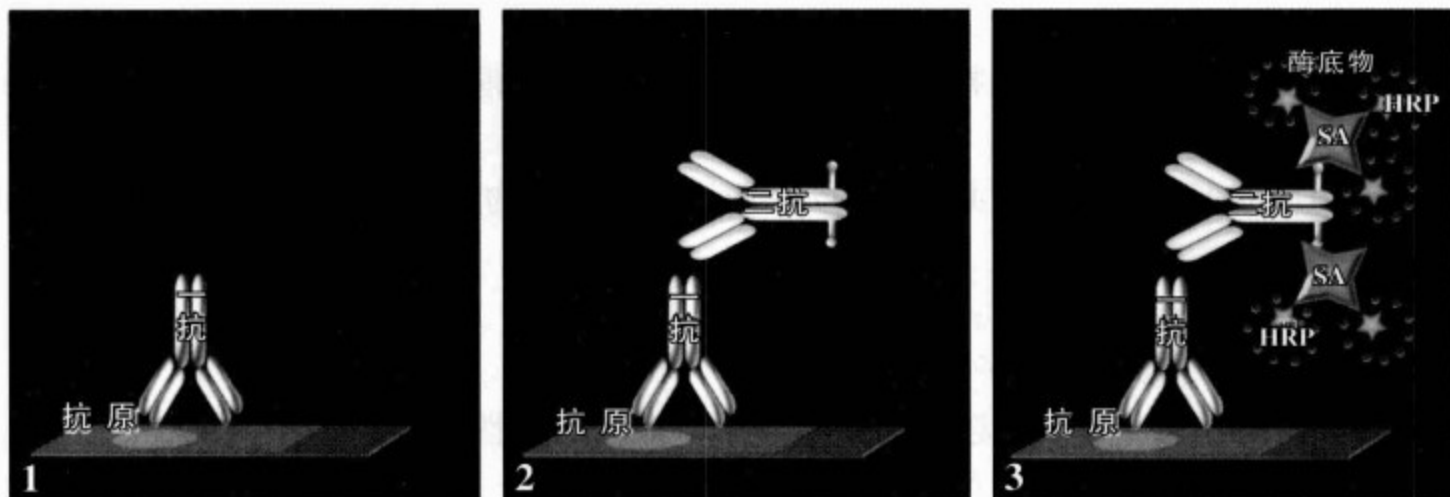


图 4-3 免疫组织化学 SP 法原理示意图 (福州迈新公司供图)

第二节 免疫组织化学染色步骤

目前,常用的免疫组织化学染色方法有 SABC 法、SP 法、SAP 法、EnVision 法和 Max-Vision 法。由于这些方法均由 SABC 法演变而来,基本步骤相同,故本节以 SABC 法为例介绍其染色步骤,其他方法仅介绍与 SABC 法的不同。

一、SABC 法免疫组织化学染色步骤

(一) 石蜡切片免疫组织化学染色

1. 烤片 烤片的目的是将带有蜡的组织切片牢固地黏在载玻片上,以免染色过程中切片脱落。切片在 56~60℃ 的恒温箱中至少放置 1 小时才能达到此目的,但是,通常的烤片温度为 58~60℃,时间为 2~6 小时。由于高温干燥可加速组织中抗原的氧化,因此高温烤片对抗原有破坏作用。

2. 脱蜡和水化 分别在二甲苯 I、II 中浸泡 15~30 分钟,以脱掉组织中的蜡。但是,进入组织中的二甲苯不能与水溶性染色液相溶,故需进一步通过下行梯度乙醇把组织中的二甲苯逐步替代出来。切片在 100% 乙醇 I、II 中分别浸泡 5 分钟,95%、90%、80% 和 70% 乙醇中分别浸泡 2 分钟,PBS 漂洗 3 次,每次 3 分钟,置蒸馏水中待用。

3. 抗原修复 由于石蜡切片标本多数使用甲醛固定,甲醛在组织中所形成的醛键、羧甲基等封闭了部分抗原决定簇,或由于蛋白分子之间的交联而使抗原决定簇隐蔽,因此在染色前有些抗原需要先进行抗原修复或暴露,才能使组织中的抗原抗体充分结合,出现理想的染色结果。至于哪种抗原需要进行修复,需在建立染色程序时确定。常用的方法有加热抗原修复法和酶消化法两种。经大量试验验证,加热抗原修复法优于酶消化法,其机制目前仍不清楚,可能是加热打开了组织抗原因甲醛固定所引起的抗原决定簇的交联,因此使免疫组织化学染色的敏感度大幅度提高。

(1) 加热修复法:加热修复法分为高压加热修复法和微波修复法两种:①高压加热修复法:取一定量枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)于高压锅中,大火加热直至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于不锈钢或耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中。盖上锅盖,扣紧压力

阀,继续加热至喷汽,从喷汽开始计时,1~2 分钟后,高压锅离开热源,冷却至室温(稍冷后,可在自来水笼头下加速冷却),取出玻片,先用蒸馏水冲洗 2 次,再用 PBS 冲洗 2 次,每次 3 分钟。注意加热时间长短的控制很重要,从组织切片放入缓冲液到高压锅离开火源的总时间控制在 5~8 分钟为好,时间过长可能会使染色背景加深。缓冲液的量必须保证能浸泡到所有切片,用过的枸橼酸缓冲液不能反复使用。②微波修复法:取一定量 pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液(缓冲液量不得小于 500ml),于微波盒中,微波加热直至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中高档微波继续处理 15~20 分钟,取出微波盒冷却至室温,从缓冲液中取出玻片,先用蒸馏水冲洗 2 次,之后用 PBS 冲洗 2 次,每次 3 分钟。

(2) 胰蛋白酶消化修复法:主要用于细胞内抗原的显示。使用 0.1%氯化钙液(pH 7.8)制成 0.1%胰蛋白酶液,37℃ 孵育切片 15~30 分钟,之后用 PBS 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

(3) 胃蛋白酶消化修复方法:主要用于细胞间质抗原的显示。一般使用浓度为 0.4%,消化时间为 37℃,30~180 分钟。

4. 细胞膜打孔 切片置于 0.1%~0.3% Triton X-100 中,室温浸泡 25 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。Triton X-100 为去污剂,其脂溶性可使细胞膜穿孔,增加细胞膜对抗体的渗透性。检测细胞膜抗原时可免去此步骤。

5. 灭活内源性酶及封闭内源性生物素 在生物体组织内均含有一定量的内源性酶和内源性生物素,如富含血细胞的组织标本有大量具有活性的过氧化物酶,肝、脾、肾、脑及胚胎组织中富含生物素。如采用过氧化物酶检测系统或碱性磷酸酶和 NBT/BCIP 显色系统进行免疫组织化学染色时,酶的作用是催化底物,使显色剂显色,而组织中的内源性酶同样也能催化底物,使其显色,这就影响免疫组织化学染色的特异性。在使用亲和素试剂的免疫组织化学染色中,内源性生物素易结合亲和素,形成亲和素-生物素复合物,导致假阳性。所以在染色之前应设法将组织内的内源性酶灭活或将内源性生物素封闭,以保证染色的特异性。

(1) 灭活内源性过氧化物酶:将组织在 3%甲醇-H₂O₂ (3ml 纯甲醇中加入 30% H₂O₂ 0.3ml,现用现配)中室温浸泡 10 分钟,继而用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。

(2) 灭活碱性磷酸酶:最常用的方法是将左旋咪唑(以每毫升加 24mg)加入底物液中并保持 pH 为 7.6~8.2,可除去大部分内源性碱性磷酸酶,对于仍能干扰染色的酸性磷酸酶可用 0.05mol/L 酒石酸抑制。

(3) 封闭内源性生物素:将组织切片用 0.01%亲和素溶液室温处理 10~20 分钟,使其结合位点饱和,以消除内源性生物素的活性。也可购买生物素阻断剂试剂盒,其中 A 液为亲和素,B 液为生物素。使用时加 A 液 1 滴,室温 10 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 2 分钟;加 B 液 1 滴,室温 10 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 2 分钟。

6. 非免疫血清封闭 抗体能被组织切片中富有电荷的胶原和结缔组织成分吸附,从而导致背景着色,为了防止这种现象发生,最好在特异性抗体处理切片之前,选择与二抗种属相同的非免疫血清封闭电荷,阻止一抗与之结合,抑制非特异性背景着色。常用方法是用 2%~10%羊血清或 2%~5%牛血清白蛋白在室温下作用 10~30 分钟。但应注意此种结

合不牢固,所以最好不要冲洗,倾去余液直接加一抗。SABC 或 SP 免疫组织化学试剂盒中常配有非免疫血清。

7. 第一抗体孵育 滴加特异性一抗于切片上,4℃孵育 24~48 小时,或室温孵育过夜,也可在 37℃孵育 1~2 小时。之后,用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。一抗分为多克隆抗体和单克隆抗体。多克隆抗体的抗原专一性较差,非特异性反应较明显,效价不太稳定。但多克隆抗体制备简便,价格低廉,抗体效价较高,稀释度一般在 1:100~1000 之间,高者可达 1:数万。利用单克隆抗体制备技术制备的单克隆抗体特异性强,无交叉反应,质量和效价稳定,非特异性反应较少,标记结果可靠,在应用中有更多的优越性。但单克隆抗体制备复杂,价格昂贵,抗体效价较低,稀释度在 1:50~100。抗体的选择是开展免疫组化染色最重要环节之一。市场销售的一抗大部分来源于国外,生产厂家各异,因此,对购入的抗体首先要进行预实验检测。试剂公司在销售抗体时附有说明书,包括抗体的来源、免疫球蛋白的亚类、单抗或多抗、使用稀释度、使用流程和注意事项、洗涤时缓冲液的适宜离子强度和 pH 值等。市场销售的一抗分为即用型和浓缩型两种,对前者抗体的效价无需摸索,但对于浓缩型一抗,则应摸索出最佳的工作效价,抗体浓度过高或过低都将可能出现阴性结果,应该以一个适当的稀释度得到最佳的抗原染色强度和最低的背景着色。稀释特异性抗体常用含 1%~3%非免疫血清的 PBS,需现配现用,稀释后的一抗存放时间不可超过三天。

8. 生物素标记第二抗体孵育 滴加稀释度合适(按说明书推荐的稀释度或预实验摸索)的生物素标记二抗于切片上,室温孵育 0.5~1 小时,继而 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。二抗有抗鼠、抗兔和抗羊等之分,特异性要与一抗匹配,否则,一抗和二抗连接有误可导致假阴性染色结果。例如,兔抗鼠或人的一抗需与抗兔的二抗匹配,小鼠抗大鼠或人的一抗需与抗小鼠的二抗匹配。目前,生物素化二抗多以即用型形式存在于 SABC 或 SP 免疫组织化学试剂盒中,故无需考虑其浓度。

9. SABC-POD 或 SABC-AP 孵育 滴加稀释度合适(按说明书推荐的稀释度或预实验摸索)的 SABC-POD 或 SABC-AP 于切片上,室温孵育 10~30 分钟,随后 PBS 漂洗 4 次,每次 5 分钟。SABC 或 SP 试剂盒中的即用型试剂无需稀释。

10. 显色 显色是免疫组化染色的最后关键步骤,一般过氧化物酶的检测系统选用 DAB 或 AEC 显色。前者显色为棕色,后者为红色。要得到最佳的显色效果,必须在镜下严格控制,以检出物达到最强显色效果而背景无色为终止点。根据经验,DAB 在配制后最长放置时间是 30 分钟以内,过时则不能使用,DAB 滴加到组织切片时作用时间最长不宜超过 10 分钟(最好在 5 分钟内),否则不管有无阳性结果均应终止反应。对一些富含内源性酶的组织用 DAB 显色时极易出现背景色,应尽可能在镜下控制,以达到最佳分辨效果。DAB 有致癌作用,故操作时应戴手套,尽量避免与皮肤接触,用后及时洗手,接触 DAB 的实验用品最好经洗液浸泡 24 小时后方能再次使用。AEC 显色系统的弊端是易溶于有机溶剂,所以封片时应以水性封片剂为主,故染色切片不能长期保存。免疫酶染色时,酶底物浓度的增加或孵育时间的延长,均可增强染色强度。过氧化物酶显色时, H_2O_2 浓度较大使显色反应过快而致背景加深,且过量 H_2O_2 能抑制酶的活性,故 H_2O_2 浓度要适中(DAB 和 AEC 显色液配制方法见附录一)。

如果上述步骤使用链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物,则需选用 NBT/BCIP 作为

显色系统,阳性结果为蓝黑色。显色后蒸馏水或自来水冲洗。采用碱性磷酸酶作为标记物底物时,染色过程中的缓冲液用 0.02mol/L TBS(pH 8.2)较好。

11. 苏木精复染细胞核 为使组织切片清晰的显示组织结构,便于准确定位,常对切片进行复染。最常使用的细胞核染料为苏木精,也可根据情况使用甲基绿和核快红。染色约 10 秒,镜下控制着色程度,效果好时自来水冲洗返蓝。

12. 封片 如果选用 DAB 显色,则切片经过梯度乙醇脱水(80%乙醇 2 分钟,95%乙醇 2 分钟),乙醇 I 和 100%乙醇 II 各 5 分钟,二甲苯 I 和 II 各透明 5 分钟,最后中性树脂封固(图 4-4);如果选用 AEC 显色,则切片不能经乙醇脱水,冲洗后拭干直接用水性封片剂封片(图 4-5)。

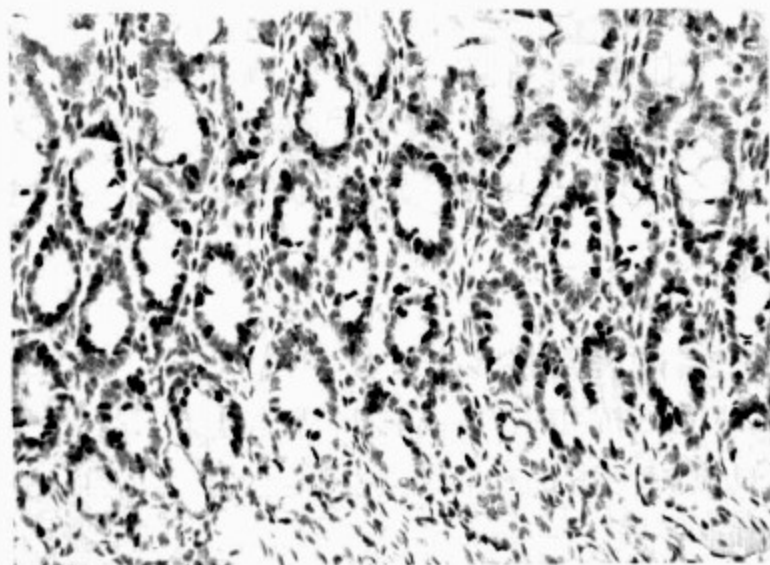


图 4-4 SABC 法染色,DAB 显色
大鼠小肠腺细胞核呈棕色为 BrdU
免疫反应阳性(周莉供图)

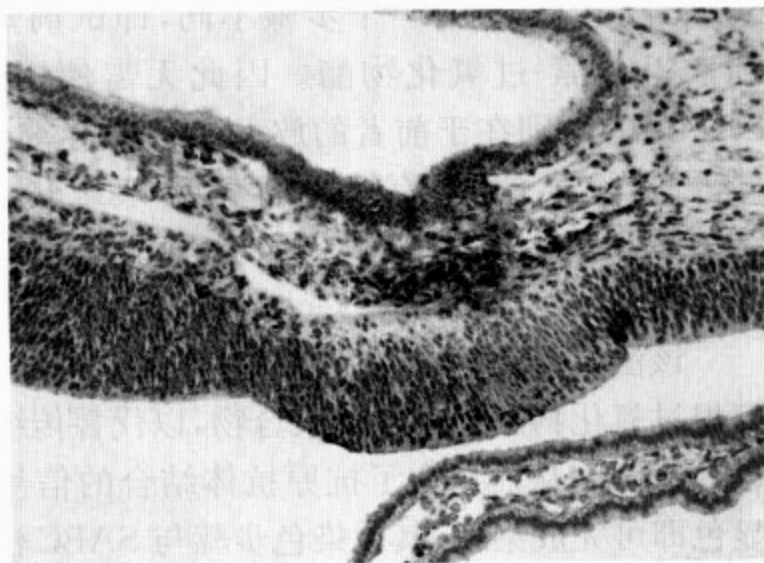


图 4-5 SABC 法,AEC 显色
胚胎 14 天大鼠第三脑室周围和室管膜细胞质呈红色
为乙酰胆碱转移酶免疫反应阳性(周莉供图)

(二) 冰冻切片免疫组织化学染色

1. 新鲜组织或在 -80°C 保存的组织用恒冷箱冰冻切片机制片,厚度为 $10\sim 40\mu\text{m}$;

2. 将切片裱于载玻片上,立即用电吹风吹干或室温放置 30 分钟,如不能及时染色,密封后 -20°C 保存;

3. 染色前组织切片用冷丙酮 4°C 固定 10~20 分钟,PBS 洗 2 次,每次 5 分钟;

4. 必要时应用 0.1% 枸橼酸钠与 0.1% Triton X-100 的混合液将细胞膜打孔。

其余步骤同石蜡切片。

(三) 培养细胞免疫细胞化学染色

1. 固定 取出细胞爬片,预热 PBS 冲洗,迅速置入 4% 多聚甲醛或冷丙酮室温固

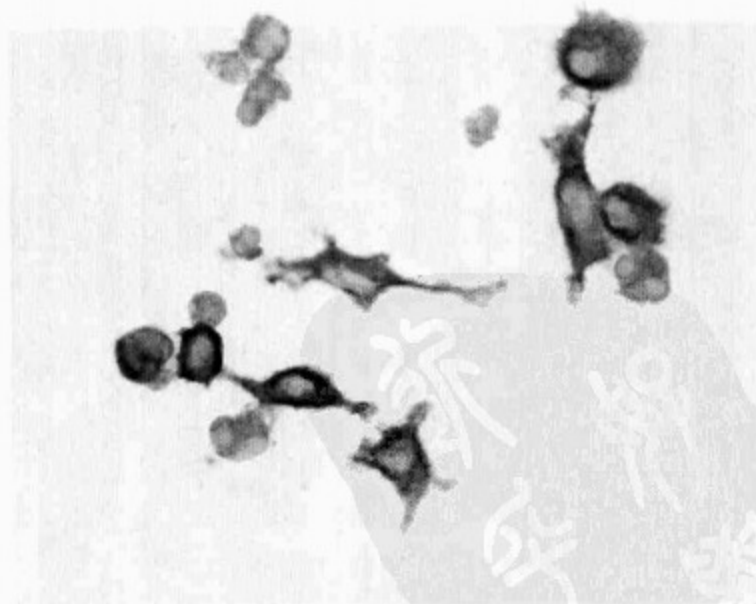


图 4-6 培养细胞 SABC 法染色
原代培养胚胎 14 天大鼠端脑细胞,可见乙酰胆碱转移酶免疫反应阳性细胞质呈红色(AEC 显色,周莉供图)

定 10~20 分钟;

2. 晾干(易脱片的组织细胞晾干时间可在 2 小时以上),PBS 冲洗 2 次,每次 5 分钟;

3. 细胞打孔 0.3% Triton X-100 浸泡 15~20 分钟(细胞膜抗体可省略此步骤)。

其余步骤同石蜡切片(图 4-6)。

二、SABC 法与其他免疫组织化学染色方法比较

(一) SP 法或 SAP 法

该法由于用链霉亲和素替代 ABC 法中的亲和素-生物素复合物,因此背景清晰,敏感性增加,无非特异性染色,阳性反应易于辨认。是目前最常用的方法。在操作步骤中,与 SABC 法相比,仅有一个步骤不同,即试剂盒中的链霉菌抗生物素-过氧化物酶替代了亲和素-生物素-过氧化物酶。因此无需使用生物素阻断剂消除内源性生物素。SP 法与 SAP 法的区别在于前者的放大系统为链霉亲和素-过氧化物酶,后者是链霉亲和素-碱性磷酸酶,故导致两者所用的显色系统也不同。SP 法与 SAP 法的其他染色步骤同 SABC 法。

(二) EnVision TM systems

该法是近几年在国内推广使用的一种方法,它的原理是将多个抗鼠和抗兔 IgG 分子与辣根过氧化物酶结合形成聚合物,以代替传统方法的二抗和三抗,直接与特异性第一抗体结合(图 4-7),从而放大了抗原抗体结合的信号,使检测变得简单而且敏感性增加。经 DAB 显色即可完成染色,其他染色步骤与 SABC 法相同。

(三) MaxVision 法

该法是根据聚合物技术把过氧化物酶与抗鼠和(或)抗兔 IgG 分子结合在多聚肽上形成多聚物分子(图 4-8),可以避免由于生物素引起的非特异性背景显色,其他染色步骤与 SABC 法相同,故适合于生物素含量较高的组织细胞的免疫组织化学实验。

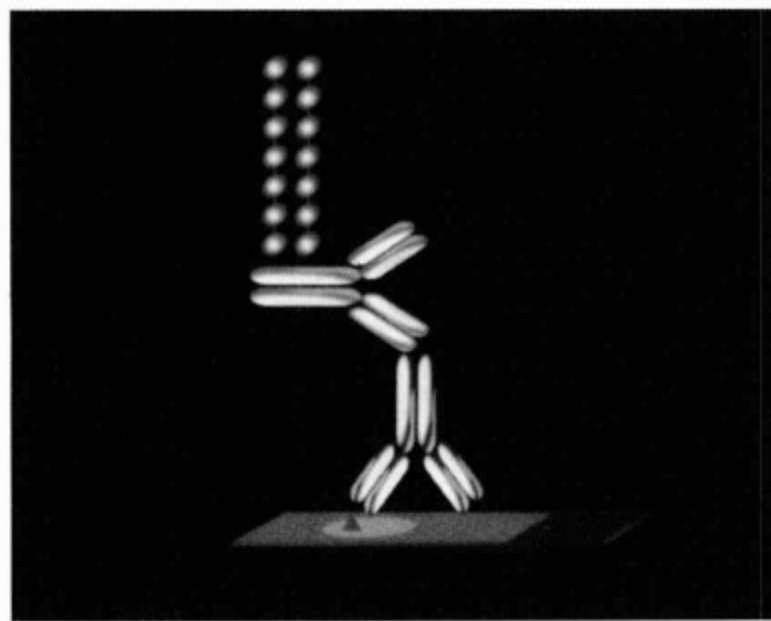


图 4-7 EnVision TM Systems 原理示意图
(福州迈新公司供图)

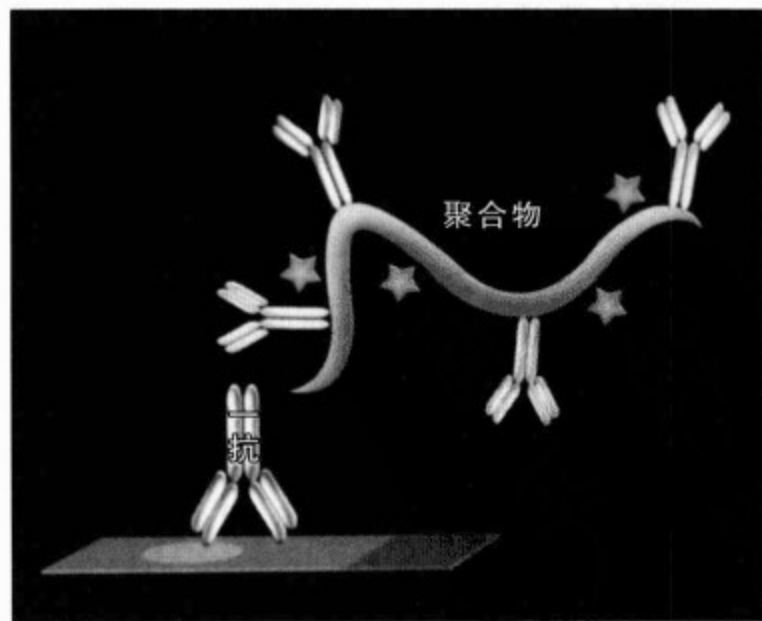


图 4-8 MaxVision 法原理示意图
(福州迈新公司供图)

三、免疫组织化学染色结果评价

对免疫组织化学染色所得结果的判断要持科学态度,根据对照实验准确判断阳性和阴性结果,排除假阳性和假阴性结果。为使实验结果准确无误,应多次重复进行实验,最后得出科学的结论。为达此目的,首先应学会区别特异性和非特异性染色结果。非特异性染色的特点是:细胞和间质染色无区别或间质染色更强;染色无特定部位,无结构性;染色无分布规律,某一部位均匀着色;染色出现在切片的干燥部位、边缘、刀痕或组织折叠处。排除非特异性染色之后,应确定特异性染色在组织细胞中的部位和程度,并且考虑是否有必要进行半定量测定。

(一) 以抗原表达模式定位

1. 细胞质内弥散性分布,多数免疫组织化学染色为胞质型阳性反应,如细胞角蛋白(Cytokeratin,CK)和波形蛋白(Vimentin)等(图 4-9)。

2. 细胞核周边胞质内分布,其判别要点是细胞核轮廓被勾画得很清楚,如 CD3 多克隆抗体的染色。

3. 胞浆内局限性点状阳性反应,如 CD15 抗体的染色。

4. 细胞膜线性阳性反应,大多数淋巴细胞标志物的染色均如此,如 CD20。

5. 细胞核阳性反应,如 BrdU(图 4-4)、Ki-67 及雌、孕激素受体蛋白等。

有些抗原的阳性表达可同时出现在细胞的不同部位,如细胞质和细胞膜等。

(二) 阳性染色结果定量

1. 计算免疫反应阳性细胞数 方法是选择每个样品中 10 个非重叠视野,计算每个视野中的阳性细胞与总细胞数的百分比,取平均数,连续观察和计算至少三个条件相同的样品。得出数据经统计学处理后可在计算机 Microsoft Excel 中作出柱形图,如图 4-10。

2. 另一种方法以染色阳性强度和阳性检出率相结合而定,一般阳性细胞数在 0~25 为阴性,25~50 为+,50~75 为++,75 以上为+++。此种判定方法容易出现人为误差,现已很少在论文中出现。

3. 图像分析系统检测阳性结果(详见第七章)。

四、讨论

(一) 实验计划

每次实验前应列出详细实验计划,其中包括实验目的、拟用方法、所用一抗和二抗的种类和效价、预实施的操作流程方案以及预期实验结果等。实验分组编号用玻璃笔标记在玻

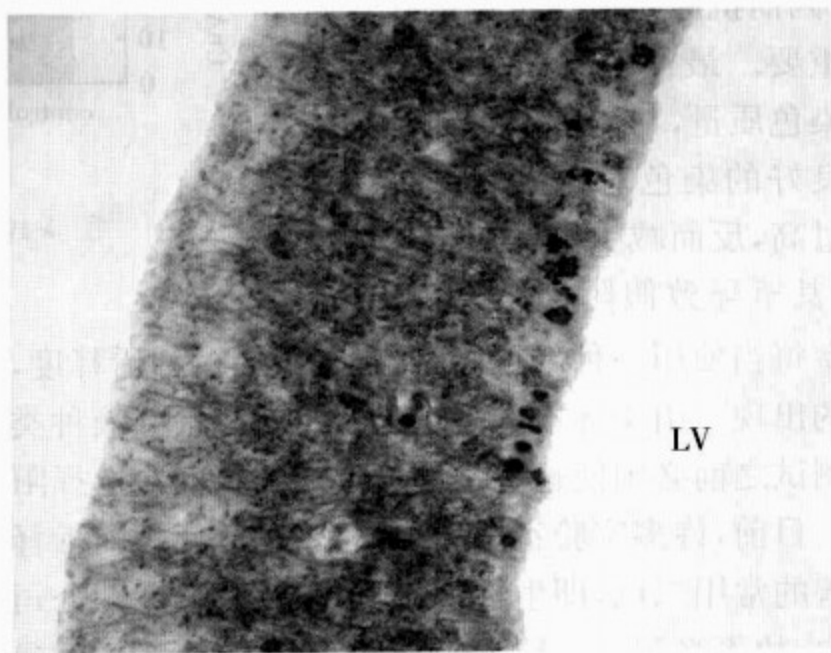


图 4-9 免疫组织化学染色(SP法,AEC显色) 胚胎 12 天大鼠端脑背侧脑室区可见波形蛋白(Vimentin)免疫反应阳性细胞,其胞体位于脑室区,一端伸出长突到达软脑膜(周莉供图)

片上,对每一抗体均应配以阳性和阴性对照。

(二) 抗体的稀释度

抗体稀释度,即抗体浓度。组织中抗原的免疫染色是通过适宜的抗体溶液系统而得以定性和定位,因而抗原与抗体浓度的比例十分重要。最佳的抗体稀释度可提高染色质量,与周围组织或细胞形成良好的染色对比。如果抗体浓度过高,反而减少抗体与抗原的结合,甚至导致假阴性结果,故各实

验室每当使用一种新抗体时,必须试用多种稀释度,从中确定最佳工作浓度,以防假阴性结果的出现。由于标本的固定、切片种类、稀释液种类和湿盒等具体条件均可影响稀释度,故在测试之前必须使这些条件稳定。稀释度应选择阳性反应着色最强、背景着色最弱的滴度。

目前,许多实验室常用浓缩型一抗,使用前稀释成工作浓度的稀释方法见表 4-1。由于市售的常用二抗,即生物素化 IgG,一般由试剂公司配成即用型,并装入免疫组织化学试剂盒内,故不必测试二抗工作浓度。

表 4-1 确定一抗最佳工作浓度方法

一抗稀释度	特异性染色强度	非特异性染色背景强度
1 : 50	++++	++
1 : 100	+++	+
1 : 200	++	-
阴性对照	-	-

从表 4-1 中可以看出,在一抗稀释度 1 : 100 和 1 : 200 之间可找出最佳稀释度。

(三) 滴加抗体注意事项

切片在血清封闭后,倾去多余血清,便可滴加第一抗体。滴加前取出玻片,用吸水纸拭去组织周围的液体,组织与细胞表面的液体要用滤纸条轻轻吸掉,但注意勿使组织干燥,尽快滴加抗体工作液 1 滴(约 50 μ l)于组织表面。由于切片周围无液体,滴加的抗体成为一个液滴,这样既可节省抗体,又可增加抗原与抗体结合的机会。如果玻片上是培养细胞,应在镜下选择一个理想的区域用免疫组织化学油笔在此区域外围画一圆圈,再滴加抗体,尔后应轻轻摇动切片数秒,以促进抗体与组织待测抗原的结合,避免假阴性小区的出现。这一操作过程虽然简单,却十分重要。加抗体时切忌加样器或吸头碰到组织或细胞,以免造成破损。

(四) 抗体的保存

1. 抗体分装 购入的浓缩型抗体,为避免反复冻融而失效,一般需要分装在多个安瓿中,根据需求量,每安瓿含 10~20 μ l。除留一支现用,其余应立即放置低温冰箱内贮存

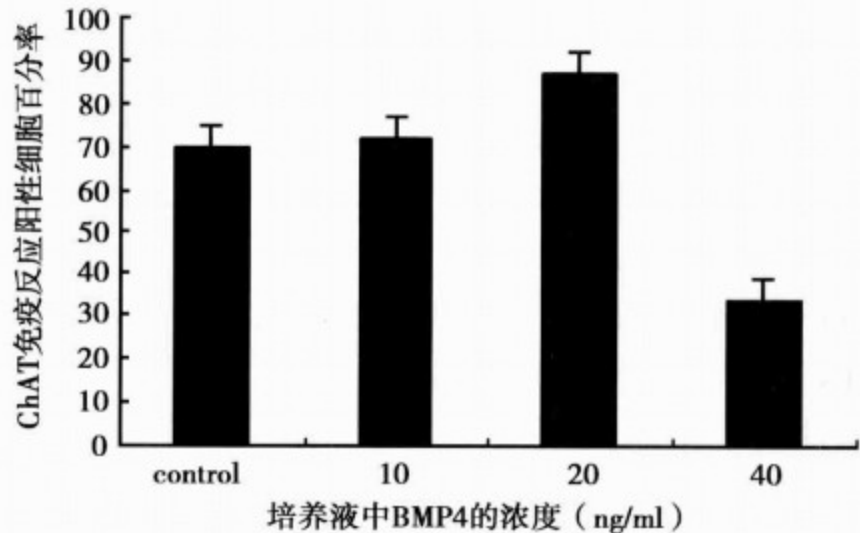


图 4-10 不同浓度 BMP4 对 ChAT 阳性免疫反应细胞数量的影响

(-20℃以下)。用时取一支,以免长期保存在4℃冰箱内失效。

2. 抗体稀释 一般按其工作浓度稀释,如1:100、1:1000等,然后用旋涡器混匀液体。剩余的抗体可保存在4℃冰箱内,尽量在1~2个月内用完,而不要放在0℃以下,否则抗体会很快结冰,反复冻融可使抗体效价急剧下降。对于抗体的稀释液,在夏天温度很高时,最好加入少许防腐剂如叠氮钠或柳硫汞等,以免在切片上作用时间超过10小时而生真菌。

3. 无菌与消毒 保持使用中的抗体无菌是困难的,但是与抗体接触的工具如滴管、吸管、试管、安瓿以及加样器等最好经过消毒,尽量减少污染的机会,否则抗体极易污染细菌与真菌,从而迅速发生浑浊沉淀而失效。

(五) 对照实验

由于影响免疫组织化学染色结果的因素甚多,染色中必须有对照实验,否则不可能正确评价染色结果。对照实验包括阴性对照、阳性对照和自身对照。在实践中可用染色组织切片中不含抗原的组织作为阴性对照,而用含抗原的正常组织作阳性对照,这种自身对照具有节约的意义。观察染色结果时,先观察对照组织的结果,如阳性对照组织中阳性细胞呈强阳性,阴性对照细胞呈阴性,内源酶阴性,背景无非特异性染色时,表明本次实验的全部试剂和全过程技术操作准确无误,待检组织中的阳性细胞具有可信性。免疫组织化学染色中对照片的设置非常重要,它是判断染色是否成功的关键依据,而且也是检测每一个抗体的质量标准。常设的对照实验如表4-2。

表4-2 对照实验方法和结果分析

对照种类	靶组织	实验试剂	阳性反应意义
阳性组织对照	组织中含待测抗原	按常规操作流程	提示操作系统的试剂和操作方法无误
一抗阴性对照	组织中待测抗原未定	用与第一抗体相同种属正常血清取代一抗和用PBS取代一抗,其余步骤不变	提示有非特异性反应存在
二抗阴性对照	组织中待测抗原未定	用与第二抗体相同种属正常血清取代二抗和用PBS取代二抗,其余步骤不变	提示一抗对组织有非特异性吸附或组织内未灭活内源性酶

(六) 免疫组织化学技术应用的基本原则

免疫组织化学染色在生物医学研究中具有十分广泛的作用,并且涉及许多研究领域。但是,免疫组织化学技术也有其局限性,例如,组织细胞内的待测物质要有抗原性,而且需要有一定浓度方可检出;检出的免疫反应阳性蛋白不能被确定是细胞新合成的蛋白还是通过细胞间运输而来的蛋白,因此,在实验设计中应充分考虑这些特点。如果实验需要证明已知蛋白为何种细胞合成,需采用分子原位杂交技术解决。为引导初学者在实验设计中合理巧妙地运用免疫组织化学技术,将其应用的基本原则简述如下:

1. 确定细胞类型和形态 组织细胞内有些蛋白具有组织特异性,如胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)只存在于星形胶质细胞内,神经丝蛋白(Neurofilament, NF)只存在于神经细胞内。通常把这些具有组织特异性的蛋白称为标记性蛋白(Pro-

tein maker)。通过标记性蛋白的特异性抗体可确定细胞种类。有些细胞(如表皮内朗格汉斯细胞和黑色素细胞等)在光镜下不易辨认,通过对胞质内的特定蛋白实施免疫组化染色,便能清楚显示此类细胞外形轮廓。这种作用在神经科学研究和肿瘤临床病理中显得尤为重要。

2. 辨认细胞产物的来源 利用某些细胞产物为抗原,制备相应的抗体,对组织细胞实施免疫组织化学染色,以确定细胞产物的来源。如内分泌细胞产生的各种激素,大多数可用免疫组化染色技术辨认(图 4-11),据此可研究细胞的分泌功能及对内分泌肿瘤作功能分类,检测分泌异位激素的肿瘤等,了解细胞分化程度。

3. 确定细胞的分化程度 分化程度不同的同一类细胞多表达不同的标志性蛋白,根据对这些不同蛋白的鉴定可确定细胞的分化程度。例如,神经上皮细胞的标志性蛋白是巢蛋白(nestin),当其分化为放射状胶质细胞时表达波形蛋白(vimentin),在神经元发生期分化为成神经细胞时则表达Ⅲ β -神经微管蛋白(TUJ1),成神经细胞分化为成熟的神经元时表达神经丝蛋白(neurofilament, NF)。

4. 追踪神经纤维束和它的投射区 用于此目的的免疫组织化学方法常与轴浆运输示踪法相结合来研究神经元之间的联系。轴浆运输示踪法是利用某些物质可被神经末梢摄取,经轴质逆行运输到胞体的特点,用组织化学方法显示出神经元的轮廓。常用示踪剂有辣根过氧化物酶和荧光金等。例如,为观察周围神经系统或中枢神经系统某核团神经纤维投射,先将示踪剂注射到动物神经纤维末梢部位,使动物存活一段时间,在预期神经纤维投射部位取材,先通过组织化学方法使示踪剂定位,再实施免疫组织化学方法确定其性质。

5. 在临床病理中的应用 如鉴定病变性质,发现微小病灶,探讨肿瘤起源或分化表型,确定肿瘤分期,指导治疗和预后,辅助疾病诊断和分类,寻找感染病因等。

(七) 疑难问题剖析

1. 非特异性背景染色(见表 4-3)。

表 4-3 非特异性背景染色的常见问题和解决办法

常见问题	解决办法
操作过程中漂洗不充分	每步步骤后冲洗 3 次,每次 5 分钟
加试剂后切片干燥	防止切片干燥
组织切片折叠	勿取折叠处观察染色结果
组织中所含过氧化物酶未阻断	可再配制新鲜 3% H_2O_2 封闭,孵育时间延长

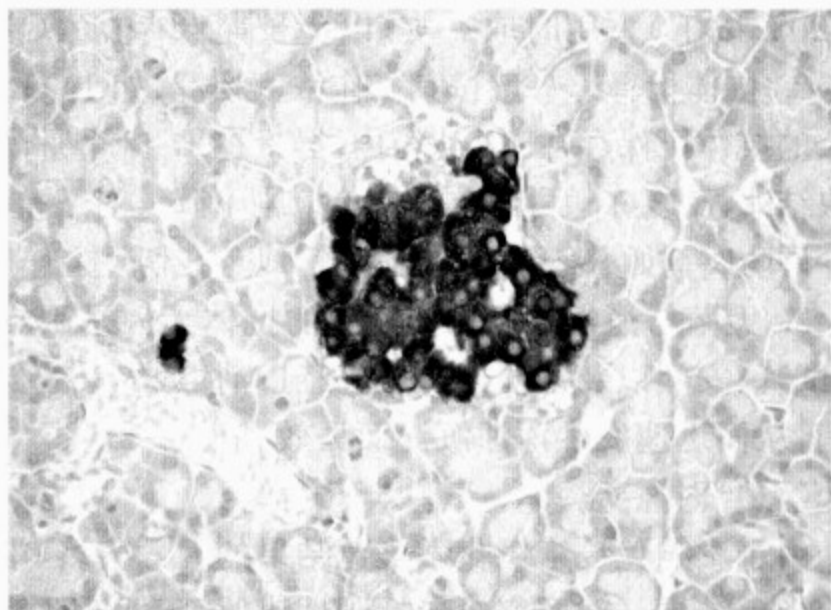


图 4-11 免疫组织化学染色(SP法,DAB显色)
大鼠胰腺胰岛内胰岛素免疫反应
阳性细胞呈棕色(周莉供图)

续表

常见问题	解决办法
组织中所含内源性生物素未封闭	使用阻断剂阻断内源性生物素
组织抗原弥散	组织及时固定,固定液要符合标准
切片黏附剂过厚	重新配制黏附剂涂片
血清蛋白封闭不充分	延长血清蛋白封闭时间或再次用 2%BSA 封闭

2. 染色过强(见表 4-4)。

表 4-4 染色过强的常见问题和解决办法

常见问题	解决办法
一抗浓度过高或抗体孵育时间过长	降低一抗浓度或缩短一抗孵育时间
孵育温度过高,超过 37℃	一般室温 20~28℃
生物素化二抗或 SABC-POD 孵育时间过长	缩短孵育时间
DAB 显色时间过长或 DAB 浓度过高	显色时间不能超过 5~10 分钟,以显微镜下观察为准

3. 染色弱(见表 4-5)。

表 4-5 染色弱的常见问题和解决办法

常见问题	解决办法
抗体浓度过低或孵育时间过短	提高抗体浓度,孵育时间不能少于 60 分钟
试剂超过有效使用期	及时更换试剂
操作中,滴加试剂时缓冲液未沥干,致使试剂稀释	每步骤滴加试剂前吸干切片中多余的缓冲液
复染或衬染太深	复染时要淡染细胞核
室温太低,低于 15℃	适当延长孵育时间
组织经固定和包埋等处理后组织抗原被破坏,残留抗原未被抗体检出	新鲜组织及时固定,防止自溶
蛋白过度封闭	封闭时间不要超过 10 分钟

4. 染色阴性(见表 4-6)。

表 4-6 染色阴性的常见问题和解决办法

常见问题	解决办法
操作步骤错误	重新实验,设立阳性对照
组织中无抗原	设立阳性对照实验,以验证实验结果
一抗与二抗种属关系错误	仔细检查一抗与二抗种属关系
试剂盒与显色系统不相匹配	使用与试剂盒相匹配的显色系统
试剂盒中一种或多种试剂活性降低	不同批号试剂盒不能混用,不能使用过期试剂盒

第三节 免疫组织化学双重染色

在生物医学和临床研究实践中,经常需要检测两种不同物质是否在同一样品中共存或同一种细胞中共存,因此出现了免疫组织化学双重染色。此方法有几种类型,包括免疫酶组织化学和免疫荧光细胞化学法结合;同一切片的再度染色法(先对第一种抗原染色,阳性部位拍照,再用酸处理使抗原抗体解离,继之,对第二种抗原染色、拍照);两种酶标抗体双重染色(分别用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶标记第二抗体,用间接法分别显示 A 和 B 抗原,如两种一抗来自同一种属,常有重叠染色);不同种属来源的抗体双重染色。目前,最常用的是最后一种方法。

不同种属来源的抗体双重染色,两种抗体间无交叉反应,特异性较高,即使细胞内抗原量很少也能检测。但是,当两种抗原存在于同一部位而其中之一浓度较高,占绝对优势时,将妨碍另一种抗原染色,此种情况应分别染色,首先染色含量较少的抗原,再显示含量丰富的抗原。在该方法中应用最多的是把 SABC 法或 SP 法的实验流程重复两次,其中两种不同特异性抗体(可以是小鼠或大鼠单克隆抗体和兔多克隆抗体的任何两个组合),与一抗对应的不同种属生物素化二抗和两种不同显色系统,即可将不同部位或相同部位的两种抗原显示出来。该方法用于石蜡切片时应考虑所选择的两个抗体的修复方法应该一致或一个抗体的修复对另一个抗体的染色结果没有影响。

SP 法双重染色步骤

1~6 步骤与 SABC 法相同,但无需使用生物素阻断剂;

7. 切片加入 A 特异性抗体(如兔抗 A 抗体),4℃ 过夜孵育后,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

8. 滴加生物素化二抗(如抗兔二抗),室温孵育切片 10 分钟,继而 PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

9. 滴加链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶,室温孵育 10 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

10. 碱性磷酸酶显色液(BCIP/NBT)显色(紫蓝色),PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

11. 滴加 0.05% 盐酸,室温 10 分钟(可避免已显色的抗原褪色);

12. 滴加抗小鼠二抗同种属的非免疫血清,37℃ 孵育 10 分钟;

13. 滴加 B 特异性抗体(如小鼠抗 B 抗体),4℃ 过夜孵育,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

14. 滴加生物素化抗小鼠二抗,室温孵育切片 10 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

15. 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育 10 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

16. 过氧化物酶显色液(AEC)显色(鲜红色),PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟;

17. 苏木精复染细胞核;

18. 水溶性封片剂封片。

注意事项

在使用 SP 法双重染色之前需要对待测抗原的性质、二抗的种属类型和显色系统进行

详细设计。购买免疫组化双染试剂盒时,应选择与设计方案相同的配套试剂。在选择一抗时应避免定位在细胞的同一部位(如胞核、胞浆和胞膜)的两种抗原,如果不可避免,最好选择免疫荧光组织细胞化学双重染色方法,因为两种不同颜色的荧光重叠后呈现另一种颜色的荧光(如红色荧光与绿色荧光重叠呈现黄色荧光),它比 SP 法的显色系统更容易区别和辨认阳性结果。

在进行双重染色之前,必须对所选择的一抗分别进行单独染色预实验,预实验条件必须与双染条件相同,在观察预实验结果和抗体定位正确后,再进行双染实验。

(周 莉)

第四节 免疫荧光组织化学技术

免疫荧光组织化学(immunofluorescence histochemistry)或免疫荧光细胞化学(immunofluorescence cytochemistry)是将荧光作为标记物的免疫组织化学技术。1942年,Coons等首次报道用异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体,检查小鼠组织切片中的可溶性肺炎球菌多糖抗原,从此开创了免疫荧光组织化学技术的先河。随着荧光标记技术和单克隆抗体技术的不断发展和激光扫描共聚焦显微镜的应用,使免疫荧光组织化学的特异性、快速性和在细胞、分子水平定位的敏感性与准确性大大提高。它可将生物样品形态、功能和代谢密切结合,在细胞、亚细胞水平原位检测抗原分子,这是其他任何生物技术难以取而代之的。故目前免疫荧光组织化学技术已成为生物学、基础医学和临床医学各学科领域常用研究方法之一。

一、荧光的基本知识

(一) 荧光

荧光(fluorescence)是某些物质被一定波长的光(如紫外光)照射后能发射出一种比激发光更长的光。光的吸收具有高度选择性,即一定能量的光量子辐射,只能被一定结构的物质分子或原子所吸收,如石英玻璃几乎不吸收可见光,但有较强的吸收红外光作用。利用物质对光吸收的高度选择性,可制成各种滤片(如荧光显微镜中的激发滤片和阻断滤片),吸收一定波长范围的光或允许特定波长的光通过(图 4-12),用来激发不同的荧光素,产生不同颜色的荧光(表 4-7)。

(二) 荧光物质的特性和种类

荧光物质(fluorescent material)又称为荧光素(fluorescein 或 luciferin)、荧光色素或荧光探针,是指能够吸收光并能在较短时间内发射荧光,而且能作为染料的化合物。荧光素通常具有芳香环结构。

1. 荧光物质的特性

(1) 荧光效率:荧光色素能发出荧光,除具备合适的能量外,还须具备高荧光效率。荧光效率(fluorescence efficiency)即荧光量子产率,是指荧光物质吸收光后发射出的荧光光子数与其所吸收激发光光子数之比。

即

$$\text{荧光效率} = \frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收光的光量子数}}$$

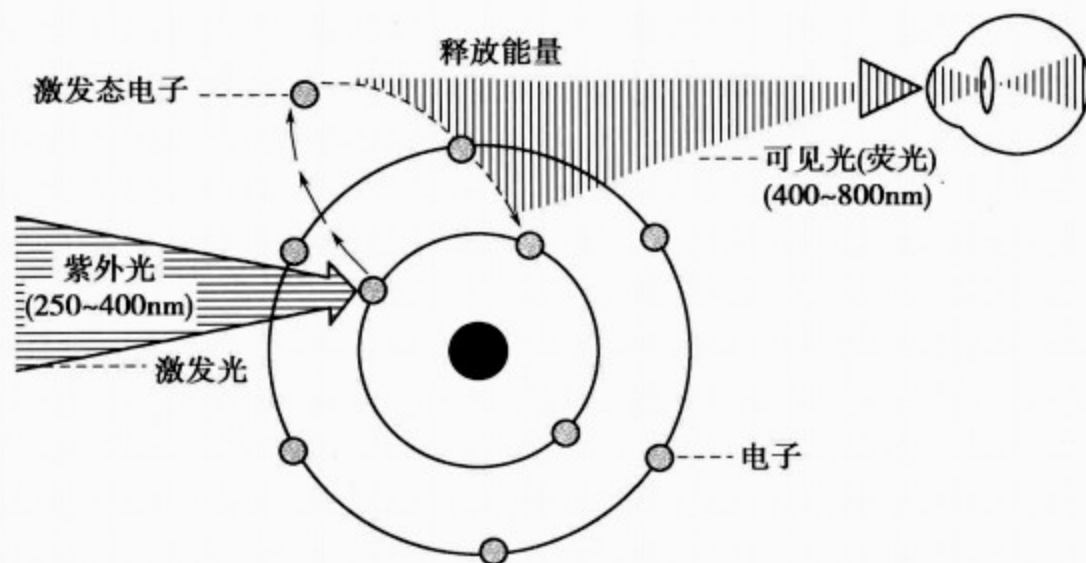


图 4-12 荧光产生示意图

表 4-7 荧光显微镜中常用光的波长与颜色的关系

光谱范围	波长范围(nm)	光谱颜色	光谱范围	波长范围(nm)	光谱颜色
紫外光区	<390	肉眼不可见		500~570	绿色
可见光区	390~430	紫色		570~600	黄色
	430~450	蓝色		600~630	橙色
	450~500	青色		630~670	红色

荧光量子产率数值反映了荧光物质将吸收的光能转化为荧光的效率,其数值越大,该物质的荧光越强,用于荧光分析的荧光物质荧光量子产率数值要求达到 0.35 以上。大部分物质没有发射荧光的性质,即使是荧光色素也不能将吸收的全部光转变为荧光,而是在发射荧光的同时,或多或少地以其他形式释放其所吸收的光能。因此,在通常情况下,荧光量子产率数值总是小于 1。

(2) 荧光强度:荧光强度(fluorescence intensity)是指荧光色素发射荧光的光量子数,决定荧光色素检测的灵敏度。在一定范围内,激发光越强,荧光也越强,即荧光强度等于吸收光强度乘以荧光效率。所以,选用适当强度的光源作为激发光源和选用适合于被检荧光物质选择性吸收的光谱滤片作为激发滤片,是提高荧光强度的根本方法。

(3) 荧光物质的吸收光谱和发射光谱:每种荧光物质的吸收光不仅有一定波长,而且在各波长上的吸收量也不同,从而构成特殊的吸收光谱曲线;发射荧光的情况也是如此。因此,荧光物质在一定条件下有一定的吸收光谱(激发光谱)和发射光谱(荧光光谱),如吖啶橙的吸收光谱(最大吸收波长)是 455nm,其发射波长光谱为 450~700nm。因此,吖啶橙与不同细胞成分结合后,可产生橙、黄、红、绿等荧光。了解各种荧光染料的吸收光谱和发射光谱,有利于在观察被检标本时,有效地选择适当的滤片,获得最好的荧光效果。

(4) 荧光稳定性:提高激发光强度固然可以提高荧光强度,但激发光强度不可能无限提高。因为激发光强度超过一定限度时光吸收趋于饱和,而且不可逆地破坏激发态分子,这种

现象称光漂白。对于荧光显微镜和激光共聚焦显微镜而言,如光源长时间照射样品,可导致光漂白现象,严重影响检测。解决光漂白问题最直接的方法:一是降低光照强度,二是使用抗淬灭剂(anti-fade reagent)。

(5) 荧光色素分子对环境的敏感性:荧光色素的荧光光谱和量子产率受环境影响,这也是众多荧光素具有探针作用的基础。影响因素主要有:

1) 荧光色素染液的 pH:荧光色素是否发射荧光以及辐射何种荧光与它们在溶液中的存在状态有关。荧光色素均含有酸性或碱性助色团,溶液的酸碱性对它们的电离有影响,每种荧光色素有它最适宜的 pH。一些荧光色素在 pH 8.5~9.5 时,发射荧光较强,例如 1-萘酚-6-磺酸在 pH 6.4~7.4 的溶液中会发射蓝色荧光,当 pH 低于 6.4 时,则不发射荧光。

2) 温度:荧光色素的荧光量子产率和荧光强度通常随溶液温度的降低而增加,如荧光素的乙醇溶液在 0℃ 以下每降低 10℃ 荧光量子产率增加 3%,降至 -80℃ 时,荧光量子产率接近 100%;反之则减弱,甚至导致荧光淬灭。但一般在 20℃ 以下荧光量子产率随温度变化不太明显,故进行荧光染色过程中,要注意控制温度。但有些荧光染色如荧光抗体染色,在 37℃ 时,温度对异硫氰酸荧光素的荧光效率无明显影响。

3) 溶剂性质对荧光素的影响:溶剂性质对荧光素的荧光强度有明显影响,同种荧光素在不同溶剂中,其荧光光谱的位置和强度均有差别,荧光染色时常根据所需要的 pH 值缓冲液配制染液。

4) 荧光素浓度的影响:荧光素浓度对荧光强度的影响更明显。在稀溶液中,荧光强度与荧光素的浓度呈线性关系;浓度增加到一定程度时,荧光强度保持恒定,即使再增加浓度,荧光强度也不发生变化;若浓度继续增加,超过一定限度后,由于荧光物质分子间的相互作用引起自身荧光淬灭现象,使荧光强度随着浓度的增加而减弱。荧光素染色的应用浓度一般为 $10^{-3} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

由此可见,在进行荧光探针实验时,应注意合适的 pH、温度、溶剂和荧光素浓度等条件。另外,染色液最好新鲜配制,先配高浓度储存液,临用前再稀释,避免因储存时间过长而失效。

(6) 荧光的淬灭及抗淬灭

1) 荧光的淬灭:荧光淬灭(quench)是指荧光分子由内部因素和外部因素同时作用造成的不可逆破坏。内部因素主要是分子从激发态回到基态以非辐射跃迁形式释放能量。外部因素则包含多方面,主要有:①光照射是致荧光淬灭的最常见原因,荧光的产生需要光照射,但同时光照射也会促进激发态分子与其他分子相互作用而引起碰撞,使荧光淬灭(图 4-13);②荧光物质的分子与外部分子(或离子)形成非荧光的化合物;③共振能量的转移;④溶剂种类、pH 值及温度等环境条件。

能够引起荧光淬灭的物质称淬灭剂,如卤素

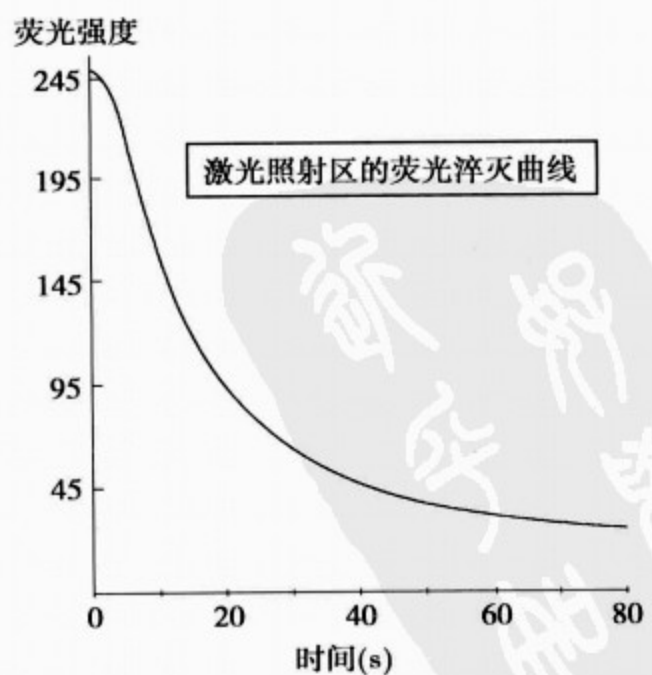


图 4-13 激光照射下的荧光淬灭曲线图

离子、重金属离子、具有氧化性的有机化合物(硝基化合物、重氮化合物、羰基化合物和羟基化合物)及氧分子等。

2) 荧光的淬灭:标记样品的荧光淬灭是在荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观察时遇到的主要问题。由于激光扫描共聚焦显微镜具有更强的功率和聚焦更准确的光束,与普通荧光显微镜相比,标本的光漂白作用更为明显,荧光素的荧光可在连续观察过程中逐渐减弱或消失。因此,应考虑使用抗荧光淬灭剂(抗荧光衰减剂)。常用抗荧光淬灭剂有 p-苯二胺(Para-phenylene diamine, PPD)、n-丙基没食子酸盐(propyl gallate, NPG)、1,4-二偶氮双环[2,2,2]-辛烷(1,4-diazobicyclo[2,2,2]-octane, DABCO)等。其中 p-苯二胺是最有效的抗淬灭剂,但由于对光和热均有较强的敏感性,且具有毒性,因而限制了在体内的应用。理想的 PPD 抗淬灭剂混合液配方是:9 份甘油、1 份 PBS 和浓度在 2~7mmol/L 之间的 PPD,最终 pH 为 8.5~9.0。n-丙基没食子酸盐无毒性,对光和热稳定,但抗荧光漂白的效果不如 PPD,可用于体内研究。推荐浓度为 3~9mmol/L,用甘油配制效果较好。1,4-二偶氮双环[2,2,2]-辛烷是一种稳定的非离子性抗淬灭剂,价格便宜且易使用,可用于体内研究。

此外,还有其他的抗荧光淬灭方法也能使活性细胞或非活性标本荧光强度得到增强,如使用中密度滤片、采用高数值孔径物镜和相对较低的放大倍数等。

2. 常用荧光素 常用于免疫荧光组织化学染色的荧光素有:异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)、四乙基罗丹明(tetraethyl rhodamine B200, RB200)、得克萨斯红(Texas red)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、花青类(cyanine, 如 Cy3、Cy5)等。此外还有一些新型荧光染料,如量子点。

(1) 异硫氰酸荧光素(FITC):FITC 性质稳定,易溶于水和乙醇,能与蛋白质结合,是检测组织细胞内蛋白质最常用的荧光探针。它还能标记抗体,可用于免疫组织化学单染或多重染色。缺点是在光照下易淬灭,易受自发荧光影响。最大激发光波长为 490nm;最大发射光波长为 525nm,呈现黄绿色荧光。

(2) 四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC):该荧光素能与细胞内蛋白质结合,比 FITC 稳定性好,在生理条件下对 pH 值变化不敏感,荧光强度受自发荧光干扰小。最大激发光波长为 550nm;最大发射光波长为 620nm,呈橙红色荧光,与 FITC 发出的黄绿色荧光对比鲜明,常用于免疫荧光组织化学双重染色。

(3) 四乙基罗丹明(RB200):能与细胞内蛋白质结合,不溶于水,易溶于乙醇和丙酮,性质稳定,可长期保存,广泛应用于双标记示踪染色。最大激发光波长为 570nm,最大发射光波长为 595~600nm,呈橙红色荧光。

(4) 花青类染料:常用的有 Cy3、Cy5 等,能与细胞内蛋白质结合。这类染料的荧光特性与传统荧光素类似,但水溶性和对光稳定性较强,荧光量子产率较高,对 pH 等环境不敏感。常用于多重染色。Cy3 最大激发光波长为 570nm,最大发射光波长为 650nm,呈绿色荧光。但是,在绿光光谱波长激发下,Cy3 也可出现红色荧光。Cy5 的最大激发光波长为 649nm,最大发射光波长为 680nm,呈红色荧光。由于 Cy5 的最大发射波长为 680nm,很难用肉眼观察,而且不能使用高压汞灯作为理想的激发光源,因此,使用普通荧光显微镜时,不推荐使用 Cy5。通常观察 Cy5 时需使用激光扫描共聚焦显微镜。

(5) 乙酸甲酯:其本身不发荧光,但透膜进入细胞质后,在酯酶的作用下转变为具有荧光特性的乙酸甲酯。其激发光谱有 pH 依赖性,是使用最多的细胞内 pH 荧光指示剂。最大激发光波长为 505nm,最大发射光波长为 530nm,呈绿色荧光。

(6) Indo-1:是典型的双发射荧光探针,无钙时在 485nm 左右有发射峰,结合钙后,则在 405nm 处有发射峰,两者的比值与细胞内游离钙离子浓度成线性关系,将此比值与标准曲线相比即可得出细胞内游离钙浓度,因此,可利用此探针定量检测细胞内游离钙离子浓度。最大激发光波长为 330/346nm,最大发射光波长为 405/485nm,呈紫色(405nm)或青色(485nm)荧光。

(7) 量子点(quantum dot):是近年来研制的一种新型荧光染料,又称半导体纳米晶体(semiconductor nanocrystal),是由几百或几千个纳米级颗粒构成的半导体材料,性质稳定,溶于水,细胞本身不能合成和组装。量子点具有荧光时间长、产生多种颜色、检测方便和应用范围广等优点。当某一波长的激发光对多种大小不同的量子点进行照射时,可以同时观察到多种颜色,因而可同时进行多个目标的观察和检测。量子点可与抗体、链霉亲和素等多种分子进行耦联,检测靶分子的分布和功能。

二、免疫荧光组织化学基本原理及方法

(一) 基本原理

免疫荧光组织化学技术是用免疫荧光技术检测细胞或组织内抗原或半抗原物质的方法。根据抗原抗体反应原理,先将已知抗体(或抗原)标记荧光素制成荧光标记物,再用这种荧光标记物作为分子探针与组织细胞内的相应抗原(或抗体)反应,在细胞或组织中形成含有荧光素的特异性抗原抗体复合物,这种复合物上的荧光素受激发光照射而发出各种颜色荧光,利用荧光显微镜观察,即可对组织细胞中的抗原或抗体进行定性、定位乃至定量研究。蛋白质、多肽、核酸、酶、激素、磷脂、多糖、受体及病原体等,凡能作为抗原或半抗原的物质均可用免疫荧光组织化学技术检出。

(二) 基本方法

1. 直接法

(1) 检查抗原法:此法是免疫组织化学最早使用的方法,用荧光素标记已知特异性抗体,直接与组织细胞中相应抗原结合,在荧光显微镜下可见抗原存在部位呈现特异性荧光(图 4-14)。此法特异性强,快速而简便,但是,由于一种荧光抗体只能检测一种抗原,很难获得各种市售的特异性荧光标记抗体;此外,该方法敏感性较低。

(2) 检查抗体法:将抗原标

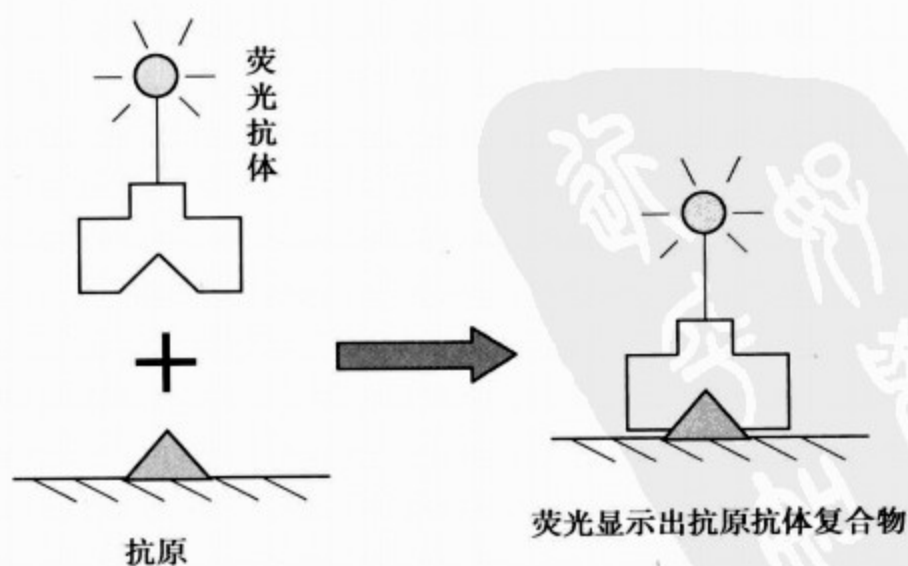


图 4-14 免疫荧光细胞化学直接法示意图(吴强供图)

记荧光素,即为荧光抗原。将此荧光抗原直接与细胞或组织内相应抗体反应,即可定位检测出相应的特异性抗体。

2. 间接法

(1) 检查抗原法:第一抗体不标记,使用与一抗种属相同抗体的 Fc 段(有种属特异性)作为抗原免疫动物,制备抗抗体,即第二抗体,并用荧光素标记第二抗体。反应时,首先用特异性抗体(第一抗体)与组织细胞中的相应抗原反应,然后用缓冲液洗去未与抗原结合的抗体,再用荧光素标记的第二抗体与结合在抗原上的第一抗体结合,形成抗原-抗体-荧光抗体复合物(图 4-15)。由于结合在抗原-抗体复合物上的荧光抗体数量显著多于直接法,从而提高了反应的敏感性。如细胞抗原上每个分子结合 3~5 个第一抗体分子,当此抗体作为抗原时,每一个抗体分子又可结合 3~5 个荧光标记的第二抗体分子,故与直接法相比,荧光亮度可增强 3~4 倍。此法只需制备有种属特异性荧光标记的第二抗体,可与多种特异性第一抗体相匹配,故目前应用最为广泛。

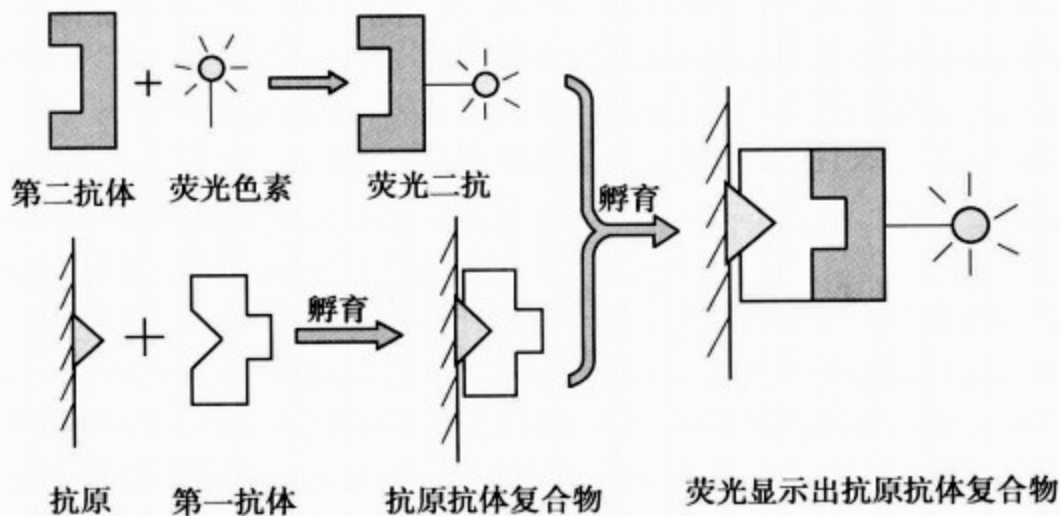


图 4-15 免疫荧光细胞化学间接法示意图(吴强供图)

(2) 检查抗体法:常用检查抗体的间接法有两种:一种是先将特异性抗原与组织细胞内抗体反应,再用此抗原的特异性荧光抗体与结合在细胞内抗体上的抗原相结合,抗原夹在细胞抗体与荧光抗体之间,故称为夹心法(sandwich method)。另一种方法是在已知抗原的细胞或组织切片上加入待检血清,如果血清中含有细胞或组织切片中某种抗原的抗体,抗体结合在抗原上形成沉淀,再用间接荧光抗体(抗种属特异性 IgG 荧光抗体)与结合在抗原上的抗体进行反应(如检测人血清中的抗体必须用抗人 IgG 荧光抗体等),利用荧光显微镜即可见抗原抗体反应部位呈现明亮特异性荧光。此法是检验血清中自身抗体和多种病原体抗体的重要手段。

3. 双重免疫荧光标记法 在同一组织细胞标本上需要同时检测两种抗原时,需进行双重荧光染色。双重免疫荧光标记法(double immunofluorescence labeling method)也分为直接法和间接法。

(1) 直接法双重免疫荧光标记:将标记有两种不同荧光素的抗体(如抗 A 和抗 B)以适当比例混合,滴加在标本上孵育,然后洗去未结合的荧光抗体,在荧光显微镜下分别选择两种相应的激发滤片观察,即可对两种抗原进行定位和定量。直接法简便可靠,但灵敏度较低。

(2) 间接法双重免疫荧光标记:用未标记的两种特异性第一抗体孵育组织或细胞,洗去多余的第一抗体后,再用两种不同的荧光素分别标记的第二抗体孵育组织或细胞,洗去多余的第二抗体,后在荧光显微镜下分别选择两种相应的激发滤片观察,从而对两种抗原进行定位和定量。使用此法应注意两种特异性第一抗体必须来源于不同种属,且荧光标记第二抗体的种属必须与第一抗体的种属相匹配。

4. 对照实验 为保证免疫荧光组织化学染色的特异性,排除非特异性染色,必须在初次实验时进行对照实验。

(1) 直接法需设的对照实验

1) 标本自发荧光对照:标本只加 PBS 或不加 PBS,甘油缓冲液封片,荧光显微镜观察应呈阴性荧光,即未见与特异性荧光相似的荧光。

2) 抑制实验:可分为二步法和一步法。二步抑制法即在标本上先加未标记的特异性抗体,再滴加标记荧光抗体,结果应呈阴性或明显减弱的荧光。一步抑制法是先先将荧光抗体与未标记抗体作适量(未标记抗体多于标记抗体)混合,再滴加在标本上染色,结果应为阴性。一步法较二步法简便而且稳定。为证实此种染色的抑制是由于较多的未标记抗体竞争抑制所致,而不是由于荧光抗体被稀释所致,可用盐水代替未标记抗血清,染色结果应为阳性。

3) 阳性对照:用已知阳性标本作直接法免疫荧光染色,结果应呈阳性荧光。

如标本自发荧光对照实验和抑制实验均无荧光或弱荧光,而阳性对照实验和待检测标本均呈强荧光,即为特异性阳性荧光。

(2) 间接法需设的对照实验:除与直接法一样设置自发荧光对照、抑制实验和阳性对照实验外,还需设荧光抗体对照实验,即标本只加荧光标记抗体,结果应为阴性。如自发荧光对照、荧光标记抗体对照和抑制实验均阴性,阳性对照和待检测标本均呈强荧光,即为特异性阳性荧光。

三、免疫荧光组织化学染色步骤

(一) 直接法

直接法简便而快速,适合检测浓度较高的蛋白质抗原,如肾脏、皮肤抗原的检查。在临床上也常用于细菌、螺旋体、原虫及真菌的检测。该法基本染色步骤如下:

1. 染色 切片经固定后,滴加经稀释至染色效价的荧光标记特异性抗体,置入湿盒内,室温或 37℃ 染色 30 分钟。

2. 洗片 洗去存留的荧光抗体,将切片浸入 pH 7.2~7.4 的 PBS 中振荡或摇动洗涤 2 次,每次 5 分钟,再用蒸馏水洗 1 分钟,除去盐结晶。

3. 封固和观察 用 50%甘油缓冲液(pH 9.0~9.5 的 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液配置)封固或用抗淬灭剂封固后,置荧光显微镜下观察。

(二) 间接法

1. 检测抗原法 以单层细胞培养标本为例介绍此法的染色步骤:

(1) 取出细胞贴附生长的小盖片,用预热的 PBS 冲洗 2 次;

(2) 4%多聚甲醛(或冷丙酮)固定 5~10 分钟,晾干;

(3) 0.01M PBS(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 5 分钟。

(4) 0.3% Triton X-100 孵育,室温 20 分钟,PBS 漂洗 2 次(细胞膜抗原可省略此步骤);

(5) 非免疫血清(或 15%小牛血清)孵育,室温 10 分钟;

(6) 滴加特异性一抗(如小鼠抗大鼠波形蛋白单克隆抗体,1:200 稀释度),4℃ 过夜或 37℃ 孵育 30 分钟,PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;

(7) 滴加与第一抗体种属匹配的荧光素标记二抗(如羊抗小鼠 FITC-IgG,1:100),37℃ 避光孵育 30 分钟,PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;

(8) Hoechst 333442 复染细胞核 15~20 分钟(不是必需步骤);

(9) 甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下镜观察;

(10) 结果分析:波形蛋白免疫反应阳性细胞胞质呈现绿色荧光(图 4-16),如细胞核复染后可呈现亮蓝色荧光。阴性细胞仅见细胞核为亮蓝色荧光。

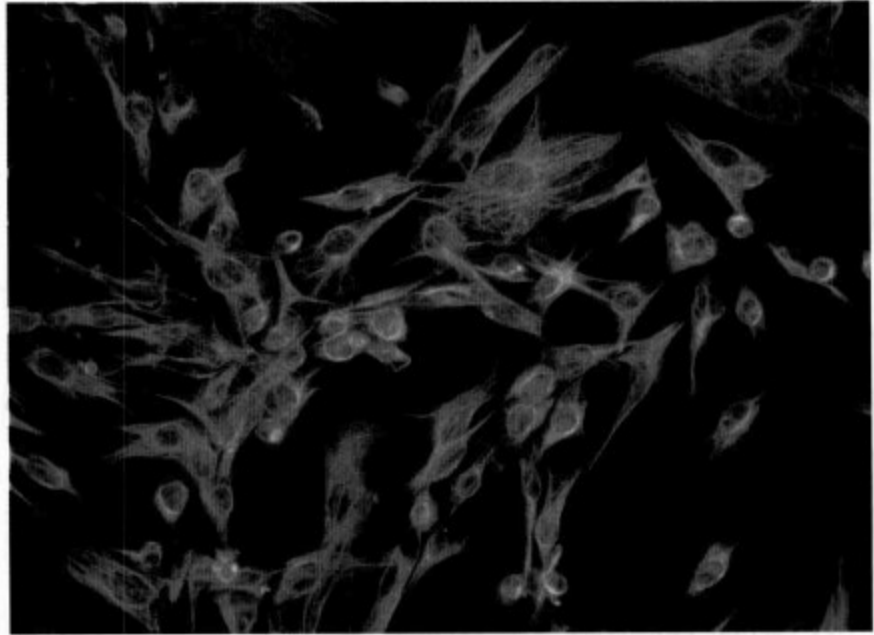


图 4-16 荧光免疫细胞化学染色

原代培养胚胎 14 天大鼠端脑细胞,波形蛋白免疫反应阳性细胞呈绿色荧光(FITC 标记二抗,周莉供图)

注意事项:①如标本为甲醛固定的组织切片,需增加抗原修复步骤;②对于易脱片的细胞样品在固定后增加晾干时间,可起到防脱片的作用;③如果结果分析显示有非特异性染色,则需在正常血清封闭之后再行 5%牛血清白蛋白封闭。

2. 检测抗体法

(1) 切片或涂片固定后,置于染色湿盒内,滴加未标记的特异性抗原于标本表面,37℃ 孵育 30 分钟,PBS 漂洗 2 次,每次 5 分钟,用吸水纸吸去残留液体;

(2) 滴加荧光标记抗体 37℃ 孵育 30 分钟,PBS 漂洗同上;

(3) 甘油磷酸缓冲液或抗淬灭剂封固,荧光显微镜下检测。

(三) SABC-Cy3 法

在免疫荧光组织化学技术中,常用方法还有 SABC-Cy3 法。它的基本原理和染色步骤与免疫组织化学中 SABC 法大体相同,唯一不同的是亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物中的酶组分被荧光素 Cy3 替代,从而形成亲和素-生物素-Cy3 复合物,故称之为 SABC-Cy3 法。在其染色步骤中没有酶与底物和供氢体的显色作用,取而代之的是荧光素染色。由于 Cy3 所产生的荧光稳定性和敏感性好,而且 SABC 法放大系统效率高,所以,在样品抗原量少的情况下,此法优于其他方法(图 4-17)。

(四) 双重染色法

若在同一标本中有 A 和 B 两种抗原需要同时显示,A 抗原的抗体用 FITC 标记,B 抗原的抗体用 TRITC 标记,可采用以下染色方法:

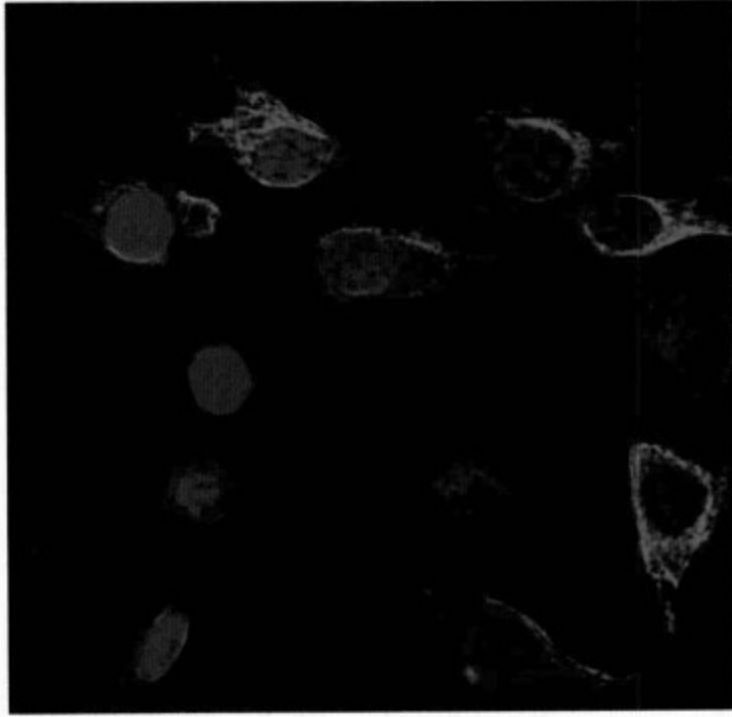


图 4-17 SABC-Cy3 法

激光扫描共聚焦显微镜下, C6 细胞株波形蛋白免疫反应阳性细胞呈红色荧光(Hoechst 33258 复染细胞核, 1200 倍油镜放大, 周莉供图)

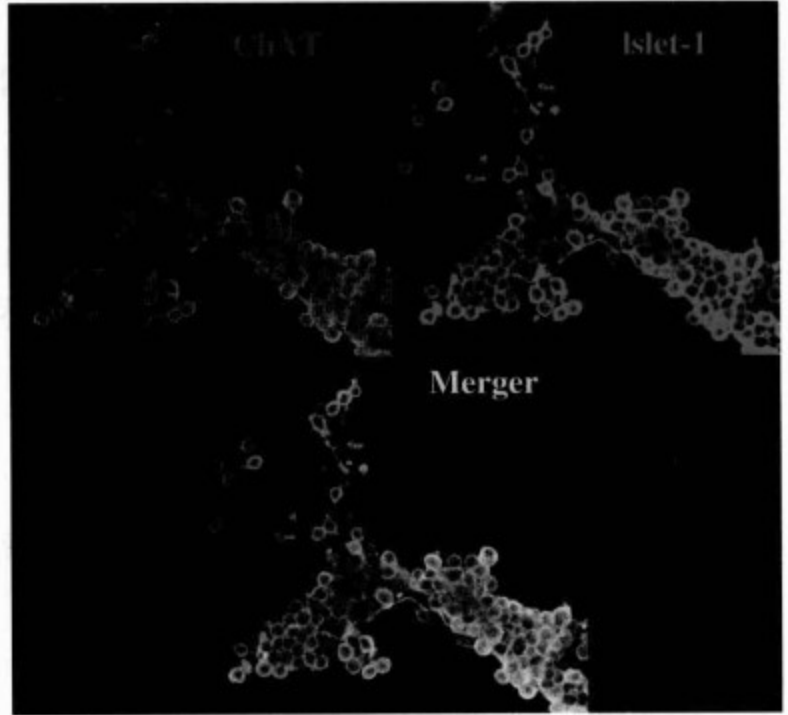


图 4-18 免疫荧光细胞化学双重染色法

原代培养胚胎 14 天大鼠端脑细胞, 在骨发生形态蛋白-4 诱导下, 乙酰胆碱转移酶(呈绿色荧光)和同源域蛋白 Islet-1(呈红色荧光)共存于细胞质内(激光扫描共聚焦显微镜观察, 周莉供图)

1. 一步双染色法 先将两种荧光标记抗体按适当比例混合(A+B), 按直接法进行染色。

2. 二步双染色法 先用 TRITC 标记的 A 抗体进行免疫荧光染色, 再用 FITC 标记的 B 抗体染色, 根据两种抗体的动物种属不同, 可用直接法也可用间接法, 结果 A 抗原呈现橘红色荧光, 而 B 抗原呈现黄绿色荧光。在应用中, 常用的方法是免疫荧光组织化学中间接法和 SABC-Cy3 法相结合。例如, 在实验设计时, 选择小鼠抗大鼠 A 和兔抗大鼠 B 作为两种不同的特异性一抗, 相匹配的二抗分别为 FITC-抗小鼠 IgG 和生物素化-抗兔 IgG。进行双重染色时, 由于两种一抗种属来源不同, 可把一抗混合使用。孵育结束后洗涤未结合的一抗, 滴加二抗时, 先加入生物素化-抗兔 IgG(二抗)孵育, 洗涤后, 滴加 SABC-Cy3 复合物, 经荧光显微镜下观察已出现特异性荧光, 再进行 FITC-抗小鼠 IgG(二抗)的孵育, 最后封片观察。其结果 A 抗原呈现绿色荧光, B 抗原呈现红色荧光(图 4-18)。

此法应注意两种一抗在混合稀释时, 抗体的终浓度应为每一种抗体的工作浓度, 换言之, 混合后的液体要同时满足两种一抗的工作浓度。若两种一抗种属来源相同, 必须分两次进行双重染色, 即先用第一种一抗和第一种荧光二抗对 A 抗原进行染色, 洗涤后, 用第二种一抗和第二种荧光二抗对 B 抗原进行染色, 否则会出现交叉反应而使染色无特异性。

(五) 膜抗原荧光抗体染色法

该法与直接法或间接法原理及步骤相同, 但形式不同, 即对活细胞在试管内进行染色, 常用于淋巴细胞或肿瘤细胞膜抗原和受体等的检测与研究, 阳性荧光主要表达在细胞膜上。

(六) 补体法

1. 材料

(1) 免疫血清 60℃灭活 20 分钟, 用 Kolmers 盐水作 2 倍稀释成 1:2、1:4、1:8 或更

高。如免疫血清补体结合的效价为 1 : 32, 则免疫血清应作 1 : 8 稀释。Kolmers 盐水配制: 在 pH 7.4, 0.1mol/L 的磷酸缓冲盐水中溶解 $MgSO_4$, 含量为 0.01%;

(2) 补体用新鲜豚鼠血清, 一般作 1 : 10 稀释或按补体结合反应试管法所测定的结果, 按 2 单位的比例, 用 Kolmers 盐水稀释备用;

(3) 抗补体荧光抗体: 在免疫血清效价为 1 : 4, 补体为 2 单位的条件下, 用补体染色法测定免疫豚鼠球蛋白荧光抗体的染色效价, 然后按染色效价 1 : 4 的浓度用 Kolmers 盐水稀释备用。

2. 操作步骤

(1) 涂片或切片固定;

(2) 吸取经适当稀释的免疫血清与补体等量混合液(此时免疫血清及补体均稀释 1 倍)滴于切片上, 置于湿盒内, 37℃ 孵育 30 分钟;

(3) 用缓冲盐水振荡洗涤 2 次, 每次 5 分钟, 吸干标本周围水液;

(4) 滴加经过适当稀释的抗补体荧光抗体, 37℃ 孵育 30 分钟, 水洗同上;

(5) 蒸馏水洗 1 分钟, 甘油缓冲液封固。

3. 对照实验 染色过程应设立对照实验, 包括:

(1) 抗原对照;

(2) 抗血清对照: 用正常兔血清代替免疫血清;

(3) 灭活补体对照: 将补体经 56℃ 30 分钟处理后, 按补体同样比例稀释, 与免疫血清等量混合后, 进行补体法染色。

此法的荧光抗体不受免疫血清的动物种属限制, 故一种荧光抗体的应用可更广泛, 敏感性亦较间接法高, 效价低的免疫血清亦可应用, 故可节省免疫血清, 尤其是在检查形态小的立克次体、病毒颗粒等或浓度较低的抗原时, 使用此法甚为理想。

(七) 荧光抗体再染色法

若切片或其他标本经某种荧光抗体染色后, 未获得阳性结果, 而又疑有另外的病原体存在时, 可用相应的荧光抗体再染色。

有时存档蜡块不能再用以切片, 可用存档的 HE 染色标本, 褪去盖片和颜色, 再进行免疫荧光或其他免疫细胞化学染色。

四、非特异性荧光染色的消除

组织的非特异性荧光染色机制很复杂, 其产生的原因主要有: 一部分荧光素未与蛋白质结合, 形成了聚合物和衍化物, 不能被除去; 抗体以外的血清蛋白与荧光素结合形成荧光素蛋白与组织成分结合; 除被检抗原以外, 组织中还存在类属抗原(如 Forssman 抗原), 可与组织中特异性抗原以外的相应抗体结合; 从组织中难于提纯抗原性物质, 所以制备的免疫血清中往往混杂一些抗其他组织成分的抗体, 以致抗体不纯; 抗体分子上标记的荧光素分子太多, 因过量标记的抗体分子带过多的阴离子, 可吸附于正常组织, 因而呈现非特异性荧光染色; 荧光素不纯、标本固定不当等其他因素。

由于目前多使用商品化荧光标记抗体, 所以, 研究者主要在荧光染色过程中, 注意避免产生非特异性荧光染色, 常用方法如下:

1. 荧光抗体稀释法 先检测荧光抗体特异性染色与非特异性染色的效价,若二者效价相差较大,则可将荧光抗体稀释至一临界浓度,使特异性染色呈阳性,而使非特异性染色保持阴性。

2. 伊文氏蓝衬染法 采用 FITC 等荧光探针时,可用此方法。用含 0.01%伊文氏蓝(Evans blue)的 PBS 稀释荧光抗体,可将背景细胞和组织染成红色荧光,与特异性黄绿色荧光形成鲜明对比,减少了非特异性荧光。但在进行激光扫描共聚焦显微镜观察时最好不用此法,因为在目标荧光进行叠加时有一定影响。伊文氏蓝一般先配成 1%溶液,保存于 4℃,用前再稀释至 0.01%。

3. 其他 染色中要充分洗涤,采用胰酶消化组织切片或用 10%牛血清白蛋白封闭等可以消除非特异性染色,提高特异性染色。

五、生物荧光显微镜

1903 年 Wood 首次设计了一种能吸收可见光和允许紫外光通过的滤片。以此为基础,1911 年 Reichert 设计了第一台荧光显微镜。随着荧光染色方法和荧光显微镜装置的改进,尤其是荧光抗体技术的建立,荧光显微镜在生物医学各领域的应用愈来愈广泛。荧光显微镜是利用一定波长的光(通常是紫外光或蓝紫光)激发显微镜下标本内的荧光物质,使之发出荧光,呈现荧光影像。荧光显微镜包括光源、滤片系统和显微镜三个部分。

(一) 荧光显微镜的分类及主要组成

1. 荧光显微镜的分类 按高压光源的激发光路不同分为落射(反射)荧光显微镜和透射荧光显微镜(图 4-19)。新型的落射光装置是来自于光源的光照射到干涉分光滤镜后,波长短的紫外光和紫蓝光由于滤镜上镀膜的性质而反射,当滤镜对光源呈 45°倾斜时,光便垂直射向物镜,经物镜射向标本,使标本中的荧光物质受到激发,这时物镜直接起聚光器作用。同时,波长长的部分光(绿、黄、红等)对滤镜是可透的,不向物镜方向反射,因此,滤镜起激发滤板的作用。由于标本的荧光处在可见光波长区,可透过滤镜到达目镜而被观察到。透射

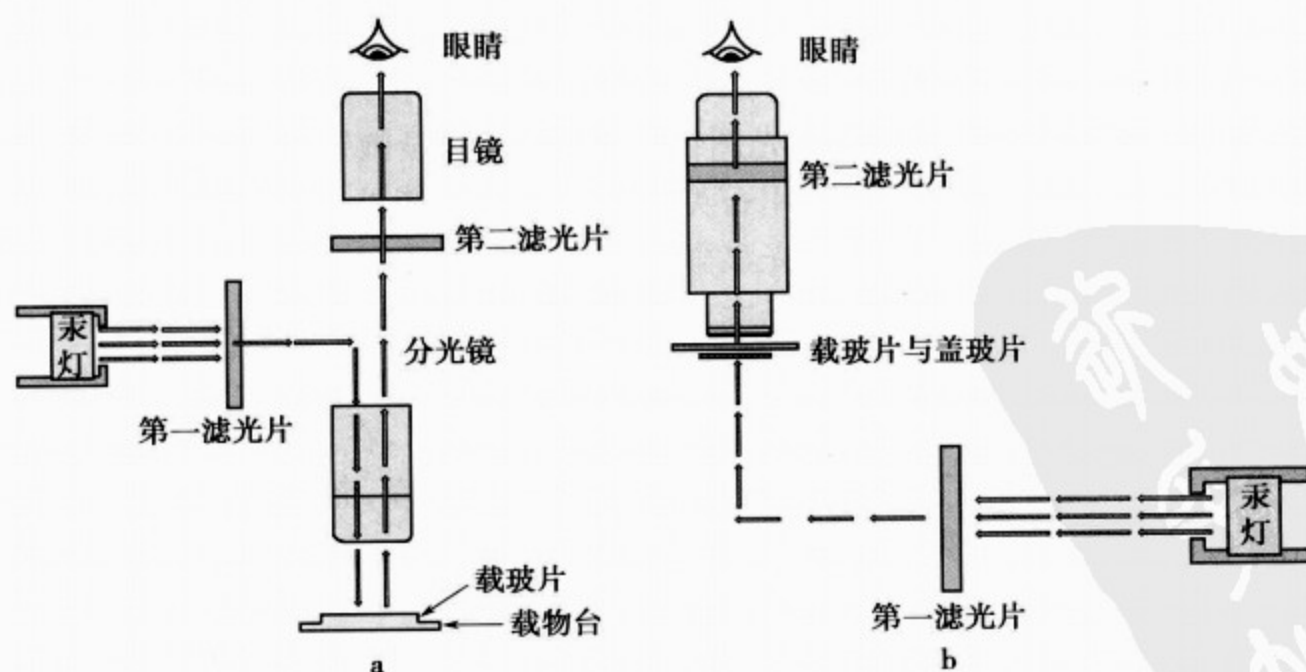


图 4-19 落射荧光显微镜和透射荧光显微镜激发光路比较图

a. 落射荧光显微镜 b. 透射荧光显微镜

荧光显微镜的激发光来自载物台下方,经聚光器射向标本,使标本中的荧光物质受到激发。前者荧光图像的亮度随着放大倍数增大而提高,在高放大倍数时比透射光源强。近年研制的新型荧光显微镜多采用落射光装置,称之为落射荧光显微镜。

按结构形式分为正置式荧光显微镜和倒置式荧光显微镜。正置荧光显微镜可满足样品制成薄片后的观察方式,既可作为普通显微镜使用,也可作荧光观察。倒置荧光显微镜和正置荧光显微镜的区别在于物镜与照明系统颠倒,前者物镜在载物台之下,后者物镜在载物台之上。倒置荧光显微镜能观察各种活细胞,通常用于培养细胞的观察。

2. 荧光显微镜的组成 生物荧光显微镜主要由照明系统、滤光片系统和显微镜三部分构成:

(1) 照明系统:生物荧光显微镜包括高压和低压两个照明系统,高压汞灯可发射出各种波长(紫外到红外)的光,提供激发光源,用于荧光显微镜观察。低压光源的卤素灯提供可见光,用于普通显微镜观察。

(2) 滤光片系统

1) 激发光滤片(excitation filter):位于光源和显微镜之间的光路内,其作用是吸收可见光,允许一定波长的紫外光或蓝紫光通过。根据观察的需要,可将某一种激发滤片置于光路使一定波长的光透过,作为激发光源激发样品中的荧光物质。

2) 阻断滤片(barrier filter):又称吸收滤片,此种滤片安装在物镜和目镜之间的光路中,它吸收视野内未被标本内荧光物质吸收的激发光,以获得清楚的荧光影像和保护观察者的眼睛。

3) 反光镜:反光镜上镀有一层铝,铝对紫外光和可见光的蓝紫光吸收很少,反射率达90%以上。反光镜可折射激发光,通过改变光路,使激发光射入样品。

4) 隔热滤片:能吸收热量,保护其他光学元件。

5) 中性滤片:可不同程度地吸收可见光,减弱光强度。

(3) 显微镜:荧光显微镜与普通显微镜一样均由光学系统(物镜和目镜)和镜架机械装置组成。但是,荧光显微镜中的物镜最好用消色差物镜,因其自身荧光极微且透光性能(波长范围)适合于荧光。由于图像在显微视野中的荧光亮度与物镜数值孔径的平方成正比,而与其放大倍数成反比,所以,为提高荧光图像的亮度,荧光显微镜使用数值孔径大的物镜。专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成,分明视野聚光器和暗视野聚光器两种。在一般荧光显微镜上多用明视野聚光器,它具有聚光力强、使用方便等特点,特别适于低、中倍放大的标本观察。暗视野聚光器在荧光显微镜中的应用也日益广泛。因为暗视野聚光器的入射光斜射会聚在标本上,除散射光外,不直接进入物镜,散射光是由激发光激发标本内荧光物质而发射出的荧光。这样,在黑色的视野背景中,可呈现鲜明的荧光图像,不仅增加了荧光强度和物像清晰度与灵敏度,而且给人以舒适感。并且暗视野聚光器可以观察明视野聚光器难以分辨的细微荧光颗粒,在很大程度上增强了荧光显微镜的分辨率。

荧光显微镜与普通显微镜比较,主要区别有:在照明系统的光源中使用高压汞灯提供全波段激发光;照明方式通常为落射式,即光源通过物镜投射于样品。由于荧光弱时,数值孔径大,才便于观察,故物镜数值孔径大于普通显微镜物镜。荧光显微镜的物镜分辨率高于普

通显微镜;特殊的滤光片系统,如激发滤片,阻断滤片等。

(二) 荧光显微镜的基本操作及注意事项

1. 基本操作步骤

(1) 安装紫外防护罩。

(2) 打开高压汞灯的电源控制箱开关。

(3) 插入挡光板,中断光路。

(4) 预热 5~10 分钟。

(5) 将载有样品的载玻片放到载物台上。

(6) 选择接物镜(按照先低倍,后高倍顺序)。

(7) 旋转分光镜组件转盘,选择所需要的分光镜组件:“O”为观察透射光时用;“WU”为观察蓝色荧光时用(如 DAPI);“WB”为观察绿色荧光时用(如 FITC);“WG”为观察红色荧光时用(如 TRITC)。

(8) 使用阻断滤片(目前多数阻断滤片内置于荧光显微镜)。

(9) 通过粗、细螺旋调整焦距。

(10) 打开与显微镜连接的计算机,点击数码成像系统软件,采集数码图像。

2. 注意事项

(1) 因观察荧光使用的光源为高压汞灯,其中发出的光含紫外光,对人眼有损害作用,故必须安装紫外防护罩。

(2) 为延长汞灯寿命,打开汞灯后不可立即关闭,以免水银蒸发不完全而损坏电极,一般需要等 15 分钟后才能关闭。

(3) 汞灯熄灭后待完全冷却才能重新启动,否则灯内汞蒸气尚未恢复到液态,内阻极小,再次施加电压,会引起短路,导致汞灯爆炸。这样不仅损坏电器,更重要的是汞蒸气溢出,将导致工作室污染。故关闭汞灯之后,不能马上再次打开,必须等待至少 30 分钟。

(4) 高压汞灯工作时散发大量的热量,因此,工作环境温度不宜太高,必须有良好的散热条件。

(5) 汞灯的使用寿命约 200~300 小时,在电源控制箱上有时间累计计数器,使用者要记录累计小时数,达到 300 小时,需更换新灯泡,否则亮度不够,影响观察。

3. 荧光显微镜标本制作特点和观察要求

(1) 载玻片:载玻片厚度应在 0.8~1.2mm 之间,玻片太厚吸收光多,激发光难以在标本上聚集。载玻片必须光洁,厚度均匀,无明显自发荧光。有时需用石英玻璃载玻片。

(2) 盖玻片:盖玻片厚度应约 0.17mm,光洁。为加强激发光,也可用干涉盖玻片,这种特制盖玻片的表面镀有若干层对不同波长的光起不同干涉作用的物质(如氟化镁),它可以使荧光顺利通过而反射激发光,这种反射的激发光可激发标本中的荧光。

(3) 标本:组织切片或其他标本不能太厚,一般以 5~20 μ m 为宜,切片太厚可使激发光大部分消耗在标本下部,而物镜直接观察的标本上部不能被激发。切片折叠或杂质过多均可影响荧光的观察。

(4) 封片剂:封片剂必须无自发荧光、无色透明。加上抗淬灭剂后再用指甲油(实际操

作中体会指甲油封片效果很好,可做到薄而均匀)将盖玻片四周封固,既保持盖玻片不滑动,又能防止抗淬灭剂蒸发。在没有抗淬灭剂的情况下,也可使用含 30%甘油的 PBS,还可用甘油与 0.5mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.0~9.5)等量混合液作封片剂。

(5) 镜头的清洁:在油镜使用完毕后,需用擦镜纸沾上无水乙醇或 3:7 的醇醚混合液轻轻擦拭。

(6) 及时观察:标本染色后应及时观察,因时间过长荧光会逐渐减弱。若标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃ 保存,可延缓荧光减弱时间。

六、激光扫描共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是在荧光显微镜成像基础上配置激光光源和扫描装置,在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦装置,利用计算机进行图像处理,对观察样品进行断层扫描和成像,是一种高灵敏度与高分辨率的显微镜,在生命科学领域的组织、细胞和分子水平研究中的应用十分广泛,主要用于样品荧光定量检测,共聚焦图像分析,三维图像重建、活细胞动力学参数分析和细胞间通讯等方面研究。

(一) 激光扫描共聚焦显微镜基本原理

激光扫描共聚焦显微镜以激光作为光源,激光器发出的激光通过照明针孔形成点光源,经过透镜、分光镜形成平行光后,再通过物镜聚焦在样品上(图 4-20 实线所示),并对样品内聚焦平面上的每一点进行扫描。样品被激光激发后的出射光波长比入射光长,可通过分光镜,经过透镜再次聚焦,到达探测针孔处,被后续的光电倍增管检测到,并在显示器上成像,得到所需的荧光图像,而非聚焦光线(图 4-20 虚线所示)被探测针孔光阑阻挡,不能通过探测针孔,因而在显示器上显出荧光信号(图 4-20)。这种双共轭成像方式称为共聚焦。因采用激光作为光源,故称之为“激光扫描共聚焦显微镜”。

激光扫描共聚焦显微镜通过对样品 X-Y 轴的逐点扫描,形成二维图像(图 4-21)。如果在 z 轴上调节聚焦平面的位置,连续扫描多个不同 z 位置的二维图像,则可获得一系列的光学切片图像。在相应软件的支持下,通过数字去卷积方法(deconvolution)得到清晰的三维重建图像。正因为激光扫描共聚焦显微镜能沿着 z 轴方向在不同层面上获得该层的光学切片,所以可以得到组织细胞各个横断面的一系列连续光学切片,实现细胞“CT”功能。激光扫描共聚焦显微镜在免疫荧光组织化学中的应用详见

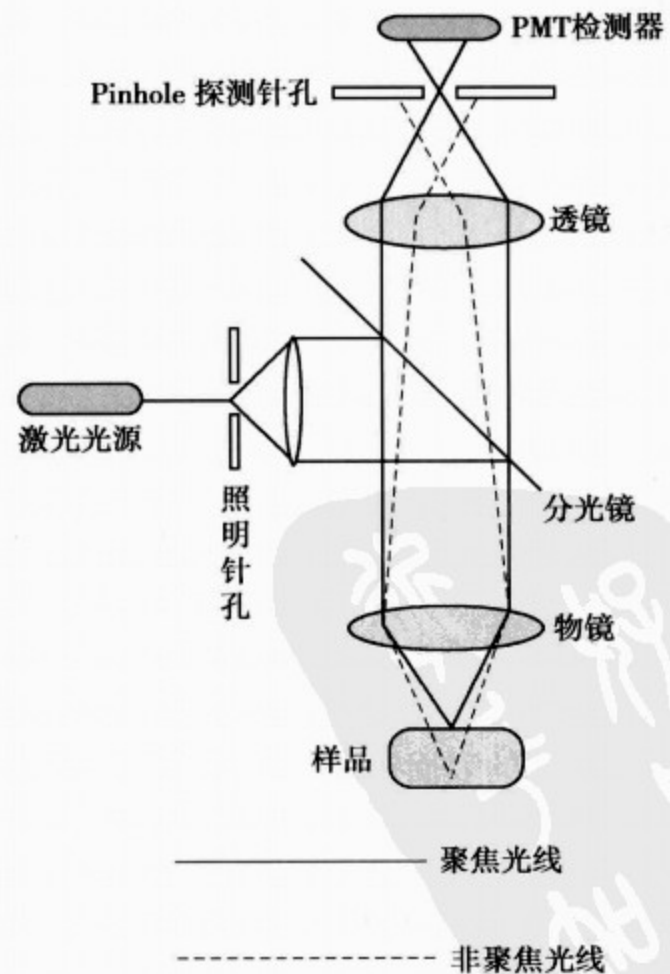


图 4-20 激光扫描共聚焦显微镜原理模式图

第七章。

(二) 激光扫描共聚焦显微镜操作步骤及注意事项

激光扫描共聚焦显微镜可测定的样品种类很多,包括生物材料、组织(切片)、细胞(亚细胞)结构等。样品中荧光的来源主要有如下几种:自发荧光(autofluorescence)、荧光染色、免疫荧光、荧光蛋白、诱发荧光(induced fluorescence)及酶致荧光(enzymatically produced fluorescence)等等。其中大部分荧光素的激发和发射波长均可在仪器自带软件的染料信息库中找到。

1. 激光扫描共聚焦显微镜样品制备特点

(1) 样品制备基本要求:激光扫描共聚焦显微镜与荧光显微镜样品制备基本相同,不同的是组织可切为厚切片,实现三维重建图像。由于激光扫描共聚焦显微镜通常为倒置式,载玻片上附着的盖玻片面积要大,上机观察时盖玻片应朝下放置在载物台上。

(2) 常见器皿:激光扫描共聚焦显微镜的载物台设计灵活,可以放置载玻片、35mm 和 50mm 平皿、培养皿、活细胞观察及灌流系统等多种常见器皿。要根据实验目的、样品种类及形态、物镜的工作距离及所用激光扫描共聚焦显微镜的载物台设置等条件确定样品观察所用的承载方式。常见的器皿有盖玻片、载玻片及 Petri 皿(Petri dish)等。应注意器皿底盘的厚度不能太厚,因为激发光要透过器皿的底部才能照射到样品上。同时,所用器皿要干净,无划痕。

Petri 皿,又称 glass bottom dish 或 coverslip bottom dish,其结构特点是在塑料平皿的圆形底部中央打出一个直径 10mm 左右的圆孔,并从平皿底部的外面粘上一片厚度约为 0.17mm 透光性极好的盖玻片以密封圆孔,配有平皿盖。使用时,将相配套的 Petri 皿支架放到显微镜的载物台上,再将载有样品的 Petri 皿放入到该 Petri 皿支架,即可用显微镜观察样品或者用共聚焦显微镜扫描样品。

Petri 皿兼有平皿和盖玻片的双重特点:①其底部的盖玻片为透光性极好的光学玻璃,透光性比塑料平皿好;②底部盖玻片厚度不大于 0.17mm,适用于高倍镜观察和高质量成像;③观察时,细胞上方有液体覆盖,不必加盖玻片,因此能够保持细胞等样品不变形,不干燥,保持其原有形态;④可以在皿中随时加入或吸出液体,因此可以随时对细胞进行洗涤或加刺激物等处理,利于维持细胞的生长和实验操作;⑤用倒置显微镜观察细胞时,可以盖着 Petri 皿盖观察,保持细胞的无菌状态,利于细胞培养;⑥节省试剂和细胞,简化操作过程。

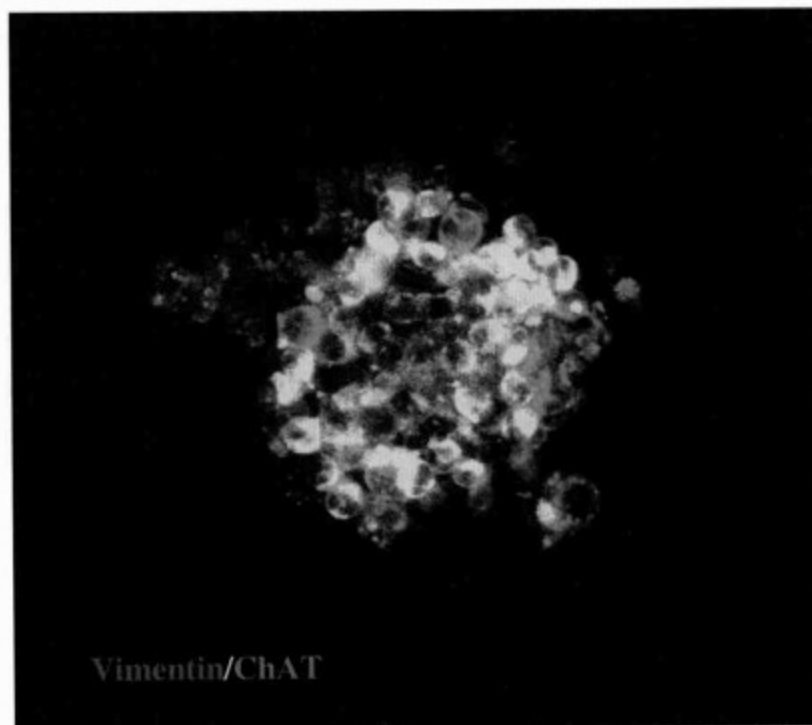


图 4-21 激光扫描共聚焦显微镜二维图像

原代培养端脑细胞神经球中波形蛋白免疫反应阳性呈绿色荧光,乙酰胆碱转移酶免疫反应阳性呈红色荧光,两者共存时呈黄色荧光(周莉供图)

进行活细胞长时间观察时,可以采用专门的灌流系统。该系统可不断更新培养基,保持细胞在正常的生长环境内被观察。

与载玻片和盖玻片相比,Petri皿的缺点是价格高、体积大,盛装液体移动时易溅出。

2. 观察步骤及仪器操作 根据实验要求制备样品完毕后,即可进行观察。基本步骤如下:

(1) 开启仪器电源及光源:一般先开启显微镜和激光器,再启动计算机,然后启动操作软件,设置荧光样品的激发光波长,选择相应的滤光镜组块,以便光电倍增管(photo multiplier tube, PMT)检测器能得到足够的信号结果。使用汞灯的注意事项同普通荧光显微镜。

(2) 设置相应的扫描方式:在目视模式下,调整所用物镜放大倍数,在荧光显微镜下找到需要检测的细胞。切换到扫描模式,调整双孔针和激光强度参数,即可得到清晰的共聚焦图像。

(3) 获取图像:选择合适的图像分辨率,将样品完整扫描后,保存图像结果即可。

(4) 关闭仪器:仪器测定样品结束后,先关闭激光器部分,计算机仍可继续进行图像和数据处理。若要退出整个激光扫描共聚焦显微镜系统,则应该在激光器关闭后,待其冷却至少10分钟后再关闭计算机及总开关。

3. 获取三维图像 激光扫描共聚焦显微镜具有细胞“CT”功能,因此,它可以在不损伤细胞的情况下,获得一系列光学切片图像。选用“Z-Stack”模式,即可实现此项功能。其基本步骤是:①开启“Z-Stack”选项;②确定光学切片的位置及层数;③启动“Start”,获得三维图像。

4. 获取时间序列图像 共聚焦显微镜的“Time-Series”功能,可以自动在实验者规定的时间内按照设定的时间间隔获取图像。只需设定所需的时间间隔以及所需图像数量,开启“Start T”功能键,即可进行实验。“Time-Series”功能大大减轻了实验者的劳动强度,对于荧光漂白恢复和钙离子成像等实验非常实用。

5. 双重或多重荧光串色处理 在两种或两种以上荧光素之间,如果荧光发射峰很近,那么荧光光谱彼此会有部分重叠,检测时可能出现一种荧光素的信号扩散到另一荧光通道的情况。这种现象称为串色或荧光光谱交叉(crosstalk)。避免或排除光谱交叉干扰的方法通常有以下几种:

(1) 使用几种荧光素时,尽量选择相互之间无光谱交叉的荧光素。

(2) 降低标记荧光强度:样品的一种或几种荧光强度太高,有时会导致光谱交叉出现。采用降低标记物浓度、缩短标记时间及调整荧光素介质等方法可降低样品荧光强度。

(3) 采用序列扫描方法:主要是指用不同波长激光轮流照射样品,同时在相应的荧光检测通道轮流采集,并显示每种荧光的共聚焦图像。对于双重荧光染色样品其具体操作过程是:首先只用一种激光激发相应的第一种荧光物质,在第一通道显示其荧光图像;再用另一种激光激发另一种荧光物质,在第二通道显示其荧光图像。相应的顺序扫描软件能够将两通道的不同荧光图像同时分通道显示并叠加合成,展示出两荧光间空间定位关系。依此类推,用顺序扫描方法还可以采集三重或更多重荧光样品的图像。

(4) 修改光谱检测仪器的检测条件:在图像上出现比较弱的荧光交叉信号时,可通过

改变仪器的检测条件来克服。常用的措施有：①降低干扰荧光的激发光强度以降低其发射荧光强度；②减小被干扰通道的检测灵敏度；③改变激发光波长和检测波长范围等。例如在荧光通道 2 的图像上看到来自通道 1 的较弱的荧光交叉信号，这时，在保证采集到各通道清晰图像的情况下，降低通道 1 的激发强度，减小通道 2 的光电倍增管效能以降低其采集的灵敏度，小范围内改变各通道的检测波长，可以消除来自通道 1 的荧光交叉信号。

(5) 荧光光谱鉴别法：通常情况下，不同荧光物质的荧光光谱不会完全重叠，利用不同荧光光谱之间的差异，可以将来自于两种荧光物质的荧光信号鉴别开来，得到各自的荧光图像。

6. 注意事项及维护保养

- (1) 仪器周围要远离电磁辐射源；
- (2) 环境无震动，无强烈的空气扰动；
- (3) 室内具有遮光系统，保证荧光样品不会被外源光漂白；
- (4) 环境清洁；
- (5) 控制工作温度在 5~25℃。

(三) 组织芯片中免疫荧光染色的定量分析

组织芯片(tissue chip)技术是一种快速、经济及高通量的现代组织化学技术。组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray, TMA)，它是将数十个乃至数以千计不同来源的组织样品粘贴到同一张固相载体如玻璃片或硅片上，形成组织微阵列。在同一反应条件下进行免疫组织化学染色，以了解病变组织与相应正常组织内蛋白质等抗原的细胞来源、分布特征和表达差异等。它的最大便利之处在于可以对大量组织标本同时进行检测，可缩短检测时间，减少不同染色样品间人为造成的差异，使得各组织或穿刺标本间对某一生物分子的测定更具有可比性。下面我们以实例简要介绍对组织芯片采用免疫荧光组织化学染色(Cy3 探针标记)。

组织金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)广泛存在于各种组织中，在乳腺癌细胞中表达明显增加。采用免疫荧光组织化学技术(Cy3 探针标记)对乳腺癌组织芯片中 TIMP-1 进行染色，并利用生物芯片扫描仪定量分析，可高效率地检测 TIMP-1 在大量乳腺癌组织中表达的改变。采用 GenePix[®] Personal 4100A 型生物芯片扫描仪对组织芯片中各点进行扫描，通过 GenePix Pro 5.0 分析软件获得每点平均荧光强度值，同时得到组织芯片扫描后经数字化处理形成的组织芯片图像(图 4-22)。SP 法免疫组织化学染色的组织芯片用 Image Pro-Plus 图像分析系统测定每点平均灰度值。对两种方法所得结果比较显示，两者呈明显正相关，表明组织芯片免疫荧光组织化学染色结果采用生物芯片扫描仪扫描，对受检蛋白相对含量进行定量分析，具有快速简便、客观准确和高效的特点。但是生物芯片扫描仪不能观察到组织结构，因此，待测物质在组织中的定位还必须依赖于荧光显微镜下人工观察(图 4-23)。

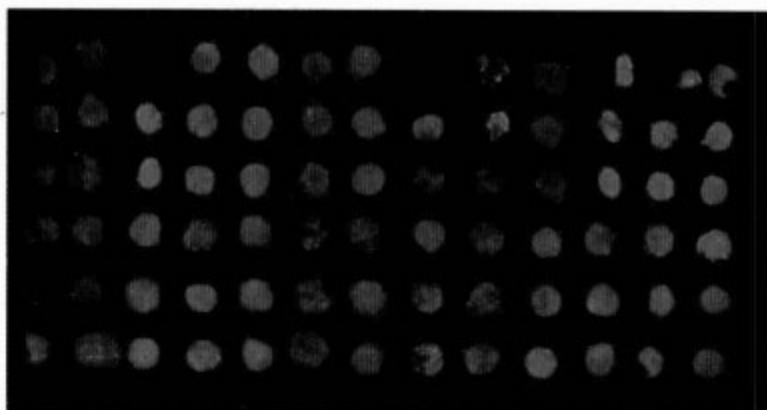


图 4-22 生物芯片扫描仪扫描图像

乳腺癌组织芯片组织金属蛋白酶抑制剂-1 免疫荧光组织化学染色(Sp 法, Cy3 标记, 在蓝光光谱波长激发呈绿色荧光, 吴强供图)

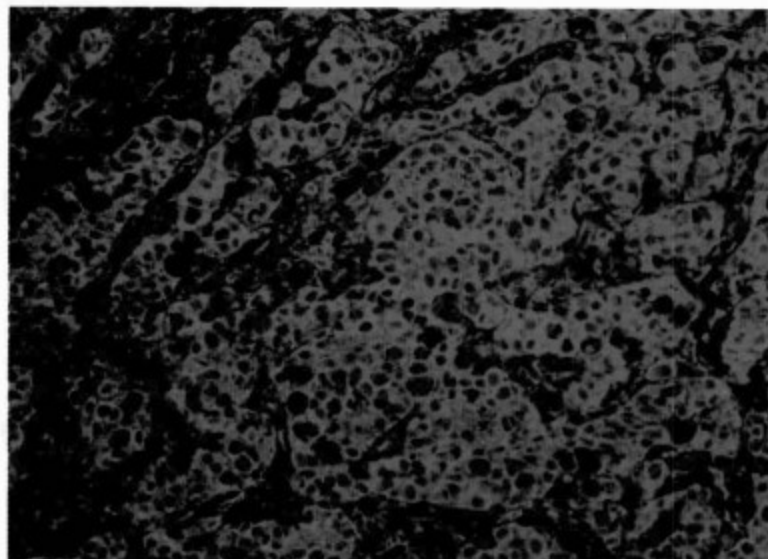


图 4-23 普通荧光显微镜下图像

乳腺癌组织芯片中组织金属蛋白酶抑制剂-1 免疫荧光组织化学染色(Cy3 标记, 在绿光光谱波长激发呈红色荧光, 吴强供图)

(吴 强)

应用举例

——免疫荧光组织化学双重染色 在神经元发生研究中的应用

由于大脑中胆碱能神经元直接参与人类运动、学习和记忆, 它的胚胎发生和发生机制一直是神经科学的热点, 因为这一问题的解决可能会找到治疗胆碱能系统退行性疾病的有效途径, 也将阐明神经元如何发生这个神经科学的基本问题。要实现这一目标, 首先要确定胚胎发生过程中胆碱能神经元的时空定位、胚胎来源以及如何获得胆碱能表型的过程。关于胆碱能神经元在端脑的时空定位, 20 世纪 80 年代末美国几个实验室报道了几乎一致的研究成果, 而对于后两个问题始终一筹莫展。有一天, 在翻阅文献时我发现了一个奇怪现象, U. B. Schambra(1989 年)和他的同事在使用乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)作为胆碱能神经元标志性蛋白追踪胆碱能神经元的时空定位时发现, 在端脑背侧脑室区有许多正在进行有丝分裂的细胞表达 ChAT。他们对此感到非常惊奇, 又无法解释这种现象, 故在论文中仍然把这些细胞看作胆碱能神经元(U. B. Schambra, 1989 年)。传统观点认为: 已分化的功能神经元不可能进行有丝分裂。在端脑发育为大脑的过程中, 其脑室区的神经上皮细胞分裂之后, 分化为成神经细胞便开始迁移, 直至目的地才获得神经元表型。正当这些疑团在脑海中百思不得其解的时候, 联想到前不久在 Nature 杂志中看到一篇令人震撼的研究论文: 美国 Columbia 大学 S. C. Noctor 和他的研究小组为观察端脑脑室区具有分裂能力的神经上皮细胞产生成神

经细胞的过程,将表达绿色荧光蛋白(GFP)的逆转录病毒注射到胚胎 15、16 天大鼠侧脑室,24 小时后,具有放射状胶质细胞形态的细胞均表达高水平 GFP,并显示波形蛋白(Vimentin)阳性,波形蛋白是放射状胶质细胞的标志性蛋白,3 天后沿皮层板(大脑皮质发育的原基)方向出现放射状排列的克隆,每个克隆包含 2~17 个细胞不等,其中含有几个 III β 神经微管蛋白(TUJ1)阳性细胞和通常为一个放射状胶质细胞。使用显微延时摄影(time-lapse images)记录随时间变化的克隆,发现已有 GFP 的放射状胶质细胞发生不对称分裂,并产生神经细胞,后者沿着产生它的放射状胶质细胞突起向皮层放射状迁移,并分化为皮质锥体神经元(Stephen C. Noctor, 2001 年)。因此,他们得出放射状胶质细胞不但具有胶质细胞性质而且还有神经干细胞性质,大脑皮层的锥体神经元是由放射状胶质细胞产生。这一挑战性结论打破了人们以往固有的观念,也使我产生了胆碱能神经元可能来源于放射状胶质细胞的想法。为证实此判断,必须证明 U. B. Schambra 在端脑侧脑室区发现正在进行有丝分裂又同时表达 ChAT 的细胞是放射状胶质细胞。于是,一个实验设计方案油然而生,免疫细胞化学方法对细胞类型的鉴定比其他方法有更大优势,尤其是对神经系统发育过程中分化不同的细胞。如果通过免疫细胞化学双重染色方法证实端脑侧脑室区正在进行有丝分裂的细胞既表达 ChAT 又表达 vimentin,将会为结论提供主要证据。实验设计选择了胚胎 14 天大鼠,即神经元发生高峰期,在端脑冠状切片上对 ChAT 和 vimentin 实施免疫组织化学双重染色(图 4-24),同时在体外培养端脑细胞,以同样的方法对 ChAT 和 vimentin 免疫细胞化学双重染色(图 4-21)。尽管实验中遇到一些困难,但是在研究小组的不懈努力下终于完成了这次实验,并得到令人兴奋的可喜结果。我们又以此结果为线索开始了对放射状胶质细胞如何获得胆碱能表型的探索。

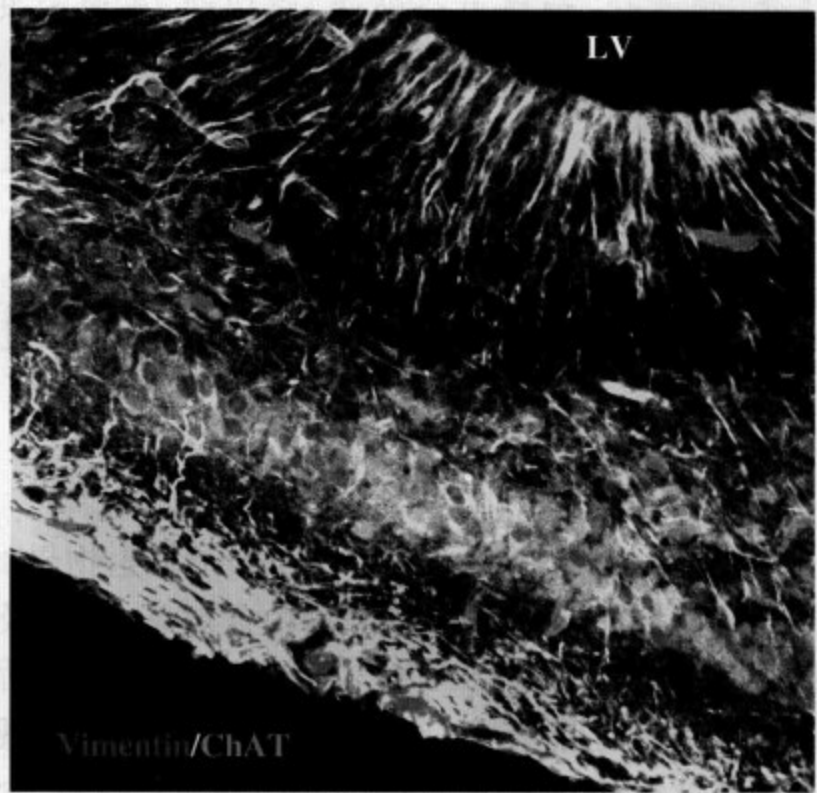


图 4-24 免疫荧光组织化学双重染色
胚胎 14 天大鼠端脑背侧波形蛋白(vimentin)免疫反应阳性细胞呈绿色荧光,乙酰胆碱转移酶(ChAT)免疫反应阳性细胞呈红色荧光,两者共存呈黄色荧光(周莉供图)

(周 莉)

参 考 文 献

1. Schambra UB, Sulik KK, Petrusz P. Ontogeny of cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Journal of Comparative Neurology*. 1989, 288(1):101-112.
2. Stephen C. Noctor, Alexander C. Flint, Tamily A. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 2001, 409(6821):714-720.

第五章 原位杂交组织化学

原位杂交组织化学(in situ hybridization histochemistry),简称原位杂交(in situ hybridization),是将分子杂交与组织化学相结合而在核酸原有的位置进行细胞内核酸定性、定位的一种技术。原位杂交可定位细胞内的DNA,但更多地用于定位细胞内的mRNA,因此,它为研究单一细胞中编码各种蛋白质和多肽(或其前体)的相应mRNA定位以及研究细胞内基因表达及有关因素的调控提供了有效的手段,可视为细胞化学或免疫细胞化学技术中革命性的突破。原位杂交技术已广泛应用于遗传学、病毒学、神经内分泌学、病理学、免疫学及发育生物学等各个领域。在医学实验中,原位杂交技术已从基础医学走向临床医学,并作为一种常规技术在各个领域广泛应用。

第一节 原位杂交组织化学基本原理

一、核酸的化学组成与基本结构

核酸是一类十分重要的生物大分子。生物界的核酸可分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两类。两类核酸均由含氮碱、戊糖及磷酸三种成分组成。其中DNA所含的戊糖为脱氧核糖,而RNA所含的为核糖。核酸中的含氮碱简称碱基,包括嘌呤碱和嘧啶碱两类。嘌呤碱有腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),嘧啶碱有胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)和胸腺嘧啶(T)。DNA和RNA含有的共同碱基是A、G、C,含有的不同碱基在DNA中是T, RNA中是U。

戊糖和碱基以共价键连接成核苷。如果所连接的戊糖是核糖,则生成核糖核苷,如是脱氧核糖,则生成脱氧核糖核苷。根据核苷中所含碱基的不同,脱氧核糖核苷主要有脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胞苷和脱氧胸苷,核糖核苷主要有腺苷、鸟苷、胞苷及尿苷。

核苷与磷酸以酯键相连而形成核苷酸。核苷酸也有核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸两种。多个核糖单核苷酸或脱氧核糖单核苷酸借3'-5'磷酸二酯键相连,形成长链的大分子多核苷酸,即核酸,包括DNA和RNA。

核酸链中核苷酸按照一定的顺序排列,这种排列顺序即核酸的一级结构。由于核酸中各种核苷酸彼此之间的差别在碱基部分,因此碱基顺序也就代表核苷酸顺序,故核酸的一级结构即指核酸分子中碱基的排列顺序。

1953年,Watson和Crick提出了著名的DNA双螺旋结构学说。根据这一学说,DNA分子由两条反向平行的多脱氧核苷酸链组成,两条链围绕一个共同的轴心,以右手方向盘绕成双螺旋构型。磷酸和脱氧核糖间隔相连,位于螺旋的外侧,构成螺旋的主链,碱基则位于

螺旋的内侧。两条链上的碱基必须是腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。A与T之间以2个氢键连接,而G与C之间则以3个氢键相连。同一链内相邻碱基间的疏水作用所造成的碱基堆砌力和两条链之间的氢键是保持螺旋结构稳定的主要作用力。氢键不仅增加螺旋的稳定性,而且赋予碱基间相互结合的专一性。DNA的二级结构即指DNA的双螺旋结构。

线性DNA分子在双螺旋的基础上进一步旋转、折叠形成超螺旋,即DNA的三级结构,如细菌、质粒及一些病毒的DNA双螺旋分子尚可形成闭合环状;天然状态的DNA分子多扭曲形成麻花状;真核细胞的细胞核中双螺旋DNA以组蛋白为核心盘绕形成核小体等。

RNA分子也是由核苷酸依3',5'磷酸二酯键形成的多核苷酸链。除了有些病毒的RNA分子是双螺旋结构外,原核生物和真核生物的RNA都是单链的。RNA单链的局部可发生发夹样回折,即局部折叠成的某一片段的A与G分别与另一片段的U和C配对,形成局部的双螺旋结构。在此结构内的碱基不需全部配对,不能配对的碱基则连成小环从螺旋区中被圈出来。这种RNA单链局部小双螺旋结构即RNA的二级结构。

根据结构和功能的不同,细胞中的RNA可分为三类:即信使(mRNA)、转运RNA(tRNA)和核糖体RNA(rRNA)。

mRNA以DNA为模板,在RNA聚合酶的催化下,按碱基互补原则,从分子的5'末端向3'末端方向在细胞核内合成,因此,mRNA分子能准确地传递DNA链上的遗传信息。合成后的mRNA经核孔进入细胞质,并与核糖体结合,将单核糖体连成多核糖体。由于细胞内的基因和基因组很多,而mRNA是根据要表达的基因或基因组合成的,因此mRNA种类复杂多样。

tRNA是RNA中最小的一种,其3'端的碱基顺序均为CCA,是氨基酸结合的位点。在tRNA分子中有能识别mRNA所携带的遗传密码的反密码子。tRNA作为一种运载工具能把各种氨基酸搬运到多核糖体。目前已知的tRNA有250余种,每一种tRNA只能搬运一种特定的氨基酸到多核糖体上,并将其配置在mRNA的特定部位,以使氨基酸按照mRNA携带的遗传信息合成蛋白质。

rRNA是细胞中含量最多的一种RNA,它们与相关的蛋白质一起,共同构成核糖体,是氨基酸装配的场所。

二、DNA变性与复性

(一) 变性

DNA的三维空间构象即超螺旋结构主要靠一些非共价键如氢键折叠形成,这些非共价键都是键能较低的键,很容易在外来作用的影响下断裂,使双螺旋解开,导致空间结构破坏,使规则的DNA变成不规则的线团,因而发生性质改变,称为DNA变性(denaturation)。变性的DNA为单链。加热接近100℃、改变pH(>10或<3)以及某些化学试剂(如乙酸、尿素和酰胺等)的作用,均可使DNA变性。

如果通过加热使DNA变性,根据DNA变性的程度与温度的关系可绘制熔解曲线。使50% DNA分子发生变性的温度称为变性温度,由于这一现象和结晶的熔解相似,故变性温度又称熔解温度(melting temperature, T_m)。 T_m 值不是一个固定的数值,它与下列因素有关:

1. DNA 的均一性 均一 DNA 如病毒 DNA, 解链发生在很窄的 T_m 值范围, 而不均一 DNA 如动物细胞 DNA, 其 T_m 值的范围较宽。

2. DNA 分子中(G+C)的含量 一定条件下, DNA 的 T_m 值由(G+C)含量所决定, 因 G 和 C 之间有三个氢键, 所以(G+C)含量较高的 DNA 的 T_m 值较高。实验表明, DNA 的 T_m 值的高低与其(G+C)的克分子含量呈直线关系。

3. 溶剂的性质 T_m 不仅与 DNA 本身性质有关, 而且与溶液的条件, 如离子强度、pH 及变性剂的浓度等有关。在低离子强度时, T_m 值较低, 反之则较高, 因此 DNA 制剂不应保存在离子强度过低的溶液中; pH 值在 5~9 范围内, T_m 值变化不明显, 在高 pH 值下, 碱基可失去形成氢键的能力, 当 pH 值大于 11.3 时所有氢键均被破坏, DNA 完全变性; 变性剂可以干扰碱基堆砌力和氢键的形成, 因此可降低 T_m 值, 如 50% 的甲酰胺可使 T_m 值降低 30°C 。

(二) 复性

变性的 DNA 只要消除变性条件, 两条互补链还可以重新结合, 恢复原来的双螺旋结构, 这一过程称为复性(renaturation)。在 DNA 热变性后, 将温度缓慢降低而使 DNA 逐渐冷却, 并维持在低于 T_m 值的一定范围内, 变性后的单链 DNA 即可恢复双螺旋结构, 因此复性过程又叫作退火。复性后的 DNA, 其理化性质都能得到恢复。倘若 DNA 热变性后快速冷却, 则不能复性。

DNA 的复性速度受到多种因素的影响:

1. 温度 温度过高, 有利于 DNA 变性而不利于复性; 而温度过低, 不利于双键间随机形成的错配氢键的断裂, 易造成两条非互补单链间的非特异性结合。复性的适宜温度一般低于 T_m 值 25°C 左右。温度过高如接近变性温度, 复性则难以进行; 温度过低, 产生非特异性复性。

2. DNA 的浓度 DNA 的浓度直接影响到 DNA 单链间碰撞的几率。DNA 浓度越高, 复性速度越快。

3. DNA 片段的大小 大分子的 DNA 扩散速度较慢, 发现互补的机会少, 难以形成正确配对, 因此复性较慢。

4. DNA 分子的复杂性 DNA 总量一定时, 基因组越复杂, 其中特定序列的拷贝数就越少, 互补序列的浓度就越低, 因此复性速度越慢, 而序列简单的 DNA 分子复性较快。

5. 离子强度 溶液的离子强度较高时, 可有效中和 DNA 双链间的磷酸基团的静电斥力, 因此复性速度较快。

第二节 核酸分子杂交

两条 DNA 单链之间能否复性, 并不取决于这两条单链是否同源, 而取决于它们的碱基顺序是否互补。如果两条来源不同的 DNA 单链具有互补的碱基序列, 也同样可以复性, 形成杂交体, 这个过程即核酸分子杂交或简称分子杂交。分子杂交是一项利用 DNA 变性-复性原理而设计的极其重要的分子生物学技术, 具有特异性强及灵敏度高的特点。分子杂交形成双链杂交体的过程, 从本质上看, 就是两条互补单链核酸分子以复性的原理形成双链核酸的过程。这一过程既可发生在两条 DNA 单链之间(DNA-DNA 杂交), 也可发生在 DNA 与 RNA

之间(DNA-RNA 杂交)、两条 RNA 单链之间(RNA-RNA 杂交)以及寡核苷酸与 DNA 或 RNA 之间。由于 DNA 分子一般都以双链形式存在,因此在进行分子杂交时,应先将双链 DNA 分子通过变性解聚成单链后再进行杂交。单链核酸分子不需变性即可直接进行杂交。

两条具有一定互补序列的核酸单链既可在一定条件下杂交而形成双链,杂交双链又可在一定条件下解链成单链。杂交双链即杂交体的稳定程度与它的变性或熔解温度(T_m)有关, T_m 值越高,杂交体越稳定。影响杂交体稳定性的因素主要包括以下几个方面:

1. 杂交双链的碱基组成 杂交双链解离成单链时主要涉及配对碱基间氢键的断裂。G-C 之间有三个氢键,而 A-T 之间或 A-U 之间只有两个氢键,故(G+C)含量越高的杂交双链越稳定。

2. 杂交双链的长度 杂交双链越长越稳定。

3. 杂交双链的碱基错配程度 错配的碱基愈多,即错配的程度愈高,杂交双链的稳定性愈低。

4. 溶液中的离子强度 离子强度愈高,杂交双链越稳定。

5. 变性剂(如甲酰胺)的浓度 有些杂交液常包含较大比例的甲酰胺,以降低杂交反应的温度。故提高杂交液中甲酰胺的浓度,可降低杂交双链的稳定性。

分子杂交按作用环境可大致分为固相杂交和液相杂交两种类型。固相杂交是将参加反应的一条核酸链先固定在固体支持物(如硝酸纤维膜、尼龙膜、乳胶颗粒、微孔板等)上,另一条核酸链游离于溶液中;液相杂交时,参与反应的两条核酸链都游离于溶液中。

原位杂交属于固相分子杂交的范畴,它应用 DNA 变性-复性原理,在低于核酸变性温度(T_m) $20\sim 30^\circ\text{C}$ 时,根据碱基互补配对原则,在适当条件下用带有标记物的、已知碱基序列的核酸与组织切片上具有相应序列的单链核酸(靶核酸)发生杂交反应,形成杂交体。然后通过相应的显示方法或检测系统在组织或细胞内将这种杂交体显示出来而在核酸原有的位置对相应的靶核酸进行定位,并可利用显微分光光度计或图像分析仪等进行半定量研究。原位杂交既吸取了分子杂交技术特异性强及灵敏度高的特点,又兼备组织化学染色的可见性,能特异地显示细胞内的核酸,并可研究特异基因在局部组织中的表达。

第三节 核酸分子探针

所谓探针,是一种已知的特异性分子,一种仅与特异的靶分子反应的分子,它可结合适宜的标记物,以便在与靶分子反应后被检测。核酸探针是指带有标记物的已知碱基序列的核酸片段,它仅与靶核酸即待测核酸反应。在原位杂交中,核酸探针是用于组织细胞内特定核酸序列定位的关键试剂。

一、探针的种类

根据核酸性质的不同,核酸探针可分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、cRNA 探针、寡核苷酸探针等几类。根据目的要求不同,可以选用不同的核酸探针。探针选择的最基本原则是应具有高度特异性,兼而考虑来源是否方便等其他因素。

(一) 基因组 DNA 探针

克隆化的各种基因片段是使用最广泛的核酸探针。几乎所有的基因片段都可克隆到质粒或噬菌体载体中,为获得大量高纯度的 DNA 探针提供了方便的来源。PCR 技术也为 DNA 探针的获得提供了另一方便的来源。选择此类探针时,要尽可能使用基因的外显子。基因组 DNA 探针通常为双链,在使用时须进行变性处理。

(二) cDNA 探针

cDNA 是互补于 mRNA 的 DNA 分子,可从 cDNA 文库中克隆获得。由于 cDNA 中不存在内含子,因此是一种较为理想的探针。

在对 cDNA 进行克隆时,可通过选择不同的载体来控制所产生的 cDNA 是双链还是单链。如果以质粒作载体,则产生双链 cDNA,获得的探针也是双链。由于双链 cDNA 有意义链和无意义链之间的复性会使能与靶 mRNA 结合的有效探针明显减少,而细胞内 mRNA 的拷贝量较少,故双链 cDNA 探针的检测灵敏度较低,较少用来做探测细胞内 mRNA 的原位杂交反应。如果将 cDNA 导入 M13 衍生载体中,则可产生大量的单链 cDNA。用这种单链 cDNA 作探针既不需要变性,也克服了双链 cDNA 探针在杂交反应中两条链间复性的缺点,使能与靶 mRNA 结合的探针浓度提高,从而提高杂交反应敏感性。

(三) cRNA 探针

cRNA 探针是以 cDNA 为模板在体外转录而成的探针,可方便地通过已克隆于特定质粒载体的 cDNA 产生。这些质粒通常在紧邻多克隆位点的位置含有一个噬菌体启动子。应用相关的 RNA 聚合酶和 4 种核糖核苷(rNTPs)(其中至少一种带有标记物)进行体外转录反应,依赖 DNA 的 RNA 聚合酶以克隆的 cDNA 为模板,以含有标记物的三磷酸核糖核苷为原料,从启动子下游开始在体外转录产生 RNA。通过改变外源 cDNA 在质粒中的插入方向或选用不同的 RNA 聚合酶,可以控制 RNA 的转录方向(即以 cDNA 的哪条链为模板转录 RNA),从而可以得到与 mRNA 同序列的同义 RNA 探针(sense probe)或与 mRNA 互补的反义 RNA 探针(antisense probe),后者即互补 RNA(cRNA)探针。通常用同义 RNA 探针作 cRNA 探针的阴性对照。

由于在体外转录反应物中可提供有标记物标记的核苷酸为原料,因此经过体外转录就能得到标记的 cRNA 探针(图 5-1)。cRNA 探针是单链探针,故以 cRNA 探针进行杂交反应可避免应用双链 cDNA 探针作杂交反应时存在的两条链之间的复性问题。cRNA 和 mRNA 之间形成的杂交体要比 cDNA-mRNA 杂交体稳定,因此杂交反应后可经受高严格度洗涤。cRNA-mRNA 杂交体不受 RNA 酶的影响,故杂交后还可用 RNA 酶处理,以除去未结合的探针。此外,体外转录合成的 cRNA 探针的长度比较一致。

由于 cRNA 探针具有以上优点,因此在分子杂交中,特别是在原位杂交中的应用较广泛。但 cRNA 探针的制备过程较复杂,需要较高的分子生物学实验条件,cRNA 对 RNA 酶敏感,易被 RNA 酶破坏,因而在操作过程中需严格防止 RNA 酶污染。

(四) 寡核苷酸探针

寡核苷酸探针是指用化学合成技术在体外合成的单链 DNA,长度一般为 30~50bp。寡核苷酸探针目前均由 DNA 合成仪合成。

在确定寡核苷酸探针的序列时,一定要使该探针能与靶核酸序列特异性结合,而与无关

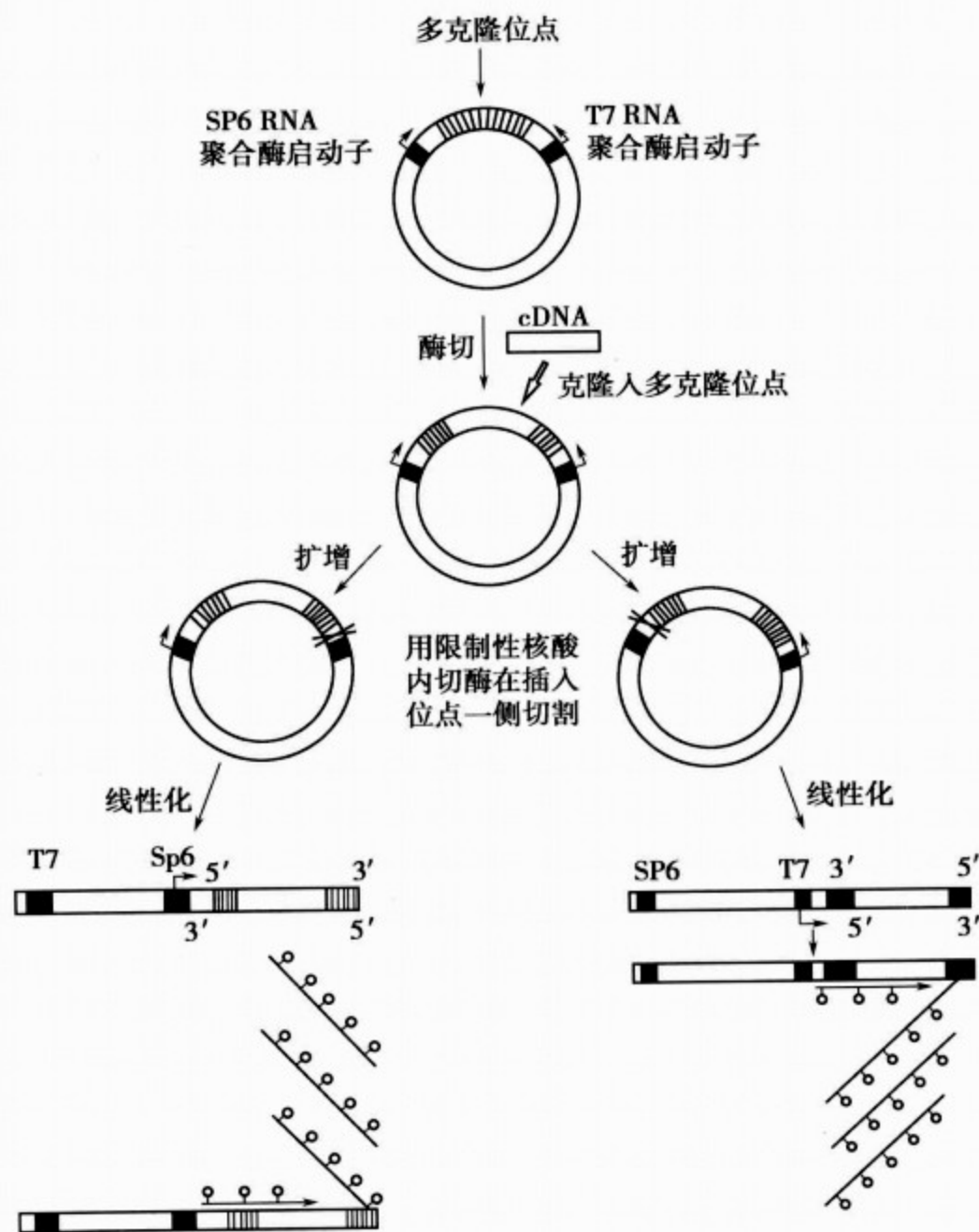


图 5-1 体外转录法制备 cRNA 探针原理图

序列不会产生杂交反应。如果靶 DNA 或 mRNA 的序列是已知的,合成寡核苷酸的序列按照碱基互补原则很容易确定。如果仅仅知道氨基酸序列,探针的设计则较复杂,因为大多数氨基酸可以具有好几种密码子,即密码具有简并性。这时就应该选择密码简并性最小的氨基酸序列。在设计筛选寡核苷酸探针时应遵守以下一些原则:

1. 长度一般为 30~50 个 bp,过长者杂交时间较长,合成量低,过短者,特异性较差。
2. 碱基中(G+C)含量应在 40%~60%,超出此范围则会增加非特异性杂交。
3. 探针分子内不应存在互补区,否则会出现抑制探针杂交的“发夹”状结构。

合成的寡核苷酸探针与 cDNA 探针相比具有以下优点:

(1) 制备简易:寡核苷酸探针以核苷酸为原料,通过 DNA 合成仪短时间内即可合成,方法简便,不需要复杂的分子生物学实验条件。

(2) 序列任定:可按照已知的某一特定目的或靶基因的核苷酸顺序合成任何一段特异性核苷酸片段用做探针。

(3) 易穿透组织:由于寡核苷酸链不长,而且是单链,对组织的穿透力比较长的双链 cDNA 分子大。

(4) 杂交时间短:由于寡核苷酸链短,其序列较简单,分子量小,所以和等量靶位点完全杂交的时间比克隆探针短。

(5) 使用简便:合成的寡核苷酸探针性质上是脱氧核糖核酸,对 RNA 酶不敏感,因此比 RNA 探针更稳定;又因此类探针为单链分子,在与组织切片细胞内 mRNA 分子杂交时不需预先加热解链。

寡核苷酸探针也有一定缺点,如与 mRNA 的杂交不如 RNA-RNA 杂交稳定,再者,因其分子较短,一般只能采用末端标记法标记,结合的标记物较少,故其敏感性较低。此外,大量合成寡核苷酸探针所需费用较高。

二、探针的标记

利用分子杂交的原理对待测核酸进行检测,必须将与待测核酸进行杂交反应的探针用某种可以检测的分子进行标记。探针的标记是指将一些可以用一定的方法显示或检测的物质,即标记物结合在探针上的过程。

(一) 探针标记物

理想的探针标记物应具备以下特性:①高度灵敏性;②与探针的结合不影响探针的主要理化特性、杂交特异性和杂交稳定性;③显示或检测要简便、节时、准确可靠、重复性好;④对环境无污染,对人体无损伤。目前用于标记原位杂交探针的标记物有 20 多种,可分为放射性标记物(放射性核素)和非放射性标记物两大类。

1. 放射性标记物 原位杂交技术最初建立时就是以放射性核素作为标记物。目前,放射性核素仍用于探针的标记。常用的放射性核素有³²P、³H、³⁵S 等。用放射性核素标记探针有以下优点:放射性核素标记的核苷酸易掺入 DNA 和 RNA 分子中;标记反应的情况可通过特殊的仪器(闪烁计数器)进行监测;用放射性核素标记的探针进行的原位杂交反应,可用敏感性高的放射自显影技术检测。但放射性核素存在辐射危害,有半衰期限制,且放射自显影检测时间长。由于这些缺点,放射性核素标记探针的应用受到了限制。

2. 非放射性标记物 目前,非放射性标记物主要有以下几类:①酶类,如辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AKP)等;半抗原,如地高辛及生物素等;②荧光素,如异硫氰酸荧光素(FITC)等。非放射性标记物标记的探针虽然在敏感性方面不如放射性核素标记探针,但其稳定性和分辨率高,检测所需的时间短,一般在 24 小时即可得到结果,且操作简便,不存在放射性污染的安全问题,不需特殊的防护设备,因此非放射性标记物的应用日趋广泛。

(二) 探针标记方法

探针的标记方法很多,大致可以分为两大类:引入法和化学修饰法。引入法是运用标记好的核苷酸来合成探针,即先将标记物与核苷酸结合,然后通过 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶及末端转移酶等将标记的核苷酸整合入 DNA 或 RNA 探针序列中去。化学修饰法即采用化学方法将标记物掺入已合成的探针分子中去,或改变探针原有的结构,使之产生特定的化学基团。引入法较化学修饰法更常用,按其整合的方法不同,引入法可分为缺口平移法、随机引物法、末端标记法和 PCR 扩增标记法和 RNA 体外转录法等。

1. 缺口平移法 缺口平移法(nick translation)是一种最常用的标记双链 DNA 探针的方法,该方法利用 DNA 聚合酶 I 的多种酶促活性将标记的三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)掺

入到新合成的 DNA 链中,从而合成高比活性的均匀标记的 DNA 探针。其基本原理是首先用适当浓度的 DNA 酶 I 在 DNA 探针分子的一条链上打开缺口(nick),缺口处形成 3' 羟基末端;利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 5'→3' 方向外切酶活性,将缺口处 5' 端核苷酸依次切除;与此同时,在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 聚合酶活性的催化下,以另一条 DNA 链为模板,以 dNTP 为原料,顺序将 dNTP 连接到切口的 3' 羟基上,从 5' 端向 3' 端方向重新合成一条互补链。其结果是在缺口的 5' 端,核苷酸不断被水解,而在缺口的 3' 端核苷酸依次被添加上去,从而使缺口沿着互补 DNA 链移动,原料中含有的标记核苷酸因此替代原 DNA 分子上的部分核苷酸而掺入到新合成的 DNA 链中,从而获得标记的 DNA 探针(图 5-2)。此方法的缺点是需要较多的 DNA 模板(>200ng),且标记效率较低。

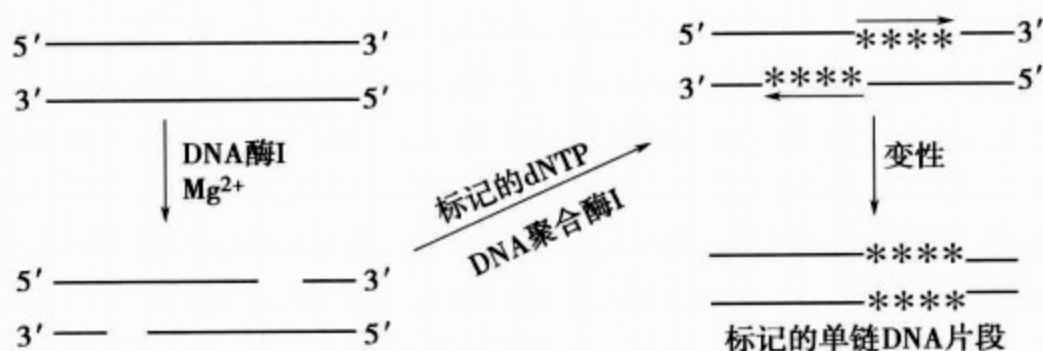


图 5-2 探针缺口平移法标记原理图

2. 随机引物法 随机引物法的原理是使被称为随机引物(random primer)的长 6 个核苷酸的寡核苷酸片段与单链 DNA 或变性的双链 DNA 随机互补结合(退火),以提供 3' 羟基末端,在无 5'→3' 外切酶活性的 DNA 聚合酶大片段(如 Klenow 片段)作用下,在引物的 3' 羟基末端逐个加上核苷酸直至下一个引物。当反应液中含有标记的核苷酸时,即形成标记的 DNA 探针(图 5-3)。6 个核苷酸混合物出现所有可能结合序列,引物与模板的结合以一种随机的方式发生,标记均匀跨越 DNA 全长。当以 RNA 为模板时,必须采用反转录酶,得到的产物是标记的单链 cDNA 探针。随机引物法标记的探针比活性高,但标记探针的产量比缺口平移法低。

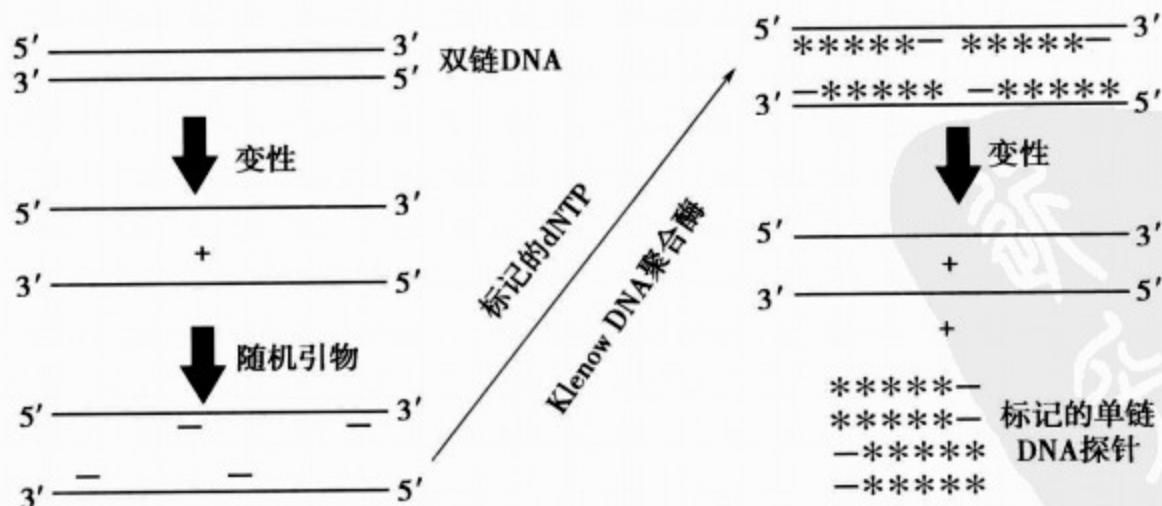


图 5-3 DNA 探针的随机引物法标记原理图

3. 末端标记法 末端标记法(end-labelling)是将标记物导入线型 DNA 或 RNA 的 3'

末端或 5' 末端的一类标记法,可分为 3' 末端标记法、5' 末端标记法和 T_4 聚合酶替代法。末端标记法主要用于寡核苷酸探针或短的 DNA 或 RNA 探针的标记,用该法标记的探针携带的标记分子较少。

(1) 5' 末端标记法:5' 末端标记法需要 T_4 多聚核苷酸激酶(polynucleotide kinase),最常用的标记物是 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 。 T_4 多聚核苷酸激酶能特异地将 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 中的 ^{32}P 转移到 DNA 或 RNA 的 5'-OH 末端,因此被标记的探针必须有一个 5'-OH 端,而大多数 DNA 或 RNA 的 5' 端都因磷酸化而含有磷酸基团,因此标记前要先用碱性磷酸酶去掉磷酸基团(图 5-4)。

(2) 3' 末端标记法:通过末端脱氧核糖核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)催化标记的 dNTP 加到单链或双链 DNA 的 3' 末端上(图 5-5)。

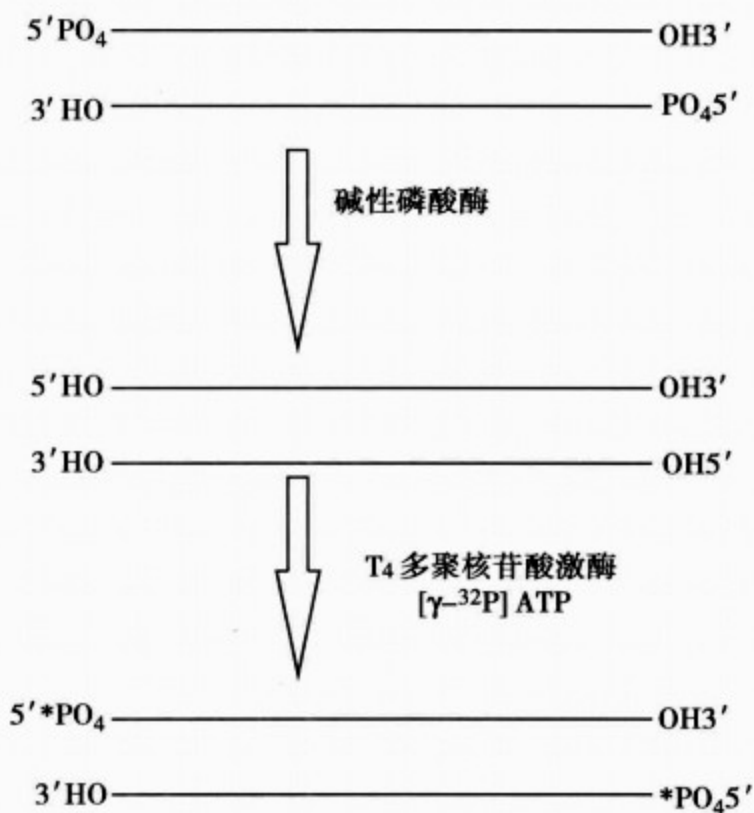


图 5-4 探针 5' 末端标记法原理图

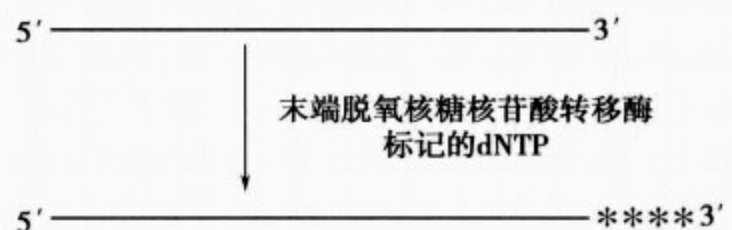


图 5-5 探针 3' 末端标记法原理图

(3) T_4 聚合酶替代法:根据 T_4 DNA 聚合酶具有 $5' \rightarrow 3'$ 聚合酶活性和 $3' \rightarrow 5'$ 方向核酸外切酶活性,而在 4 种三磷酸核苷存在时 $3' \rightarrow 5'$ 方向核酸外切酶活性被抑制的特性,首先,在缺乏核苷酸的情况下,利用 T_4 DNA 聚合酶从 $3' \rightarrow 5'$ 端对双链 DNA 进行水解,产生带凹缺的 3' 端 DNA 分子,然后加入 4 种三磷酸核苷,抑制 T_4 DNA 聚合酶的 $3' \rightarrow 5'$ 外切酶活性,在 $5' \rightarrow 3'$ 聚合酶活性的作用下, DNA 分子开始修复,带有标记的核苷就掺入到修复的 3' 端片段中(图 5-6)。

4. PCR 扩增标记法 PCR 扩增标记法的原理与普通的核酸 PCR 相同,即 Taq DNA 多聚酶以 DNA 为模板,在特异引物引导下,在 PCR 仪中合成 cDNA 探针。由于在反应体系中加入一定量的标记 dNTP,因此扩增的同时又是一个标记过程(图 5-7)。

5. RNA 体外转录法 在以体外转录方式合成 cRNA 探针时,如在转录体系中加入标记的 rNTP 原料,就能合成带有标记物的 cRNA 探针。当反应终止后,再用 DNA 酶 I 来消

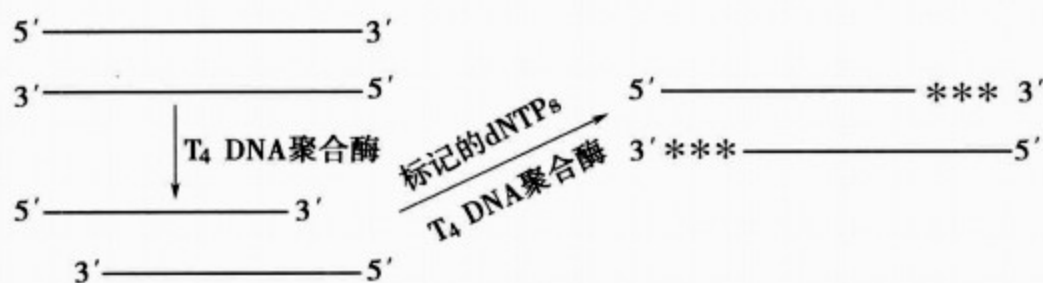


图 5-6 T₄ DNA 聚合酶替代法标记 DNA 探针原理图

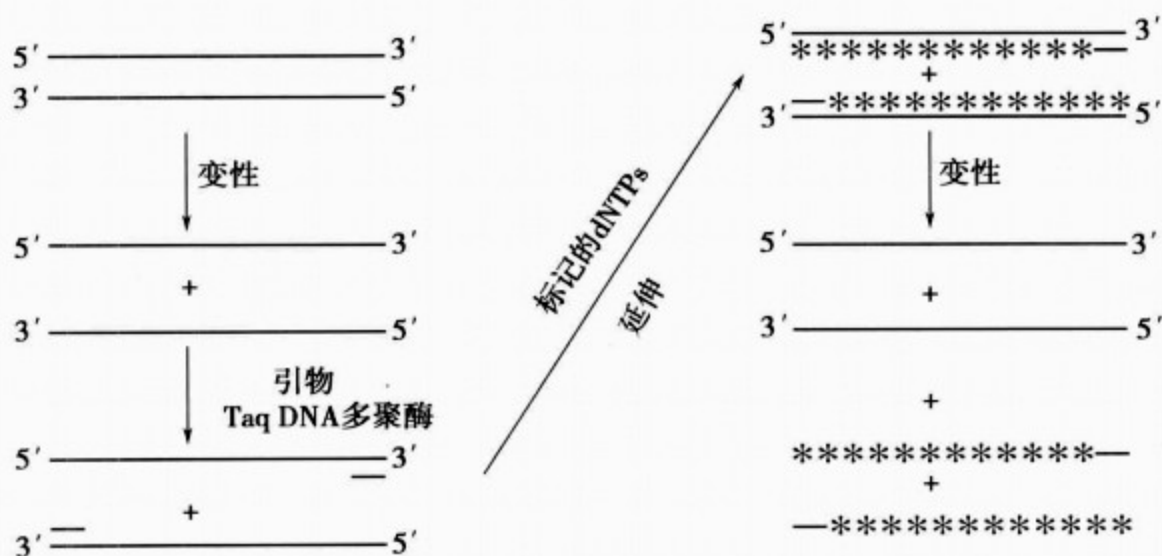


图 5-7 cDNA 探针 PCR 扩增法标记原理图

除 DNA 模板,而标记的 cRNA 则能耐受 DNA 酶 I 的影响(详见本节探针的种类中 cRNA 探针)。

第四节 原位杂交组织化学基本程序

根据所用探针的种类和靶核酸的不同,原位杂交可分为 DNA-DNA 杂交, DNA-RNA 杂交和 RNA-RNA 杂交三类。因原位杂交多用于检测组织细胞内的 mRNA 及其表达,故 DNA-RNA 杂交和 RNA-RNA 杂交较多见, DNA-DNA 杂交主要用于染色体原位杂交以对染色体中的 DNA 进行定位。

根据探针的标记物是否能直接检测,原位杂交又可分为直接法和间接法两类。在直接法中,探针用放射性核素、荧光素或一些酶标记,探针与组织细胞内靶核酸所形成的杂交体可分别通过放射自显影、荧光显微镜或酶促呈色反应而直接显示(图 5-8)。直接法原位杂交操作步骤少,所需时间短,但由于没有杂交信号的放大,对一些低拷贝的靶序列检测的敏感性不够。间接法一般都用半抗原标记探针,最后通过免疫组织化学或亲和组织化学对半抗原定位,间接显示探针与组织细胞内靶核酸所形成的杂交体(图 5-9)。间接法原位杂交敏感性较直接法高,是最常用的原位杂交方法,荧光原位杂交也可用间接法进行。

尽管因核酸探针种类和标记物的不同,原位杂交技术在具体应用的方法上各有差异,但

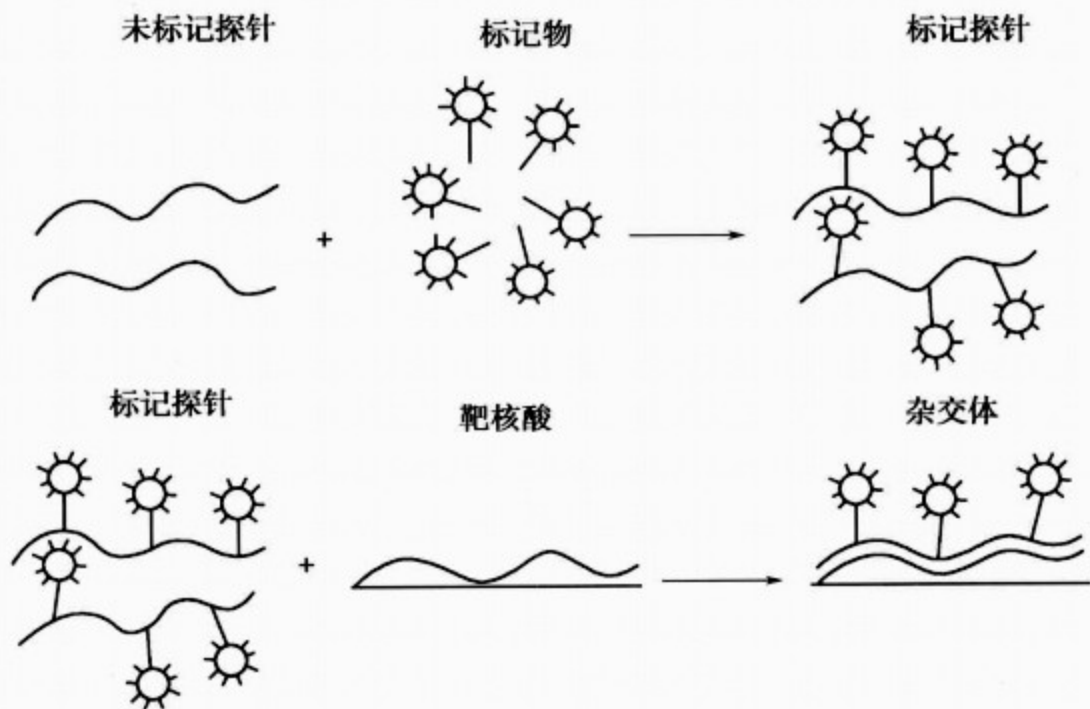


图 5-8 直接法原位杂交示意图

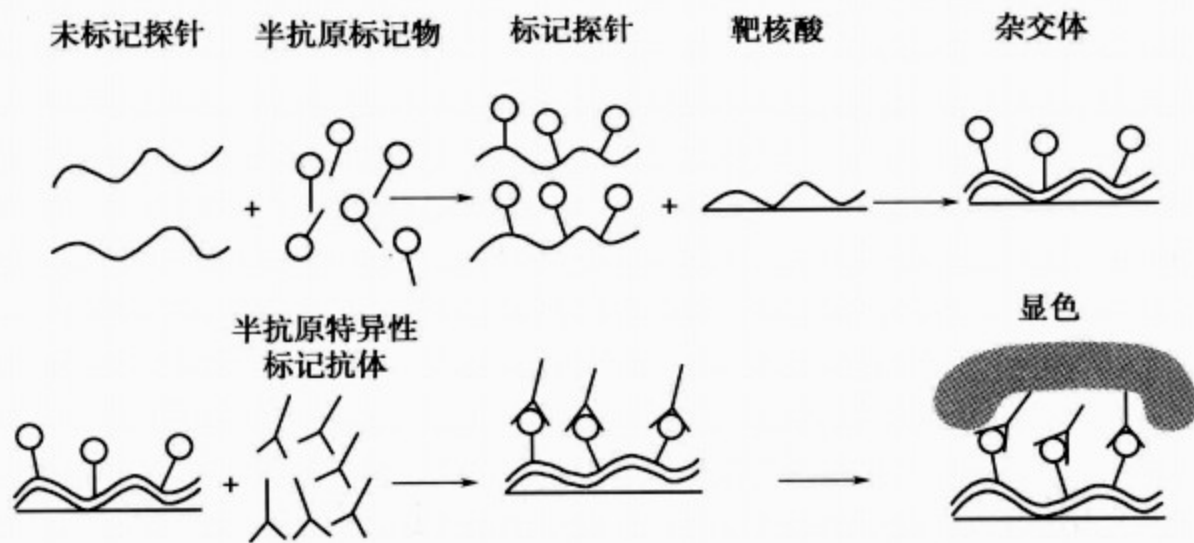


图 5-9 间接法原位杂交示意图

其基本方法和原则大致相同,可分为标本制备、杂交前处理、杂交反应、杂交后处理和杂交体检测五大基本步骤。

一、标本制备

(一) 取材

用于原位杂交反应的组织应尽可能新鲜,因此要求取材迅速。由于很多 RNA 极易降解,取下的组织应尽可能迅速固定或冷冻。为了避免外源性 RNA 酶引起靶组织中 RNA 丢失,取材时应戴手套,所用的器械、容器都要经高压消毒,或清洁后用经焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理过的灭菌蒸馏水清洗。此外,避免用手直接接触组织、器械、容器和溶液等。

(二) 固定

进行原位杂交时,组织常需要用化学固定剂进行固定。在固定剂的应用和选择上应兼

顾三个方面,即保持良好的细胞结构,最大限度地保持细胞内 DNA 或 RNA 的水平并使探针易于进入细胞。DNA 比较稳定,固定剂的种类和浓度并不十分重要,而 RNA 极易被降解,故在固定时,固定剂的种类、浓度和固定时间均十分重要。

1. 固定剂 固定剂分为沉淀固定剂和交联固定剂两类。常用的沉淀固定剂有乙醇和丙酮等,交联固定剂有多聚甲醛和戊二醛等。经用沉淀固定剂固定的组织通透性较好,利于探针穿入组织,但沉淀固定剂可能引起 RNA 的丢失,而且保存组织形态结构也不十分理想。醛类交联固定剂可较好地保存组织中的 RNA,对保存组织形态结构优于沉淀固定剂,但由强交联固定剂戊二醛固定后的组织通透性很低,探针较难进入其中。一般认为,4%多聚甲醛固定对检测 mRNA 的组织较为理想,它既能有效地保存靶 RNA 和组织形态结构,又可使组织具有一定通透性。

2. 固定方法 固定方法可分浸渍法和灌注法。取材方便的组织,在迅速取材后立即浸入固定液中进行浸渍固定。而对较难取材的组织,先行灌注固定,然后取材,并将取下的组织浸入固定液中再行浸渍固定。固定后的组织浸入 25%的蔗糖磷酸缓冲液中,置 4℃冰箱过夜,次日冰冻切片或保存在液氮中待冰冻切片。经固定和漂洗后的组织也可在 25%蔗糖磷酸缓冲液中于 4℃保存 1~2 个月。新鲜组织也可在取材后直接以液氮或干冰速冻,冰冻切片后再浸入 4%多聚甲醛固定 10~30 分钟,干燥后立即进行杂交或保存在-80℃冰箱内备用。

(三) 切片

1. 冰冻切片 在原位杂交中以冰冻切片最常用。切片时,要尽量避免 RNA 酶污染,操作时需戴手套,使用 70%酒精擦洗工作台、切片机刀架、摇柄和载物台等手常接触的部位以及其他器械。切片厚度可根据具体情况而定。如靶组织中待测 mRNA 量较少,所采用的原位杂交方法敏感性较低,为了能得到较多的信号,切片可厚些(约 15~20 μm),反之则可薄些(约 5~10 μm)。粘贴切片前,载玻片要清洗干净,使其不含 RNA 酶,并进行硅化处理。清洗方法:先用热肥皂水刷洗,自来水清洗干净后置于清洁液中浸泡 24 小时,清水洗净烘干,95%乙醇中浸泡 24 小时后蒸馏水冲洗,150℃以上高温烘干,锡箔纸包好无尘存放。硅化载玻片的制作步骤如下:

- (1) 将清洗干净的载玻片在丙酮中浸泡 5 分钟进行脱脂;
- (2) 再入无水乙醇浸泡 5 分钟,然后风干;
- (3) 继之浸入硅烷(silane)液数秒(配法:将 4ml 3-氨基-丙基三乙氧基硅与 200ml 丙酮混合即可);
- (4) 移至丙酮内 5 分钟;
- (5) 入双蒸水 5 分钟;
- (6) 最后风干备用。

由于原位杂交的实验周期长,实验程序繁杂,为了防止组织或细胞标本在杂交过程中脱落,载玻片要涂以铬矾明胶或多聚赖氨酸(分子量大于 300 000)等黏附剂。

2. 石蜡切片 石蜡切片展片时需用含 DEPC 的双蒸水加温展片,制成的石蜡切片置于 52℃烤箱中过夜后即可进行原位杂交反应。经烤干的切片可在室温下保存。

3. 培养细胞 培养细胞标本制备常采用细胞离心法。先将生长在培养瓶壁上的细胞用胰蛋白酶处理,制成每毫升含 1×10^5 细胞浓度的悬液,经离心制成细胞离心标本,使细胞

贴附于经处理的载玻片上,经空气干燥 1~2 分钟后浸渍固定,再经 PBS 和蒸馏水漂洗后置 37℃干燥保存或 70%乙醇 4℃保存。如果细胞直接生长在载玻片或盖玻片上,则可将长有细胞的载玻片或盖玻片直接固定,再按上述方法漂洗、干燥和储存。

二、杂交前处理

杂交前处理的目的在于提高组织通透性,增加靶核酸的可及性以及防止 RNA 或 DNA 探针与组织细胞或载玻片之间的非特异性结合,从而增强杂交信号,降低背景。杂交前处理的具体方法和步骤因所采用的固定剂、组织标本以及探针不同而异。用温和的非交联固定剂固定的细胞培养标本和冰冻切片,不需经特殊的杂交前处理,一般均能获得较好的杂交反应结果。而用交联固定剂固定的标本,尤其是福尔马林固定的石蜡切片,则需经杂交前处理才能获得较好的结果。杂交前处理主要包括增强组织的通透性和核酸探针的穿透通性,减低背景染色两个方面。

(一) 增强组织通透性和核酸探针穿透性

对于用戊二醛等强交联固定剂固定的组织,由于固定剂与蛋白质产生广泛交联,需要应用较强的增强组织通透性的试剂。增强组织通透性常用去污剂或某些消化酶处理,通过这种处理可广泛除去蛋白质而增强组织的通透性和探针的穿透性,提高杂交信号,但同时也会降低 RNA 的保存量,影响组织结构的形态,导致标本从载玻片上脱落,因此在用量和时间上应加以注意。

1. 去污剂处理 常用去污剂为 Triton X-100,一般将切片浸入含 0.2%~0.5% Triton X-100 的 PBS 内处理 15 分钟。

2. 蛋白酶处理 蛋白酶 K 的消化作用在原位杂交中十分重要,其浓度及孵育时间视组织种类、固定剂种类、切片厚度而定,一般应用蛋白酶 K 1 μ g/ml(于 0.1mol/L Tris, 50mmol/L EDTA, pH 8.0 缓冲液中),37℃孵育 15~30 分钟,以达到蛋白充分消化作用而不影响组织形态为目的。蛋白酶 K 还具有消化靶 DNA 周围蛋白质从而提高杂交信号的作用。在蛋白酶 K 消化后,用蛋白酶 K 抑制剂终止反应,即在冷 PBS 中清洗及在含 0.2%或 0.1mol/L 甘氨酸的 PBS 中清洗。为保持组织结构,通常用 4%多聚甲醛再固定 3~5 分钟。石蜡切片在此之前必须先脱蜡,并经下行酒精入水。

(二) 减低背景染色

1. 酸酐和稀酸处理 为了防止探针与组织中碱性蛋白之间的静电结合,降低背景,杂交前标本可用 0.25%醋酸酐处理 10 分钟。经醋酸酐处理后,组织中蛋白的碱性基团通过乙酰化而阻断,使蛋白质的等电点偏向酸性,从而抑制非特异性吸附。组织和细胞标本也可在杂交前用稀酸(如 0.2mol/L HCl 10 分钟)处理。稀酸处理能使碱性蛋白变性,如再结合蛋白酶消化,即可将碱性蛋白移除,这样不仅能增强靶核酸探针的可及性,也可避免碱性蛋白与核酸之间的非特异性结合,达到降低背景的目的。

2. 预杂交 预杂交是指在杂交前用不含探针的预杂交液在杂交温度下预先孵育标本 1~2 小时,以阻断标本中可能与探针产生非特异性结合的位点,达到减低背景染色的目的。预杂交是减低背景染色的一种有效手段。

3. 内源性生物素和酶的抑制 非放射性原位杂交,如用生物素、HRP 或 AKP 做标记

物,组织中内源性的生物素、过氧化物酶或 AKP 则应事先阻断。当对含有内源性生物素较丰富的组织(如肝和肾组织)用免疫细胞化学 ABC 法检测杂交反应时,标本可先用未标记的卵白素-生物素孵育,以阻断内源性生物素。适宜的杂交前蛋白酶消化有利于消除内源性生物素的干扰。用 5% 脱脂奶粉缓冲盐液来稀释标记的亲合素以及将标本浸于含 2% 牛血清白蛋白的缓冲液,均可防止或抑制标记的亲合素与组织标本之间的非特异性结合。对于内源性的 AKP 和过氧化物酶可通过将标本分别浸于 20% 醋酸(4℃)中 15 秒或 0.019g/L 过碘酸淋洗和用含 1% H_2O_2 的蒸馏水或甲醇溶液室温孵育 30 分钟加以阻断。

三、杂交反应

杂交反应是指用杂交液孵育组织切片,杂交液中标记的核酸探针在适当的条件下与组织细胞内相应的靶核酸互补结合形成杂交体的过程。杂交液的成分与预杂交液基本相同,所不同的只是加入标记的核酸探针。

杂交前的准备只是为杂交成功奠定基础,要获得满意的实验结果,在杂交反应的实验过程中还必须注意以下环节。

(一) 双链 DNA 探针和靶 DNA 变性

进行杂交反应时,探针和靶核酸必须均是单链,两者方能结合。如果探针和靶核酸均为双链或二者中有一者是双链,必须通过变性使其变为单链。一般通过加热变性,变性温度为 95℃,5~15 分钟。探针和(或)靶核酸一旦变性,则需立即进行杂交反应,否则解链的核酸又会重新复性。如果用单链探针检测靶 RNA,一般不需要变性。有时单链探针较长,可能会在局部形成双链,这时也同样可通过加热处理使局部双链解开以利于探针和靶核酸之间的结合。

微波炉处理也可使双链 DNA 探针和靶 DNA 变性。此法不仅能使双链探针和靶核酸有效地变性,而且还能使杂交信号增加。这可能是由于微波辐射引起基质蛋白质变性,使靶核酸暴露,也可能是微波辐射对靶核酸构型产生直接影响,从而提高杂交效率。

(二) 杂交液

杂交液内除含一定浓度的标记探针外,还含有较高浓度的盐、甲酰胺、硫酸葡聚糖、牛血清白蛋白及载体 DNA 或 RNA 等。杂交液中含较高浓度的钠离子可使杂交率增加,还可降低探针与组织标本之间的静电结合。甲酰胺可使 T_m 值降低,故杂交液中加入适量的甲酰胺可避免因杂交温度过高而引起的细胞形态结构的破坏以及标本脱落。硫酸葡聚糖能与水结合,从而减少杂交液的有效容积,提高探针有效浓度,以达到提高杂交率的目的。在杂交液中加入牛血清白蛋白及载体 DNA 或 RNA 等,均为阻断探针与组织结构成分之间的非特异性结合以降低背景。当杂交液 pH 5~9 时,杂交体的形成不受 pH 变化的影响,常用的杂交缓冲液的 pH 为 6.5~7.5,含 20~50mmol/L 磷酸盐。

(三) 探针长度

一般用于原位杂交的探针最佳长度应在 30~100bp 之间。探针短,易于进入细胞,杂交率高,杂交时间短。200~500bp 的探针仍可使用,如超过 500bp 的探针最好在杂交前用碱或水解酶进行水解,使其变成短片段,达到实验所需求的碱基数。

(四) 探针浓度

探针浓度的高低将影响杂交反应的速度。探针浓度低,杂交反应进行得缓慢,反之则进

行得快。在原位杂交反应中,探针浓度远比组织中靶核酸浓度要高。最适宜的探针浓度应能获得最强的杂交信号和最低的背景。探针在不同组织上,或在用不同方法制备的标本上弥散和穿透情况不同,因而所需要的最适宜浓度可能也有差别。最适宜的探针浓度要通过预实验确定,一般为 $0.5\sim 5.0\mu\text{g}/\text{ml}$,通常建议放射性核素探针浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$,非放射性探针为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。此外,杂交液的量也要适当,一般以每张切片 $10\sim 20\mu\text{l}$ 为宜。杂交液过多不仅造成浪费,而且过量的杂交液含核酸探针浓度过高,反而导致高背景染色等不良反应。

(五) 杂交温度和时间

杂交温度应低于杂交体的熔解或解链温度(T_m) $20\sim 30^\circ\text{C}$,大约在 $30\sim 60^\circ\text{C}$ 之间,因为在上述温度条件下进行杂交反应,杂交率最高。在实际操作中,杂交温度的选择是:当杂交液中的甲酰胺浓度为 50% ,盐浓度为 $0.75\text{mol}/\text{L}$ 时,DNA 探针的杂交温度为 42°C 左右,RNA 探针杂交温度为 $50\sim 55^\circ\text{C}$,寡核苷酸探针的杂交温度为 37°C 左右。在实验中需要根据具体情况摸索最佳杂交温度。

杂交反应时间可能随探针浓度的增加而缩短,但在一个相当大的浓度范围内,杂交反应在 $4\sim 6$ 小时内完成。在实际操作中,一般将杂交时间定为 $16\sim 20$ 小时,或为了方便,将杂交液和标本孵育过夜。然而,杂交反应时间不要超过 24 小时,反应时间过长,形成的杂交体会解链,杂交信号反而会减弱。

(六) 杂交严格度

杂交体双链间碱基对的相配程度,可影响杂交体的稳定性,错配的杂交体稳定性较正确配对的杂交体差。杂交严格度(hybridization stringency)表示通过杂交及冲洗条件的选择对完全配对及不完全配对杂交体的鉴别程度,或是指决定探针是否能与含不相配碱基对的核酸序列结合而形成杂交体的条件。在高严格度条件下,只有碱基对完全互补的杂交体稳定,而在低严格度条件下,碱基并不完全配对的杂交体也可形成。影响严格度的因素有甲酰胺浓度、杂交温度和离子强度,因此可通过控制这些因素来减少非特异性杂交体形成,提高杂交特异性。在低甲酰胺浓度、高离子强度和低杂交温度条件下,严格度低,反之严格度就高。严格度愈高,杂交反应特异性愈强,但敏感性愈低;反之,特异性愈差,而敏感性愈高。

杂交严格度可在杂交反应及杂交后洗涤过程中调节。杂交反应在低严格度条件下进行,以保证探针与组织标本上靶核酸之间最大限度地结合,而杂交后冲洗则在高严格度条件下进行,以仅保存碱基对完全互补的杂交体,而含不相配碱基对的杂交体由于在高严格度条件下不稳定而被洗去。

此外,在杂交时,将杂交液滴于组织切片后,应放置硅化的盖玻片,防止孵育过程中高温导致杂交液的蒸发。盖玻片自身的重量能与有限的杂交液吸附而达到覆盖和防止蒸发的作用,必要时可在盖玻片四周用橡皮泥封固盖玻片。硅化的盖玻片优点是清洁光滑无杂质,不会产生气泡和不影响组织切片与杂交液接触。在孵育时间较长时,为了保证杂交所需的湿润环境,可将盖有硅化盖玻片的载玻片在进行杂交时放在盛有少量标准枸橼酸盐(standard saline citrate, SSC)溶液的密封硬塑料盒中进行孵育。

四、杂交后处理

杂交后处理的目的是除去未参与杂交体形成的过剩探针,解除探针与组织标本之间的

非特异性结合,包括那些与靶核酸相似的序列和探针之间形成的含非互补碱基对的杂交体,从而减低背景,以获得较高的信噪比。

杂交后处理主要包括系列不同浓度和不同温度盐溶液的漂洗(详见实验七)。洗涤条件(盐浓度、温度、洗涤次数和时间)因核酸探针类型和标记物不同而略有差异,一般而言,盐浓度由高到低,而温度由低到高,漂洗 10~15 分钟。高浓度的盐可减少探针与组织标本间的静电结合,洗涤过程中至少有一次高严格度条件(低盐、高温、高甲酰胺)下的漂洗。漂洗过程中,还必须注意防止切片干燥,因干燥的切片即使用大量溶液漂洗也很难减少非特异性结合。当用 RNA 探针时,杂交后可用 RNA 酶处理以降解单链 RNA,但 RNA-RNA 杂交体不受 RNA 酶的影响。在杂交后 RNA 酶处理时,应注意所用试剂不能含有对 RNA 酶有抑制作用的物质,如还原剂(用³⁵S 标记探针做原位杂交时所用的 DTT)和甲酰胺等。放射性核素标记探针的杂交后漂洗应比非放射性标记探针更充分。

五、杂交体检测

杂交体检测又称杂交体显示,是指通过一定方法使杂交反应形成的杂交体(杂交信号)成为在显微镜下可识别的产物。对原位杂交反应信号进行显示的方法因探针标记物不同而异。

(一) 放射性核素标记探针的检测

第一个原位杂交实验(1969 年)以³H 作为核酸探针的标记物,杂交信号用放射自显影术检测。随着原位杂交技术的推广和应用,³²P、¹²⁵I 及³⁵S 等放射性核素均可用来标记探针,放射自显影技术也一直是用于杂交信号检测的手段之一。

放射自显影是利用感光乳胶记录被研究材料中放射性物质分布和定位的方法。在原位杂交中,放射自显影术的基本过程包括:组织切片中结合在探针上的放射性核素以某种射线使感光乳胶曝光,形成潜影,再经显影、定影和水洗等程序获得影像。所形成的影像是与放射性标记物分布和活度一致的正像,即有曝光的部位形成黑影,放射性越强,曝光形成的黑影越深(图 5-10)。

放射自显影检测技术具有敏感性高和易于定量分析等优点。但是,由于放射性核素对人体的辐射和半衰期短,使应用受到限制。

(二) 非放射性标记探针的检测

根据标记物的不同,非放射性标记探针原位杂交信号的显示方法也不同,如果用荧光素标记探针,杂

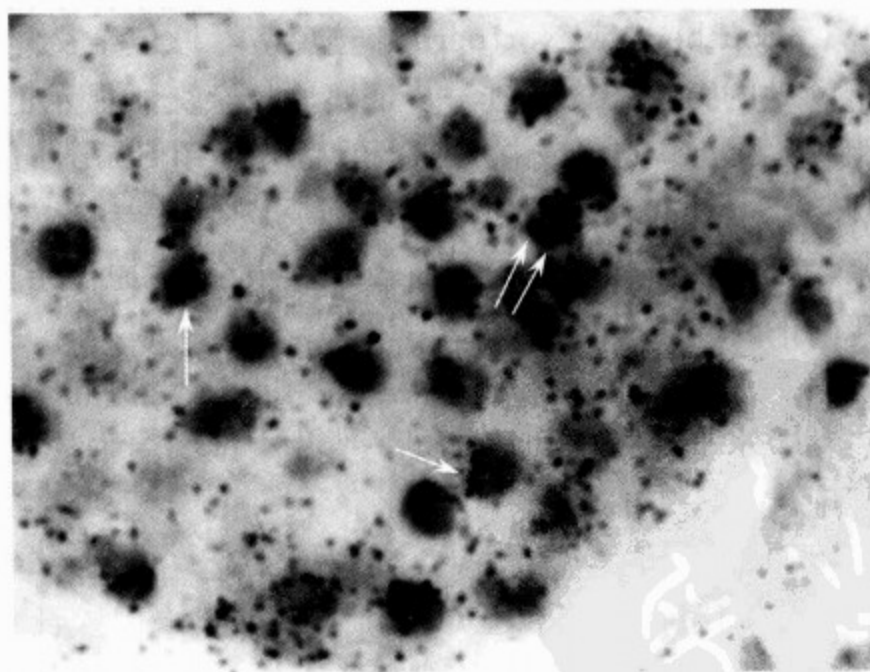


图 5-10 放射性同位素标记探针的原位杂交
³²P 标记的 Zacl 探针显示小鼠垂体中间叶中 Zacl mRNA 的表达。银颗粒(箭头所示)为阳性信号(Pagotto U, Endocrinology, 1999; 140(2): 987-996)

交信号可直接在荧光显微镜下观察,如果用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记探针,原位杂交信号可用相应底物的酶促反应来显示。目前,常用非放射性标记物多为半抗原,以半抗原标记探针的原位杂交信号可通过免疫酶组织化学或亲和组织化学技术显示。如用生物素标记探针进行原位杂交,带有标记探针的杂交体可以根据亲和素-生物素亲和组织化学原理,或生物素-抗生物素抗体的免疫细胞化学原理进行检测。以地高辛标记探针在进行原位杂交反应后,可根据免疫组织化学原理,用结合有酶(如 HRP 或 AKP)或荧光素的抗地高辛抗体与标记在探针上的地高辛进行免疫反应,再用相应底物显示酶促反应(图 5-11)或在荧光显微镜下观察荧光间接显示杂交体的存在。

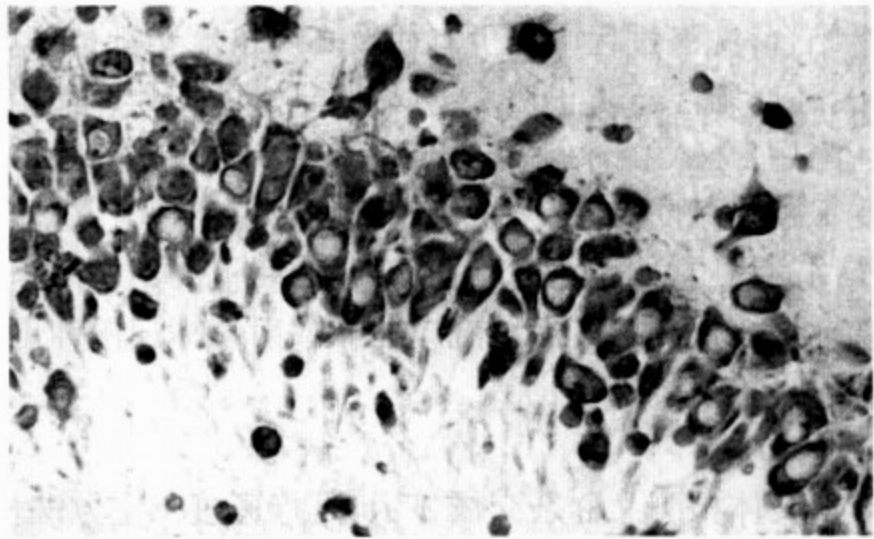


图 5-11 地高辛标记探针的原位杂交

地高辛精标记蛋白激酶 C(PKC) β 寡核苷酸探针,免疫组织化学 ABC 法显色,示大鼠海马锥体细胞内 PKC β I mRNA (西安交通大学医学院邱曙东教授供图)

六、对照实验

为证明原位杂交实验操作的准确性和实验结果的可靠性,必须设置一系列对照实验。对照实验的设置应根据核酸探针和靶核酸的种类以及现有的可能条件选定。一般应在下述几种对照实验中选择 3~4 种,以证实杂交结果的可信性。

(一) 组织对照

1. Southern 或 Northern 印迹反应 原位杂交能在组织细胞原位显示待测核酸(DNA 或 RNA)的存在。为了进一步证实原位杂交所显示的核酸是否存在于被检组织内,可从被检组织中提取 DNA 或总 RNA,然后分别用 Southern 或 Northern 印迹法进行检测。一般情况下,Southern 或 Northern 印迹反应结果与原位杂交结果一致,两者互相支持。但是,当阳性细胞在被检的组织中所占比例很小时,原位杂交结果可能为阳性,而印迹反应则由于靶核酸的含量太低而呈阴性结果。

2. 免疫组织化学 如果能获得靶基因产物抗体,可结合免疫组织化学方法,从蛋白质(或多肽)水平在相邻切片或同一切片中证明蛋白质(或多肽)和相应的 mRNA 共存于同一细胞中。

(二) 探针对照

1. 已知阳性组织和已知阴性组织对照 用探针在已知含靶核酸序列的阳性组织和已知不含靶核酸序列的阴性组织标本上进行原位杂交,应分别得到阳性结果和阴性结果。如果已知阳性组织出现阴性结果,则应对探针的制备及原位杂交的各个步骤进行检查。相反,如已知阴性组织出现阳性结果,则提示存在非特异性杂交信号。

2. 用有意义链 RNA 探针做原位杂交 因为无意义链 RNA 的碱基序列与靶 mRNA 碱基序列互补,故检测组织细胞中的 mRNA 时常用无意义链 RNA 探针(反义 RNA 探针)

进行原位杂交。而有意义链 RNA 探针碱基序列则与靶 mRNA 的序列相同,因此,用有意义链 RNA 探针进行原位杂交应得到阴性结果,这一阴性对照实验是证明探针特异性的很好方法。

3. 吸收实验 将标记探针先同与之互补的 DNA 或 RNA 杂交,然后再进行原位杂交,结果应为阴性。此实验类似于免疫组织化学的吸收实验。

(三) 杂交反应对照

1. 空白实验 在进行原位杂交时,将杂交液中除去标记探针,结果应为阴性。这是一项简便而有意义的阴性对照。

2. 杂交前用核酸酶预处理标本 根据靶核酸是 DNA 或 RNA,对被检测的标本用 DNA 酶或 RNA 酶进行预处理以消化被检核酸,然后再进行原位杂交。与未经 DNA 酶或 RNA 酶预处理的标本相比,如果杂交信号明显减弱,则证明标记探针与未经酶预处理标本中的 DNA 或 RNA 之间有杂交体形成。通常以核酸酶预处理标本并不能使杂交信号完全消失,要完全消化靶 DNA 或 RNA 则需要对酶的浓度和消化时间等因素反复摸索后才能实现。在做此项对照实验时应注意在核酸酶处理后,需把加在标本上的酶清除干净,以免残留的酶破坏探针而导致错误结论。

(四) 检测系统对照

1. 放射自显影检测系统对照 放射性核素自显影对照包括空白片的阳性对照和阴性对照。阳性对照是将浸渍乳剂的空白片在光线下曝光后显影,阳性结果证明乳胶及显影过程工作正常。阴性对照是将空白片浸乳胶后不经曝光便与原位杂交标本一起进行显影,结果应为阴性。如果阴性对照片上有较多银粒,则说明乳胶有放射性污染,应丢弃并换用新乳胶。

2. 非放射性原位杂交检测系统对照 绝大部分的非放射性原位杂交反应是以免疫组织化学方法进行显示的,在对照实验中应包括免疫组织化学的一系列阳性对照和阴性对照。

第五节 原位杂交组织化学技术进展

除了经典的原位杂交外,原位杂交可与其他组织化学技术相结合,或与其他分子生物学技术相结合,使其应用范围扩大,成为更有应用价值的技术。

一、原位 PCR 技术

PCR 技术是根据生物体内 DNA 复制的特点而建立的在体外经酶促反应将特定 DNA 序列进行高效和快速扩增的技术,它可将单一拷贝或低拷贝的待测核酸以指数形式扩增而达到用常规方法可以检测的水平,但不能进行组织学定位。原位 PCR(in situ PCR)技术由 Hasse 等人于 1990 年建立,是将 PCR 的高效扩增与原位杂交的组织学定位相结合,在不破坏组织细胞形态结构的前提下,利用原位完整的细胞作为一个微反应体系来扩增细胞内的靶序列,在组织切片、细胞涂片或培养细胞中来检测和定位微量核酸。

原位 PCR 技术的基本原理与液相 PCR 的扩增原理相似,即在耐热的 DNA 聚合酶作用

下,以合成的 DNA 作为引物,经过加热(变性)、冷却(退火)、保温(延伸)等改变温度的热循环,使特异性靶序列 DNA 产量以 2^n 倍的方式扩增。原位 PCR 是先将细胞或组织进行固定和酶消化处理,以保持组织细胞的良好形态结构,使细胞膜和核膜均具有一定通透性,再滴加 PCR 反应所需的各种试剂于样本上,然后将载有细胞或组织的玻片放入原位 PCR 仪上进行扩增反应。其结果可在显微镜下直接观察或用标记探针进行原位杂交后再用显微镜观察。根据在扩增反应中所用的 dNTP 或引物是否标记,原位 PCR 可分为直接法和间接法两类以及原位逆转录 PCR。

1. 直接法原位 PCR 在反应体系中使用标记的三磷酸核苷酸或引物,在标本进行 PCR 扩增时,标记物掺入到扩增产物中。通过显示标记物,可原位显示靶 DNA 或 RNA,扩增产物可直接观察而无需进行原位杂交。目前常用的标记物有地高辛、FITC 和生物素等。该方法的优点是使扩增产物直接携带标记分子,因此操作简便省时,但特异性较差,扩增效率较低,易出现假阳性,特别是在组织切片上,假阳性信号主要来自标本中受损 DNA 的修复过程。由于固定、包埋及制片过程均可造成 DNA 损伤,受损的 DNA 可利用反应体系中的标记 dNTP 进行修复。这样,标记物则掺入到非靶序列 DNA 分子中,产生假阳性。另外,引物与模板的错配也可导致假阳性信号的产生。在直接原位 PCR 的基础上建立的 5' 端标记引物原位 PCR 方法,虽然也有上述非特异性修复和扩增现象,但由于无标记物的掺入,故非特异性产物虽可以产生却无法显示,从而避免了假阳性结果。

2. 间接法原位 PCR 是先将引物、核苷酸及酶等反应物引入细胞内进行扩增,然后用特异性标记探针与扩增产物进行原位杂交,检测细胞内扩增的 DNA 产物。该方法能克服由于 DNA 修复或引物错配引起的非特异性染色问题,使扩增效率提高,特异性增强,故是目前应用最为广泛的原位 PCR 方法。该法需在扩增反应后再进行原位杂交,故操作步骤繁琐,用时长。

3. 原位逆转录 PCR 是将逆转录反应和 PCR 相结合,在原位检测细胞内低拷贝 mRNA 的方法。整个反应分两步进行,第一步以 mRNA 为模板,在逆转录酶催化下合成 cDNA;第二步则以 cDNA 为模板,用 PCR 对靶序列进行扩增,最后用标记的探针与扩增的 cDNA 进行原位杂交而间接检测细胞内的 mRNA。该方法的优点是不需从标本中提取 mRNA,不会因在核酸的分离中造成靶序列破坏而致信号丢失。与液相 PCR 不同的是,原位 RT-PCR 反应过程在固定的组织或细胞标本上进行,标本需先用 DNA 酶处理以破坏组织细胞中的 DNA,以保证 PCR 扩增的模板是从 mRNA 反转录合成的 cDNA,而不是细胞中原有的 DNA。其余基本步骤与液相的 RT-PCR 相似。

就具体方法而言,原位逆转录 PCR 与上述原位 PCR 一样,也可分为直接法和间接法,操作时的注意事项也相似,不同的是在进行原位逆转录 PCR 时要特别防止 RNA 酶对待测核酸的降解。另外,由于在原位 PCR 前要进行逆转录过程,因此实验周期较长,操作过于复杂。但随着将逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶功能合二为一的新型 reverse transcription thermal(rTth)酶的商品化,原位逆转录 PCR 整个操作过程与普通原位 PCR 十分相似。其方法是将待测核酸与 rTth 酶、特异性引物和含有标记的 dUTP 和 dNTP 同时滴加于切片上,在原位 PCR 仪上先用 60°C 温浴 30 分钟,以从待测 mRNA 逆转录 cDNA,再经 20 个 PCR 循环,扩增特异性 cDNA,并同时使扩增的 cDNA 片段中掺入标记物,最后用组织化学

或免疫组织化学方法检测阳性信号。

二、荧光原位杂交技术

荧光原位杂交技术(florescence in situ hybridization, FISH)是一种利用荧光信号对原位杂交样本进行检测的技术。它将荧光信号的高灵敏度、安全性及直观性和原位杂交的高特异性结合起来,通过荧光标记的核酸探针与待测样本核酸进行原位杂交,在荧光显微镜下对荧光信号进行辨别和计数,从而对染色体或基因异常的细胞和组织样本进行检测和诊断,为各种基因相关疾病的分型、预前和预后提供准确的依据。自20世纪80年代末, Pinkel 和 Heiles 将 FISH 技术引入染色体检测领域以来, FISH 技术在临床诊断及科研工作中得到广泛运用,并显示出比传统技术的显著优势性。1986年, Dilla 等首次用荧光素直接标记 DNA 探针检测人特异性染色体。接着 Pinkel 等利用生物素标记 DNA 探针,建立了间接荧光原位杂交技术,这一技术放大了杂交信号,提高了 FISH 的敏感性。此后,地高辛和二硝基苯酚等标记物以及各种不同颜色荧光素在 FISH 技术中被广泛利用,不断完善了该技术的信号检测系统。PCR 技术与 FISH 的巧妙结合,不仅提高了制备探针的能力,也提高了该方法的敏感性,可用于鉴定任一目的基因在染色体中的定位。计算机图像分析技术在 FISH 中的应用极大地提高了 FISH 技术的敏感性以及结果的直观性和可信度。FISH 技术还可与流式细胞术、染色体显微切割等技术结合使用,使该技术不仅用于细胞遗传学的基础研究,也越来越广泛地应用于肿瘤细胞遗传学研究、遗传病基因诊断等临床医学研究中。

FISH 有直接法和间接法两种。直接法是用已知碱基序列的特异 DNA 片段作为探针,并标记上不同荧光素,在组织切片、间期细胞及染色体标本上与靶核酸进行 DNA-DNA 原位杂交,因所形成的杂交体带有荧光素,故可在荧光显微镜下直接观察。常用的荧光素有异硫氰酸荧光素(FITC)、得克萨斯红(Texas red)、罗丹明(rhodamine)及其衍生物四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)等。该方法简单快捷,但信号较弱,敏感性较低。间接法使用非荧光物质标记的探针,如生物素或地高辛等标记探针,再通过亲和连接或免疫反应带入荧光物质来检测杂交体的存在。因为有杂交信号放大作用,从而增加了杂交的敏感性,也降低了实验成本,故间接法 FISH 是目前使用较多的方法。

FISH 实验操作与用非荧光标记探针的原位杂交基本相似,在组织准备方面,以新鲜组织、冷冻组织样本、细胞涂片、培养细胞爬片及中期染色体等材料进行 FISH 的结果优于石蜡包埋组织样本的杂交效果。由于 FISH 是 DNA-DNA 原位杂交,故在杂交前的变性处理颇为重要。

近年来,在 FISH 技术的基础上发展起来的分子遗传学新技术不断出现,如多色 FISH 技术、染色质纤维荧光原位杂交(chromatin fiber FISH)和 DNA 纤维荧光原位杂交(DNA fiber FISH)技术等。多色 FISH 通过选用多种具有可分辨光谱的荧光染料与不同的探针结合(直接法),在一个染色体中期分裂象或细胞核中可呈现多种颜色标记,同时检测多种染色体异常。如许多用染色体涂片方法和 G 或 Q 显带技术无法检测或难以确定的染色体异常,通过多色 FISH 技术可以揭示染色体畸变,并确定畸变的来源。此外,多色 FISH 对于

复杂的染色体核型改变,尤其是实体瘤的染色体检查具有很好的临床应用价值。多色 FISH 也可采用三种或三种以上不同的标记物,如生物素、地高辛和二硝基苯酚标记探针,然后用不同颜色荧光素,如 FITC(绿色)、罗丹明(红色)和 cascade blue(蓝色)标记抗体进行检测(间接法),可同时得到多种不同颜色的荧光信号,这种方法可以在同一标本上同时检测多种 DNA 序列。

纤维 FISH 技术是将细胞的全部 DNA 在玻片上制备出高度伸展的染色质 DNA 纤维,然后用标记不同颜色荧光物质的探针与 DNA 纤维进行杂交,最后用荧光显微镜观察结果并分析,若配合计算机图像分析软件使用,结果会更理想。纤维 FISH 技术可以快速直接目视判断探针位置以及多个探针间的相对位置、物理位置和重叠程度等,因而大大加速了基因定位和人类基因组高分辨物理图谱的绘制。

PRINS 技术是将 PCR 和 FISH 技术联合使用,先由寡核苷酸引物或变性 DNA 片段与细胞内的靶 DNA 互补序列复性,在聚合酶的作用下,将荧光标记的脱氧核苷酸(如 FITC-11-dUTP)带入新合成的 DNA 中。PRINS 技术可用于检测罕见的异染色质变异体和评价肿瘤细胞株的染色体异质性。

三、胚胎原位杂交技术

通过分析 mRNA 在不同发育时期组织中的表达变化,有助于了解胚胎发育的基因调控机制。原位杂交是研究胚胎基因表达的常用方法,在发育生物学研究中起重要作用。胚胎原位杂交包括全胚胎原位杂交和胚胎组织切片原位杂交。

全胚胎原位杂交技术(whole mount in situ hybridization)可以从整体水平反映胚胎发育过程中基因表达的时空顺序,是一种广泛应用于胚胎发育调控基因表达研究的技术。该技术实验步骤少,简单易行,大量减少了分析所需时间。

全胚胎原位杂交成功的关键因素是进行适当的蛋白酶 K 处理。使用不同探针时,应摸索不同的蛋白酶 K 浓度、处理时间和温度。

全胚胎原位杂交实验中,经常会出现背景信号太强或信噪比太低的情况。产生这些情况的原因,通常是由于探针或抗体滞留于胚胎体腔和体室以及杂交后漂洗的条件不够严格等。杂交预处理前,将胚胎在解剖镜下用细针在脑室、颈背部、颌面部和心室等处刺孔,以使反应后的探针或抗体不在这些部位滞留,并在漂洗时充分洗除。同时,杂交后使用 RNA 酶充分消化未杂交的标记 RNA 探针,提高杂交后漂洗的严格度,抗体反应后充分漂洗均能降低背景信号,提高信噪比。

对较大的胚胎标本来讲,探针很难穿透整个组织,因此需切成切片后进行杂交即胚胎组织切片原位杂交,以克服全胚胎原位杂交方法中探针不能渗入到胚胎深部的问题。

四、双重和多重原位杂交技术

为了在同一标本上或同一细胞内同时检测是否存在两种或两种以上的靶核酸序列,可应用双重或多重原位杂交技术,即以两种或多种标记探针与靶核酸杂交,然后利用不同的检测手段分别显示各种靶核酸的存在和分布。该技术与免疫组织化学技术中的双重或多重标记相似,除了探针本身的特异性外,对结果的干扰主要来自标记物及检测试剂的互相影响。

下面根据所用标记物性质不同,分别介绍双重标记原位杂交技术的基本原则。

(一) 放射性核素和非放射性标记探针的双重标记原位杂交

非放射性标记原位杂交技术的兴起和发展,为双重标记原位杂交提供了有效的技术途径。在将放射性核素和非放射性物质标记的两种探针结合进行的双重标记原位杂交技术中,常用的放射性核素标记物为³⁵S,常用的非放射性标记物为生物素和地高辛。该双重原位杂交技术可分为一步法和二步法两种。在一步法中,原位杂交反应用两种探针的混合物一次完成,显示杂交信号时,先用碱性磷酸酶标记的链霉亲和素与杂交体上的生物素结合,并用硝基四氮唑(NBT)和5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐(BCIP)作为底物显示杂交体上的碱性磷酸酶(或用ABC法显示杂交体上的生物素)或以碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体与杂交体上的地高辛结合,并用NBT和BCIP显示碱性磷酸酶,标本脱水干燥后再进行放射自显影处理以显示另一靶核酸。一步法的优点是杂交反应一次完成,操作流程较短,同一细胞内的两种信号容易分辨;缺点是放射自显影的阳性信号要比单标时明显减少,碱性磷酸酶或ABC的阳性反应产物有可能会引起核乳胶的化学显影。在二步法中,先后使用不同的探针进行两次杂交反应,一般先用³⁵S标记探针进行原位杂交,放射自显影显示第一种杂交体后再用生物素或地高辛标记的探针进行第二次原位杂交,按生物素-亲和素-碱性磷酸酶法(或ABC法)或地高辛-抗地高辛抗体-碱性磷酸酶法显示第二种杂交体。二步法的杂交信号在镜下明显可辨。用放射性核素标记探针进行第一次原位杂交的整个操作顺序,包括放射自显影的显影定影过程,不会改变mRNA的结构,也不会影响第二次杂交反应时靶核酸对探针的可及性。二步法的整个操作流程要比一步法长,但它没有一步法中存在的放射性标记信号的丢失,以及碱性磷酸酶(或ABC)阳性反应产物可能引起乳胶化学显影的弊端。

(二) 非放射性标记探针的双重标记原位杂交

如果用不同的标记物标记不同的核酸探针,只要互相不影响各自的杂交反应,检测系统也不相互干扰,杂交信号易于分辨,原则上均能用于双重或多重标记原位杂交。应用非放射性标记探针的双重标记原位杂交,可克服放射性核素标记探针的分辨率低、时间长以及放射性污染等缺点。

1. 应用生物素和地高辛标记探针的双重标记原位杂交 应用生物素和地高辛分别标记的两种探针进行双重标记原位杂交时,杂交反应可用含两种标记探针的杂交液一次进行。因为生物素标记探针可用辣根过氧化物酶标记的亲和素检测(以3-氨基-9-乙基-卡巴唑为底物,阳性反应产物为红色),而地高辛标记的探针用碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体来检测(反应产物为蓝色),两个检测系统互相无干扰,所以,标记的亲和素和抗地高辛抗体也可混合在一起一次孵育。但两种酶的呈色反应需要的pH条件相同,故呈色反应需分先后两次进行。

2. 双重荧光标记原位杂交 利用具有不同颜色的荧光素分别标记不同的核酸探针,可检测同一组织或细胞内两种不同的靶核酸。用不同的荧光素作标记物进行双重标记原位杂交,有直接法和间接法两种。直接法将具有不同颜色的两种荧光素分别标记两种不同的核酸探针,用其做原位杂交,杂交信号能在荧光显微镜下通过选择不同的激发滤片而直接观察。此法操作简便,但敏感性不高。间接法用生物素和地高辛分别标记两种不同的核酸探

针,然后用不同荧光素标记的亲合素(或抗生物素抗体)和抗地高辛抗体来检测杂交体。间接法比直接法敏感性更高。

(三) 两种放射性核素标记探针的双重标记原位杂交

用 ^3H 和 ^{35}S 分别标记两种不同探针,用混合探针做原位杂交。在放射自显影时,标本被覆两层核乳胶,并在两层核乳胶之间用一层透明的塑料膜将其分开。因 ^3H 的 β 射线能量低,故 ^3H 的信号在第一层乳胶上; ^{35}S 的 β 射线能量高,它不仅能使第一层核乳胶曝光,而且还能穿透塑料薄膜使第二层核乳胶曝光,结果 ^{35}S 的信号可同时两层核乳胶中见到。两层乳胶上的信号用彩色显微放射自显影术分别显为深红色和蓝色,两种杂交信号更容易在镜下鉴别。

此法虽能在同一标本上检出位于不同细胞中的两种靶核酸,但不能分辨位于同一细胞中的两种靶核酸。而且,该技术操作复杂、检测过程需要两次放射自显影,所费时间较长,故推广使用受到一定限制。

五、原位杂交结合免疫组织化学技术

原位杂交结合免疫组织化学技术主要用于在同一细胞内同时或先后检测特定基因在核酸和蛋白质或多肽水平的表达,这样,不仅能了解基因表达,而且还能研究某种基因表达的翻译和转录调节。如果免疫组织化学检测的抗原成分是与原位杂交的靶核酸不同基因编码的蛋白质或多肽等,那么同时使用原位杂交和免疫组织化学技术可研究一种基因的转录与另一种基因编码的蛋白质合成之间的相互关系。在病毒学研究中,将原位杂交与免疫组织化学相结合,可在细胞水平上同时研究病毒基因及其表达产物,即病毒抗原的分布。如果将检测病毒基因的原位杂交与检测细胞类型特异性抗原的免疫组织化学相结合,则可鉴别受染细胞的类型,尤其对在含多种细胞类型的组织(如神经组织)中确定受染细胞的类型更有帮助。总之,原位杂交和免疫组织化学结合的双标记技术在深入研究基因表达的调控以及病毒性疾病的发病机制等方面具有广阔的应用前景。

原位杂交结合免疫组织化学技术可以分别在相邻的连续切片上进行。只要在相邻切片上能得到同一细胞的连续切面,对照观察相邻切片上同一细胞切面原位杂交和免疫组织化学结果,就可以判断在同一细胞内是否存在特定的靶核酸 DNA 或 RNA 和由该基因或另一种基因编码的蛋白质或多肽。

原位杂交结合免疫组织化学技术更多的是在同一细胞标本或组织切片上进行,这样可避免因相邻切片法观察时不易找到同一细胞的切面而产生的空间误差和样本误差。但采用同一切片的双标记技术时,第一次标记染色过程总要或多或少地影响第二次标记染色的结果,使第二次染色结果不很理想。

在同一细胞和切片标本上进行原位杂交和免疫组织化学双标记时,可以先用原位杂交检测核酸,也可以先用免疫组织化学检测蛋白质,不同的检测程序各有其优缺点。

1. 原位杂交在先 细胞和切片标本先用核酸探针做原位杂交,检测 DNA 或 mRNA,接着再进行免疫组织化学反应,检测抗原成分。原位杂交可用放射性核素标记探针,也可用非放射性标记物标记探针,免疫组织化学可用 ABC 法等。先做原位杂交,尤其是 RNA 原

位杂交,标本中的 mRNA 丢失较少,杂交信号较强。但是,在原位杂交的操作过程中,可能会影响抗原物质的抗原性,会减弱免疫组织化学的染色强度。

标本先做原位杂交,操作步骤基本上按单做原位杂交的程序进行。只是由于杂交前的蛋白酶消化会改变蛋白质的三维结构,从而导致抗原性改变,所以应用时要小心,蛋白酶消化的时间要适度,不可过长。杂交和洗涤的温度不要超过 45℃,杂交温度过高会导致抗原物质变性。

如用放射性核素标记探针进行原位杂交,放射自显影可在杂交反应后立即进行,也可在免疫组织化学反应完成后进行。如在放射自显影完成后再进行免疫组织化学染色,组织标本上的核乳胶薄膜可能会影响抗体分子的穿透。

如用地高辛标记的非放射性核素探针进行原位杂交与免疫组织化学双标记,可在杂交反应后将原位杂交检测核酸的抗地高辛抗体(Fab'段)与免疫组织化学检测蛋白或多肽的第一抗体混合在一起,一同孵育标本。之所以两种抗体能相混合同时孵育标本,是因为检测核酸的抗地高辛抗体只有 Fab'段,不具有抗体抗原决定簇的 Fc 段,而检测蛋白或多肽的免疫组织化学程序中的第二抗体是以其 Fab'段与第一抗体的 Fc 段结合而反应的,不能与抗地高辛抗体结合,因此,原位杂交中的抗体与免疫组织化学中的抗体混合孵育标本不会产生交叉结合。这两种抗体混合孵育标本可明显缩短原位杂交和免疫组织化学结合的双标记实验周期。

2. 免疫组织化学在先 细胞和切片标本先用特异性抗体经免疫组织化学检测其中的相应抗原成分,接着用核酸探针做原位杂交,显示同一细胞或标本内的 DNA 或 mRNA。免疫组织化学技术多用 ABC 法,显色剂可用 DAB、PPD(Para-phenylene diamine)或 AEC(3-amino-9-ethyl-carbazole)。当与放射性核素的原位杂交结合时,DAB 或 PPD 显色所呈的棕褐色或棕黑色阳性产物在随后的原位杂交的操作过程中比较稳定,不会褪色。如果用 AEC 作显色剂,阳性产物呈红色,它与原位杂交放射自显影的阳性信号黑色银粒对比更加鲜明,易于在同一细胞内分辨出来。但由于 AEC 的阳性产物能溶于乙醇等有机溶剂,因此在随后的原位杂交操作过程中不能用乙醇脱水,可代之以空气干燥。

免疫组织化学若与生物素或地高辛等非放射性标记探针的原位杂交相结合,在选择检测系统时应考虑到两个系统之间是否存在相互干扰。再者,在选用显色剂时,免疫组织化学和原位杂交最终的两种成色阳性产物应易于分辨。

先进行免疫组织化学反应,后进行原位杂交,通常抗原能较好地显示,但靶核酸有可能在进行免疫组织化学的过程中易于遭到破坏。当靶核酸是 mRNA 时,则要求整个免疫组织化学染色过程必须在无 RNA 酶的条件下进行。

六、电镜原位杂交技术

原位杂交技术自创立以来,为基因的定位和表达、基因进化、发育生物学、肿瘤学、微生物学、病理学、医学遗传学和遗传分析等领域研究提供了极其宝贵的资料,发挥了其他技术难以取代的作用。但不论是使用放射性核素探针,还是非放射性探针,大部分研究工作都还限于光镜水平。为了对检测的靶核酸进行更精确的亚细胞定位,以及能观察含靶核酸序列细胞的超微结构,人们便将原位杂交与电镜技术相结合,使原位杂交从光镜水平延伸到电镜

水平。

(一) 电镜原位杂交的特点

电镜原位杂交的原理和基本操作步骤与光镜水平的原位杂交相似,但电镜原位杂交不仅要求获得满意的杂交信号,而且还要求保持良好的超微结构。为了兼顾既保存较好的细胞超微结构又保证较好的杂交反应两者之间的关系,在电镜原位杂交中应注意以下几个特点:

1. 选择合适的固定剂 所用固定剂最好为交联固定剂,如甲醛和戊二醛,既能良好保存细胞超微结构,又能有效地保存组织细胞中的核酸,尤其是 RNA 分子。这类交联固定剂,尤其是戊二醛,主要缺点是影响探针对靶核酸的可及性,当细胞中靶核酸序列的拷贝数很少时,这种影响尤为明显。所以,一般主张用较低浓度(0.1%~0.5%)的戊二醛或与 4% 多聚甲醛联合使用。在实验中可试用不同浓度的多聚甲醛和(或)戊二醛,以摸索最佳浓度。

锇酸是电镜技术中常用的一种固定剂,但经锇酸固定的组织,RNA 的保留较差。在原位杂交技术中,标本在原位杂交反应后再用锇酸进行后固定似乎不影响标记信号,这样有利于膜结构的保存,可增加细胞亚微结构的电子密度反差。

2. 选择合适的探针 放射性和非放射性探针都可用于电镜原位杂交。与光镜原位杂交反应一样,用放射性核素标记的探针做电镜原位杂交,其敏感性较高,标记物不干扰杂交反应,并且结果适于进行定量分析。常用的放射性核素为³H、³⁵S、¹²⁵I 和³²P。³H 的 β 射线能量最低,杂交信号能得到最佳的亚细胞定位,但放射自显影的曝光时间较长。³⁵S 的 β 射线能量较高,故其亚细胞定位不如³H 精确,但放射自显影时间较短,实际应用中应用最广。应用非放射性标记探针进行电镜原位杂交不需长时间进行放射自显影,又可避免放射性核素的污染问题,而且其分辨率即杂交信号的亚细胞定位要比放射性核素标记探针好。在电镜原位杂交中用得最多的非放射性标记物是生物素。杂交体上的生物素可用 HRP 或胶体金标记的抗生物素抗体、A 蛋白或卵白素来检测。

如果用强交联剂固定,应选择较短序列的探针,使探针易于渗透,提高杂交反应效率。

3. 适宜的杂交前处理 杂交前处理中应尽量避免蛋白酶消化,去污剂 Triton X-100 的浓度也应降低,以不高于 0.02% 为宜。因醋酸酐处理能破坏细胞亚微结构,故应避免。

4. 适宜的检测方法 电镜原位杂交的杂交信号必须具有高电子密度,只有这样才能在电镜下识别。

放射性核素标记探针电镜原位杂交的杂交体用放射自显影术检测。电镜放射自显影要求分辨率极高,与光镜放射自显影相比,专用于电镜放射自显影的核乳胶的银粒较细,一般要求银粒直径在 1.6×10^{-7} m 以下。制备电镜自显影标本时,要求乳胶层薄到只有一层溴化银晶体的厚度,称为单层乳胶。在单层乳胶中,溴化银晶体彼此接近,既不互相重叠,又不留有无溴化银晶体的空隙。当超微结构中体积极小的放射源的核射线穿透单层乳胶时,只使距放射源最近的银粒曝光,而射线不作用于其他的银晶体上,不至造成影像弥漫泛化。

非放射性标记探针电镜原位杂交的杂交体,大多用免疫组织化学技术检测。各种电镜免疫组织化学技术,如免疫酶、胶体金及 A 蛋白等,都可用于电镜原位杂交。免疫酶法的敏感性较高,但由于酶反应产物在探针标记处聚集成较大的团块,故其分辨率较低。胶体金颗

粒,特别是较大直径的胶体金颗粒在组织中的穿透性不如 HRP,再则胶体金颗粒所带负电荷与组织中靶核酸的负电荷之间的相斥力都会影响胶体金标记的敏感性。采用小颗粒的胶体金或应用直径仅为 1.4nm 的纳米金(nanogold)能增加其组织穿透性;采用多步法的免疫组织化学技术或者将生物素通过一长的连接臂标记核酸探针,然后再用胶体金标记的抗生物素抗体或亲和素来检测,这样使金颗粒之间的距离增加,使两者之间的静电排斥力减小。采取这些措施,可使胶体金标记的敏感性增高。小颗粒胶体金或纳米金标记通过银加强后,其敏感性更高。

(二) 常用电镜原位杂交技术的基本程序

根据杂交反应是在组织包埋前进行、包埋后进行还是在不经包埋的细胞、染色体整体标本或冷冻超薄切片上进行,电镜原位杂交技术大体上可分为包埋前、包埋后和不包埋三类。其中以包埋后法制片比较容易,应用较广泛。

包埋后电镜原位杂交的特点是杂交反应在电镜包埋后的超薄切片上进行。这一技术能否成功的关键取决于电镜包埋过程是否能把细胞中的靶核酸保留在它们原来所在的亚细胞结构上。一般认为,常规的包埋剂(疏水性树脂)不适用于包埋后原位杂交。如环氧树脂,需要在较高的温度下(60℃)经 48 小时才能聚合,长时间的高温包埋过程会影响组织内核酸的保留,而且树脂的疏水性也不利于在亲水条件下进行的杂交反应。包埋后原位杂交常用的包埋剂都是亲水性树脂,如 Lowicryl K4M、比乙二醇甲基丙烯酸酯及 LR White 等。

由于铜可能与以后使用的某些试剂发生化学反应,故超薄切片应载于镍网或金网上而不能载于铜网上。

在超薄切片上进行原位杂交的基本步骤与光镜原位杂交类似,但杂交前一般不用蛋白酶 K、去污剂或酸类处理,或用低浓度的去污剂短时间处理,但可用预杂交液减弱背景。将载网漂浮在蜡膜上的液滴上进行反应和洗涤。

包埋前法是在冷冻或振动切片上先行原位杂交,然后作电镜包埋和超薄切片。包埋前法可与光镜原位杂交检测相连续,易获得阳性结果,但超微结构损伤较严重,且细胞膜可阻碍探针进入靶位。

不包埋法在冷冻超薄切片上进行,但冷冻超薄切片技术要求高,费用大,尚难以普及。

七、肽核酸原位杂交

肽核酸(peptide nucleic acids, PNA)是 20 世纪 90 年代初发现的新型 DNA/RNA 同类物,是一类人工合成的以电中性的肽链酰胺 2-氨基甘氨酸组成的多聚酰胺键取代 DNA 中的戊糖磷酸二酯键骨架而形成的类似核苷酸的物质。像传统的 DNA 序列那样,PNA 寡聚体的氨基末端相当于 DNA 的 5'端,其羧基末端相当于 DNA 的 3'末端。尽管 PNA 单体也具有一个游离的氮末端和一个游离的碳末端,但严格说来它既非肽又非酸,仅仅具有一个拟肽骨架,因而化学上和蛋白质(肽)更为接近。它与 DNA 的相同之处在于 PNA 也携带 ATCG 四种碱基单体,这就保证了 PNA 能够按照碱基互补的原则识别相应的碱基序列。与 DNA 不同的是它没有磷酸戊糖骨架,因在结构上与传统的寡核苷酸有所不同,故与寡核苷酸相比,PNA 寡聚体具有独特的特性:

1. 由于 PNA 的电中性骨架,其分子中不含磷酸基团,因此 PNA 链更容易和带有负电荷的互补序列的 DNA 或 RNA 链结合,而且形成的复合物分子较 DNA/DNA 双链或 DNA/RNA 杂交链更为稳定。

2. PNA 与核酸杂交不仅具有很高的亲和性,还有很高的特异性。PNA 对互补 DNA 的错配容忍程度比相应的 DNA/DNA 更低,一个 15mer 的 PNA/DNA 分子在其中间段出现一个错配碱基,其 T_m 值下降 $8\sim 20^\circ\text{C}$,两个碱基错配则完全不能杂交。

3. PNA 不被目前已知的任何核酸酶或蛋白酶所降解。如在合成 PNA 时将其标记,即可作为原位杂交等分子杂交技术的探针以检测靶核酸。以 PNA 作为探针的原位杂交操作程序类似于普通原位杂交技术,杂交前探针要在 80°C 变性 3 分钟,然后在室温杂交。由于 PNA 具有上述特性,因此肽核酸原位杂交具有其独特的优势。

(张钦宪 李和)

科学史话

——割裂基因的发现

基因是遗传的功能单位,蛋白质是由基因表达后行使生理功能的主体。蛋白质的合成过程是由 DNA 转录为信使 RNA,信使 RNA 在细胞质内翻译合成为功能蛋白质,一个基因只能转录和翻译为一种蛋白质。这种对基因的传统认识多少年来一直令人深信不疑。然而,研究者在大量研究过程中逐渐发现,细胞核内的 RNA 与细胞质内的 RNA 具有显著差异,因而,开始对传统观念产生怀疑。最早报道出自于 1962 年美国冷泉港实验室 Henry Harris 对新合成 RNA 分子行为的研究。他将培养细胞置于含有 ^3H -尿嘧啶核苷的培养液中孵育,使新合成的 RNA 带有放射性核素标记,然后分别间隔一定时间测定核内和胞质内放射性核素产生的银颗粒数目。Harris 惊奇地发现,细胞质内放射性核素标记的 RNA 量还不到核内原始标记量的 10%。意外的结果使他认为,大量的核内 RNA 在进入细胞质之前,已发生降解(Harris, 1994)。这一非凡结论开始并没有引起大家的认同,因为它与传统的蛋白质合成过程不相容。然而,接着由 James、Darnell 及他的同事所进行的有关分离核 RNA 行为实验也证明了 Harris 的论点。他们将培养的人细胞首先用 ^3H -尿嘧啶核苷标记,不同时间后分离出核 RNA,并采用移动区带离心进行分析。当标记时间仅有几分钟时,发现放射性 RNA 以一系列不均一分子发生沉降,其沉降系数在 20S 到 100S 范围内。由于 RNA 分子的不均一性,它们被称为不均一核 RNA(heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)。为了追踪这些分子的去向,Darnell 进行了另一个实验。在这一实验中,先用 ^3H -尿嘧啶核苷短暂孵育细胞标记 hnRNA,然后加入放线菌素 D,以阻止额外放射性 hnRNA 的形成,再将细胞孵育一定时间。在几小时之内,发现大量的放射性从 RNA 组分消失。这一结果支持了关于大多数新合成的 RNA 发生快速降解的论点(Darnell, 1985)。

核内 hnRNA 在进入细胞质前,其降解是随机的还是有选择的呢? 核酸杂交实验表

明,存在于 hnRNA 上的大多数碱基序列在细胞质 RNA 中不存在,因此可以得出 hnRNA 发生了选择性降解,只有那些特定序列才能被运送到细胞质中。hnRNA 似乎可作为 mRNA 的前体,故又被称为前体 mRNA。细胞核内的前体 mRNA 怎样转变为胞质中的 mRNA 呢?这是涉及基因表达调控的十分关键的问题。当时,真核细胞的基因结构是否与细菌相同这一问题仍悬而未决。为解决这一问题,首先要在细胞核的一个特定基因与其细胞质中的 mRNA 之间建立精密的生物化学分析途径。此时,美国冷泉港实验室有 10 多位研究者参与这项研究。1976 年, Richard Roberts 与当时的研究生们一起发现,源于同一腺病毒的不同 mRNA 均开始于相同的 11 个核苷。当他们将这些 mRNA 与腺病毒 DNA 混合杂交时,其结果更使他们震撼。这些腺病毒 mRNA 除 11 个核苷没有被杂交结合外,其余部分均与相应的 DNA 链结合。与此同时, Roberts 实验室的另一位研究人员 Sayeeda Zain 也没有在腺病毒 DNA 上找到预期可以找到的位于 mRNA 上的 11 个核苷。冷泉港实验室的另两位研究者也发现,来自于腺病毒基因组一个区域的 DNA 片段能与来自于另一个不同区域的 mRNA 杂交。所有这些发现均与基因连续的观念相互矛盾。当这些奇怪现象在冷泉港实验室越积越多时, Roberts 萌生了用电镜方法观察的想法,希望借此来解释那奇妙的 11 个核苷的来源。幸运的是,冷泉港实验室的 Louise Chow 和她的丈夫 Tom Broker 是世界一流的电镜专家,完全有经验来决定腺病毒 mRNAs 在 DNA 链上的定位。Roberts 将其想法告诉了这对夫妻,他们精心设计了每一个细节,并在几周之内便拿出漂亮的电镜观察结果。清晰的电镜照片使人坚信,被认为含有 11 个核苷的 mRNA 起始区与 DNA 链的另一区段结合,而与这一 mRNA 的其余部分没有相连在一起。更令人惊讶的是,在结合有这一 mRNA 的 DNA 链上,有两个向外突出的 DNA 环,表明这些突出的 DNA 部分没有与这一 mRNA 的任何部位杂交。于是,工作在冷泉港实验室的这些学者作出了与传统观念相反的结论,认为 DNA 链上的遗传信息不是连续的,也就是说,基因是割裂的。与此同时,美国麻省理工学院的 Phillip Sharp 研究小组以腺病毒这一相同的研究模型几乎同时作出了同样的发现。当这些研究结果于 1977 年 6 月在冷泉港会议上报告后,立即引起轰动,使生物学家们产生了变革基因结构的认识。会后不久,这一结论很快在其他真核基因中也得到广泛证实(Sharp, 1994; Travis, 1993)。

割裂基因这一创造性的发现意味着真核细胞的基因结构和 mRNA 合成要比在细菌中复杂得多,其基因在表达过程中需进行剪接(splicing),一些区段为基因中非编码区域,称为内含子(intron),在剪接后丢失,一些区段为基因中的编码区域,称为外显子(exon),在剪断后重新拼接起来,形成成熟 mRNA。换言之,一个基因由多个外显子和内含子间断相接而成(Gilbert, 1978)。这一研究的发现变革了传统的基因结构。从此,一个新的称为 RNA 剪接的研究领域随之诞生。在 RNA 剪接研究中的发现之一是选择性剪接(alternative splicing),即在同一个基因中,其剪接位点和拼接方式可以改变,从而导致一个基因能产生多个具有明显差异的相关蛋白产物。由于割裂基因的发现,使对基因调控的认识不断深入,硕果累累。16 年后 Phillip sharp 和 Richard Roberts 因此获得 1993 年度诺贝尔生理学 and 医学奖。在他们回顾自己经历时曾风趣地说,当观察到腺病毒与其 mRNA 之间形成不连续的杂种分子图像时,他们立刻感到诺贝尔已带着他的遗产敲开了他们的心扉(Travis, 1993)。

(周 莉)

参 考 文 献

1. 桂建芳. RNA 加工与细胞周期调控. 北京:科学出版社,1998.
2. Harris H. An RNA heresy in the fifties. Trends Biochem. Science. 1994,19(7):303-305.
3. Darnell JE. RNA. Sci. Amer. 1985,253(4):68-78.
4. Sharp PA. Split genes and RNA splicing(Nobel Lecture). Cell,1994,77(6):805-815.
5. Travis J. Medicine: Discovery of genes in pieces wins for two biologists. Science,1993,262(5133):506.
6. Cohen J. The culture of credit. Science,1995,268(5218):1706-1711.
7. Gilbert W. Why gene in the pieces? Nature,1978,271(5645):501.



第六章 电镜组织化学与免疫电镜技术

电镜组织化学技术(electron microscopic histochemistry),也称电镜细胞化学技术(electron microscopic cytochemistry),是将组织化学(细胞化学)与电镜技术相结合,用于研究组织细胞超微结构与功能的一项新技术。电镜组织化学技术在普通光镜组织化学技术基础上发展而来,所以,在应用此技术之前,需对电镜技术和光镜组织化学技术有所了解。有关光镜组织化学基本原理和操作规程注意事项可参考本书第三、四章,本章主要介绍电镜技术、常用电镜组织化学技术以及免疫电镜技术。

第一节 电镜技术

电子显微镜(electron microscope, EM)简称电镜,根据其性能不同,可分为透射电镜(transmission EM, TEM)、扫描电镜(scanning EM, SEM)、电子探针分析电镜(electron probe microanalyzer EM)、超高压电镜(ultra high pressure EM)、冰冻电镜(cryo-EM)及冰冻蚀刻电镜等。透射电镜即通常所说的电镜。电镜最大的优势在于具有高分辨率,目前电镜分辨率已达 0.14nm ,远高于光镜分辨率($0.2\mu\text{m}$),它将人们带入一个微观世界,是生命科学研究者的重要实验工具,在研究组织细胞的超微构造、蛋白质与核酸在亚细胞的分布和功能等方面具有不可替代的优势。

一、透射电子显微镜基本原理

TEM的应用最为广泛,所以,掌握TEM技术对于理解和应用其他相关电镜技术非常重要。TEM的基本原理与光镜相似,但是,TEM是用产生电子束的电子枪代替可见光源,以轴对称的电磁场代替光学的玻璃透镜,将肉眼不可见的电子束成像在荧光屏上,进行观察和记录。

二、超薄切片技术

因电子束的穿透能力较低,可被样品吸收,因此,观察的样品必须相当薄,通常为 $50\sim 80\text{nm}$ 。样品过厚,电子束易被吸收,不利于TEM观察;样品过薄,电子束易穿透,但反差低,镜下难以区别组织细胞的超微结构。所以,制作超薄切片是TEM最关键和最基本的技术。超薄切片的制作过程与石蜡切片的制作过程基本相似,亦需经固定、脱水、浸透、包埋、切片和染色等步骤,每一步骤的严格认真操作是获得理想结果的前提条件。

(一) 固定

为了尽量保持组织细胞成分的生活状态,对标本的固定必须迅速。常用的固定方法为化学固定,即用一些化学试剂迅速固定组织细胞的形态,尽量使研究材料保持接近生活状态,防止组织自溶。理想的固定剂不仅能使细胞的蛋白成分凝固,抑制组织细胞内各种酶的

活性,而且,还应尽可能地保存组织细胞的抗原性,避免抗原成分弥散丢失。但是,固定本身亦是一系列化学反应过程,或多或少地会对组织细胞超微结构产生一定影响,所以,任何一种固定剂都有它的利和弊。

1. 固定剂 目前,TEM常用的固定剂有醛类和钨酸两大类,二者的作用方式和特点不尽相同,结合应用,可以发挥互补作用,固定效果较佳。

(1) 醛类固定剂:最常用的有甲醛(formaldehyde)和戊二醛(glutaraldehyde)两种。其作用机制是利用醛基与组织内蛋白分子形成交联,对组织细胞内碳水化合物及蛋白等具有较好的固定效果。甲醛含1个醛基,交联作用较弱,有较强的穿透力,能较快地进入细胞内,迅速发挥固定作用,对于细胞内线粒体的形态、酶的活性以及组织细胞抗原的保存等效果较佳,但单独使用时对细胞成分的保存效果较差,在脱水过程中大部分基质会丢失,不能很好地保存组织细胞的超微结构,因此,在电镜标本固定时多与戊二醛混合使用。由于市售的甲醛溶液中含有甲酸,不宜作为电镜标本固定剂,应用多聚甲醛(paraformaldehyde)粉来配制。戊二醛含两个醛基,交联作用较甲醛强,对内质网等细胞的膜系统和细胞质的超微结构保存效果尤佳,而且固定的组织标本可在戊二醛中长期保存(定期更换保存液,4℃冰箱内可保存12个月),这一点特别适于临床手术标本的固定。但醛类固定剂无电子染色效果,单独醛类固定的组织细胞图像对比度低,且对脂肪无固定作用。市售普通戊二醛为25%水溶液,保存时间较长的戊二醛pH可能下降,低于3.5时,最好避免使用。电镜用高纯度戊二醛,特别是装入密闭的安瓿内的小包装(每支2ml),质量较佳,但价格略贵。

固定电镜标本时,将多聚甲醛与戊二醛混合使用效果较好,浓度多为2%多聚甲醛-2.5%戊二醛。用于免疫电镜标本固定时,一般主张用较低浓度(0.1%~0.5%)的戊二醛与4%多聚甲醛联合使用,建议在实验中试用不同浓度的多聚甲醛和(或)戊二醛,以摸索最佳浓度。

(2) 四氧化钨:四氧化钨(osmium tetroxide, OsO_4)通称钨酸,为无色或淡黄色的针状结晶体,是一种强氧化剂,可溶于水。 OsO_4 与氮原子有较强的亲和力,因而对细胞内各种蛋白成分具有良好的固定作用,并能与不饱和脂肪酸反应,使脂肪及生物膜内的脂蛋白成分得以固定,在稳定细胞膜和保存脂肪等方面具有其他固定剂无法替代的作用。另外, OsO_4 的电子密度高,与组织细胞成分结合后,可发挥电子染色作用,能够增强图像的对比度(反差)。因此, OsO_4 一直是电镜研究中的常用固定剂,常用于醛类固定后的进一步固定,即通常所说的后固定。一般先配制2% OsO_4 贮备液,置特制的瓶内,4℃冰箱保存,用前以0.2mol/L PBS稀释。1% OsO_4 能够满足绝大多数组织细胞超微结构研究的后固定。

配制方法:市售 OsO_4 大部分为结晶体,1g 安瓿内封装。首先用清洁剂及双蒸水彻底清洗安瓿,干燥后用称药纸包好,轻轻砸破安瓿,迅速装入 OsO_4 专用的棕色瓶中,加入50ml 双蒸水,盖好瓶塞置冰箱。 OsO_4 在水中的溶解较慢,约需两天,若不完全溶解将影响固定效果。 OsO_4 水溶液为淡黄色,可长期保存,但在密闭较差的普通瓶中保存, OsO_4 易被还原成棕红色或黑色,被还原的 OsO_4 固定效果不佳,不宜再用。

OsO_4 固定作用强,易使酶的活性丧失,不适于包埋前电镜细胞化学和免疫电镜等研

究,而且,OsO₄ 具有较强的刺激性,对人体鼻、咽喉黏膜、角膜等有一定的毒性刺激,应用时,需在通风良好的橱柜内操作。另外,电镜研究所用的醛类、OsO₄、后述的电子染色用的铅、放射性铀以及含有重金属的定影液等,直接流入下水道将污染环境,危害人类健康,所以,为减少环境污染,应将用后的各种废液分类收集,经无害处理后再流入下水道。

2. 常用缓冲液 配制电镜标本固定液的常用缓冲液主要有磷酸盐缓冲液和二甲胂酸盐缓冲液两种。磷酸盐缓冲液适于绝大多数组织细胞电镜标本的处理,但是,磷酸盐缓冲液不如二甲胂酸盐缓冲液柔和,在对较脆嫩的组织细胞和胚胎标本进行电镜研究时,多选用二甲胂酸盐缓冲液。另外,磷酸盐可与组织块染色用的铀形成沉淀,影响结果的观察,所以,用磷酸盐缓冲液配制的醛类和 OsO₄ 固定的组织标本进行组织块染色前,需用蒸馏水充分漂洗。二甲胂酸盐缓冲液易配制,冰箱内长期保存亦无真菌生长,而且,对组织细胞的作用较柔和,早年的电镜研究者较偏爱之。但胂的毒性较大,对人体有害,加之二甲胂酸钠较昂贵,目前较少应用。大多数组织细胞的电镜研究磷酸盐缓冲液均可满足要求。

3. 常用组织细胞标本固定方法 根据标本不同,固定方法可分为以下三类:

(1) 常规电镜标本固定:临床材料不能灌流固定,则采用直接浸泡固定,而实验动物材料首选灌流固定,使固定液迅速到达全身各组织细胞而充分固定。

1) 灌注固定:具体操作参考第二章,应注意的是:先用含肝素的生理盐水或 Kreb's 液灌流冲洗血液,至右心房流出液不含血细胞为止,以动物全血量的 2~3 倍液为宜;灌流的压力过大,则液体流速快,易致毛细血管破裂,组织细胞间隙增大等,而压力太小,则流速慢,固定液不能迅速进入各组织器官,达不到充分固定的效果。因此,最好采用恒流灌注泵,流速为 3~5ml/分钟,灌流效果较好,缺少恒流灌注泵的实验室亦可用临床输液架自制灌流装置替代。整个灌流过程大约 1 小时左右完成。

2) 取材:外周组织灌流后尽快取材,而对于取材较费时的中枢神经系统最好将动物置于冰内或冰箱中数小时使之变硬后再取材。将组织修至 3mm×3mm×5mm 大小,置电镜固定液内继续固定 2~4 小时(4℃)。临床材料或不能灌流固定的标本经修块后,直接浸泡在电镜固定液内,组织稍变硬后,修成所需大小的组织块,继续固定 2~4 小时(4℃)。

3) 后固定:以 0.1mol/L PB 充分漂洗 3 次,每次 10 分钟,然后用 1% OsO₄ 避光 4℃ 固定 1~2 小时(视组织块大小而定)。OsO₄ 较贵,为节约 OsO₄ 用量,并减少其对环境的污染,OsO₄ 的用量以液体覆盖组织标本即可。

4) 漂洗:锇酸固定前后,应用冷(4℃)0.1mol/L PB 洗去残留的固定剂,因为醛能与锇酸起反应,产生细而致密的颗粒沉淀在样品中,既影响锇酸的固定作用,又会造成样品污染。此外,由于锇酸也能与乙醇作用产生沉淀,因此,用锇酸后固定后,也应将多余的锇酸固定液漂洗掉。

(2) 游离细胞的固定:对于骨髓细胞、血细胞、脱落细胞、胸腹水渗出细胞等游离细胞及培养细胞等,按以下方法固定:

1) 离心:游离细胞直接置于离心机内 4℃ 离心 5 分钟,2000~4000r/min;经消化的贴壁培养细胞等可置 1.5ml 左右离心管内离心,条件同上。

2) 固定:轻轻移弃上清液,加入电镜固定液,冰内或 4℃ 固定 30~60 分钟。若此过程

中沉淀聚集的细胞分散,可再离心沉淀之。

3) 漂洗:0.1mol/L PB 漂洗 2 次,每次 5 分钟,不宜吹打,避免细胞团块分散。

4) 后固定:0.1mol/L PB 配制的 1% OsO₄ 冰内或 4℃ 后固定 30~45 分钟, PB 充分漂洗。

(3) 贴壁培养细胞固定:适于研究细胞极性和细胞间的相互关系等。

1) 固定:将固定液直接加入贴壁培养细胞的培养皿内,冰内或 4℃ 固定 30~60 分钟。

2) 漂洗:0.1mol/L PB 漂洗 2 次,每次 5 分钟。

3) 后固定:0.1mol/L PB 配制的 1% OsO₄ 冰内或 4℃ 后固定 30~45 分钟, PB 充分漂洗。

(二) 脱水

电镜用包埋剂多数不溶于水,如环氧树脂。为使非水溶性包埋剂充分进入组织或细胞内,并能一起很好地聚合,在包埋前应用脱水剂将组织细胞内的水分充分除去。常用的脱水剂有乙醇和丙酮,它们既能与水按任何比例混合,又是树脂的有机溶剂。脱水时一般采用从低浓度到高浓度的逐级脱水方式,使组织块均匀收缩。如果突然置入高浓度脱水剂中,可使组织脱水过度而不均匀收缩,深部脱水不完全。脱水剂的各级浓度为 30%、50%、70%、90% 和 100%,每步脱水 10~20 分钟,最后再经干燥吸水剂处理的无水乙醇处理两次,10~20 分钟/次。注意:①更换液体时,操作要迅速,避免组织标本表面干燥;②组织切片(如进行免疫电镜研究的已染色切片)、游离细胞或培养细胞的脱水可相应缩短时间,5~10 分钟/次即可;③尽量避免在无水乙醇内时间过长,以防组织脆硬及细胞内物质丢失,影响超微结构的观察;④如当日完成包埋过程所需时间不足时,标本可置于 70%乙醇内停留过夜。贴壁生长在塑料培养板内的培养细胞可直接在培养板内脱水。

为增加反差,标本可在脱水过程中用以 70%乙醇配制的 1%~2%醋酸铀进行组织块染色 30 分钟~2 小时,然后从 70%乙醇开始继续脱水。

(三) 浸透与包埋

标本在脱水后,需用常温下呈液态、加温聚合后具有一定硬度的介质对其进行处理,使其具有适当的硬度和良好的切割性能,这种介质称为包埋剂。浸透是指通过包埋剂完全取代脱水剂,使其渗透到组织细胞中的过程,包埋则是将浸透好的组织细胞置于适当的模具中并灌入包埋剂,然后加温聚合成具有一定硬度的组织块的过程。

1. 浸透 因包埋剂不能直接溶于乙醇等脱水剂,所以,脱水后的组织细胞先需经既能溶于乙醇又能溶于包埋剂的环氧丙烷(propylene)移行液置换、除去组织内乙醇,使包埋剂容易浸透到组织细胞内部。一般用环氧丙烷处理 2~3 次,每次 5 分钟。因环氧丙烷极易挥发,操作应迅速。继之,顺次用环氧丙烷与包埋剂(环氧树脂)按 1:1 比例浸透组织标本 30 分钟,1:3 比例浸透 2 小时,纯包埋剂浸透 2~12 小时。浸透切片或细胞标本时,也可用乙醇代替环氧丙烷稀释包埋剂。

2. 包埋 将少量纯包埋剂加入包埋模具(药用空心胶囊、特制锥形的塑料囊或多孔橡胶模板),再将组织块转移到包埋模具内,然后灌满包埋剂。生长在塑料培养板内的细胞可直接将包埋剂加入培养板孔内进行包埋。已进行组织化学或免疫组织化学反应(包埋前染色)的切片在浸透后可与包埋剂一起放入 2 层耐高温的透明塑料薄膜间,然后用 2 张载玻片

将薄膜夹紧。置入包埋剂的标本在 60℃ 下聚合 48 小时,使树脂变硬,形成包埋块,干燥保存。

理想的包埋剂应满足如下条件:①粘度低,容易渗透进入组织细胞内;②聚合前后体积变化小,聚合均匀;③对细胞成分抽提作用小,超微结构保存良好;④易于调整软硬度,超薄切片相对容易;⑤能耐受电子束的轰击,高温下不变形;⑥电镜观察时,包埋剂本身不产生背景,透明度好。

目前,常用的环氧树脂包埋剂是含有环氧基的高分子化合物的总称,为淡黄色液体。聚合前为单体线性聚合物,含两种反应基团,即环氧基和羟基,当加入胺类催化剂(也称加速剂),可使单体分子两端的环氧基端端相连成为长链状聚合物。加入硬化剂(多为二酸酐类)后,羟基与酸酐结合,形成分子间的横桥连接,成为不可逆的聚合物。

常用的硬化剂有十二烷基琥珀酸酐(亦称十二碳烯基丁酸酐,DDSA),甲基内次甲基邻苯二甲酸酐(亦称六甲酸酐,MNA)。常用的催化剂为 2,4,6-三(二甲氨基甲基)苯酚(DMP-30)。注意:可通过改变 DDSA 和 MNA 及环氧树脂三者的比例,获得所需硬度的组织包埋块。

环氧树脂中,Epon812 是符合上述条件较好的一种包埋剂。包埋剂易吸水,受潮易氧化,所以,通常需密封,冰箱内保存,但在使用前应恢复室温,以防吸水。

(1) Epon812 包埋剂:Epon812 是进口试剂,其黏度低,是国内外常用的包埋剂之一。配制方法各实验室不尽相同,以下所用比例仅供参考。用前配制,先将 Epon812、DDSA 和 MNA 依次加入,搅拌混匀后加入 DMP-30,充分搅拌后真空除去气泡或静置 30~60 分钟,使气泡逸出后应用。

Epon812	16.2ml(19.66g)	8.1ml(9.8g)	5.4ml(6.55g)
DDSA	10.0ml(10.0g)	5.0ml(5.0g)	3.3ml(3.3g)
MNA	8.9ml(10.9g)	4.5ml(5.5g)	3.0ml(3.6g)
总量	35.1ml(40.56g)	17.6ml(20.3g)	11.7ml(13.45g)
DMP-30	0.6~0.7ml	0.25~0.35ml	0.17~0.23ml

稍硬的包埋块可按以下比例配制(适于制作更薄的超薄切片)。

Epon812	10.6ml(12.9g)	7.1ml(8.6g)	5.3ml(6.4g)
DDSA	5.0ml(5.0g)	3.3ml(3.3g)	2.5ml(2.5g)
MNA	6.7ml(8.2g)	4.5ml(5.5g)	3.4ml(4.1g)
总量	22.3ml(26.1g)	14.9ml(17.4g)	11.2ml(13.0g)
DMP-30	0.33~0.44ml	0.23~0.3ml	0.17~0.22ml

若想保存更多的胶原纤维成分,需制备略软的包埋块,可用 Araldite M 代替 MNA。

Epon812	10ml(12.1g)	5ml(6.1g)
DDSA	24ml(24.0g)	12.0ml(12.0g)
Araldite M	10ml(11.3g)	5ml(5.7g)
总量	44ml(47.4g)	22ml(23.8g)
DMP-30	0.66~0.88ml	0.33~0.44ml

(2) 环氧树脂 618:环氧树脂 618 系国产试剂,在组织细胞的超微结构保存和制作高质量切片方面虽不如 Epon812,但在保存膜性结构等方面较佳,且价格便宜,国内使用较多。配制时需加入增塑剂邻苯二甲酸二丁酯(DBP)。自 1965 年应用以来,配制比例几经改进。笔者实验室应用的配方如下:

环氧树脂 618	10ml	5ml
DDSA	4ml	2ml
MNA	5ml	2.5ml
DBP	3.0ml	1.5ml
总量	22ml	11ml
DMP-30	0.30~0.4ml	0.15~0.25ml

配制步骤:先将环氧树脂 618、DDSA 和 MNA 混在一起并充分搅拌,若黏度较高可在 40℃ 条件下使黏度下降便于搅拌,然后加入 DBP,再搅拌,最后加入 DMP-30,充分搅拌后,置室温使气泡溢出备用。

(四) 超薄切片制作

1. 修块 将包埋块固定在修块器或超薄切片机上,于解剖显微镜下用单面刀片削去表面的包埋剂,露出组织标本(OsO_4 固定后,组织标本黑化,易识别),然后以双面刀片在组织周围切削包埋剂,修成大小为 1.5~3.0mm 左右、边缘整齐的梯形为宜。

2. 玻璃刀的制备 用于超薄切片的刀有两种,玻璃刀和钻石刀。玻璃刀制作方便,价格便宜,而且,在应用钻石刀做超薄切片前,亦需用玻璃刀将组织块的表面切削光滑。

玻璃刀一般用制刀机于用前制备,将清洗干净的玻璃条裁切成 2.5cm×2.5cm 的正方体,略偏离对角线的方向划割,制成两把三角形的刀,刀刃方向的锐角越小,刀锋越利。制好的玻璃刀用胶布围绕刀刃做一个水槽,并用熔化的石蜡密封,以防漏水,其目的是使制作的超薄切片漂浮在水面上。近年一些厂商推出的蓝宝石刀可替代玻璃刀用于半超薄切片的制作。

3. 制作半薄切片 制作半薄切片的目的是选择电镜观察部位,不经此步定位,盲目切削,容易将欲观察的部位修掉。因此,半薄切片对于准确定位和提高电镜工作效率至关重要,而且有利于对同一部位进行光镜和电镜的对比观察。半薄切片厚度为 0.2~0.4 μm 。将制作的切片置于事先滴有蒸馏水的载玻片上,加温 80~90℃,使切片展平,干燥,1%甲苯胺蓝染色后,光学显微镜观察。

4. 载网 超薄切片需置于载网(mesh)上染色后方能电镜观察。常用的载网有铜网和镍网两种,以铜网为多,呈圆形,直径 3mm,网孔多为方形,其数量称为目,有 50、75、100、150、200、300 和 400 目等,亦有一些其他特殊类型的网孔,如单孔和三条形孔等,可根据研究目的选择所需铜网。网孔目数越多,观察时图像越稳定,200 目以上的铜网,可不需支持膜,直接喷碳观察即可,但一般观察以 150 目为宜。目数越多,观察对象越易被遮掩,影响工作效率。新铜网或回收再利用铜网用前需在超声波发生清洗器辅助下丙酮清洗 3 次,再经酒精和纯水清洗干燥后应用。

5. 支持膜 为增加超薄切片在载网上的牢固性和稳定性,常在载网上覆盖一层厚约 20nm 的透明支持膜。良好的支持膜应尽量薄,以减少对图像反差的影响。常用支持膜有

火棉胶膜(collodion)及聚乙烯醇缩甲醛膜(formvar)。

火棉胶膜的制作方法:将2%~5%的火棉胶溶液滴在水面上,轻轻铺展开,使其成为一薄膜,缓慢移去容器内的水,使薄膜覆盖于预先摆放的铜网表面,此过程称湿式制作法。formvar膜多采用干式制作法,即将0.2%~0.5%的formvar溶液涂抹在载玻片上,也可将清洁的载玻片置于formvar液中15~30秒,取出后自然干燥,从载玻片上分离formvar膜,将清洁的铜网置于其上,30~40℃烘干后备用。此方法制作的支持膜最好用前在解剖镜下挑选,除去有孔和皱缩的膜、选择具有完好薄膜覆盖的铜网,有利于提高工作效率。

6. 超薄切片 应用钻石刀制作超薄切片时,应避免组织块与刀刃相碰,一旦触碰,可能毁坏钻石刀刃,所以,在调整刀与组织块的距离时,需借助照明灯光仔细观察刀刃与组织块的距离。若要制作理想的超薄切片,适当调节水槽的液面高度、灯光位置及切片速度等非常重要。因为许多因素均能影响超薄切片质量,所以,每个操作环节均重要,须仔细认真、反复实践方能获得满意结果。目前,Leica公司的UCT超薄切片机系列,不仅可以制作所需厚度的超薄切片,而且,还能自动控制进行连续超薄切片。

普通TEM的加速电压为70~100kV,该电子束难以穿透较厚的组织切片,所以,生物医学材料的切片厚度在50~80nm为宜,一般可获得对比度较佳的图像。需要注意的是,通常切片机的指示仪显示的切片厚度并不能完全代表超薄切片的实际厚度,所以操作者应根据经验和超薄切片在水液面反光的颜色判断切片厚度,以银白色(厚度约50~70nm)为佳,切片呈紫红色时,厚度一般大于100nm,电子束对其穿透较差,影响超微结构的识别,但切片太薄,小于40nm(暗灰色)时,图像的反差低,观察难度大。

7. 电子染色 因组织细胞成分主要由碳、氢、氧、氮等低原子序数元素构成,本身不能形成足够的反差,所以,超薄切片在电镜观察前需用重金属盐进行电子染色,使其与组织细胞中的一些成分结合,以增加图像的对对比度。用醋酸铀进行组织块染色和OsO₄后固定等虽具有一定程度的电子染色作用,但是,欲获得更清晰的图像,超薄切片仍需再经电子染色。常用的方法为醋酸铀和铅双染技术。

(1) 醋酸铀染色:重金属铀与细胞内核酸、核蛋白等有较强的结合能力。具体方法:取干净的蜡板或封口膜(如parafilm)置于实验台上,滴数滴染色液,然后将载有超薄切片的铜网置于其中,或将切片面朝下,使载网浮在液滴上,避光,室温下染色10~20分钟。然后迅速用蒸馏水清洗,除去残存染色液,以防醋酸铀干燥形成结晶体,影响结果观察。铀的结晶为细长针状,镜下容易识别。铀是放射性元素,操作时需注意防护。常用的1%醋酸铀水溶液,需置棕色瓶,铅盒内保存。

(2) 铅染色:重金属铅与大多数细胞成分结合,可显著提高图像的对对比度。下面简介笔者常用的Reynolds硝酸铅/枸橼酸钠液配制和染色方法。

Reynolds硝酸铅/枸橼酸钠染色液配制方法:双蒸水用前需煮沸数分钟,除去水中二氧化碳,冰中冷却至室温备用。称取1.33g硝酸铅和1.76g枸橼酸钠,加入100ml三角烧杯内,加入上述双蒸水30ml溶解,持续摇动数分钟,溶液呈乳白色混浊状态,然后逐滴加入1mol/L NaOH 8.0ml,边滴入边摇动,液体逐渐透明,最后加双蒸水至50ml,过滤、冰箱内保存。该溶液pH 12左右,4℃冰箱内可保存1~2个月,如有沉淀出现需滤过后使用,但长期

保存的溶液染色效果不甚理想。

染色方法与醋酸铀染色相似,但染色过程中应尽量减少染色液与空气中的二氧化碳接触,可采用在盒内放入少许 NaOH 颗粒吸收空气中的二氧化碳。室温(25℃),染色时间为 2~8 分钟。染色时间过长,铅易形成碳酸铅沉淀,污染切片,影响超微结构的观察。

三、观察与记录

不同制造商生产的电镜在结构和控制部分有许多相似之处,特别是近年问世的新型号电镜如 Philips 的 Tecnai 系列和 Hitach 7500 等的计算机控制系统较完善,操作简便,详细的调整可参照仪器使用说明书。下面仅介绍观察注意事项:

1. 启动 电镜正常工作的必须条件是镜筒在高真空状态,所以,最好保持仪器长期处在真空状态,既有利于提高工作效率,又能延长仪器使用寿命。如果不能维持长期开机状态,应每周至少启动机器两次,尽量保持电镜的真空状态,避免空气中的水分进入,引起镜筒内金属部件生锈,影响仪器正常运转。

2. 加高压 确认真空度达到仪器要求标准后,启动高压开关,逐渐加压,一般从 20~40kV 开始,逐步升至自己选择的加速电压值。生物样品观察的加速电压以 70~100kV 范围为宜。加速电压高,穿透力较强,可以得到较高分辨率的图像,但是,超薄切片太薄,小于 50nm 厚时,图像反差会降低,影响观察。

3. 灯丝电流 目前生物学研究所用的透射电镜常用的灯丝为 tungsten 和 LaB6 两种。当仪器高压稳定后,可缓慢转动灯丝旋钮,使电流通过灯丝,直至荧光屏呈现灯丝影像,同时观察电流表,通常电流为 15~30 μ A,以灯丝像偏略不饱和状态为佳。

4. 镜筒合轴 电镜的镜筒各部件的机械光轴中心应在同一直线上,称为机械轴,而各电子透镜的光轴中心亦应在同一直线上,称为电子光轴。观察前应采用机械移动和电磁偏转等方法使电子光轴和机械光轴相重合,此过程称合轴,比较复杂,需较熟练的操作和丰富的经验,但不必每次观察均进行合轴。日常观察可参考仪器使用说明书,仅进行电子光轴中心的调整即可。

5. 消除物镜像散 物镜极靴磁场的不对称性,可产生固有像散,而极靴孔、样品架、光栅孔的污染等均可增加像散。因此,观察时,需通过调节使物镜的极靴磁场得到方向性补偿,消除像散,可获得较高质量图像。新型号电镜固有像散较小,易于调节,而且仪器的计算机调控系统能够记忆不同研究者的最佳观察条件,每次应用自己的条件即可。

6. 观察 装入样品后,低倍下选择欲观察的切片(操作熟练者可采用先移开物镜光阑,选择观察切片,尔后恢复光阑,能提高工作效率),按下自动调整焦距旋钮,通过调整零点(Z 点)使图像清晰为止。观察时,应先在较低倍率(2000~6000 倍)纵观切片全貌,并根据研究目的,选择感兴趣的部位,高倍观察、记录。

注意:摄影部位在记录前不宜长时间观察,电子束照射时间长,易降低图像的清晰度,故调整焦距和消除像散等操作最好是在拟摄影部位的附近为佳。观察记录时一般应先低倍后高倍,养成低倍观察的习惯至关重要。低倍时,电子束照射切片面积大,切片不易破损,并有

利于同半薄切片的图像对比分析;而高倍观察时,电子束亮度比较集中,容易损伤样品,所以,应尽量避免先高倍观察再低倍摄影而导致的图像质量降低。另外,电子束集中照射可使样品的局部温度升高,切片发生缓慢漂移,所以高倍摄影记录时应确定无图像漂移后再进行。

7. 记录 电镜观察的目的是研究或测量组织细胞的超微结构,所以需要将结果保留。常用方法是显微照像或记录为数码资料。底片的分辨率远较荧光屏高,能够提供更多的信息。底片和数码资料均可长期保存。摄影的基本原则如下:

(1) 选择摄影部位:首先低倍镜下选择照相范围,将感兴趣的部位置于摄影框内。实际操作时,摄影的倍率应低于拟照相倍率的30%左右为佳。例如,拟摄10 000倍的图像时,最好在6000~8000倍摄影,最后所需放大倍率可经暗室光学放大底片或经图像处理数码资料获得,但此过程不能无限放大,超过一定限度则无法增加图像的细节放大,即所谓无效放大。另外,若高倍和低倍图像所示问题的效果相同,应尽可能拍摄低倍相片,这样一张图像所提供的研究信息将更多。

(2) 调整焦距:原则上低倍摄影的焦距可略偏不足些为佳,这样可增加图像的对比度。低于5000倍摄影时,可借助电镜的自动聚焦系统,结合Wobbler的应用,可获得较高质量的图像,而摄影倍率超过10 000倍时,应在双眼目镜下直接调整图像最清晰为宜。

(3) 消除像散:超过2万倍以上的摄影,需要除去物镜的像散,并应确认是否有图像漂移后再摄影。

(4) 调节亮度与曝光时间:根据仪器设定,调节摄影的亮度,低倍摄影的曝光时间可略长,而高倍可短些,一般情况,曝光时间以2~4秒为佳。

(5) 摄影:摄影前,将观察标本名称、观察日期及条件等基本信息输入计算机,记载在底片上,并做好笔记。近年的新型号电镜均为自动送片系统,摄影时轻按快门,可自动推进底片和曝光,在此过程中,应避免触摸仪器,轻微的振动亦将影响图片的质量。

(6) 底片显影:每次摄影完毕,最好自己显影底片,数码资料亦应及时整理,判断观察结果满意与否,需要重新摄影时,容易寻找所需部位。一般而言,显影液温度在20℃,显影时间3~4分钟为宜,提高或降低显影液的温度,需相应调整显影时间。注意:为防止显影液的温度上下不一致,导致底片显影不均,影响图像质量,显影前应充分将显影液搅拌均匀,最好先试显影1~2张底片,选择最佳显影时间;显影过程中亦应不断搅动底片,使其与显影液均匀接触。

(7) 关机:关机顺序与启动过程相反。关机前应将标本台的X轴和Y轴移至中心,放大倍率置于5000,亮度调至最暗,关闭灯丝和加速电压。观察结束后最好使电镜保持真空状态,如果关闭真空系统电源时,需30分钟后再关闭冷却水,自动水冷系统的电镜不需手工关闭冷却水。

目前,电镜全过程操作步骤经短时训练均可掌握,但是,电镜研究者需有高度责任心和严谨的工作态度,从取材、观察至底片处理的每一步,均需认真对待,才能获得理想的电镜图像。

第二节 电镜组织化学技术

电镜组织化学技术是在光镜组织化学基础上发展起来的形态学研究技术,它将组织化学与电镜技术相结合,使组织化学研究从光镜微细结构水平发展到电镜超微结构水平。电镜组织化学技术将组织细胞中特定的化学成分通过特定的化学反应形成反应产物,然后使其形成电镜下易于观察的高电子密度不溶性沉淀物,从而在超微结构水平对特定化学成分进行原位分析,由此将生物化学与超微结构有机联系起来,显示组织细胞内各种固有化学成分的定位。电镜组织化学技术主要检测一些酶的活性及其在超微结构的定位。虽然目前已知酶的种类超过 2200 余种,但电镜组织化学能显示的不超过 100 种。

一、基本原理

每种酶催化反应的基本原理和生物学特性等可参考本书的光镜组织化学技术章节。

(一) 酶组织化学反应过程

欲观察某些酶类在细胞内的分布,可通过酶的细胞化学反应显示酶的存在部位,即在一定条件下,利用细胞内的酶作用于相应底物的特性,使酶与底物在酶所在部位形成中间复合体,即易溶于水的酶反应产物(也称初级反应产物),此过程系酶作用于底物的酶反应过程,为特异性反应;当捕捉剂,如电子供体等存在时,该中间复合体迅速转变成不溶的沉淀物(也称最终反应产物),此阶段为捕捉反应,为非特异性的,形成的终产物经适当处理可在电镜下进行定性定位分析。

(二) 酶反应底物的特异性

一般认为酶作用的底物具有较严格的选择性,这也是酶细胞化学反应的基础,所以实验中应尽量保证酶反应的特异性。常用的方法包括:

1. 在孵育液中加入非特异性酶的抑制剂,除去不相关的酶反应。
2. 选择特异性较强的专一底物。
3. 选择酶的最适 pH,如酸性磷酸酶和碱性磷酸酶虽然作用底物相同,但是,两者的最适 pH 不同,所以通过选择最适 pH 可获得较特异的酶反应。

(三) 捕捉反应

电镜酶组织化学常用的捕捉反应为金属盐沉淀法和嗜钨性物质生成法两种。

1. 金属盐沉淀法 其原理是使酶反应所生成的易溶性初级反应产物与重金属结合,形成难溶的终产物,即高电子密度的沉淀物。常用的重金属有铅、铜、钡和铈等。

2. 嗜钨性物质生成法 基本原理是使酶反应产生嗜钨性终产物,后者经 OsO_4 固定,形成高电子密度的钨黑,电镜下容易识别。

二、样品制备

良好的样品制备是电镜酶细胞化学技术成功的关键。酶电镜组织化学样品制备要求既要保存酶的活性,同时又要保存细胞的超微结构,并能防止酶反应产物扩散。每种酶对固定

液的要求和显示方法虽不尽相同,但电镜酶组织化学的基本程序相似,下面简要介绍其基本要求:

1. 取材 组织标本的取材是样品制备的第一步,非常重要,所以,取材前应做好计划和充分准备。原则上,目标要明确,操作要迅速,临床标本取材时还应注意:①活检钳的刀口必须锋利,以免挤压组织;②取材部位必须是主要病变区;③手术标本除病变部位外,还应分别取病灶与正常组织交界区和远距病灶区的正常组织作对照。

2. 固定 常用的固定剂为2%~4%多聚甲醛和0.5%~2%戊二醛,以0.1mol/L PB或二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.4)配制,固定时间为30~60分钟(4℃)。注意:固定液的浓度越高,时间越长,越易引起酶失活;对于不同组织和酶,最好通过预实验选择合适的固定液浓度和固定时间。

3. 漂洗 用与配制固定液相同的缓冲液充分漂洗组织,4℃,1~2小时为宜。

4. 切片 组织标本经含蔗糖的缓冲液浸洗3小时以上,用振动切片机或冰冻切片机将组织切成30~50 μm 厚片,有利于孵育液从切片两面充分渗透入组织中,与细胞内的酶反应。

5. 预孵育 切片经充分漂洗后用不含底物的孵育液预孵10分钟。

6. 孵育 将切片移至含适当底物和捕捉剂的液体孵育,使其发生特异的细胞化学反应。孵育的温度和时间通常以35℃、30~60分钟为宜,温度不宜超过37℃,温度过高或孵育时间过长,容易导致反应产物的弥散。

注意:为得到较理想的实验结果,最好通过预实验确定孵育温度和时间;应根据实验需要于用前新鲜配制相应的孵育液;所用试剂纯度要高,器皿须清洁;孵育液中底物和捕捉剂的浓度、pH值和缓冲液的缓冲能力等必须配合适当。另外,配制孵育液应按配方顺次加入各种试剂,应一种试剂溶解后再加入另一种试剂,最终配制的孵育液应清澈透明,必要时,可过滤除去沉淀后应用。

7. 后处理 一般用冷缓冲液漂洗切片终止孵育,继之用2.5%戊二醛进一步固定,并根据需要可用1% OsO₄进行适当的后固定(4℃,30~60分钟)。注意:OsO₄固定后,酶反应产物易溶于水,故OsO₄固定时间以不超过60分钟为宜。

8. 脱水、包埋、超薄切片制作、电子染色以及观察 按第一节常规电镜方法进行,但是脱水时间可缩短1/2左右。注意:初次实验最好不对超薄切片进行电子染色而直接进行电镜观察,以了解组织细胞超微结构的保存和反应产物的分布情况,确认电子染色是否影响酶细胞化学反应产物的电镜观察。

9. 对照实验 为确保实验结果的可信性,任何实验方法均需必要的对照实验,酶组织细胞化学技术尤其如此。鉴定酶细胞化学反应特异性的方法较多,主要包括在孵育液中不加底物,或加入酶的特异性抑制剂,或采用热变性及消化等方法使酶失活,对照实验应不存在酶反应的沉淀产物。

三、结果观察

电镜酶组织化学结果的判断应从细胞超微结构、反应产物电子密度的强弱、分布定位是否准确等方面综合分析。良好的染色应该是酶细胞化学反应产物的定性、定位明显而准确,

电子密度均匀、颗粒细密。如果出现定位不准确或反应产物不同程度的弥散,则为人工假象,需尽力避免。

第三节 免疫电镜技术

免疫电镜技术(immunoelectron microscopy, IEM)是根据抗原与抗体特异性结合的原理,利用高电子密度的标记物标记抗体或用经免疫组织化学反应能产生高电子密度产物的标记抗体,在超微结构水平对抗原进行定性、定位的技术方法。Singer 于 1959 年首先建立了用电子密度较高的铁蛋白(ferritin)标记抗体的方法,可对细胞表面抗原进行超微结构定位。该技术为免疫电镜技术的发展奠定了基础。Nakane 与 Pierce 于 1968 年成功建立了免疫酶标记电镜技术,使细胞内抗原的超微结构定位成为可能。Faulk 和 Taylor 于 1971 年提出用胶体金(colloidal gold)标记抗体,并首先用于免疫电镜研究,由此大大促进了免疫电镜技术的发展。

一、免疫电镜技术的特点

免疫电镜技术与光镜免疫细胞化学(见相关章节)和常规电镜技术(见本章第一节)的主要不同点如下:

(一) 组织取材与固定

免疫电镜技术的取材要求更迅速更精细。与电镜酶细胞化学标本制备相似,既要求保存良好的细胞超微结构,同时又要保持组织细胞的抗原性,但是,两者间往往处于矛盾之中,也就是说,强固定剂虽有利于超微结构的保存,但易导致抗原性明显减弱,所以免疫电镜的组织标本固定不仅要考虑超微结构的保存,亦应尽力保持其抗原性,故应选用较温和的固定剂。常用固定剂有过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛(periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP)液和 2%多聚甲醛-0.5%戊二醛混合液。在包埋前染色中,PLP 较为常用,该固定液较适用于含糖类丰富的组织,对超微结构及许多抗原活性保存较好。因为 PLP 中的过碘酸能氧化糖类,使其中的羟基转变为醛基,赖氨酸的双价氨基与醛基结合从而把抗原交联起来。因组织抗原绝大多数含蛋白质和糖类,而抗原表位一般位于蛋白部分,PLP 能选择性地使糖类交联,这样既稳定了抗原,又不影响抗原表位与抗体的结合。加入低浓度的多聚甲醛则能稳定蛋白与脂类。但赖氨酸较贵,而多聚甲醛/戊二醛固定液相对经济简便,效果也较理想。

(二) 染色方法

免疫电镜技术与光镜免疫细胞化学染色方法的基本原理和试剂准备基本相同,相关内容可参考本书第四章,这里仅介绍免疫电镜的几种染色方法,包括包埋前染色、包埋后染色和冰冻超薄切片免疫染色三种。

1. 包埋前染色 包埋前染色即在进行常规电镜包埋处理前先行免疫组织化学染色,然后于解剖显微镜下将免疫反应阳性部位取出,修成 2~4mm³ 大小的组织块,再按常规电镜方法处理,包括戊二醛的再固定、锇酸后固定、脱水、包埋、超薄切片和电镜观察等。如果特

异性免疫反应的范围太小或只观察特定部位的免疫反应,为了准确定位,可做第二次包埋,即第一次包埋时将已进行免疫反应的组织经戊二醛再固定、锇酸后固定、脱水及包埋剂浸透后置于两层耐高温的透明塑料薄膜之间(类似夹心面包),高温聚合后,在解剖显微镜下取出需要的阳性部位作第二次包埋,或将取出的阳性部位用强力快干胶粘在已聚合的包埋剂块上供切片观察。

包埋前染色的组织,以中间部位的结构较理想,表层因受机械修整、挤压的影响,超微结构保存往往不甚理想。为提高工作效率,进行超薄切片制作前,亦应先制作半薄切片观察。为避免超薄切片电子染色所用的铅或铀与免疫染色的结果混淆,应将相邻的超薄切片分别捞在两个铜网上,一张直接进行观察,另一张电子染色后观察,对比分析。

包埋前染色法的主要优点:①因组织细胞免疫染色前未经 OsO_4 固定、脱水及树脂包埋等处理,故组织细胞的抗原性保存相对较好,可获得较好的免疫染色效果;②可在光镜下选取免疫反应阳性部位定位制作超薄切片,有利于提高电镜的工作效率。主要缺点是受到抗体穿透性的限制,组织深层细胞内抗原难以标记。

2. 包埋后染色 包埋后染色即组织标本经 OsO_4 固定、脱水、树脂包埋及超薄切片后再行免疫组织化学染色(图 6-1)。值得注意的是,在包埋后染色标本制备时, OsO_4 固定可以省略或尽量缩短后固定时间,因为不少实验表明, OsO_4 可使组织细胞的抗原性明显减弱。包埋后染色是将超薄切片贴在载网上进行免疫染色,染色过程中应注意保持载网湿润,避免干燥。

包埋后染色具有超微结构保存好、方法简便、阳性结果可重复性好以及可信度高等优点,可对同一组织块的连续切片进行其他抗原的免疫标记,能更准确地解释免疫标记结果,而且还能在同一切片上进行双重或多重标记。该方法也具有明显的缺点,如抗原活性可因标本处理过程而减弱或消失,组织中的抗原可与包埋剂发生反应而改变性质,以及被包埋在包埋剂中的组织不易进行免疫反应等。据报道,应用无水乙醇或 NaOH 饱和溶液等处理超薄切片,可减少或除去组织细胞内的包埋剂,获得较好的染色效果。

3. 冰冻超薄切片染色 将新鲜组织或轻度固定的组织置于 2.3mol/L 蔗糖液 $3\sim 5$ 小时,液氮速冻,利用冰冻超薄切片机在冰冻状态下制作超薄切片,厚度 $70\sim 100\text{nm}$ 。冰冻超薄切片未经固定、脱水和包埋等处理而直接进行免疫染色,组织细胞的抗原性保存较好,兼有包埋前和包埋后染色的优点(图 6-2)。但冰冻超薄切片制作难度大,要求技术熟练程度高,而且,需要特殊的仪器,难以普及推广。

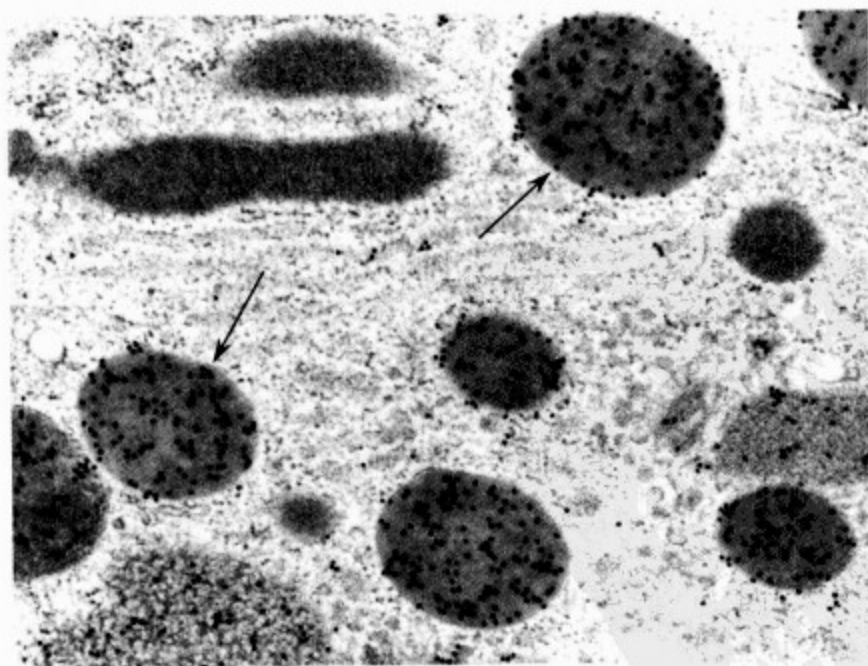


图 6-1 环氧树脂包埋后免疫胶体金电镜图
箭头所示金颗粒沉积在胰淀粉酶原颗粒部位(周德山供图)

(三) 包埋

1. 环氧树脂包埋 将一定大小的组织片(免疫染色的切片)或未染色的组织块直接脱水,环氧树脂包埋后,制作超薄切片,进行包埋后染色,再经常规电镜样品制备处理;另外,包埋前染色的标本也可将切片贴在载玻片上,然后将充满环氧树脂的硅胶囊倒置于切片上聚合,原位包埋,类似于贴壁培养细胞的常规电镜处理。

2. 低温包埋 前面所述的环氧树脂包埋需高温聚合,易使组织细胞的抗原性丢失,因此在免疫电镜技术中,许多实验室着手研究低温包埋剂,尝试低温包埋方法,特别是 20 世纪 80 年代免疫细胞化

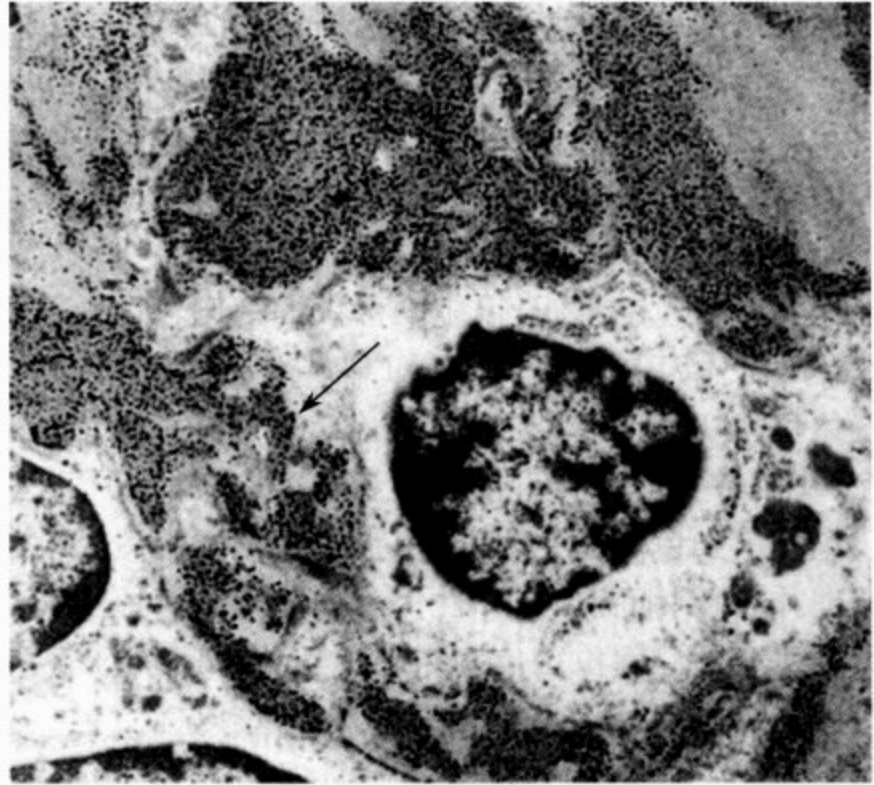


图 6-2 低温包埋剂包埋后免疫胶体金电镜图
箭头所示球内系膜蛋白沉积(周德山供图)

学技术在电镜中广泛应用,加速了低温包埋剂的实验研究,许多低温包埋剂相继问世。低温包埋剂多为乙烯系化合物如 Lowicryls、LR White 和 LR Gold 等,常用于铁蛋白或胶体金免疫电镜技术的包埋后染色,能检出应用环氧树脂包埋难以检出的多种抗原。现将常用的几种低温包埋剂及其应用简介如下:

(1) Lowicryls: Lowicryls 是丙烯酸盐(acrylate)和甲基丙烯酸盐(methacrylate)化学物质,包括 K4M、K11M、KM23 等,其主要特点是在低温下(K4M: -35°C ; K11M 和 KM23: $-60\sim-80^{\circ}\text{C}$)仍保持低黏度,并具有在紫外光(波长 360nm)照射下聚合的能力。这种光聚合作用与温度无关,但实验中为保持包埋剂的低黏稠度,以利于其向组织细胞内渗透,要求在低温下照射。在这些包埋剂中,K4M 和 K11M 具有亲水性,能较好地保持组织细胞的微细结构和抗原性,特别适于免疫细胞化学染色,且背景染色低,是超微结构定位组织细胞抗原的良好包埋剂。KM23 为疏水性,图像反差好,较适于扫描电镜和透射电镜的暗视野观察标本制作。下面以 K4M 为例介绍此类包埋剂的应用:

1) 包埋剂的配制:商品 Lowicryls 包埋剂由三部分组成,即单体(monomer)、交联剂(crosslinker)和引发剂(initiator)。调整单体和交联剂的比例,可制备软硬度合适的包埋块(包埋时多用硅胶囊代替橡胶或塑料制品,后两者影响紫外线的吸收)。包埋剂配制比例如下:

K4M	8.65g	17.30g	25.95g	34.6g
交联剂	1.35g	2.70g	4.05g	5.4g
引发剂	0.05g	0.10g	0.15g	0.20g
合计	10.05g	20.10g	30.15g	40.20g

一般可分别用注射器取包埋剂,置于玻璃烧杯内,天平称量,将三者按顺序加入后用玻

璃棒轻轻搅动 3~5 分钟,切忌过分用力搅拌,以防产生气泡,影响包埋效果。

2) 包埋:标本相继用 65%乙醇 0℃脱水 1 小时,80%乙醇-25℃脱水 2 小时,在 1:1 和 2:1 的 Lowicryl K4M 包埋剂/80%乙醇中,分别浸透 1~2 小时(-25℃),在纯 Lowicryl K4M 包埋剂中浸透 2 小时(-25℃),更换纯 Lowicryl K4M 包埋剂,浸透过夜(-25℃),继而将新鲜纯包埋剂置于包埋模具内,将组织轻轻移入,以紫外线灯(波长 360nm)距标本 30~40cm 照射 24 小时(-25℃),使之聚合。聚合后的胶囊可移至室温,继续在紫外线灯下照射 2~3 天,以增加包埋块硬度,有利于制作优良的超薄切片。为缩短整个实验流程时间,也可采用快速包埋法,即仅聚合步骤在低温下进行,其余所有步骤在 4℃或室温处理。

3) 免疫染色:将制作的超薄切片(厚 60~80nm)贴于镍网上,自然干燥,继之于湿盒内进行包埋后免疫染色(室温),用金标记抗体或铁蛋白标记抗体作为第二抗体。必要时可用 1% OsO₄ 后固定 30 分钟(室温),以增强切片的反差。

(2) LR White 和 LR gold:二者均为透明树脂,是一种混合的丙烯酸单体,黏度非常低,具有较强的嗜水性,故穿透性较强,有利于抗体和其他化学物质进入 LR 树脂内,与组织细胞抗原结合。因该类树脂具有良好的亲水性,所以,标本可不用完全脱水,至 70%乙醇即可直接进行树脂包埋,有利于保持组织细胞的抗原性。LR gold 是一种光引发的低温聚合包埋剂,聚合温度在-25℃左右,因聚合后呈金黄色而得名。该树脂能最大限度地保持组织细胞的抗原性,特别适于免疫电镜的抗原定位研究。LR White 可在高温和低温两种情况下聚合,前者在 60℃聚合 24 小时,后者在-25℃有加速剂存在的条件下聚合 48 小时,配制方法可参考产品说明书。样品处理和免疫染色同 Lowicryl 包埋剂(图 6-2)。

Lowicryl 和 LR 等低温包埋剂需在低温暗处(-20℃)保存。因其有一定的刺激性,配制时应戴手套,并在通风橱内操作,以免有害气体刺激眼睛,如不慎接触应立即流水冲洗。

(四) 对照实验

电镜免疫染色技术亦需进行对照实验以确定染色的特异性,所用方法与光镜免疫组织化学染色基本相同(见本书第四章)。

二、几种常用电镜免疫染色技术

(一) 免疫铁蛋白电镜技术

1. 基本原理

铁蛋白的分子量 460kD,为一种含铁(约占 23%)的蛋白质,直径 10~12nm。目前常用的间接免疫染色技术是应用低分子量的双功能试剂将第二抗体与铁蛋白相连,制备标记抗体。此复合物既保留了抗体的免疫活性,又因铁蛋白含有 2000~3000 个铁原子的致密铁离子核心,形成四个圆形致密区,所以,具有较高的电子密度,易于电镜观察。

早年的研究中,因没有铁蛋白标记抗体商品出售,所以多数实验室需要自己制备铁蛋白,再标记抗体,操作较麻烦,且质量控制难度也较大,难以广泛应用。目前已有铁蛋白标记的多种间接抗体(第二抗体)商品出售。

2. 电镜标本的制备方法

(1) 固定:与电镜酶细胞化学相似,可用醛类和 OsO₄ 双重固定,以保存组织细胞的超

微结构。有文献记载,4%多聚甲醛/0.5%戊二醛(pH 7.2)4℃固定,继之0.2% OsO₄后固定,并不影响抗原活性,但笔者认为应尽量避免或缩短 OsO₄后固定时间为宜。

铁蛋白标记的抗体分子量较大,较适合于细胞表面抗原的定位研究,而对细胞内抗原的研究则需进行适当处理,以增强其标记抗体的通透性。常用方法如下:

1) 冻融法:小块组织或细胞固定后,可用液氮速冻、室温迅速融化,使细胞膜破裂,有利于标记抗体进入细胞内与其相应抗原结合,但超微结构的保存不甚理想。

2) 冰冻切片法:固定的组织经5%蔗糖脱水,液氮速冻,制作10~15μm厚的冰冻切片,PBS漂洗,直接进行包埋前免疫染色,再按常规电镜样品处理。

(2) 免疫染色:多用包埋前染色,以间接染色法使用居多,孵育均在湿盒内进行,一般操作程序如下:

1) 将组织标本制成10~15μm冰冻切片;

2) 切片漂洗后,1% BSA孵育,室温15分钟;

3) 特异性抗体(第一抗体)中室温孵育30~60分钟,也可4℃孵育过夜;

4) 冷PBS充分漂洗3次,每次3~5分钟;

5) 铁蛋白标记的第二抗体孵育,室温30~45分钟;

6) 漂洗同上,再经戊二醛固定1小时;

7) 漂洗后,1% OsO₄ 4℃后固定15~30分钟;

8) 样品的脱水、包埋、超薄切片制作及电镜观察等处理与常规电镜相同(图6-3)。

(二) 免疫酶电镜技术

1. 基本原理 免疫酶组织化学技术是以酶作为抗原抗体反应的标记物,酶催化相应的底物,形成一种不溶性的反应产物。光镜观察时,要求形成的终产物为不溶性的有色沉淀,而电镜观察时,则要求酶反应的终产物经适当处理后,具有较高的电子密度。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是目前应用最多的酶标记物,具有稳定性强和酶反应特异性高等优点。

2. 电镜标本制备 免疫酶电镜技术主要用于包埋前染色。

(1) 培养细胞的免疫酶标抗体染色法

1) 0.1mol/L PB(pH 7.2)配制的4%多聚甲醛原位固定(4℃)1小时;

2) 2% H₂O₂/甲醇处理(可省略),室温20分钟,封闭内源性过氧化物酶活性;

3) PBS漂洗后1% BSA室温孵育15分钟;

4) 特异性抗体(第一抗体)室温孵育3小时或4℃孵育过夜;

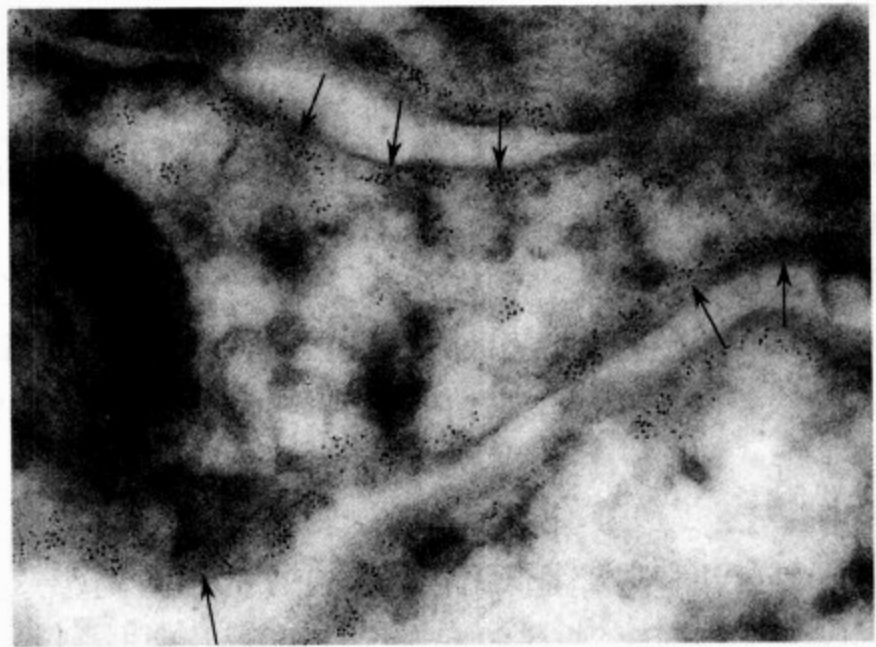


图6-3 冰冻超薄切片铁蛋白标记抗体免疫电镜图
(周德山供图)

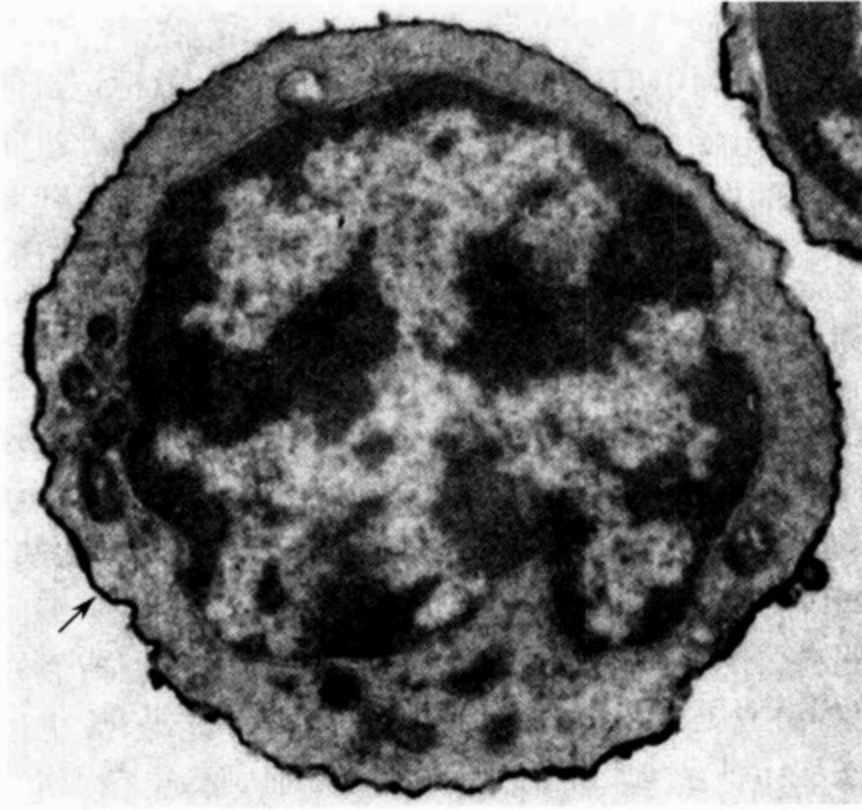


图 6-4 培养细胞的免疫酶标抗体染色法电镜图
显示胸腺细胞表面 thyl. 2 抗原分布(箭头所示)(周德山供图)

(2) 组织切片的免疫酶标抗体染色法

1) 4%多聚甲醛固定的组织置 15%~20%蔗糖 PBS 中漂洗,4℃过夜或组织块下沉至杯底;

2) 制作 30~40 μ m 厚的振动切片或冰冻切片,PBS 漂洗;

3) 2% H₂O₂/甲醇处理,室温 20 分钟,封闭内源性过氧化物酶活性;

4) 1% BSA 室温孵育 15 分钟;

5) 第一抗体 4℃孵育 12~24 小时,PBS 漂洗;

6) HRP 或生物素标记的第二抗体室温孵育 30~60 分钟,如系生物素标记的第二抗体,反应后则需进一步按 ABC 法要求操作;

7) 呈色反应:0.03%~0.05% DAB-0.01% H₂O₂/0.05mol/L Tris-HCl(pH 7.6)显色,适时终止反应,PBS 漂洗;

8) 1%戊二醛 0.1mol/L PB 配制固定 15~30 分钟(4℃),PBS 充分漂洗;

9) 样品的饿酸后固定、脱水、包埋、超薄切片制作及电镜观察等处理与常规电镜相同(图 6-5)。

5) PBS 充分漂洗后,HRP 或生物素标记的第二抗体室温孵育 30~60 分钟,如系生物素标记的第二抗体,反应后则需进一步按 ABC 试剂盒要求操作;

6) PBS 漂洗后,1%戊二醛 0.1mol/L PB 配制固定 30~60 分钟,PBS 漂洗;

7) 呈色反应:0.03%~0.05% DAB-0.01% H₂O₂/0.05mol/L Tris-HCl(pH 7.6)显色,适时终止反应,PBS 漂洗;

8) 1% OsO₄ 后固定 30~60 分钟;

9) 样品的脱水、原位包埋、超薄切片制作及电镜观察等与常规电镜相同(图 6-4)。

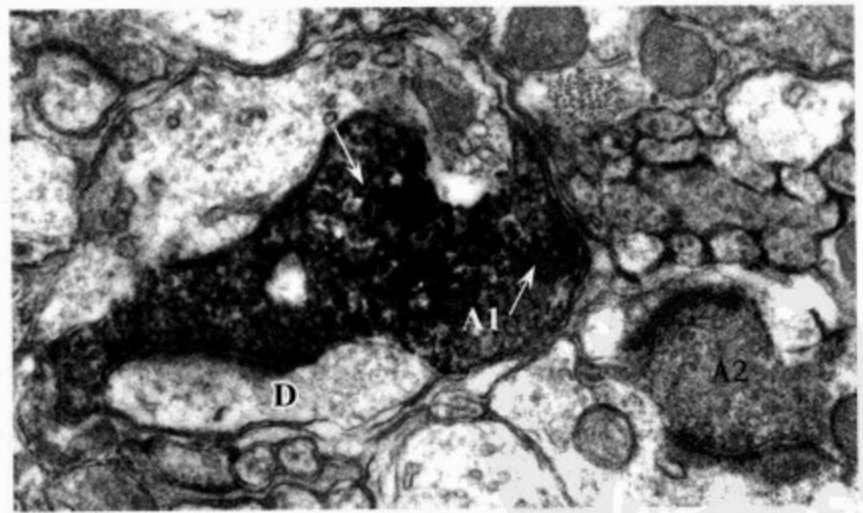


图 6-5 组织切片的免疫酶标抗体染色法电镜图
环氧树脂包埋前免疫酶染色示大鼠脊髓背角浅层内 P 物质在轴突终末中的分布,箭头示高电子密度的免疫反应产物(A1, 标记的轴突终末; A2, 未标记的轴突终末; D, 树突)(李和供图)

(三) 免疫胶体金电镜技术

胶体金标记抗体技术建立于 20 世纪 70 年代初,因胶体金液呈樱桃红色,故标记抗体后进行免疫染色,可直接光镜观察。金颗粒的电子密度相当高,电镜下清晰可辨。因此近年来该技术被广泛应用于生物学和医学各领域的电镜研究,自 20 世纪 80 年代开始,有取代免疫酶细胞化学电镜技术之趋势。目前,国内外已有不同直径的金颗粒标记的各种间接抗体(第二抗体)商品出售,实验需要时可直接购买。

该技术的主要优点:①省时,程序较酶标抗体法简单;②不需 H_2O_2 等处理,对组织细胞超微结构保存较好;③金颗粒电子密度高,电镜下容易识别,且易于同其他免疫反应产物区别;④可与酶标抗体或铁蛋白标记抗体等相结合进行双标记染色,研究两种不同抗原在超微结构水平的定位;⑤也可用不同直径的金颗粒标记不同的抗体,研究两种以上抗原的共存;⑥因抗原抗体反应部位结合金颗粒数量的多少与抗原的量呈正相关,故可用于组织细胞抗原的半定量分析;⑦将胶体金标记的第一抗体直接加入培养液中,利用培养细胞具有吞饮作用的特点,可进行培养细胞内的抗原定位研究;⑧金颗粒具有较强激发电子能力,故也可用于扫描电镜对细胞表面抗原或一些受体的定位观察;⑨胶体金液无毒,对人体亦无损伤。因此,胶体金标记抗体染色技术是目前免疫电镜技术最常用的理想染色方法。

1. 免疫胶体金电镜染色方法 免疫胶体金电镜染色亦可分包埋前和包埋后两种染色方法,前者因标记抗体对细胞膜的穿透性较差,故仅适于细胞表面抗原的显示,而后者较常用于对细胞内抗原的显示。现分别介绍如下:

(1) 包埋后染色

1) 常规包埋或低温包埋的组织标本按包埋后染色要求制作 50~70nm 超薄切片,切片载于镍网或金网上;

2) 经 OsO_4 后固定或环氧树脂包埋的组织,需用 H_2O_2 蚀刻,以增加抗体的通透性。方法:将 1% H_2O_2 (数滴)滴于蜡板上,镍网的载切片面向下轻轻浮于液滴表面或置于液滴内,室温 10 分钟,低温包埋剂包埋的组织细胞可省略此步骤。

3) PBS 漂洗 3 次,每次 5~10 分钟;

4) 正常羊血清(1:50)或 1% BSA 室温孵育 20~30 分钟;

5) 第一抗体孵育,可先置 4℃,12~24 小时,然后室温 1 小时,使抗体充分渗透并结合。

6) PBS 漂洗同上;

7) 将载网置含 1% BSA 的 PBS(pH 8.2)中,为胶体金标抗体的结合提供碱性环境;

8) 胶体金标记的第二抗体(1:50,以 pH 8.2 的 PBS 稀释),室温孵育 20~30 分钟;

9) 双蒸水洗 3 次,每次 5 分钟,

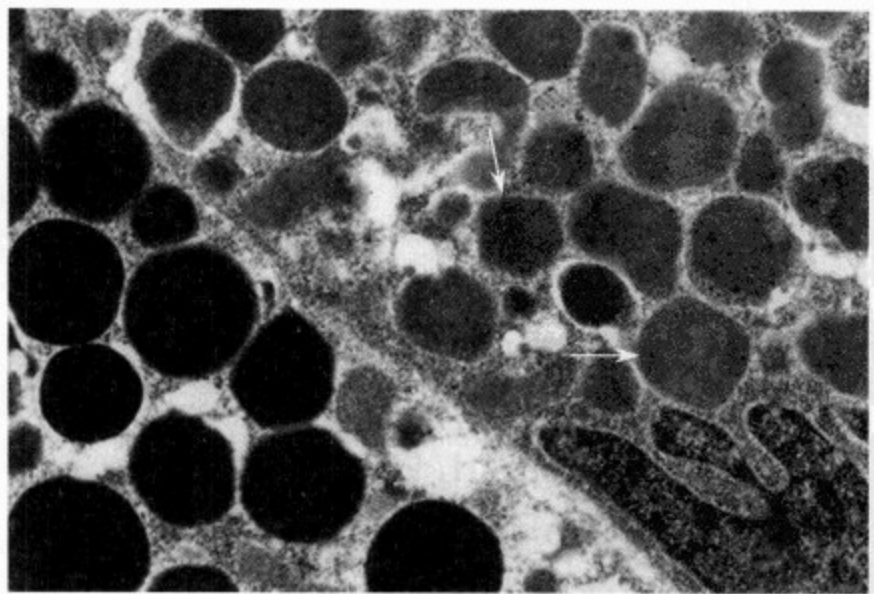


图 6-6 环氧树脂包埋后胶体金法电镜图显示抗原存在部位(箭头所示)(周德山供图)

如进行双标记免疫染色,则用 PBS 漂洗,重复步骤③~⑦;

10) 直接或经电子染色后进行电镜观察,方法与常规电镜操作相同(图 6-6)。

(2) 包埋前染色

1) 将冰冻组织切片贴于涂抹黏附剂的载玻片上,培养细胞经离心后可制成涂片,冰冻组织切片也可进行漂浮染色。

2) PBS 漂洗及染色程序与包埋后染色步骤基本相同。第一抗体的孵育时间可适当延长,一般先置 4℃,24~48 小时,再室温孵育 1~3 小时。染色后,最好用 1% OsO₄ 后固定 30~60 分钟,以提高固定效果,增强电子密度。然后按照常规电镜标本制作方法进行系列乙醇或丙酮脱水、包埋、超薄切片及电子染色等处理。

2. 胶体金标抗体双重染色法 利用两种不同直径的胶体金颗粒标记两种第二抗体,在电镜下进行两种不同抗原的亚细胞定位。基本原则:首先需购买拟研究的两种抗原的特异性抗体,以及不同直径金颗粒标记的相应第二抗体,然后在同一张载网上分别或同时显示组织细胞内两种抗原所在部位。染色方法主要为包埋后染色,操作步骤与显示单一抗原的包埋后染色程序基本相同,在第一种抗体染色后,再重复上述染色过程,显示另外一种抗原成分。也可分别将两种不同种属来源的特异性抗体(第一抗体)和不同直径胶体金颗粒标记的相应第二抗体混合,直接孵育,这样可节省重复染色过程所需要的时间,并可减少重复染色带来的污染(图 6-7)。

理想的染色结果应背景清洁,金颗粒集中在抗原抗体反应部位。欲获得最佳染色,实验中需注意:①用高特异性和高亲和力抗体;②被检组织细胞需含一定量抗原,如抗原太少,则难以被抗体标记;③漂洗是否彻底是决定实验成功的关键因素之一;④实验所用各种液体可用 0.22μm 微孔滤器(minipore filter)滤过,各种器皿应清洁。

3. 电镜免疫胶体金-银法染色技术 免疫胶体金-银染色(immuno gold-silver staining)技术系 20 世纪 80 年代 Holgate 将免疫金染色和银显影方法结合而建立的一种新型检测技术,亦可用于电镜包埋前染色。其基本原理是先进行免疫胶体金染色标记抗原,使其结合在组织细胞抗原所在位置,然后进行物理显影,当显影剂中的对苯二酚将银离子还原成银原子时,后者将围绕金颗粒形成一个“银壳”。“银壳”本身亦具有催化作用,进一步促使更多银离子还原,则使“银壳”越来越大,抗原位置因此而变得清晰,抗原信号也得以放大,故此法是最为敏感的细胞化学方法之一。因金颗粒的电子密度高,加之敏感性也高,故特别适合免疫电镜的抗原研究。主要操作程序如下:

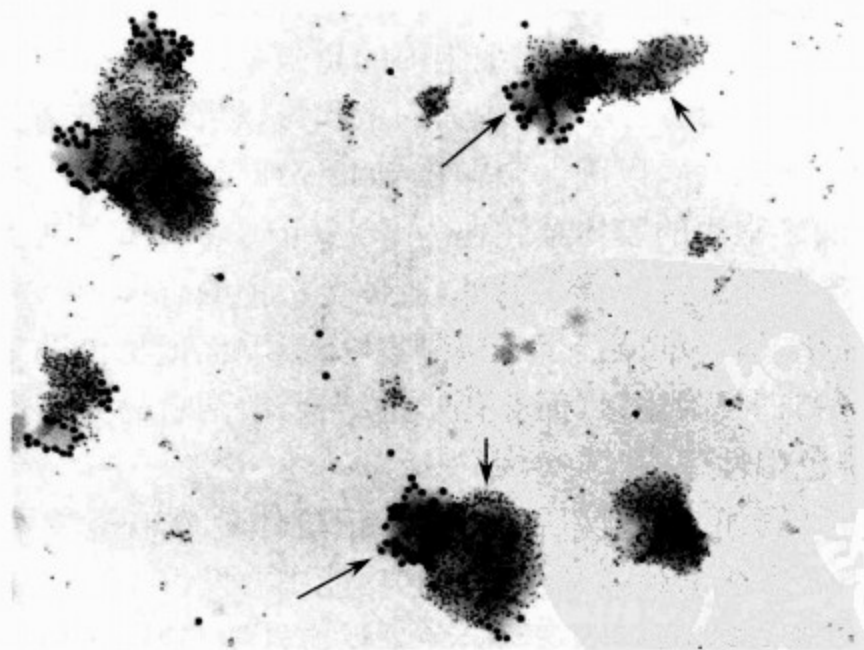


图 6-7 胶体金标抗体双重染色法电镜图
环氧树脂包埋后免疫电镜胶体金双重标记显示两种抗原的共存(长箭头示大颗粒,短箭头示小颗粒)(周德山供图)

- (1) 组织固定后,5%、10%和20%系列浓度的蔗糖处理,制作冰冻切片,厚10~30 μm ;
- (2) 含1%正常羊血清或1% BSA 的 PBS 室温孵育 20 分钟,封闭抗体非特异性结合部位;
- (3) 含1%氢硼化钠的 PBS 孵育 20 分钟;
- (4) 第一抗体孵育,可先置 4 $^{\circ}\text{C}$,12~18 小时,然后室温 1 小时,使抗体充分渗透并结合;
- (5) PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟;
- (6) 0.1% BSA/PBS 液(pH 8.2)漂洗 5 分钟,为胶体金结合提供碱性环境;
- (7) 胶体金标记的第二抗体(pH 8.2)室温孵育 30~45 分钟,需摸索最佳稀释度;
- (8) 硝酸银液避光处理 2~10 分钟,显影时间最好根据实验结果确定;

硝酸银液配制:双蒸水 60ml,枸橼酸缓冲液 10ml,对苯二酚 1.0g 溶于 30ml 双蒸水,将三者混合,完全溶解后,用前加入硝酸银液 2.0ml(含 35mg 硝酸银)混匀;

枸橼酸缓冲液的配制:枸橼酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$)25.5g,枸橼酸钠($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)23.5g,用双蒸水溶解至 100ml,即为 pH 3.5 的枸橼酸缓冲液。

- (9) 解剖显微镜下选取免疫反应阳性部位,1% OsO_4 后固定 30 分钟,双蒸水漂洗;
- (10) 组织标本的脱水、树脂包埋、超薄切片制作及电镜观察等方法同前述。

主要优点:该方法形成的金银颗粒电子密度高,反差强,敏感度高;包埋前染色的标本可在解剖显微镜下选取阳性部位,结合半超薄切片的应用,能明显提高工作效率,特别适于抗原含量少的组织细胞的免疫电镜研究。缺点:显影处理需在暗室进行,操作较繁琐;而且增加包埋前免疫染色处理的步骤易导致非特异性着色;另外,单个金颗粒周围结合的银粒子不甚牢固,漂洗等处理容易脱离,半定量研究时应注意;此外银等废液直接流入下水道,容易导致环境污染。

(四) 免疫纳米金电镜技术

在免疫酶电镜技术中,由于过氧化物酶催化 H_2O_2 与 DAB 的反应产物多呈弥散分布,常使被检抗原在组织或细胞内的超微结构定位模糊不清。而胶体金免疫电镜术所用的胶体金对许多蛋白质均具有较强的亲和力,尽管研究者们尝试了用 BSA 等其他蛋白质包被暴露的金颗粒表面,以确保金颗粒与 IgG 或 Fab' 片段之间 1:1 连接,但由此也导致标记探针过大,加之常用的胶体金颗粒为 5~20nm,本身直径较大,所以包被后的金颗粒抗体渗透性较差,导致敏感性下降。另外,胶体金标记的抗体容易凝集形成絮状物,虽在标记过程中经离心纯化,但仍难免残留一些凝集物,影响标记抗体的染色效果。此外,胶体金与 IgG 之间是通过物理吸附连接,而非化学键结合,故两者易分离,游离的抗体可与标记抗体竞争,降低免疫染色阳性率。

尽管如此,包埋后胶体金标记抗体免疫电镜技术在研究 GABA、谷氨酸等氨基酸递质在神经系统的超微结构定位和功能中亦发挥了重要作用,但因许多神经肽、酶和受体蛋白等经树脂包埋和高温聚合后,免疫反应性明显减弱,胶体金标记抗体法往往不易显示,使其应用受到一定限制。为弥补上述不足,Hainfield 和 Furuya 于 1992 年建立了一种新的金标抗体法,其金颗粒直径仅为 1.4nm 左右,故称之为纳米金(nanogold)。用纳米金标记的抗体既可用于包埋后染色,也可用于包埋前染色,因此在免疫电镜中的应用日趋广泛。

1. 基本原理 纳米金通过共价键与 IgG 的 Fab' 片段结合,较稳定,标记的抗体分子直径非常小,可通过亲和层析法纯化,纯化物中不含凝集物,无游离 Fab' 片段存在。因此,纳米金标记抗体的渗透性强,标记效率和敏感性均较高。虽然直径 1.4nm 的纳米金在电镜下较难直接观察,但通过银加强可使其放大至 5~100nm 的高电子密度纳米金-银颗粒复合物,电镜下易于分辨。如将免疫纳米金电镜技术与免疫酶电镜技术结合,因前者的反应产物在电镜下呈颗粒状高电子密度,而后者反应产物在电镜下呈弥散状高电子密度,故可对两种抗原进行双重免疫电镜标记。

2. 免疫纳米金染色方法 免疫纳米金染色与免疫胶体金-银法染色基本相似,也可分为包埋前染色和包埋后染色。下面分别介绍包埋前免疫纳米金单重染色和与免疫酶染色结合的双重染色基本程序:

(1) 包埋前免疫纳米金单重染色:同前述免疫电镜方法制备组织切片,按以下步骤进行免疫染色:

- 1) 含 1% 正常血清或 1% BSA 的 PBS 预孵育 20~30 分钟;
- 2) 特异性第一抗体 4℃ 孵育 24~48 小时后 PBS 漂洗 3 次,每次 10 分钟;
- 3) 纳米金标记 IgG Fab' 片段(1:100, Nanoprobes)室温孵育 2 小时或 4℃ 孵育 12 小时后 PBS 漂洗 3 次,每次 10 分钟, PB 漂洗 2 次,每次 10 分钟;
- 4) PB 配制的 1% 戊二醛固定 30 分钟~2 小时,随后 PB 漂洗 2 次,每次 10 分钟;
- 5) 4℃ 下银加强漂洗缓冲液漂洗 2 次,每次 10 分钟;
- 6) 4℃ 下银加强 10~15 分钟(避光);
- 7) 4℃ 下定影液中定影 10 分钟后 PB 漂洗 2 次,每次 10 分钟;
- 8) PB 配制 1% 锇酸后固定 30~60 分钟;PB 漂洗 2 次,每次 10 分钟。

9) 按常规电镜标本制作方法进行系列乙醇或丙酮脱水、包埋、超薄切片、电子染色和电镜观察(图 6-8)。

(2) 免疫纳米金与免疫酶结合的双重染色:同前述免疫电镜方法制备组织切片,按以下步骤进行免疫染色:

- 1) 含 1% 正常血清或 1% BSA 的 PBS 预孵育 20~30 分钟;
- 2) 两种特异性第一抗体(免疫自不同种属动物)的混合物 4℃ 下孵育 24~48 小时;PBS 漂洗 3 次,每次 10 分钟;

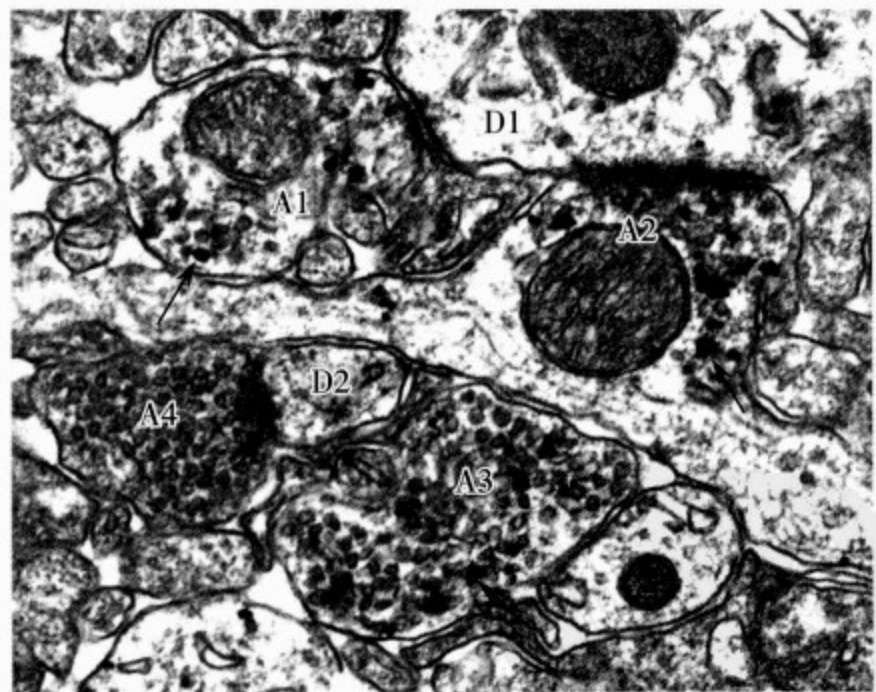


图 6-8 免疫纳米金染色法电镜图
环氧树脂包埋前免疫纳米金染色示亨廷顿蛋白相关蛋白 1 (huntingtin-associated protein 1, HAP1) 在小鼠脑内神经元轴突终末内突触囊泡上的定位(A1~A3, 含 HAP1 的轴突终末;A4, 无 HAP1 的轴突终末;D1 和 D2, 树突。箭示纳米金-银颗粒)(李和供图)

3) 与第一抗体种属相应的纳米金标记的 IgG Fab' 片段和生物素标记的第二抗体的混合物室温孵育 2 小时或 4℃ 下孵育 12 小时后 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 分钟;

4) ABC(1:100, Vector) 室温孵育 2 小时后 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 分钟, 之后 PBS 漂洗 2 次, 每次 10 分钟;

5) 4℃ 下银加强漂洗缓冲液漂洗 2 次, 每次 10 分钟;

6) 4℃ 下银加强 10~15 分钟(避光);

7) 4℃ 下定影液中定影 10 分钟后 PB 漂洗 2 次, 每次 10 分钟, 并用 0.05mol/L Tris-HCl(pH 7.6) 漂洗 2 次, 每次 10 分钟;

8) 0.03%~0.05% DAB-0.01% H₂O₂/0.05mol/L Tris-HCl(pH 7.6) 显色 10~15 分钟;

9) 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 漂洗 2 次, 每次 10 分钟, 接着以 PB 漂洗 2 次, 每次 10 分钟;

10) PB 配制的 1% 戊二醛固定 30 分钟~2 小时后 PB 漂洗 2 次, 每次 10 分钟。

按常规电镜标本制作方法进行锇酸后固定、系列乙醇或丙酮脱水、包埋、超薄切片、电子染色和电镜观察(图 6-9)。

3. 免疫纳米金电镜技术银加强液、漂洗缓冲液和定影液配置方法

A 液(HEPES 贮存液): 称取 23.83g HEPES 溶于 80ml 双蒸水, 用 1mol/L NaOH 调至 pH 6.8(不能用 HCl), 用双蒸水补充至终体积 100ml 即为 1mol/L HEPES 贮存液, 4℃ 保存。

B 液(阿拉伯胶): 称取 50g 阿拉伯胶粉(gum arabic)加入 250ml 烧杯中, 加 100ml 双蒸水, 室温下搅拌 1~2 天, 用 4 层纱布过滤后按 5ml/管分装入 15ml 塑料离心管内, -20℃ 保存。

C 液(还原剂): 称取 10mg 没食子酸正丙酯(n-propyl gallate)加入 15ml 塑料离心管内, 先用 250μl 100%乙醇溶解, 然后加双蒸水至 5ml。用前 1 小时内配制, 4℃ 保存。

D 液(银盐): 称取 11mg 乳酸银加入用锡纸包裹的 1.5ml Eppendorf 管内, 加双蒸水 1.5ml 溶解。临用前配制。

临用前在解冻的 5ml B 液中依次加入 2ml A 液、1.5ml C 液和 1.5ml D 液, 混合后即银加强液。冰中保存, 注意避光。

漂洗缓冲液: 取 1mol/L HEPES 贮存液 2.5ml、蔗糖 3.42g, 加双蒸水至 50ml, 4℃ 保存。

定影液: 取 1mol/L HEPES 贮存液 1ml、硫代硫酸钠 1.98g, 加双蒸水至 50ml, 4℃ 保存。

(周德山 李和)

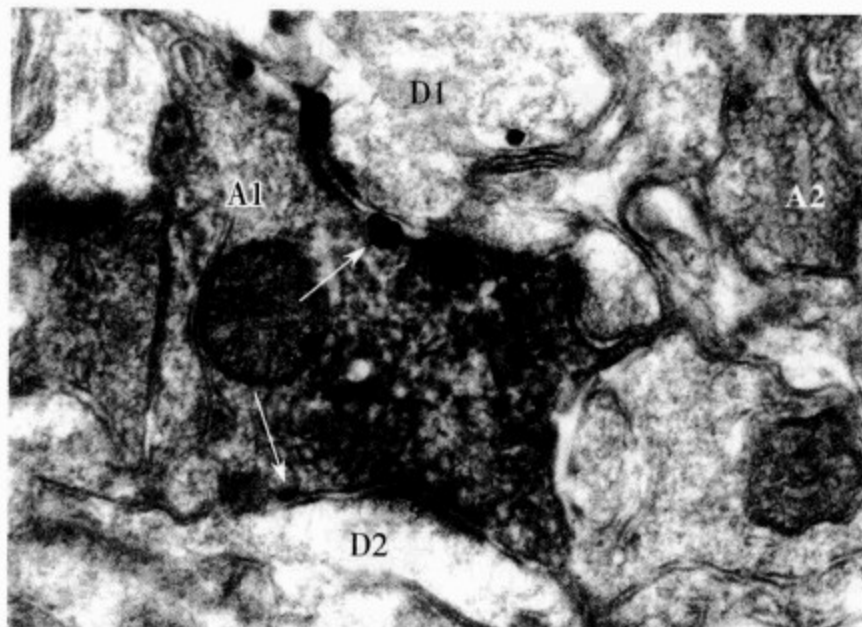


图 6-9 免疫纳米金与免疫酶结合的双重染色法电镜图
环氧树脂包埋前免疫纳米金与免疫酶结合的双重染色示大鼠脊髓背角浅层内第 7 型代谢型谷氨酸受体(mGluR7)和凝集素 I-B4 结合位点免疫纳米金染色标记的 mGluR7 特异性定位于突触前膜上(箭所示), 免疫酶染色标记的凝集素 I-B4 结合位点分布在轴突终末内(弥散的高电子密度反应产物)A1, 标记的轴突终末; A2, 未标记的轴突终末; D1 和 D2, 树突)(李和供图)

第七章 组织化学与免疫组织 化学定量分析技术

组织化学和免疫组织化学只能对组织细胞内的化学成分或抗原进行定性和定位观察。随着现代物理学的飞速发展,新理论和新技术不断涌现,发明出一批可进行定量分析的仪器,最常应用的有图像分析仪、流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜及体视学技术等,它们是现代形态学研究不可缺少的工具,它们的出现使形态学研究从定性和定位水平上升到定量分析水平。

显微图像分析系统的特点是计算机能自动精细处理各种有形的标本图像,它不仅通过各种成像系统获得图像的几何数据、光密度、灰度等信息,还可运用该系统对获得的信息作进一步处理,然后通过数字的形式把标本中的各类信息精确地表达出来。

流式细胞术是一项集激光技术、光电测量技术、计算机技术、流体力学、细胞免疫化学技术及单克隆抗体技术为一体的新型高科技细胞分析技术,该项技术可对单个细胞逐个地进行高速准确的定量分析和分类,每秒可测定数千到万个细胞,且有高度的重复性。

激光扫描共聚焦显微镜是20世纪80年代问世的一种新型分析仪器,是激光、电子摄像和计算机图像处理等现代高科技手段相互渗透的产物,是显微镜技术、光电技术和计算机技术的完美结合。激光共聚焦显微镜不仅能在细胞水平上作多种功能测量和分析,还可对组织和细胞进行三维图像分析,并能进行组织细胞内各种荧光标记物的微量分析,细胞内 Ca^{2+} 和pH值等的动态分析测量,检测细胞的受体移动及膜电位变化,酶活性和物质转运的测定等。

体视学是一系列用于获得准确组织结构的三维形态定量特征(如体积、表面积、线性结构的长度和颗粒结构的数量等)的方法。20世纪80年代以来,以Gundersen为代表的丹麦科学家建立了现代无偏体视学方法,为微观形态结构进行准确定量研究提供了有效途径。在实际应用水平上,体视学技术是一系列基于二维切片全面观察而获得显微结构的三维定量信息的精确手段。因此,现代体视学方法的出现使形态学定量研究从二维水平走向三维水平。

第一节 显微图像分析

在形态学研究中,一个常见的问题是如何获取与细胞功能相关的各种定量检测信息。如在组织化学和免疫组织化学技术中,制作了理想的标本,如何进行观察才能客观地获得尽

可能多的定量信息,这是学习显微图像分析术的目的。目前,组织化学和免疫组织化学只能解决某一物质存在于何处,而不能精确地确定此物质量的多少,所谓“量”包括颜色深浅、其所占的长度或面积等,借助于显微图像分析系统(microscope image analysis system)则可以有效地解决此问题。

显微图像分析仪,又称显微图像分析系统,是随着时代与科学技术的发展而产生的跨学科产物。它不仅能通过各种成像系统获得图像的几何数据、光密度、灰度等信息,还可运用该系统进一步处理,通过数字的形式把标本中的各类信息精确地表达出来。

一、显微图像分析系统组成

显微图像分析系统是光学、电子学和现代计算机技术相结合的产物,主要包括显微镜、计算机、图像采集装置、图像处理与分析软件等关键部件。在光学显微镜下看到的是光学图像,而在图像分析仪显示屏上看到的是电子图像,因此在显微图像分析中,整个系统最重要的工作就是要保证得到的电子图像能精确地反映光学图像,这个过程由图像扫描器(摄像机)、显像管和图像处理机(计算机)来完成。图像采集装置主要包括 CCD 摄像机、图像采集卡以及数码摄像机。CCD 摄像机和图像采集卡需一同使用,CCD 摄像机采集显微镜形成的模拟显微图像,即模拟信号,图像采集卡有模/数转换功能,经图像采集卡将这些模拟图像转换为数字图像,即数字信号,以便计算机的图像处理与分析软件能对其进行处理与分析。数码摄像机是集 CCD 摄像机和图像采集卡两者功能于一身,其输出的是显微镜视场的数字图像,可直接用于处理与分析。

二、基本术语和常用测量参数

(一) 像素与灰度

1. 像素 是构成显示器图像的最基本单元,按行和列(X 和 Y)方向排列成矩列。任何一矩列均对应一个点,这些点称为像素。单位面积屏幕上像素愈多则图像愈清晰,即分辨率愈高,显示的图像也越细腻和真实。数字图像的像素越多,灰度量级等级也越多,图像分析仪分析出的结果越准确。但是,当像素达到一定量时,由于图像分析仪计算机的存储量和计算量呈几何级数增大,从而减慢了计算机的处理速度。

2. 灰度 系指图像每一像素的明暗(深浅)程度,即该像素的图像由黑到白变化的量化等级。显微图像分析系统的灰度量级等级均为 2^n ,较常见的为 2^8 ,即 256 个量化等级。灰度的量化等级越多,图像分析系统的灰度分辨率越高,显示出的图像明暗层次越丰富,越接近被摄图像的真实颜色的明暗(深浅)层次。灰度值的大小与物质含量多少呈反比关系,灰度值越小,表示染色越深,所含物质的量越多(0 代表黑色, $2^n - 1$ 代表白色)。一般人眼能分辨的灰度级仅为 15~25,计算机在灰度的分辨能力上要强于人眼,因此,当人眼用显微镜观察得出无明显差别时,用图像分析系统则可能反映出两者的显著差异。

(二) 色彩

依据图像的颜色可分为黑白图像与彩色图像,后者又可再分为伪彩色图像与真彩色图像。黑白图像没有色彩信息,伪彩色图像仅仅是根据灰度值人为地设定为不同的颜色,以便于进一步分析。真彩色图像是由图像采集装置将每一像素的真实色彩分解为红、绿、蓝三种

原色信号,每种原色信号又有其灰度等级,最终再通过计算机重新编码还原为彩色图像。所以,真彩色图像所包含的信息量多于前两者。

(三) 光密度

光密度又称吸光度,是指光线通过某一物质前与通过后光强度(I_0 与 I_b)比值的对数值,即 $\log(I_0/I_b)$ 。光密度值与物质含量成正比关系,光密度值越小,说明光线被吸收的程度越小,物质含量则越低。

(四) 长度

对于形状不规则的线形组织结构,一般方法很难计算出长度,如组织中的毛细血管和神经纤维,细胞超微结构中的各种膜性结构等,以往常用排列稀疏或密集等词描述,图像分析仪则可测出各种图像周界线的长度。例如:在活检组织的子宫颈上皮细胞电子显微镜照片上,测出一定范围内的细胞膜长度为8128像素,桥粒长度为1229像素,计算出桥粒长度占细胞膜总长度的15%,用此方法观察到癌细胞的桥粒值远小于正常细胞,因此,则可以提出癌细胞转移的原因之一可能与癌细胞之间的细胞连接减少有关。

(五) 面积

在光镜或电镜免疫组织化学标本观察中,均涉及标本中某些结构面积变化的问题。图像分析仪在一定放大倍数下,可以测出每平方微米含多少像素,方法是画出待测结构轮廓,在此轮廓范围内含多少像素可立即显示出来,这样即可很快算出面积的数值。例如在铁蛋白法、胶体金法免疫电镜技术中,可用上述方法进行单位面积中反应产物颗粒的计数,由此进行各种实验条件下的比较。

三、吸光和发光组织样品的常用测量参数

像素是显微图像分析系统的最小测量单位,通过它我们不仅能够得到待测范围内的几何形态信息,如面积、周长和直径等等,还可根据样品是否能够吸光或发光来测量其物质的总含量。在组织化学和免疫组织化学中常用荧光素来标记物质,使被测量物质产生有色荧光,从而进行分析。此外,在原位杂交技术中,采用放射自显影的标本也可以作为发光组织细胞样品使用显微图像分析系统进行分析。

(一) 吸光组织细胞样品的测量

对于吸光组织细胞样品,图像分析系统至少能以下列三种参数来表述细胞待测物质的计量结果:

1. 积分光密度(integrated optical density, IOD),又称积分吸光度,是被测量范围内各像素吸光度的总和,表述测量范围内各像素吸光物质的总含量,测量范围可为面积或体积。
2. 平均光密度(average optical density, AOD),又称平均吸光度,是被测量范围内各像素吸光度的算术平均值,表述被测量范围内各像素吸光物质含量的平均水平,可反映此范围的染色深浅程度。
3. 平均光密度方差 反映被测量范围内各像素染色深浅差异的指标,称为平均光密度方差(variance of average optical density),是表述被测量范围内各像素间吸光度的离散程度。

(二) 发光组织细胞样品的测量

对于发光的组织细胞样品,图像分析系统也能以下列三种参数来表述细胞待测物质的

计量结果:

1. 积分光强度(integrated light intensity) 是被测量范围内各像素光强度的总和,表述测量范围内各像素发光物质的总含量,测量范围也可为面积或体积。

2. 平均光强度(average light intensity) 是被测量范围内各像素光强度的算术平均值,表述被测量范围内各像素发光物质含量的平均水平,可直观地反映此范围的亮度。

3. 平均光强度方差 反映被测量范围内各像素间亮度强弱差异的指标,称为平均光强度方差(variance of average light intensity),表述被测量范围内各像素间光强度的离散程度。

四、显微图像分析处理程序

使用显微图像分析系统处理显微图像时,使用者实际操作很少,几乎完全是通过鼠标来操纵复杂的运行过程,计算机软件可按实际需要行使其功能。计算机屏幕上显示多项指令,由鼠标指明你所需要的程序即可。虽然不同品牌和不同型号的显微图像分析系统的具体性能参数不同,但在使用中基本处理过程相同,区别只在于对显微图像的不同采集参数和处理软件的设定和使用上。显微图像处理的基本过程包括制作切片样品、获取图像、图像分割、目标测量、统计分析和结果输出。

(一) 制作切片样品

显微图像分析系统所用的切片与常规组织学切片的制作方法及要求基本相同,可根据研究者的目的选择适当类型切片。

(二) 获取图像

通过显微镜将切片图像放大,成像在摄像机上,完成光/电转换,再经模/数转换为数字信号输入计算机。在计算机屏幕上显示的数字化显微图像由于各种原因(如:图像采集卡的性能、显微镜及光源等)都会对图像产生影响,难以获取真实的目标信息,所以要通过合理的软件处理使原始数字图像得到适当变化,以适应人的视觉信息和获取特性,更便于图像目标信息的提取。

(三) 图像分割

图像分割是将图像中需要测量的目标从背景中分割出来,以便于计算机对分割出来的图形进行测定分析。图像分割的基本要求是分割出来的图形或区域必须与原来的目标大小及形态相吻合,因此,图像分割的好坏是决定测量精度的关键因素之一。设法从图像中确定并且分离出需要分析灰度相的步骤,称阈值分割。“相”(phase)是图像中我们想要测量部分的总称。测量需通过选择一定阈值来完成,如果所需相比背景暗,那么,所有暗于下限的图像均被选入。例如相的灰度是20~50,20是下限,50是上限,背景的灰度小于20,检测时暗于灰度20的图形均被选入。如果所需相比背景亮,如免疫荧光细胞化学制作的标本,那么,亮于上限的图像均被选入。例如相的灰度是5~20,5是下限,20是上限,背景灰度大于20,灰度20以下的相被选入,而背景是暗于上限的,不被选作测量。如果相暗于图像某些部分而又亮于图像的另一部分,则需在两限之间的部分选择灰度。

在检测过程中要使用图像框(image frame)和测量框(measurement frame)。检测只在图像框内进行,框的大小根据需要而定,测量框在图像框之内,是进行测量的部位。两个框

之间的部分称为保险区。图像中每个被测物均有其特征计算点(feature count point, FCP), 它在被测物的最低点, 被测物的特征计算点均应在测量框内, 有的被测物可能被测量框截断, 那么测量框外的那部分被测物应该位于保险区, 即保险区要大于被测物所占的位置, 才能观察特征计算点是否在测量框内而决定取舍。这样当换到相邻的区域进行测量时, 不会使某图形重复测量, 可避免测量误差。选择好目标图像后, 计算机控制按一定方式移动放置标本的显微镜载物台, 每个部位都将通过测量框, 不会遗漏。

(四) 测量

测量是对目标图形的定量描述。只有选择合适的特征参数才能更好地反映目标图形的各项性质, 使研究者做出正确的判断。常选取目标图形的灰度、面积、长度、周长、光密度和光强度等作为特征参数。原始参数可由计算机转化成容易理解的数值, 例如, 面积可由某图形所占像素数转化为平方微米, 使观察者容易理解。

(五) 统计分析

依据所得的数据类型, 选择正确的统计分析方法进行分析。

(六) 结果输出

通过以上各步骤, 得出最终的所需结果。

以上介绍了图像分析系统的基本概念和显微图像分析处理程序, 下面举例说明在免疫组织化学定量分析中图像分析系统的作用。如欲揭示不同条件下大鼠海马 CA₁ 区胶质原纤维酸性蛋白(星形胶质细胞标志性蛋白)免疫反应阳性细胞形态和数量的变化, 对免疫组织化学染色的大鼠脑海马切片进行显微图像分析。在每只大鼠切片的海马 CA₁ 区随意选取 10 个视野, 测定每个视野内胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)免疫反应阳性细胞数量、胞体截面积、周长、平均光密度及积分光密度, 再求出它们的平均值及标准误(其中阳性细胞数是在目镜为 15 倍, 物镜 20 倍的显微镜下, 用目镜测微器计算 100 个方格内细胞数得出的)。分析结果显示: 与正常对照组相比, 实验组阳性细胞数量约增加 0.48 倍、胞体截面积约增加 1.73 倍、周长约增加 1.09 倍、平均光密度约增加 0.20 倍、积分光密度约增加 2.31 倍。所得数据经统计学分析结果表明: 实验组与对照组相比, 差异有极显著性意义($P < 0.01$)。

五、显微图像分析应用中的注意事项

随着生命科学研究的突飞猛进和各部门学科定量研究的快速发展, 图像分析系统在医学研究中的应用越来越广泛, 并逐渐成为组织化学和免疫组织化学定量分析的主要手段。为了得到比较客观的图像分析结果, 应该充分考虑诸多因素对图像分析系统的影响, 并尽可能使实验组与对照组的处理条件保持一致, 应用注意事项如下:

(一) 设计在先, 测试在后

这是在进行图像分析时最容易忽视的问题。在实验之前的设计中, 要满足有关测试所需的基本条件, 如图像的来源是否带有偏差抽样, 放大倍数是否相等。这些图像可能因为来源不符合图像分析系统的基本原理和应用条件而存在明显缺陷, 勉强测试和分析很可能导致错误结果, 得出错误结论。

(二) 测试样本的代表性

应用随机抽样的方法来保证测试样本具有足够的代表性。使用足够的样本数量, 一定

要注意到照片数或视野数并不能代替实际研究对象的例数进行统计学分析。

(三) 实验操作过程的一致性

用于定量分析的标本,从取材和固定开始的各项操作和每一步骤的处理应该相同。对照组与实验组的组织块大小与厚度应一致;切片厚度、固定方法也要一致;如用贴片法,实验组与对照组的切片最好裱在同一载玻片上,如用漂染法,则最好在同一容器中进行处理;各种试剂的浓度、处理时间及显色时间应尽可能一致。只有做到实验操作的严格一致,对照组与实验组之间的定量分析才有可比性。

(四) 图像分析系统输入条件的一致性

在对图像进行输入时,应尽可能地保持各种条件一致。如利用光学显微镜、电子显微镜、数码摄像机或数码照相机作为输入设备时,显微镜的光源电压、光圈大小、聚光器位置、放大倍数、图像的清晰度和摄像机或照相机的光圈、焦距等均应一致。输入图像过程中任何细小变化均可能导致定量结果的较大差别,特别是灰度值或光密度值等。图像的颜色饱和度、反差和亮度的强弱也与操作者主观意志密切相关,这就要求操作者不能带有主观意识操作,否则可人为地造成定量结果的误差。

(五) 图像分析系统现有参数的局限性

图像分析系统中的一些常用参数,如面积、周长、长度及光密度等并非能解决所有实验的需求,有时应根据组织结构特点,开发和引入适合于组织化学与免疫组织化学染色的新特征参数,以便全面准确地反映组织结构特点。如果多种参数联合应用,有助于反映某一细胞或组织区别于其他细胞或组织的特征。

(六) 二维定量信息的局限性

图像分析系统获得的信息为二维定量信息,不能真实地反映组织结构的三维定量特征。例如,当比较各组样本的参照空间(包含感兴趣结构的区域)体积不同时,很难根据图像分析系统所得到的密度信息得出正确结论,即存在所谓的参照空间的“陷阱”问题。现代体视学方法能够获得组织结构的三维定量特征,也能够获得感兴趣结构的定量信息。因此,把现代体视学方法的原理正确应用于图像分析系统的定量研究中,有利于获得更为准确的定量信息。

第二节 流式细胞术

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是对单个细胞进行快速定量分析与分选的一门技术。该技术是一项集激光技术、光电测量技术、计算机技术、流体力学、免疫荧光细胞化学技术及单克隆抗体技术为一体的新型高科技细胞分析技术。概括地说,流式细胞技术是通过流式细胞仪(flow cytometer)对处在快速直线流动状态中的细胞或生物颗粒进行多参数、快速和准确地定量分析和分选。

一、流式细胞仪的工作原理

流式细胞仪主要由四部分组成:流动室和液流系统,激光源和光学系统,光电管和检测

系统,计算机和分析系统。四大系统共同完成信号的产生、转换和传输任务。检测时将待测细胞或微粒制成细胞悬液,进行荧光染色后加入样品管中。以一定压力将待测样品压入流动室,在高压下磷酸缓冲液(鞘液)从鞘液管喷出,鞘液管入口方向与待测样品流成一定角度,这样,鞘液就能够包绕着样品高速流动,组成一个圆形流束(鞘流),待测细胞在鞘液包绕下单行排列,依次通过检测区。流式细胞仪通常以激光作为发光源。经过聚焦后的光束,垂直照射在样品流上,当细胞携带荧光素标记物通过激光照射区时,产生代表细胞内部不同物质、不同波长的荧光信号,这些信号以细胞为中心向空间 360° 立体角发射,产生散射光和荧光信号。散射光包括前向角散射和侧向角散射。前向角散射与被测细胞直径的平方密切相关,反映细胞体积的大小。侧向角散射光对细胞膜、胞质及核膜的折射率更为敏感,可提供有关细胞内精细结构和颗粒性质的信息。经荧光染色的细胞受到适合的光波激发后产生的荧光通过光电转换器转变成电信号。最常用的光电转换器是光电倍增管。从光电倍增管输出的电信号需要经过放大后才能被传送到计算机,经模/数转换器传输到微机处理器形成数据文件,保存在计算机上。保存在计算机上的数据可在脱机后再进行数据处理和分析。

细胞的分选是通过分离含有单细胞的液滴而实现的。在流动室的喷口上配有一个超高频电晶体,充电后振动,使喷出的液流断裂为均匀的液滴,待测细胞就分散在这些液滴之中。将这些液滴充以正负不同的电荷,当液滴流经带有几千伏特的正负电荷偏转板时,在高压电场的作用下偏转,落入各自的收集容器中,不予充电的液滴落入中间的废液容器,从而实现细胞的分离(图 7-1)。

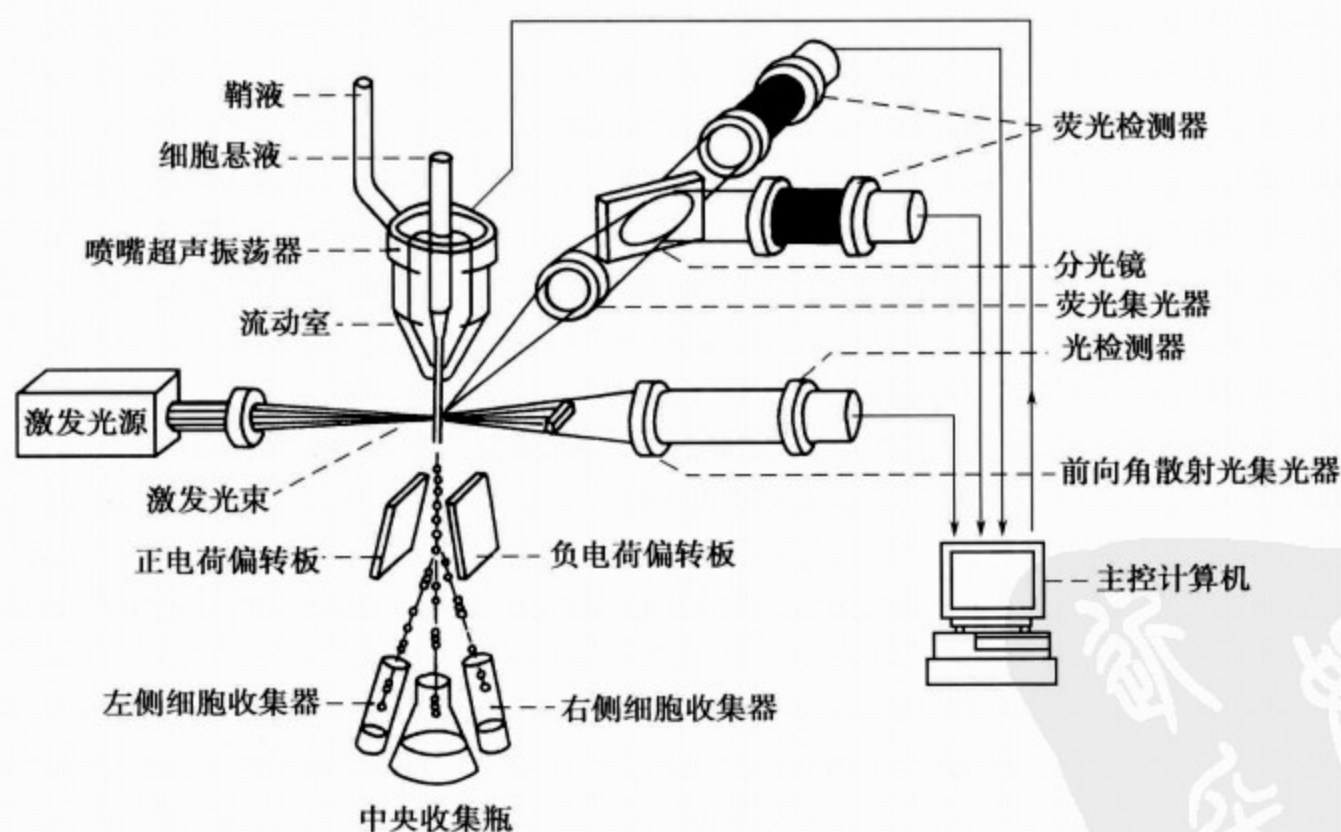


图 7-1 流式细胞仪结构图

二、流式细胞术在组织化学与免疫组织化学中的应用

流式细胞术在生物医学领域中应用十分广泛。凡能被荧光分子标记的细胞或微粒均能

用于流式细胞仪检测。如在细胞周期研究中,根据 DNA 荧光染料(如 PI)与细胞 DNA 双链的结合有一定量效关系,即 DNA 含量的多少与 PI 结合量成正比,因此,通过荧光强度可以反映细胞内 DNA 含量;在免疫学中,运用流式细胞术与单克隆抗体结合,在免疫分型、细胞分选、肿瘤细胞免疫监视、机体免疫状态监测、免疫细胞的系统发生及特性研究等方面均起着极为重要的作用;在肿瘤学中,利用流式细胞术除了进行细胞周期和 DNA 倍体分析外,还可定量分析检测细胞增殖标志物、细胞表面标志、癌基因蛋白产物、耐药蛋白及细胞凋亡等,均可获得组织形态学方法难以得到的信息,为肿瘤的临床诊断、治疗和预防提供帮助;在血液学研究中,应用流式细胞术除了用于白血病及淋巴瘤的免疫分型之外,还能进行血小板记数、血小板自身抗体测定、血小板膜表面糖蛋白分析及血小板活化分析等。

将流式细胞术与生物芯片技术有机结合,把不同生物探针(核酸和蛋白等)标记在各种有荧光的微球上,以荧光标记微球作为反应载体在液相系统中完成生物学反应,即为流式细胞术液相芯片技术。它组成由荧光微球体-探针-目的分子-报告分子的反应模式,可以在同一液相中同时检测多个目的分子。在组织化学和免疫组织化学中,流式细胞术可以对不同表型的细胞进行分类计数,以达到对某种细胞定量检测的目的。这一功能是利用流式细胞术能同时检测细胞的多种荧光信号,对不同荧光信号的细胞进行分类计数,获得含有不同化学物质的细胞群体信息的特点。本章节主要对其在这方面的应用做较详细的介绍。

(一) 流式细胞术的常用样品制备方法

流式细胞术的实验检测对象是单细胞悬液,因此,在组织化学和免疫组织化学实验中欲对待测样品细胞进行分类计数,也需把样品制备成细胞悬液,并要求被检细胞大小为 $0.2 \sim 80 \mu\text{m}$,每个样品中至少有 20 000 个细胞,细胞浓度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/ml。制备成的单细胞悬液经荧光或免疫荧光标记即可上机检测。

1. 单层培养细胞单细胞悬液的制备

(1) 弃去培养细胞(对数生长期)中的旧培养液,加入 $1 \sim 2 \text{ml}$ 0.25% 胰蛋白酶,倒置显微镜下观察,见细胞稍变圆时,停止胰蛋白酶作用。也可直接观察培养瓶,静置消化 $2 \sim 3$ 分钟,待细胞逐渐变白,有脱落趋势时,立即竖立培养瓶,停止胰蛋白酶作用,弃去胰蛋白酶;

(2) 加入 $3 \sim 4 \text{ml}$ 无钙离子和镁离子的 PBS 液,用吸管反复吹打,使其分散为单个细胞悬液,移入离心管中;

(3) 离心,去掉上清液,加入约 0.5ml PBS 液,用振荡器使细胞分散;

(4) 用细滴管或注射器将细胞迅速注入 4°C 70% 乙醇中,保存于 4°C 冰箱中备用。

2. 实体组织单细胞悬液的制备

(1) 机械法

1) 用剪刀剪碎或者用锋利的解剖刀剁碎组织;

2) 将剪碎的组织加入匀浆器中匀浆;

3) 用吸管或注射器抽吸细胞悬液,以分散细胞;

将细胞悬液在尼龙网或不锈钢网上过滤,滤出的细胞悬液细胞计数后即可使用。

(2) 酶处理法 此法是实体组织分散为单个细胞的主要方法。由于不同酶对细胞内和细胞间不同组分有特异消化作用,所以应根据所用组织类型确定使用酶的种类。此外,乙二胺四乙酸(EDTA)能结合组织中的二价钙离子和镁离子,而二价钙离子和镁离子有维持细

胞表面完整性和维持细胞间质结构的作用,因此,几种酶和 EDTA 联合使用有助于充分消化实体组织,提高细胞产出效率。下面仅介绍组织消化的一般过程,对于每种组织消化时所用的具体步骤需参考该组织细胞培养时的消化方法。

1) 将组织剪成 $1\sim 2\text{mm}^3$ 左右的小块。

2) 用胰蛋白酶或胶原酶消化组织块,胰蛋白酶适用于消化细胞间质较少的软组织,如胚胎、上皮、肝、肾等组织。胰蛋白酶工作浓度一般为 $0.1\%\sim 0.5\%$ 。对于纤维较多的组织或较硬的癌组织常用 0.25% 胶原酶,胶原酶对组织中胶原蛋白类结构消化作用强,它仅对细胞间质有消化作用而对上皮细胞影响不大。胶原酶常用剂量为 $0.1\sim 0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用大于组织量 $30\sim 50$ 倍的胰蛋白酶液或胶原酶液在 37°C 条件下消化组织,需每隔一定时间摇动一次。消化时间的长短依组织类型而定,一般来说,胰蛋白酶需作用 $20\sim 60$ 分钟,胶原酶需 $4\sim 48$ 小时。在消化过程中,如发现组织块已分散而失去块的形状,经摇动即可成为絮状悬液,则可取出少量液体在显微镜下观察,可见分散的单个细胞和少量的细胞团,可认为组织已消化充分。

3) 消化完毕后,将细胞悬液通过 100 目孔径尼龙网或不锈钢网滤过,以除掉未充分消化的组织。

4) 已过滤的细胞悬液经 $800\sim 1000\text{rpm}$ 低速离心 $5\sim 10$ 分钟后,弃上清液,加 PBS 液,轻轻吹打形成细胞悬液,细胞计数后即可使用。

3. 石蜡包埋组织的流式细胞样品制备 外科手术获得的新鲜实体组织,往往已进行石蜡包埋处理,如果再制成细胞悬液进行流式细胞分析,需将石蜡包埋组织进行以下步骤的处理:

- (1) 将石蜡包埋的组织块切成 $30\mu\text{m}$ 厚的切片,尽可能除去切片中石蜡成分;
- (2) 将切片置于离心管中,用二甲苯脱蜡 2 次,10 分钟/次;
- (3) 蒸馏水洗 2 次后,加入 $1\text{ml } 1\%$ 胃蛋白酶溶液中($\text{pH } 1.5$), 37°C 恒温振荡水浴中消化 30 分钟;
- (4) 离心,所获得的细胞沉淀可进行染色和流式细胞术分析。

(二) 免疫荧光标记样品

用于流式细胞仪检测的常用荧光素有 FITC、TRITC、Cy3、Cy5、PE 和 PI,在以上各种荧光染料中,PE 荧光最强,适用于弱表达抗原;FITC 最便宜,适用于强表达抗原,适用范围广。有关每种荧光素的特点可参见第四章。

1. 直接免疫荧光标记法 取一定量的细胞悬液(浓度约 1×10^6 个/ml),直接加入荧光素标记抗体进行免疫反应(如做双重标记或多重标记染色,可把几种标记有不同荧光素的抗体同时加入)。 4°C 孵育 $15\sim 30$ 分钟后,用 $1/15\text{mol/L}$ PBS($\text{pH } 7.2\sim 7.4$)洗 $1\sim 2$ 次,加入缓冲液重悬,上机检测。

本方法操作简便,结果准确,易于分析,适用于同一细胞群多参数同时测定。虽然直接荧光抗体标记试剂成本较高,但减少了间接标记法中较强的非特异荧光干扰,因此更适用于临床标本的检测。

2. 间接免疫荧光标记法 取一定量的细胞悬液(浓度约 5×10^6 个/ml),加入特异性第一抗体, 4°C 孵育 $15\sim 30$ 分钟,待反应完全后用磷酸缓冲液洗去未结合抗体,吸尽残留液体,

再加入荧光标记第二抗体,4℃孵育 30 分钟,生成抗原-抗体-抗抗体复合物,洗涤后即可上机检测。注意:在整个荧光标记过程中均需参考免疫荧光细胞化学间接法染色程序,尤其是加入一抗前需使用正常非免疫血清封闭,以减少非特异性反应。如果对于未经固定的细胞需使用 0.3% Triton X-100 为细胞膜打孔,以保证抗体能够进入细胞内。

此法费用较低,二抗应用广泛,多用于科研样品检测。但是,由于非特异性荧光背景较强,影响实验结果,在样品制备时应加入阴性或阳性对照。另外,由于间接法步骤较多,尤其是经过多次洗涤,均可使细胞数量骤减,因此,在加入第一抗体前细胞悬液的细胞浓度约 5×10^6 个/ml,上机检测前不少于 1×10^6 个/ml 即可,此法不适用测定细胞数较少的样品。

3. 荧光标记中的注意事项

(1) 为减少非特异性干扰,荧光标记物用前应用 0.22 μ m 滤膜过滤或高速离心 5 分钟,以除去颗粒或沉渣。

(2) 细胞样品的制备、染色及保存均应该尽量保持新鲜,防止分解代谢引起的表面抗原消失及细胞死亡,可以通过加入营养培养基或低浓度血清以及 4℃ 或冰浴中操作来解决。

(3) 细胞稀少或低比例细胞亚群分析时,为保证准确,应排除死细胞。

(4) 荧光标记抗体浓度应该合适,如果浓度过高,会使非特异性结合增加。在使用一抗之前,将样品与过量的牛血清白蛋白(BSA)或来源于同一种属的正常血清一起孵育,以阻断一抗和细胞表面或胞内结构非特异性作用。在使用一抗之后,将样品、与二抗相同种属的 5%~10% 正常血清和二抗一起孵育,以减少二抗与一抗、细胞表面或胞内结构之间的非特异相互作用。如果使用含有与一抗或二抗种属相同的血清液体稀释抗体,便可以省略此步骤。

(三) 流式细胞术数据处理与分析

数据的显示通常可分为一维单参数直方图(histogram plot)、二维点图(dot plot)、二维等高图(contour)和假三维图(pseudo 3D)等。下面简述最常用的单参数直方图和二维点图。

1. 单参数直方图 单参数直方图是一维数据用得最多的图形,可用来进行定性分析和定量分析。横坐标表示荧光信号或散射光信号强度的相对值,其单位用“道数”(channel)表示,横坐标可以是线性的,也可以是对数的。纵坐标通常代表细胞出现的频率或相对细胞数。下面以研究细胞周期为例说明如何分析单参数直方图所表达的信息。

经 DNA 特异性染料(如 PI)染色的细胞群体,通过流式细胞仪测量区受激光照射后发出特异性荧光,在一定条件下,荧光强度与细胞内的 DNA 含量成正比,DNA 含量高的细胞发射的荧光强,反之则弱。如图 7-2 显示,DNA 含量与细胞数目的关系,即

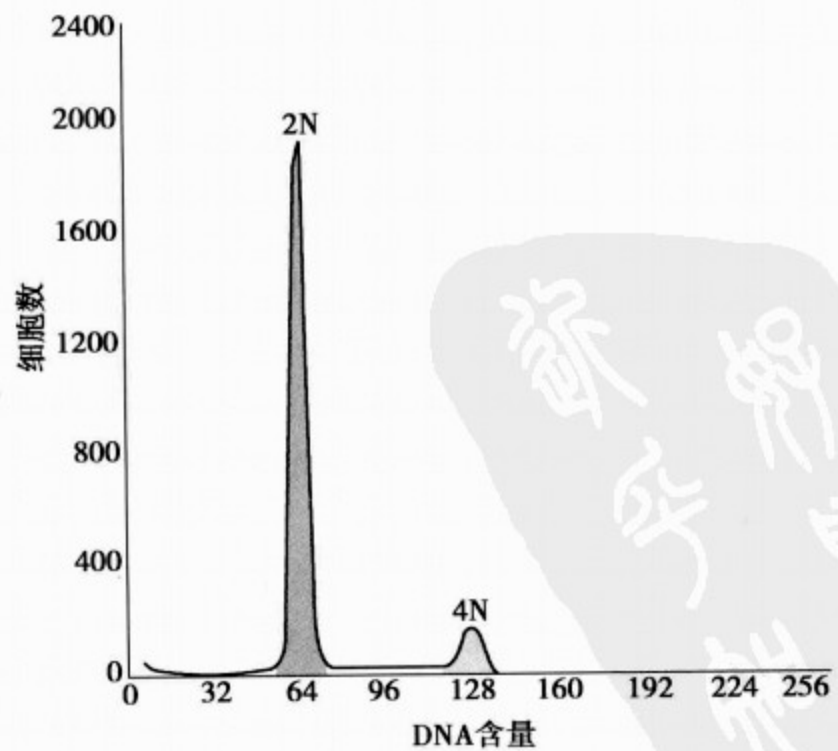


图 7-2 单参数直方图

2N(2倍体)代表G₀/G₁期细胞,4N(4倍体)代表G₂/M期细胞,两者中间代表S期细胞。这是典型的以2倍体和4倍体细胞为主的流式DNA图。通过上述信息可得到所测细胞群中增殖细胞的数量。

2. 二维点图 单参数直方图只能表明一个参数与细胞数量间的关系,不能显示两个独立参数与细胞数量的关系。当需要研究两个或更多测量参数之间的关系时,可采用二维点图。二维点图有两种形式,横坐标表示前向散射光(FSC),反映细胞的大小;纵坐标表示侧向散射光,反映细胞内颗粒的大小和多少。坐标图上每一点同时表示具有相应坐标值的细胞存在。例如,人血白细胞悬液样品上机后,在坐标图上根据细胞大小和细胞内颗粒形态出现三类不同颜色的细胞群,通过设门框把这三类细胞区分开,即红色显示淋巴细胞群(P1),绿色显示单核细胞群(P2),蓝色显示中性粒细胞群(P3)。如果欲检测其中一种细胞两个独立参数与细胞数量之间的关系,则选定其中一个门框(图7-3)。假设选定淋巴细胞(P1),即可对其两种不同荧光素标记的细胞数量进行分析,出现第二种形式的二维点图(图7-4)。在图7-4中,横坐标为PerCP-Cy5荧光标记的CD3细胞数目(荧光道数),纵坐标为FITC荧光标记的CD4细胞数目(荧光道数)。因此,左上象限(Q1)代表CD₄⁺细胞百分比,右上象限(Q2)代表CD₄⁺/CD₃⁺细胞百分比,左下象限(Q3)代表CD₄⁻/CD₃⁻细胞百分比,右下象限(Q4)代表CD₃⁺细胞百分比。由此得知,在CD₃⁺淋巴细胞中CD₄⁺淋巴细胞所占的百分比。

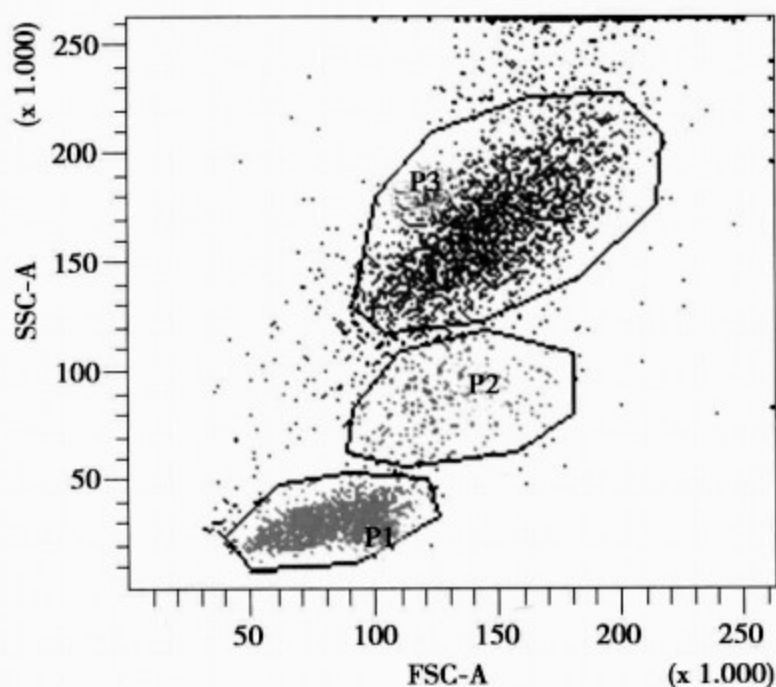


图 7-3 双指标二维点图的细胞群框定

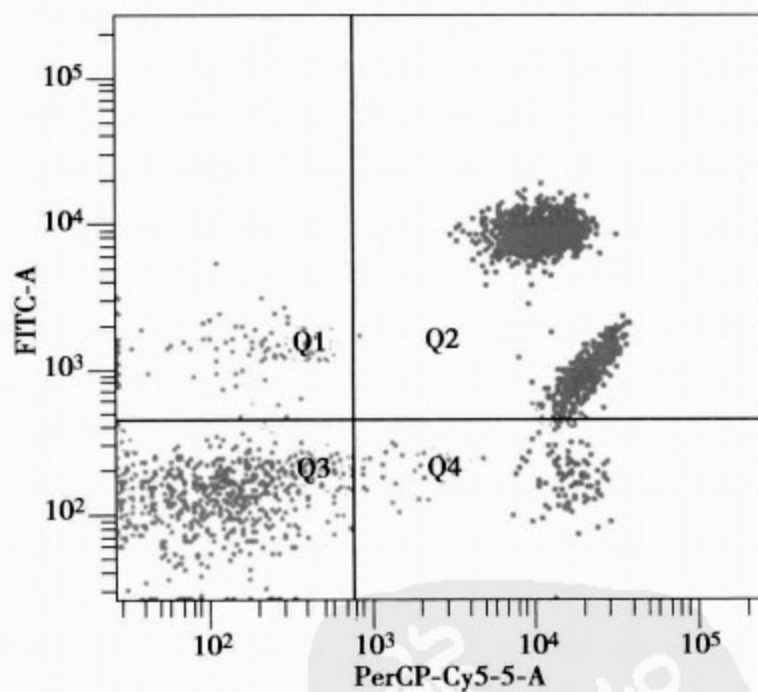


图 7-4 荧光双染色二维点图

(四) 运用流式细胞仪计数细胞应注意的问题

制作组织匀浆或细胞悬液,用荧光染料染色,则可以用流式细胞仪计数不同DNA含量或倍数的细胞数。例如,在睾丸组织中,精子细胞为单倍体细胞,精原细胞、Sertoli细胞、Leydig细胞和其他非生精细胞为双倍体细胞,初级精母细胞以及处于分裂期的精原细胞和非生精细胞为四倍体细胞。因此,运用流式细胞仪测定睾丸组织各级生精细胞DNA倍体的变化,可以间接判断不同生精细胞数目相对比例变化的趋势。但是,利用这些结果得出结

论时一定要谨慎。例如,单倍体细胞数所占百分比下降可能说明精子细胞数量减少,但以下三种情况也可能引起百分比下降:一是单倍体细胞数不变,其他倍体细胞数增加;二是单倍体细胞数增加,其他倍体细胞数也增加而且增加得相对较多;三是单倍体细胞数减少,其他倍体细胞数也减少,只是减少得相对较少。与此类似,该百分比不变可能说明精子发生未受到影响,但以下两种情况也可能出现此种结果:单倍体细胞和其他倍体细胞成比例地增加;单倍体细胞和其他倍体细胞成比例地减少。因此,姑且不论细胞的准确辨认以及组织匀浆过程中细胞粉碎等问题,流式细胞仪估计细胞数至少存在这样一个缺陷:一般只能反映细胞的相对数目比,而不能确定测定的细胞在某感兴趣区域内的总数目是否真的有所增加、减少或不变。

第三节 激光扫描共聚焦显微镜技术

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是激光、电子摄像和计算机图像处理等现代高科技手段相互渗透的产物,由于其高分辨率,高灵敏度及高放大率等特点,在细胞水平上能作多种功能测量和分析,如荧光定量测量、共聚焦图像分析、三维图像重建、活细胞动力学参数监测和细胞间通讯研究等,成为生物医学重要的研究工具。一台配置完备的激光扫描共聚焦显微镜已经在功能上完全取代了以往任何一种光学显微镜,它相当于几种制作精良的常用显微镜有机组合,如倒置显微镜、荧光显微镜、暗视野显微镜及相差显微镜等,可谓是普通光学显微镜质的飞跃。激光扫描共聚焦显微镜除能对组织细胞进行三维图像分析和各种荧光标记物的微量分析外,还能进行细胞内 Ca^{2+} 和 pH 值等动态分析测量、细胞受体移动检测、膜电位变化检测、酶活性和物质转运测定等。因此,它可以对组织细胞的多种功能进行自动高效地微量定位和定量。有关激光扫描共聚焦显微镜原理可参见第四章免疫荧光组织化学,本章主要介绍其在组织化学和免疫组织化学方面的应用以及应该注意的一些问题。

一、激光扫描共聚焦显微镜在组织化学和免疫组织化学中的应用

激光扫描共聚焦显微镜在组织化学和免疫组织化学中的主要应用是通过一种或多种荧光探针标记后,对固定或活体组织细胞标本进行观察研究,免疫荧光组织化学是应用最多的技术。激光扫描共聚焦显微镜具有紫外光和激光双重激发光源系统,免疫荧光组织化学染色后抗体已被标记荧光素,不同的荧光素被不同波长的光激发,荧光强度的变化可被激光扫描共聚焦显微镜中的计算机分析软件采集分析,从而准确反映各指标量的变化。当这些标本用普通荧光显微镜观察时,来自焦点以外其他区域的荧光对结构分辨率干扰较大,尤其是标本厚度在 $2\mu\text{m}$ 以上时,其影响更为显著。共聚焦方式可以排除焦点之外荧光干扰使分辨率提高。激光扫描共聚焦显微镜的功能可分为图像分析功能和细胞生物学功能两大类,运用于组织化学和免疫组织化学方面的主要是图像分析功能。凡是标记特异性荧光探针的组织细胞标本均可以利用激光扫描共聚焦显微镜进行图像分析。它的图像分析处理功能主要体现在三方面,即光学切片、三维图像重建和荧光定位

以及定量分析。

(一) 光学切片

激光共聚焦成像的特性使其不仅能获得胜过普通显微镜的分辨率,同时具有深度识别能力和纵向分辨率,从而可以清晰地观察较厚的标本,并可以掌握其细节。以一个最小步距 $0.1\mu\text{m}$ 的微动步进马达控制载物台升降,使聚焦平面依次位于组织标本的不同层面,可以逐层获得标本相应的光学横断面图像。这一过程称为“光学切片”,这种功能称为“显微CT”。如图 7-5 所示,用激光扫描共聚焦显微镜对经过荧光染色的神经元从细胞顶部按照 Z 轴步距,逐层向细胞底部进行断层扫描,即可获得该神经元相应的光学横断面图像。图中可以清楚地发现,在细胞顶部,其胞体面积及突起数量很少,然后依次增加;在细胞中间部位胞体面积和突起数量最多,而后再依次减少;细胞底部胞体面积明显减少,突起已经基本消失。同时,激光扫描共聚焦显微镜还可以利用免疫荧光组织化学以及原位杂交方法的双重或多重标记同时显示被检细胞亚细胞结构和靶分子(蛋白或基因等)与细胞或所在组织的关系。

(二) 三维图像重建

对具有三维空间立体结构的组织细胞进行研究时,尤其是定量研究其结构形态时,往往需要显示空间构造上的三维数据,经计算机图像处理及三维重建软件将得到各光学切片的数据组合,形成一个真实的三维图像,并可从任意角度观察,也可以借助改变照明角度来突出特征性结构,产生更生动逼真的三维效果。一系列模拟荧光处理图像可被储存并以三维动画形式显示,这可谓是形态学研究方法的重大突破。激光共聚焦显微镜三维重建分析在神经生物学中应用广泛。如图 7-6 所示,Castano 等用快速高尔基法对大鼠脑干和脊神经节进行浸染,将组织标本制成 $100\mu\text{m}$ 切片。通过预扫描,确定细胞顶部,以 $0.5\mu\text{m}$ 的 Z 轴步距连续获取组织光学切片,再对重组的三维图像整体结构任意旋转,从各个角度进行拍照和体视学分析,同时通过调节吸收参数控制三维图像的浊度。然后运用功能软件,使神经元的三维立体结构在拓扑学上得到完整重建。这种三维重建图像是由大量数字化光学切片重组而成,可以避免样品表面银颗粒带来的反射光。同时通过三维重建图像的旋转,可以观察到神经末梢的分布情况,从而可以更加直观地观察神经末

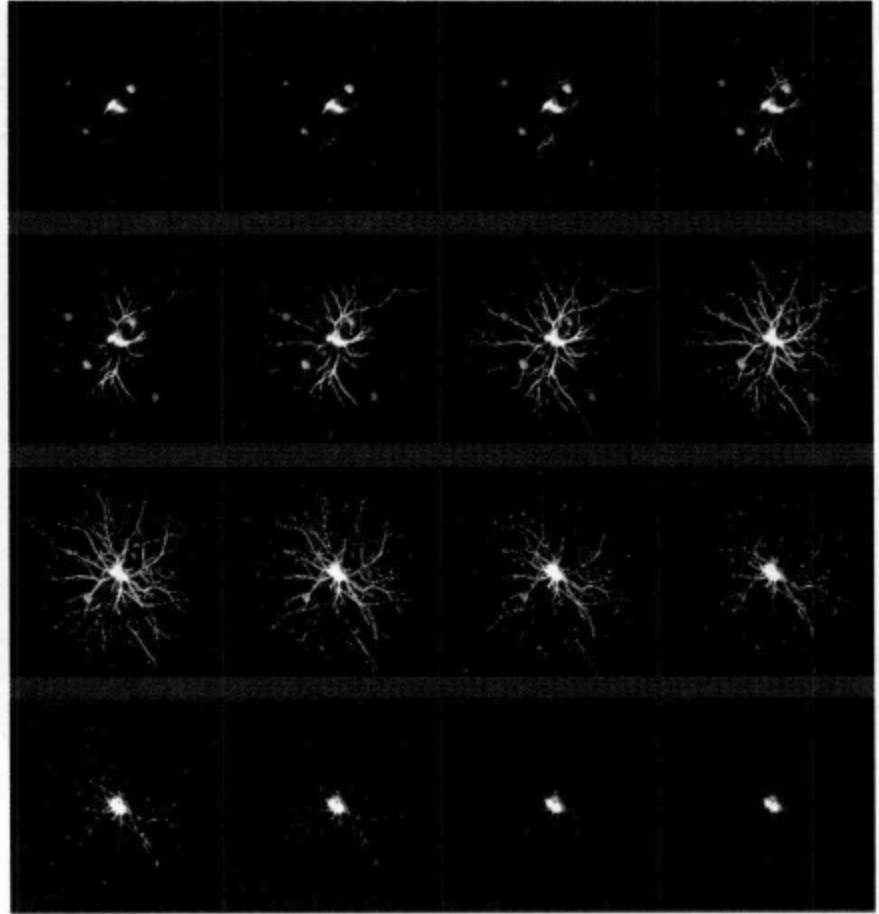


图 7-5 神经元光学切片图

使用激光扫描共聚焦显微镜对经过荧光染色的神经元从细胞的顶部按照 Z 轴步距,逐层向细胞底部进行断层扫描,获得该神经元相应的光学横断面图像(唐勇供图)

稍与其他组织结构的关系。

(三) 荧光标记物的定位和定量分析

激光扫描共聚焦显微镜可进行重复性极佳的活细胞或固定细胞的荧光定量分析。利用这一功能可对单个细胞或细胞群的溶酶体、线粒体、DNA、RNA 和受体分子含量、成分及分布进行定性和定量测定。

1. 荧光定位分析 激光扫描共聚焦显微镜可以自动将荧光图像与相差图像重叠,以显示荧光标记物在形态结构上的精确定位。在同一细胞或组织标本上需同时检查两种或两种以上抗原时要进行双(多)重荧光染色。可采用直接和间接免疫荧光组织化学方法,将这些荧光抗体(如抗 A 和抗 B)以适当比例混合,加在标本上(也可分别加)孵育后,洗去未结合的荧光抗体(具体方法见第四章)。不同荧光标记抗体最好用波长范围差别较大的荧光素,如绿色与红色搭配(图 7-7)。

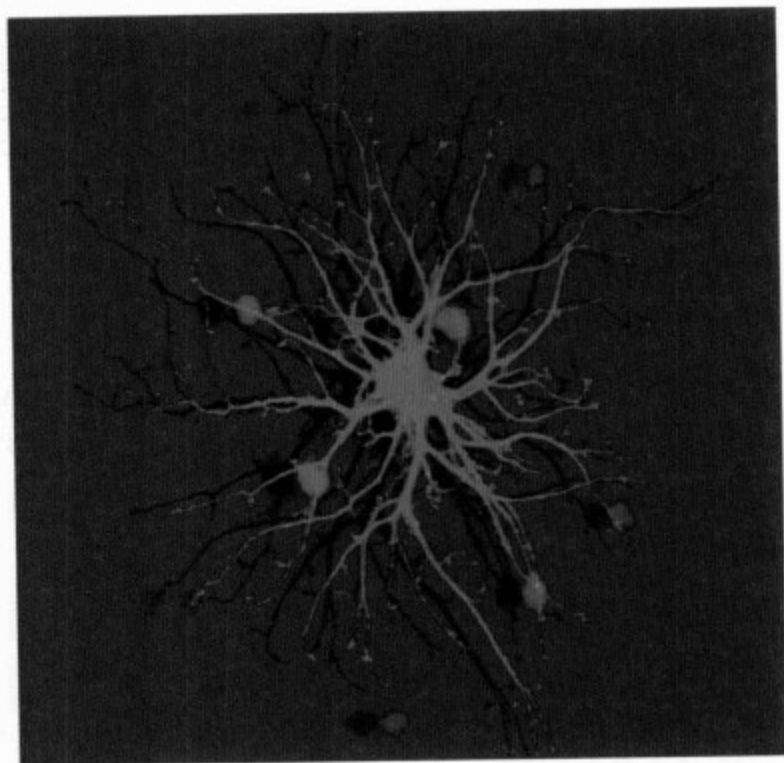


图 7-6 神经元三维重建图

运用激光扫描共聚焦显微镜对神经元一系列不同断面的光学切片分析处理所获得三维图像(唐勇供图)

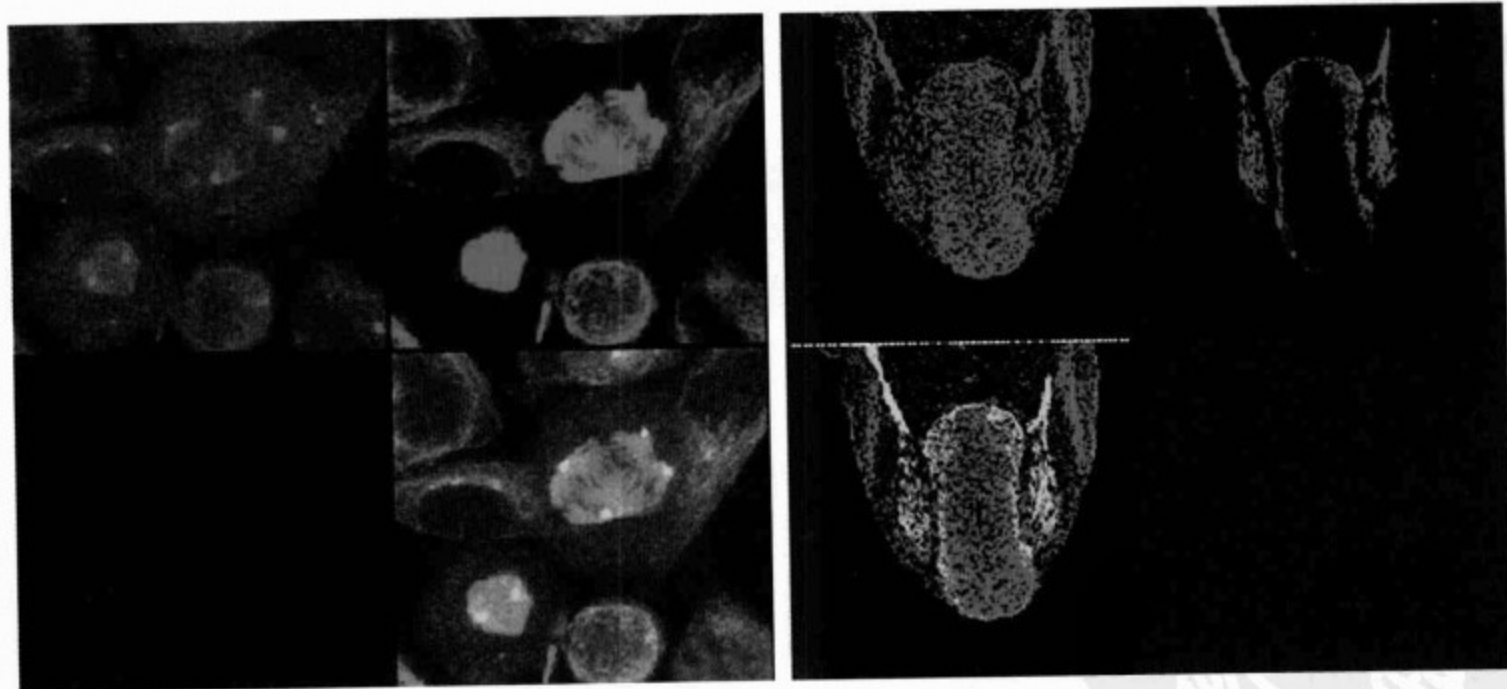


图 7-7 免疫荧光定位分析图

将不同荧光抗体分别标记分裂期 Hela 细胞的中心体和纺锤体,绿色显示为中心体,红色显示为纺锤体(唐勇供图)

2. 荧光定量分析 激光扫描共聚焦显微镜可以对经过荧光标记的组织标本共聚焦荧光进行定量分析,并显示荧光沿 Z 轴强度变化。它除了可以对单、双或三重标记的细胞及组织标本的荧光进行定量、定位分析外,还可以借助显微 CT 功能在不损失分辨率的前提下对标本深层进行荧光分布的测量,获得组织形态结构信息。激光扫描共聚焦显微镜同样

适用于高灵敏度的快速免疫荧光测定,从而准确检测抗原表达、荧光原位杂交斑点及组织细胞结构的形态学特性,并作定量分析。下面通过两个实例来说明如何运用激光扫描共聚焦显微镜进行定量免疫荧光测定和定量图像分析。

(1) 定量免疫荧光测定:先按照第四章介绍的免疫荧光组织化学技术进行荧光染色,再用激光扫描共聚焦显微镜对其进行定量和形态学分析。我国学者为确定某些物质(如猪苓多糖)是否对培养的膀胱癌 T₂₄ 细胞抑癌基因 *p53* 和抑制细胞凋亡基因蛋白 *H-ras* 表达有调节作用,用激光扫描共聚焦显微镜对经免疫荧光细胞化学染色的细胞进行共聚焦荧光断层扫描成像,每个细胞扫 32 个切面,用三维和定量软件观察与测定细胞内荧光变化,细胞培养 24 小时,对照组 *p53* 主要在细胞核内表达,阳性信号呈黄绿色亮点,点状分布,呈现一核多点表达,荧光强度较弱,为 119 ± 43 。实验组细胞核内强荧光,为 170 ± 13 ,细胞质内也有强表达,呈弥散性分布。对于培养细胞的 *H-ras* 基因蛋白表达也作了同样的检测。通过对不同组培养细胞荧光强度的测定得出:猪苓多糖对膀胱癌 T₂₄ 细胞 *p53* 基因蛋白表达有一定调节作用,对 *H-ras* 基因蛋白表达无明显影响(曾星等,2003)。近年来,应用激光共聚焦扫描显微镜对肿瘤相关抗原等进行定性定量研究的报道颇多,由此可见,激光扫描共聚焦显微镜在这一领域的应用十分广泛。

(2) 定量图像分析:激光扫描共聚焦显微镜不仅可以对生物样本进行二维和三维图像分析,还可以与荧光探针相结合,在图像处理的同时,进行图像定量分析。例如细胞面积及周长的测定和细胞核面积的测定,从而可以将生物体的形态学特征进行量化,提高了研究结果的准确性。激光扫描共聚焦显微镜能对单标记或双标记生物样品的共聚焦荧光定量分析,并显示荧光沿 Z 轴强度变化。根据实验要求设置好仪器测试的各种参数后,计算机便能自动进行数据采集,并将结果储存起来,供以后分析和输出。定量图像分析结果的表达有数字、直方图和二维坐标形式等,将生物样品的平均荧光强度、背景荧光强度、面积、周长和形状因子像素点等显示出来,同时在一种方式中表达。

我国学者为了解肝病患者肝组织纤维化程度,应用激光扫描共聚焦显微镜进行荧光定量图像分析。他们先把经肝穿刺活检得到的肝组织实施免疫荧光组织化学染色,肝组织 I、III 型胶原分别与荧光素标记抗体结合,被标记上荧光素。不同的荧光素被共聚焦显微镜中激光管激发后,荧光强度和荧光面积的变化可以被计算机分析,便能准确地量化肝组织纤维化程度。首先,使用激光共聚焦显微镜检测 I、III 型胶原的荧光定量表达。I、III 型胶原以红、绿双色荧光通道扫描观察,绿色荧光的激发波长为 488nm,在 530nm 波长以上观察,红色荧光的激发波长为 543nm,在 560nm 波长以上观察。每张切片选取 10 个视野观察,并由计算机自带扫描分析软件测定荧光强度与荧光面积。上述指标的荧光值 = 平均荧光强度 × 平均荧光面积。研究结果显示:经 FITC 和 TRITC 免疫荧光双重染色的 III 型胶原阳性表达为绿色荧光;I 型胶原阳性表达为红色荧光。慢性肝炎、肝硬化患者 I、III 型胶原的表达大量增加,在门管区、血管壁周围及炎性坏死区均可见到 I、III 型胶原表达增加,并向肝小叶内延伸,分隔包绕肝小叶;肝组织 I、III 型胶原表达的荧光定量、G-S 分期积分和已检测的血清肝纤维化指标,如透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、III 型前胶原(PCIII)和 IV 型胶原 C(IV-C)相关性分析得出结论:在慢性肝炎和肝硬化时,上述研究指标均呈显著相关性(见表 7-1)。由此说明此种方法的荧光定量分析能准确地量化肝组织纤维化程度,

对患者的治疗和预后具有指导性意义(宋怀宇等,2003)。

表 7-1 四种指标的相关分析(γ 值)

分析指标	HA (单位)	LN (单位)	IV-C (单位)	PCⅢ	G-S分期半 定量积分
I型胶原 荧光定量	0.425 (0.050)	—	0.487 (0.029)	—	0.692 (0.001)
Ⅲ型胶原 荧光定量	—	—	0.558 (0.011)	—	0.547 (0.013)
I、Ⅲ型胶原 比值(I/Ⅲ)	—	0.501 0.024	—	—	0.467 (0.038)
TGF- β 1 荧光定量	0.464 (0.039)	0.465 (0.037)	0.421 (0.049)	—	0.423 (0.050)
G-S分期 半定量积分	0.533 (0.015)	0.465 (0.037)	0.421 (0.049)	0.591 (0.006)	—

注:括号内为P值

二、激光扫描共聚焦显微镜定量分析的优势

激光扫描共聚焦显微镜与图像半定量分析相比,具有以下优点:

1. 更精细、精确度更高。激光扫描共聚焦显微镜对免疫荧光组织化学染色样品做定量分析时,利用激光聚焦和系统软件分析对组织进行深层扫描,不破坏组织细胞结构,可深层次准确定位并精确定量。而一般图像分析只是以荧光灰度的差别变化进行半定量分析。

2. 激光扫描共聚焦显微镜一般有两个以上不同波长的激光管,只要将标本标记上不同波长的荧光,就可以在同一张切片上同时分析两种或更多不同指标的变化,并比较它们之间的比值变化,精确而又方便,这一特点是一般图像分析无法比拟的。

3. 激光扫描共聚焦显微镜可根据需要提供纯荧光、白光以及荧光与白光合成图像等多种图像,远远优于一般图像分析。

4. 以往免疫荧光染色多要求冰冻新鲜组织标本,用石蜡切片在普通荧光显微镜下观察,常因背景非特异性荧光过强影响观察结果。而石蜡标本来源广泛,适用于回顾性研究。激光扫描共聚焦显微镜可扫描石蜡切片的荧光染色,可避免因背景非特异性荧光过强而影响观察结果,从而可获得清晰图像,这也是激光扫描共聚焦显微镜的优势所在。

三、注意事项

(一) 制备高特异性和高效价的荧光抗体

标本只有在用荧光探针标记的前提下才能进行共聚焦显微镜检测,制备高特异性和高效价的荧光抗体是检测的关键,这就要求选用高质量的荧光素和高特异性与高效价的免疫血清。同时还要对荧光抗体进行质量鉴定,主要是进行特异性和敏感性鉴定。

(二) 标本制作要求

1. 标本厚度 组织切片或其他标本不能太厚,否则激发光多数消耗在标本下部,而物镜观察的上部不能被充分激发。

2. 载玻片 载玻片要光洁,无自发荧光;载玻片厚度应在 0.8~1.2mm 之间,太厚会吸收较多的光,不能使激发光在标本上聚焦。

3. 封固剂 甘油必须无色透明,无自发荧光。由于荧光在 pH 8.5~9.5 时较亮,不易很快退去,常用甘油加入 0.5mol/L、pH 9.0~9.5 的碳酸盐缓冲液的等量混合液封片。

(三) 定量研究的要求

1. 随机性

(1) 在感兴趣区域内随机抽样,不能主观地选择一些便于定量的“理想切片”,这种“理想切片”不能代表所要研究的整体区域。

(2) 在随机抽取的切片上,应随机抽取观察视野。

(3) 在随机抽取的视野中,通过连续观察“光学切片”,得到感兴趣结构的三维定量信息。如果不能连续观察“光学切片”,需要在 Z 轴方向随机抽样,然后作定量研究。

2. 避免参照陷阱 如果获得的资料是密度信息,当比较各组参照空间(包含待测结构的区域)的体积不同时,根据密度信息可能得出错误结论。因此,需要注意所谓的参照空间“陷阱”问题(详见本章第四节)。

第四节 体视学

对各种生物结构的形态学研究是医学各领域研究的重要方面,尤其是定量形态学研究。对器官的整体结构水平形态学研究相对比较容易,比如用排水法测量肝脏的体积则可以清楚地了解正常肝脏与患有肝硬化病人肝脏的体积差别。但是随着科学的发展,研究者越来越关心人体在微观结构上的形态特征。任何组织结构,如细胞、细胞间质、细胞器以及某种染色阳性结构等,均为具有一定形状和空间分布的几何物体。结构的形态学描述包括两个方面:一是该结构的定性描述,二是其定量描述。免疫组织化学技术对组织细胞结构的定性研究是本书的重点内容之一,而对于这些已定性的微观结构定量研究则成了难题,因为通常只能通过二维切片来观察这些微观结构。定量研究的内容包括体积、表面积、线性结构的长度、颗粒结构的数量等,这些内容应如何进行研究呢?

20 世纪 80 年代以来,丹麦科学家 Gundersen 建立的现代无偏体视学方法为微观形态结构准确定量研究提供了可靠方法。当我们谈到现代体视学方法时,需感谢 Gundersen 教授对体视学的贡献。因为当今在国际上广泛应用的现代体视学方法绝大部分是由以 Gundersen 教授为代表的丹麦科学家发明。体视学方法是一系列用于准确获得组织细胞和亚细胞结构三维形态定量特征的方法。在国际上,体视学方法被广泛应用于生物学、基础医学和临床医学。特别值得强调的是,新的体视学方法已与各类组织细胞的特殊染色、免疫组织化学及分子生物学图像(如原位分子杂交图像)等结合起来,用于对经过基因改造(转基因或基因剔除)的动物模型的定量研究中。因此,体视学方法已成为连接形态学、功能学和分子生

物学研究的桥梁。

在实际应用水平上,体视学方法是一种基于二维切片观察而获得显微结构三维定量信息的有效手段。在统计概率的意义上讲,二维切片包含有三维结构的定量信息。但是,如果要使二维切片获得的信息真实地反映三维信息,在器官、切片、视野及空间方向上的抽样都必须满足一些基本原则。在运用当中这些抽样原则很容易实现,但同样也很容易失误。因此,基于以上所述,我们首先需明确二维切片与三维结构的关系以及如何有效获得二维信息,并在此基础上讨论获得体积、表面积、长度和数量等三维定量信息的方法。

一、体视学的基本概念及基本原则

体视学的优势在于它以三维定量数据来表达特征结构信息,先撇开体视学在统计学基础上确立的抽样原则不谈,我们所用来观察的二维切片首先应该是包含有特征物的。而不论通过什么窗口(如光学显微镜、电子显微镜和激光扫描共聚焦显微镜等)来获取二维切片图像,包含特征物的器官组织均称为参照空间,我们便是在一定参照空间内研究特征物的三维定量信息。例如要研究大鼠大脑皮质神经元,那么,大鼠大脑皮质则是参照空间。在进行体视学研究时,对于参照空间有明确要求,首先,参照空间中包含着特征物;其次,参照空间的边界清晰可辨;再次,参照空间易于获取。

(一) 二维图像与三维结构之间的关系

从下面的示意图中可以看到,当一个处于三维空间内的立体结构出现在二维切面上时,特征物的体积则表现为面积;特征物的表面积则表现为边界线(轮廓);线性结构无论在三维空间内如何走行,在二维切面上仅表现为断面数(点)(图 7-8,表 7-2)。因此,经严格设计的体视学抽样方法,通过对特征物在二维切片的面积测量,便能获得它在三维空间内的体积;通过对其边界线长度的测量,便能获得表面积;通过对断面数的测量,便能获得其长度。

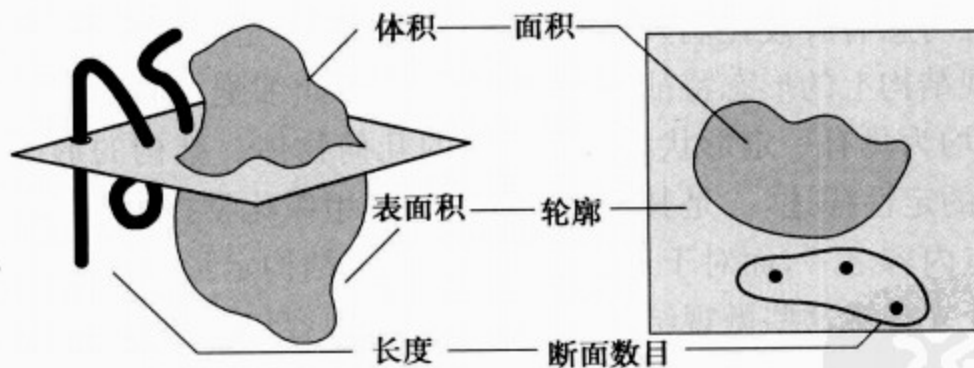


图 7-8 三维空间物体在二维切面上的表现图

表 7-2 三维空间与二维切面参数的关系

参数	三维空间	二维切面	参数	三维空间	二维切面
体积	体积(三维参数)	面积(二维参数)	长度	长度(一维参数)	点(零维参数)
面积	表面积(二维参数)	轮廓(一维参数)	数量	数量(零维参数)	

(二) 几何探针

在明确二维参数与三维参数之间的关系之后,欲得到三维数据首先要准确有效地获取

二维参数。在体视学中这些问题非常容易解决,只要利用适合的几何探针(geometric probes)和恰当的计数方法便可以得到。体视学的测试探针包括零维的测试点(test point)、一维的测试线(test line)、二维的测试框(test frame)、三维的体视框(disector)。如图 7-9 所示,a 为测试点,b 为测试线,c 为测试框,体视框将在后面专门介绍。

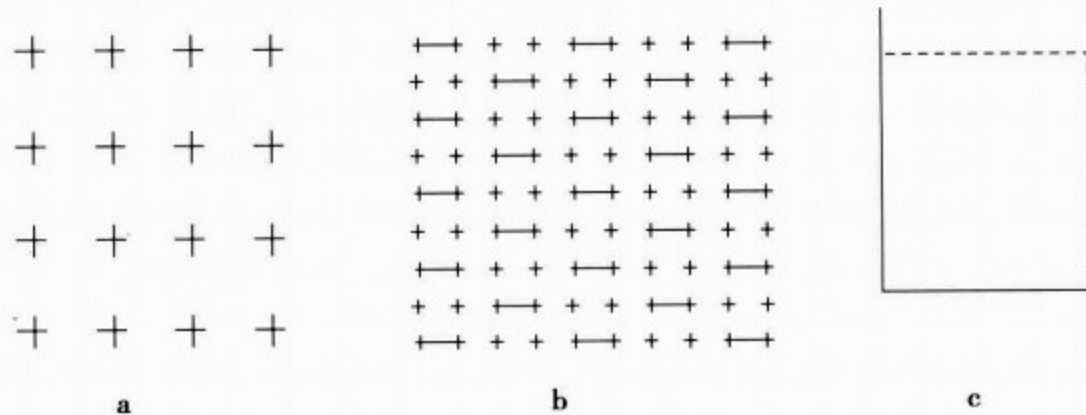


图 7-9 几何探针

a. 为测试点;b. 为测试线;c. 为测试框

利用几何探针进行二维参数计数

1. 测试点计数 计数位于所有特征结构断面内的测试点数。
2. 交叉点计数 计数测试线与所测特征结构断面边界线之间形成的交叉点数。
3. 轮廓计数 计数位于测试框“内”的所测特征结构断面的数量。

基于这些二维参数的计数可以获得体积分数(或称体积密度)、表面积密度及长度密度的信息。下面将逐一介绍这些几何探针的使用、计数原则以及计算公式。表 7-3 总结了参数、探针与维数之间的关系。组织结构参数的维数与探针的维数相加等于 3,因此,估计组织结构几何特征在三维空间内是有意义的。

表 7-3 参数、探针与维数之间的关系

参数	维数	组织结构	几何探针	维数	最终维数
体积	3	体积	测试点	0	3
面积	2	表面积	测试线	1	3
长度	1	线性结构	测试框	2	3
数量	0	集群结构	体视框	3	3

不论在二维还是三维定量信息的计算中,人们一般认为只要定量,则需计数数以千计的点,但事实并非如此。为了估算的准确性,在体视学计算时,一个最重要的方面是抽取足够的观察视野,以减少由于视野之间的差异所造成的误差。在一个标本(如一只动物)计数 100~200 个特征物断面即可。如果每个视野中的特征物断面太少,则要选择较多的视野,同时可增加每只动物的抽样量。并且也要根据研究本身最大可能地估计最佳样本抽取量。

测试系统通常很简单而且容易得到。对于很多研究目的来说,两种或三种基本测试系统足矣。可将测试系统调整到合适大小,印在透明胶片上,叠放在观察视野上面进行计数。如利用成熟的体视学设备则更为快捷方便。同时在图 7-9 中显示的均为单一测试系统,大

多数情况下,一张测试系统上并非只有一种点或线,而是由几种点和线共同组成。这样,利用分布稀疏的点,便可以进行视野中出现密集的特征物计数,而细密的点则可以进行分布稀疏特征物的计数,测试线可以进行表面积密度计算。图 7-10 是显示一张复合型测试系统。

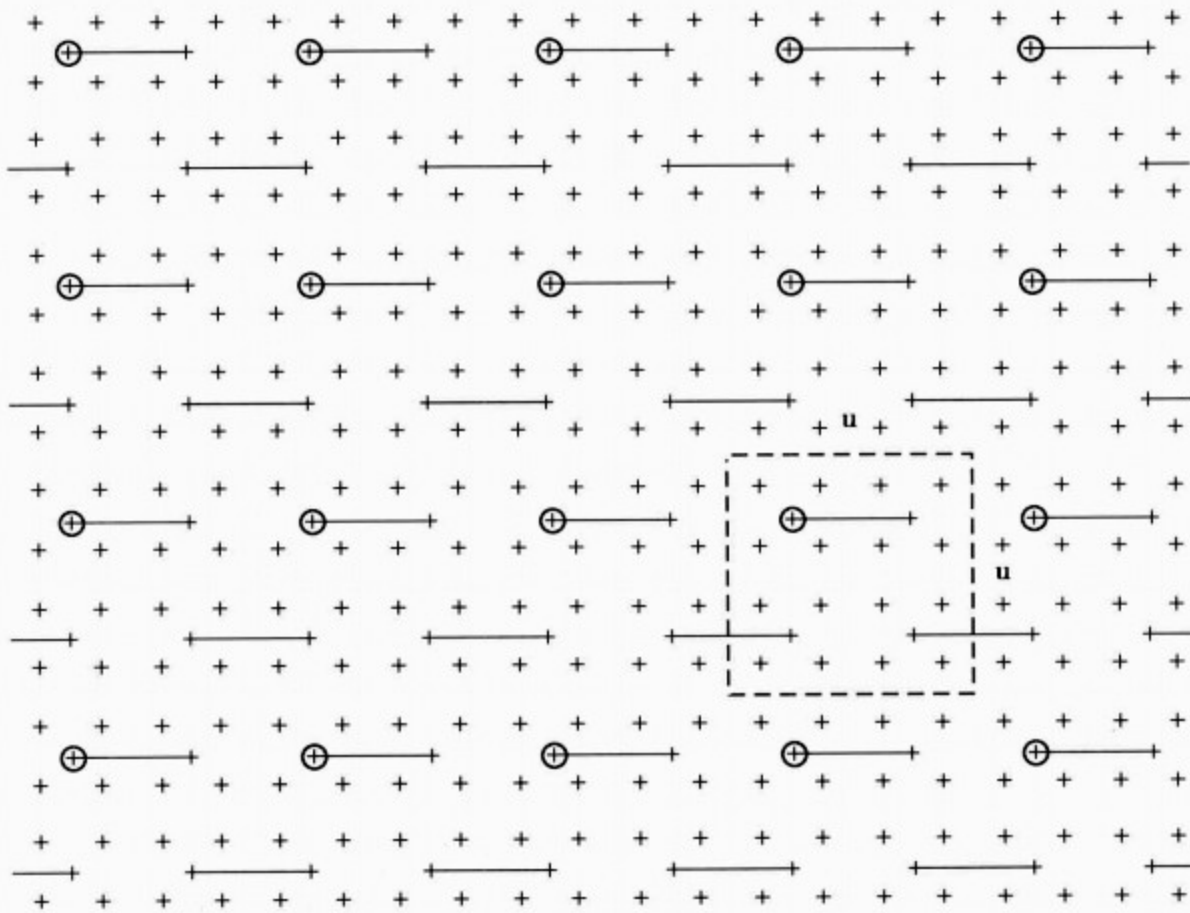


图 7-10 复合型测试系统图

一张复合型测试系统由密集的点、稀疏的点及测试线共同组成,这种测试系统同时完成多种参数的计数,方便而高效

(三) 卡瓦列里原理

卡瓦列里原理是应用最早,也是最为简单的体视学计算方法,并且在各种情况下均有广泛应用。同时,在应用此原理进行体积测算时,研究者对于所要进行测量的组织结构在形态和方向上不需要任何不真实的假设。

人体很多组织结构的形态均为不规则形,但是人们往往又对这些不规则的组织结构体积非常感兴趣,而苦于难以得到可靠的体积数据,大脑皮质沟回众多,形态迂曲是一个很好的例子。而用于解决这一问题的数学原理由卡瓦列里在 350 多年前发明。卡瓦列里原理公式为:

$$V = t \times \sum P \times a(p)$$

首先,将组织块进行包埋,切取厚度(t)均等而连续的等距组织切片。然后运用测点计数估计待测结构切面的面积。在待测结构的切面上,随机放置测点系统,计数落在组织断面上的测点数。测试系统中每一测点对应的面积为两相邻测点之间在 X 轴和 Y 轴距离的乘积。组织断面的总面积等于计数的测点总数($\sum P$),乘以所使用的测试系统中每一测试点所对应的面积 $a(p)$,即 $\sum A = \sum P \times a(p)$ 。将得到的组织断面总面积乘以切片厚度便得到所要测量的组织总体积,即 $V = \sum A \times t = t \times \sum P \times a(p)$ (图 7-11, 图 7-12)。

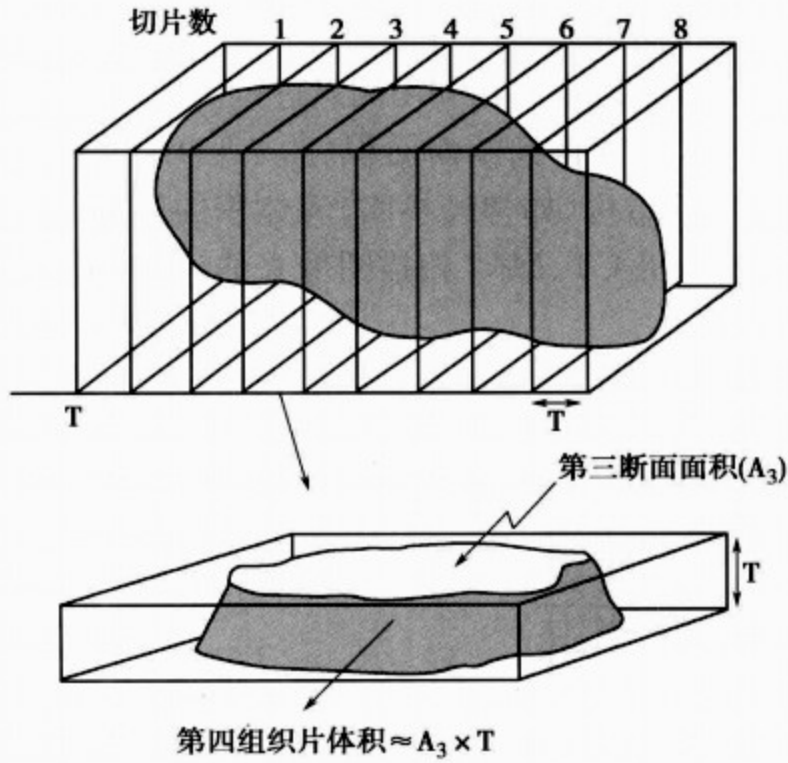


图 7-11 卡瓦列里原理测量结构体积示意图
 将组织块切成 8 片, 从中抽取第四片, 以说明如何进行体积计算, 可以测得第三个断面的面积为 A_3 , 第四片组织片的体积 $\approx A_3 \times t$ 。同样可以计算其余 7 片的体积, 它们的总和便是待测结构的总体积

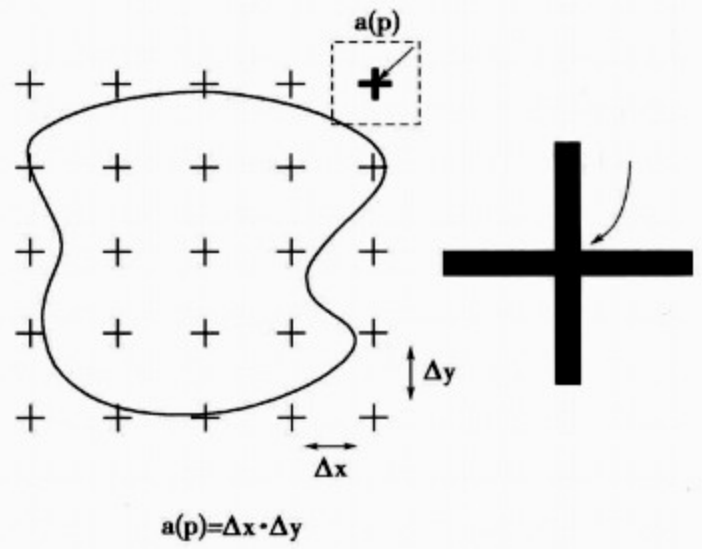


图 7-12 断面面积计算示意图

在得到平面轮廓的面积时, 在断面上随机叠加测试点, 计数击中断面的测点个数, 计数时以测点的右上象限为准。即可得出每一个测点所代表面积 $a(p) = \Delta x \times \Delta y$, 断面的面积为 $\sum A = \sum P \times a(p)$

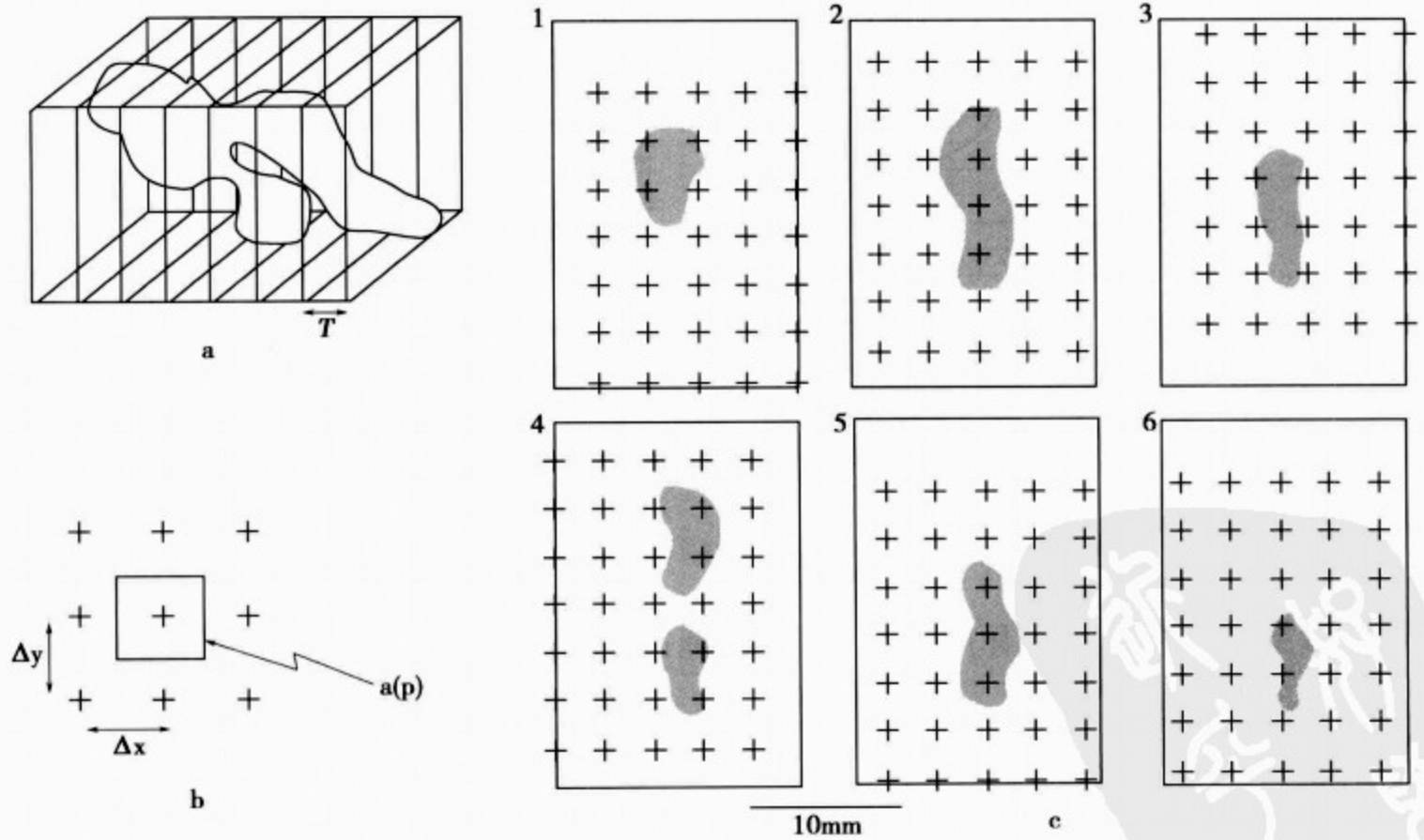


图 7-13 不规则组织块体积计算示意图

图中显示的组织块形态非常不规则, 所以切取的组织切片中可见多个断面, 但是, 不论断面多少, 只要计数击中所要研究结构断面的测点数, 然后得出测点所代表的面积以及切片的厚度, 便可获得该不规则组织块的体积

任意物体(不论其形状如何)的体积均可用卡瓦列里原理进行估算(图 7-13)。其基本要求是:通过特征结构一端的第一个切面的位置要随机决定。在利用测点进行面积估计时,不论测点疏密,只要已知每个测试点所代表的面积,便能得到断面面积(图 7-14)。卡瓦列里原理应用广泛,但多用于大器官以及不容易游离的结构(如神经核团)等体积的估算。同时,根据卡瓦列里原理,也可利用活体器官的等距随机 CT、MRI 扫描图像来估计活体器官或器官内腔室(如脑室)的体积。

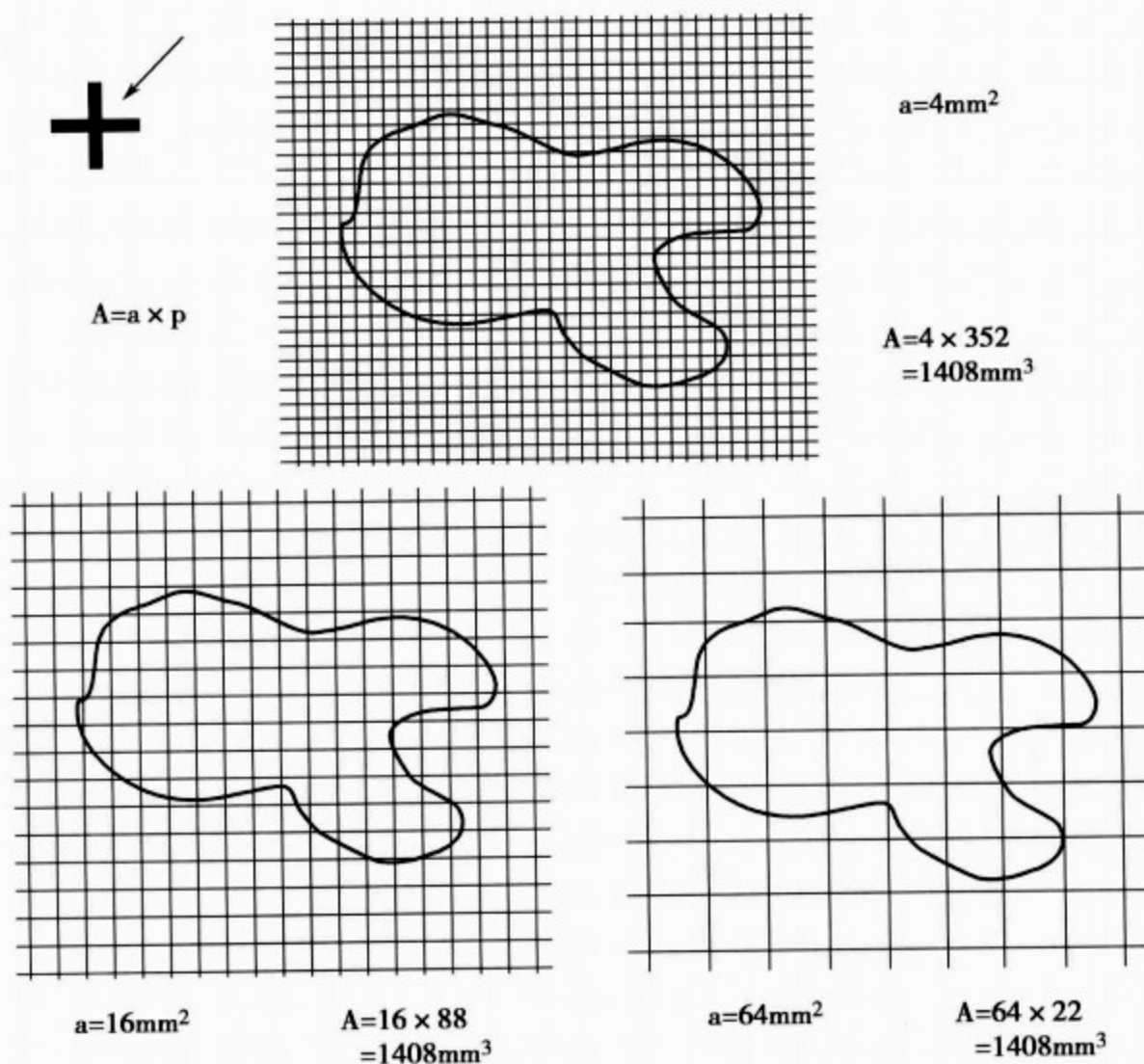


图 7-14 不同疏密的测试点测量同一个断面的面积图

图中显示利用不同疏密的测试点测量同一个断面面积,不论测试点的疏密如何,只要知道测试点所代表的面积,便可得到断面的面积,并且得到相同的数值

根据上述规则,如何具体应用卡瓦列里原理进行大脑皮质或者白质体积的计算呢? 将经过固定的大脑标本包埋于 7% 琼脂中(图 7-15),待冷却后沿着大脑的冠状切面切取连续等距脑组织切片,切片厚度为 7mm,第一片脑组织切取的位置可随机确定。由于脑切片不可能每一片均精确到 7mm 厚,故切片的平均厚度 t 可通过测量全脑长度估计,此时,要将第一片脑组织和最后一块脑组织除去,所以脑片的平均厚度 t 为全脑长/(切片数-2)。在得到所有的脑切片上随机叠放测试点,如果欲得到白质的体积,则计数击中白质的总测试点数 $\sum P_{WM}$,如果欲得到皮质的体积,则计数击中皮质的总测试点数 $\sum P_{GM}$ (图 7-16)。然后利用卡瓦列里原理公式便可以分别得到白质和皮质体积。

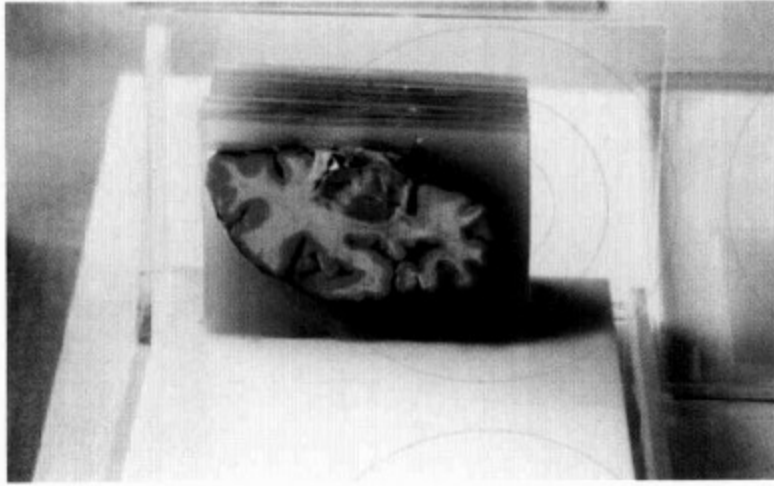


图 7-15 大脑半球琼脂包埋 7mm 等距离切片图
将人一侧大脑半球琼脂包埋,对包埋后的大脑半球作等距离连续切片,切片厚度为 7mm。图中显示已完成的 7mm 等距离切片(唐勇供图)

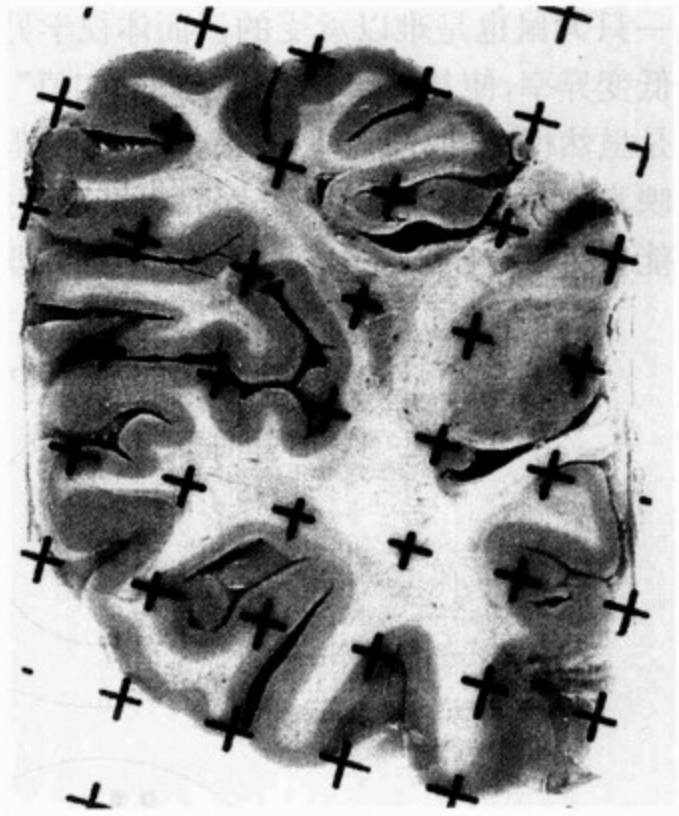


图 7-16 白质和灰质体积计算图
在每张大脑半球等距切片上随机叠放测试点,分别计数击中白质和灰质的测试点总数,然后利用公式分别计算白质和灰质体积(唐勇供图)

(四) 随机抽样

如上所述,我们不难发现对于所进行观察的切片,体视学有着自身的规定。同时,从统计学角度出发,不可能只在一张切片上观察计算便得到关于整个特征物的准确三维定量信息,故体视学必然存在其特有的抽样原则,而这些原则必须有效而且切实可行。体视学可称为形态结构的统计学,体视学测试过程,实际上是抽样过程。下面介绍体视学对切片的要求和如何进行标本抽样。

1. 三维空间内随机抽样 在体视学中经常用到“无偏(unbiased)”一词,统计学中是指“相对真实数据无系统偏差”。如果要做到这一点,我们无疑会想到对于所要研究的整体组织结构所有部位进行取样。例如,研究对象是相同年龄、性别和种系的大鼠肝细胞数目。按照图 7-17 所示,将肝脏进行连续切片,然后将所有切片连续分割成小组织切块,再按照要求进行连续组织切片观察。我们可以想象,倘若对多只大鼠肝脏的每一个部位均依据此方法研究,得到的数据应该如图 7-18 所示,即肝细胞数目均匀地分布在圆心周围。但是,此法所耗费的时间和精力,不要说对多只大鼠,就

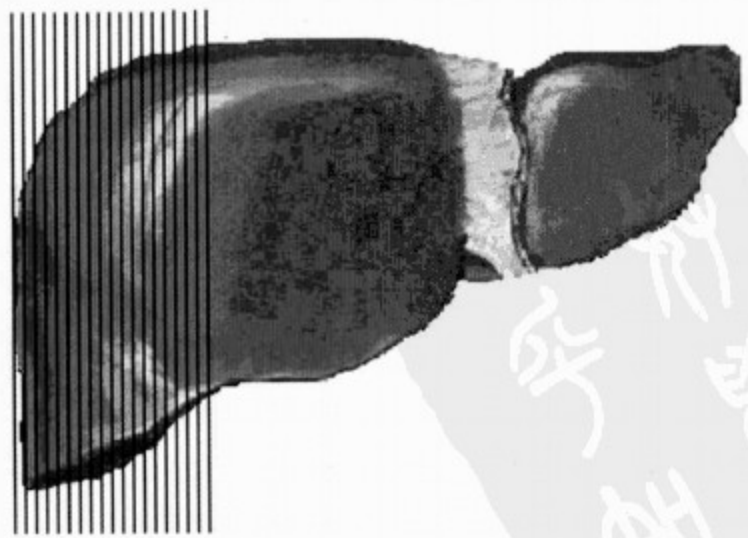


图 7-17 肝脏连续切片示意图

假设将肝脏按照如图所示的连续切片的方式进行研究

是一只大鼠也是难以承受的。而体视学另一个特点是“有效”，换言之，是指“经过适当抽样后降低变异率，使其最大程度地接近真实值”。正如图 7-18 所示，通过体视学抽样所要达到目的是虽然得到的数值并不是最为真实的，但是，这些数值也趋于集中在圆心周围，真实有效地反映真实数值的分布情况，均数与真实值没有系统偏差。所以，只有做到正确随机抽样，才可能得到“无偏”结果，并且抽样量适中(既不能太多，也不能太少)，研究才“有效”。

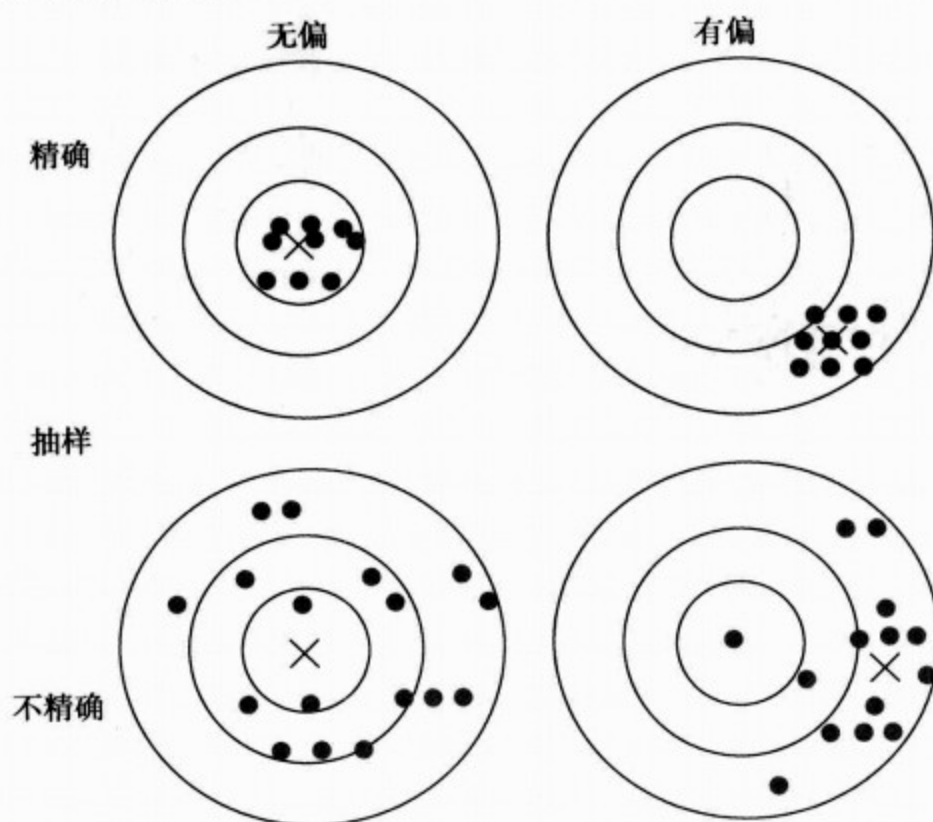


图 7-18 “无偏”和“有偏”比较图

图中所有“×”号均表示均数的位置，如果我们得到数值的均数刚好位于圆心，这样的抽样研究的过程则为“无偏”

统计学使我们牢记随机原则，形态定量研究需要多阶段抽样，欲使研究结果真实可靠，则必须遵循均匀随机原则，即均匀随机地抽取组织而不是随意地选择组织，这样，则能保证待测区域内每个部分有同等概率被抽取。为保证所研究区域内的每一部分(如从某器官所有可能切取的组织块、切片或测试视野等)有均等机会被抽选出来构成一个研究标本。可以运用单纯随机抽样方式在整个组织结构中抽样(图 7-19)，但是，在体视学上，最简单、有效的一种随机抽样方法是等距随机抽样，即开始时按简单随机抽样方法抽选出第 1 个样本(例如组织块或测试视野)，预先确定抽样间距，以后每间隔一定间距依次抽取第 2 个、第 3 个，直至无法再抽取为止(图 7-20)。

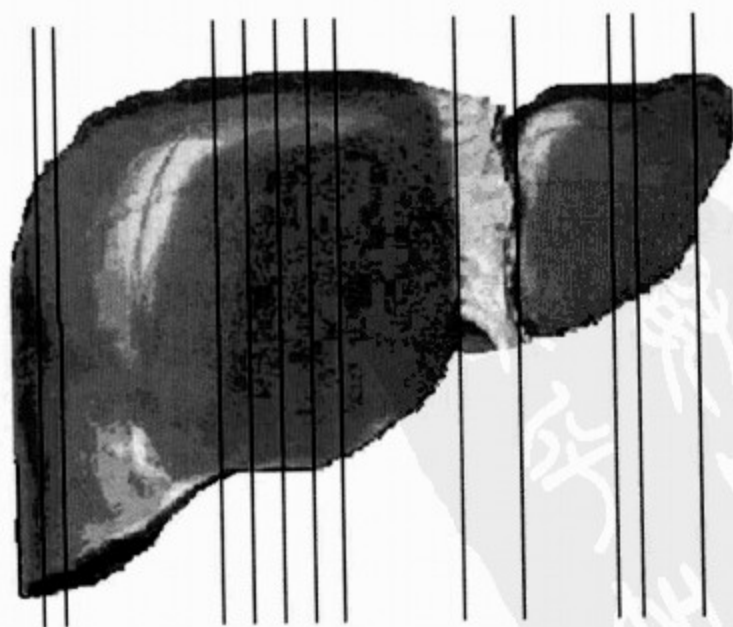


图 7-19 单纯随机抽样示意图
运用单纯随机抽样抽取组织块

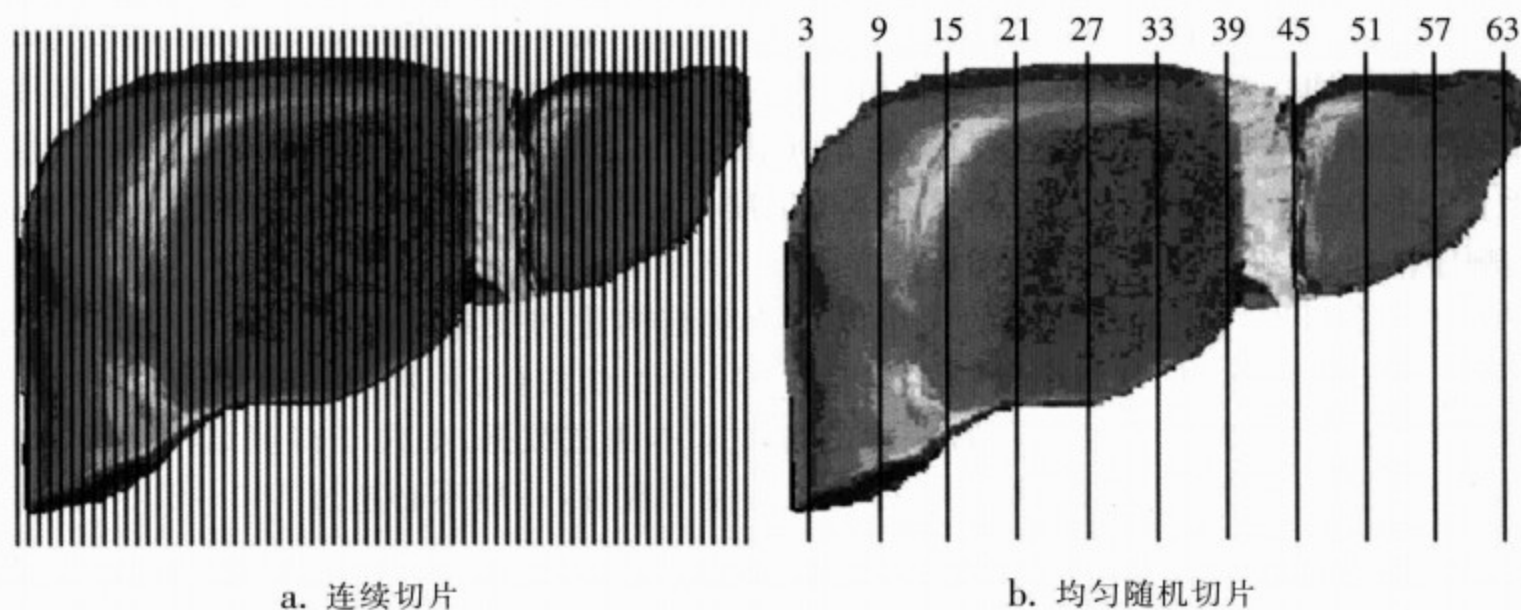


图 7-20 连续切片和等距随机切片示意图

将所得组织块按图 a 连续切成薄片,再按图 b 间隔等距离抽取组织切片,抽取时第一张组织薄片可随机选择,预先确定抽样间距。例如,确定从第 3 张切片开始抽取,每隔 6 张抽取一张,共抽取 11 张,抽取的切片号应为 3,9,15,21,27,33,39,45,51,57,63

下面以大脑研究为例说明抽样过程。随机选择一侧大脑半球,将其包埋于 6% 琼脂中,切取等距离脑组织切片,切片厚度为 7mm,共切取 20 张切片。我们确定从一侧大脑半球抽取 5 块大脑白质进行研究,首先,将从 20 张脑组织切片中抽取 5 片,即每 4 张等距切片中抽取一张(每隔 3 张抽取一张)。从前 4 个数字当中随机选择一个,这个数字则作为第一张脑片的抽取位置,假设选择 3,则第 3 张脑片作为第一个脑组织块抽取的位置,然后每隔 3 张脑片抽取一片,即 3,7,11,15,19 号脑片。由于脑片较大,还需在所得脑片上再次抽取组织块。在所得脑片上随机叠放等距有孔测试点,这些测试点排列均匀,在测试点其中白质的部位取组织块。可使大脑白质每个部位有均等的机会被抽取(图 7-21,图 7-22)。

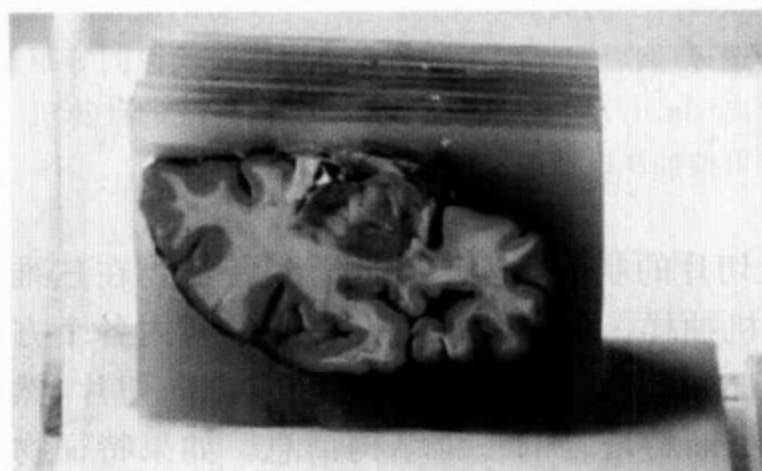


图 7-21 大脑半球连续等距随机抽样示意图
一侧大脑半球连续切片共 20 张,每片 7 mm。共抽取 5 张,则每 4 张抽取一张,第一张切片在 1~4 之间的随机数字中产生,如果为 3,应抽取的组织切片为 3,7,11,15,19(唐勇供图)



图 7-22 大脑白质随机抽样图
在随机抽取的脑组织块上随机叠放一张具有等距离孔的塑料胶片。因为塑料胶片上的孔击中大脑白质的概率是随机的,所以,当孔击中大脑白质,便在该处抽取一个组织块(唐勇供图)

实际应用中,可自己设计抽取观察组织块的多少。对于一些体积较大的器官,可采取分层等距随机抽样方式。比如先将器官切成等距的组织厚片,从中等距随机抽取组织厚片。如果研究对象是肝脏组织,不难发现,除非所用的测试点非常稀疏,否则,很难见到一个组织切片上只击中一个点,而且这样也不符合体视学抽样原则,所以,可将击中部位组织块切取后按顺序排列,再进行第二次等距随机抽样(图 7-23)。

样本含量取决于抽样误差的大小以及待测结构量的变异情况。一般情况下,选择 5~10 个动物为一组,从每个动物器官取 3~10 个组织块(切片)。在均匀随机抽样及适当抽样间距的前提下,从每个器官获得的各项基本测试数据,如位于待测结构切面内的测点总数、交点总数、轮廓总数、粒子总数或直径个数等,一般不必超过 100~200 则可获得满意的测试结果。由此可见,体视学研究可以被理解为一步步等距随机抽样的过程(图 7-24)。

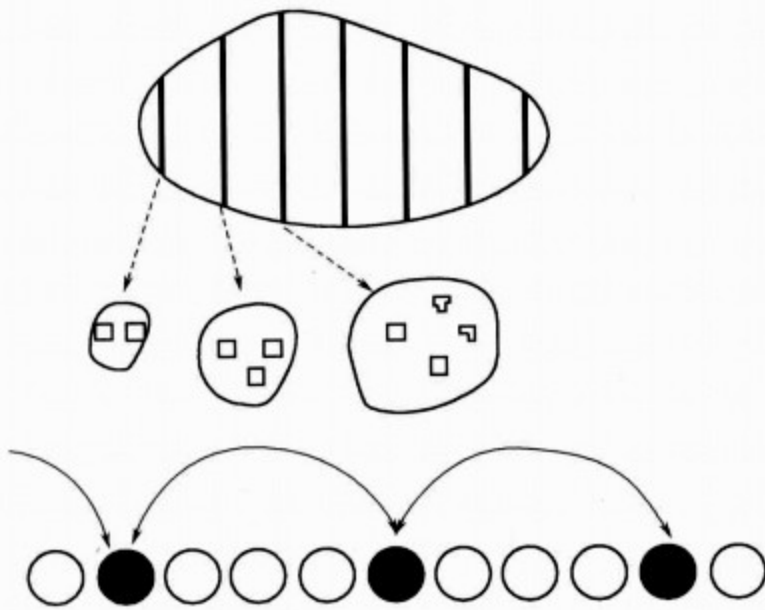


图 7-23 多次等距随机抽样图

在切取大组织器官时所得组织片较大,这样用有孔测点取下的小组织块便不只一块,如果样本量太大,则可以将所有样本排列在一起,再次进行等距随机抽样

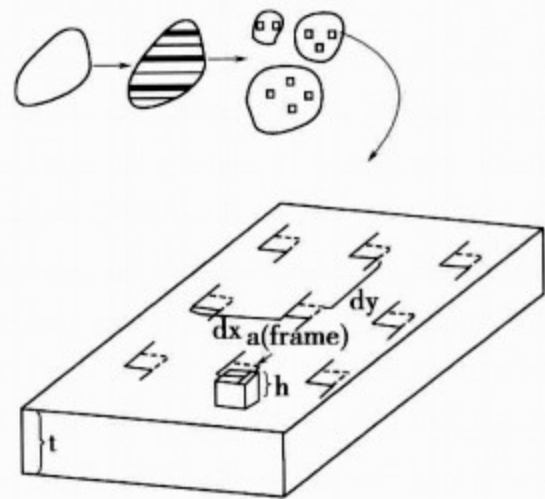


图 7-24 多次连续等距随机抽样图

图中显示如何从器官随机抽取组织片的过程,即从器官随机抽取组织片,从组织片随机抽取组织块,从组织块随机切取一张组织切片,再从这张组织切片上随机抽取视野。第一个视野的位置随机选择,然后视野在 X 轴和 Y 轴方向每次以同等距离(dx, dy)移动。体视学分析测试系统的计算机可按抽样设计控制视野移动距离

2. 三维空间内各向同性的概念及各向同性切片的制作 为正确地得到特征物在三维空间内长度和表面积等,必需对其做方向性随机抽样。如果特征物在三维空间内各个方向均匀分布,即具有各向同性,如肾小体的毛细血管球,可通过组织作任意方向切片,然后在切片上进行二维研究,通过所得二维数据推断特征物的三维结构信息。如果特征物在三维空间内呈各向不同性分布,则需通过组织制作各向同性切片,并在其中获取数据。制作各向同性切片的方法有定向法(orientator)和球切法(isector)。下面简单介绍球切法。

球切法:采用有圆形小腔的塑料模具,将组织块放入小腔内包埋,使包埋介质(如树脂)充满小腔,包埋介质变硬后形成球形包埋块。把球形包埋块取出,在平面上任意滚动,然后

对组织块按常规电镜包埋方法包埋(图 7-25)。“球切法”原理颇为简单,利用球面的各向同性特征,在平面上任意滚动球形包埋块,相当于用“盲法”随机确定球面上一个均匀随机点,由此确定空间内一个均匀随机方向。但是,“球切法”需要专门包埋模具,而且仅适用于体积较小的组织块。

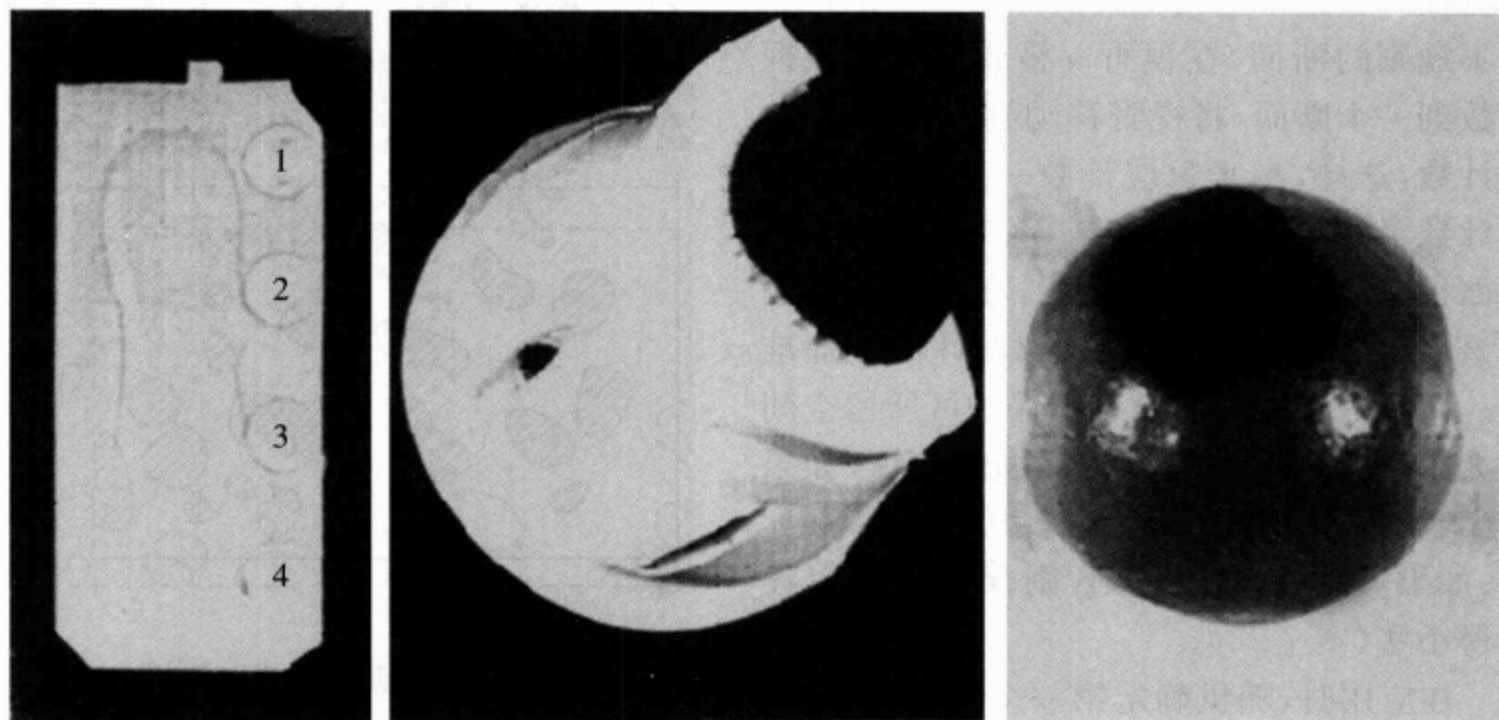


图 7-25 球切法模具图

图左侧显示一个特殊制作的模具,模具上的数字指示其深处有球形的腔。图中部显示一个弯曲的模具,可见球形腔的盖子已被切开,标本放入球形腔内,然后用包埋介质充填小腔。包埋介质变硬以后,包埋的标本则形成球形。在最上方的腔内有一个球形的包埋标本。图右侧显示球形包埋标本的放大图像

二、常用体视学方法在免疫组织化学中的应用

(一) 特征物断面计数与轮廓密度

如图 7-26a 所示,透过观察“窗口”可见一张切片,这个“窗口”可能是一张电镜照片或者是光镜下的一个视野。但是,“窗口”只是其中一部分,即人为地为这部分所观察到的视野加一个边界。其中能看到多少断面呢? Gundersen 在 1977 年发明了用于切片观察计数的无偏计数框,这个计数框由实线和虚线组成,具体计数原则为只计数完全处于框内或者只与虚线(即计数线)相交而完全不与实线(即禁止线)相交的断面。如图 7-26b 所示,在原有的观察视野上叠放无偏计数框,完全处于计数框内的断面数为 19,只与计数线相交的断面数为 8,在这个视野中计数到的断面数应是 27。为什么要用这样的计数框进行断面计数呢,利用图 7-27 显示的棋盘型计数框较易解释。假设在图 7-27 中观察到的是切片的全部内容,而不是切片的一部分视野,在上叠放一个棋盘型计数框。将棋盘计数框的每一个小格当作一个计数框,按照上述计数原则进行计数。不难发现不论断面的走行如何,大小如何,只有在它们的阴影部分所处的那个框该断面被计数一次,通过计数可以发现在整个棋盘计数框中的 7 个断面均只被计数一次。在实际应用中,我们也可根据所观察切片的内容选择这种棋盘型计数框。大多数情况下,通过观察窗口所

见的是切片的一部分视野,所以,通常利用图 7-26b 所示单一计数框,从图 7-28 看出如果来自同一特征物的不同断面,难以正确地判断是否同一特征物,则存在高估断面数的可能性。在整个切面上其实只有一个走行非常不规则的断面,在视野 a 叠放单一计数框计数到一个断面,将视野移动到 b,叠放计数框计数,这样,本来只应计数一次的断面,则被计数了两次。所以,如图 7-26b 所示,计数框面积应小于观察窗口面积,在计数框周围应该存在一定“保护区”,以确保计数更加准确。而计数框大小的设计和保护区所留空间的大小决定于研究者对目标物的认识,如果被测物形态极不规则,则保护区应尽量大些;如果其形态比较规则,则保护区可以设计得小些(图 7-26)。

在应用时,随机确定第一个计数框位置,其他计数框系统随机排列在所观察的切片上(图 7-30,图 7-31)。每个小无偏计数框面积为 a ,行距为 dy ,列距为 dx ,也就是说,每个小无偏计数框所观察的范围是 $dx \times dy$ 区域。

计数后可用一个相对值来描述断面的多少,即轮廓密度(Q_A),系指单位面积参照平面内断面的轮廓数量。它等于断面总数($\sum Q$)除以无偏计数框的总面积($\sum A$)。其计算公式为:

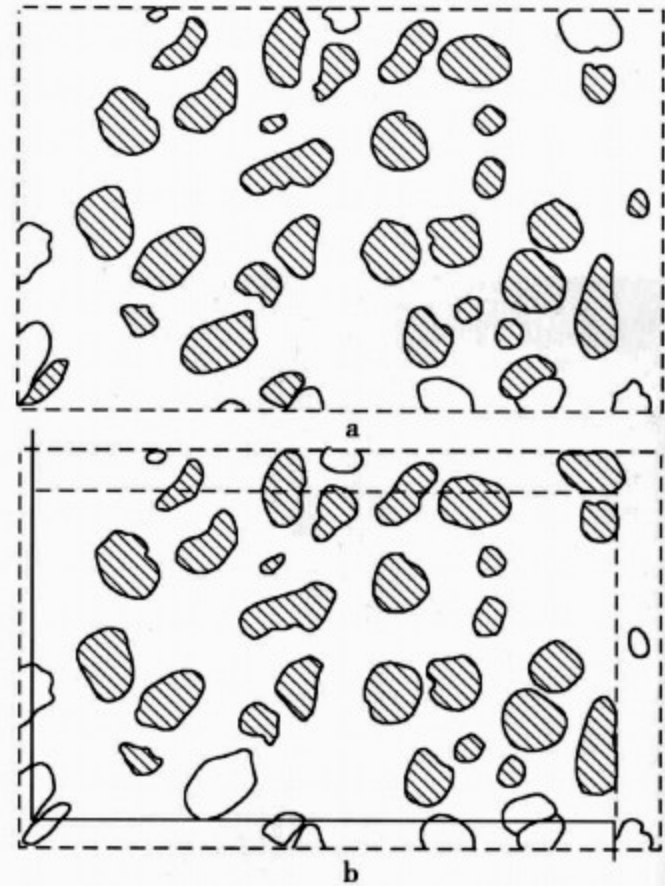


图 7-26 断面计数示意图
a 显示有 31 个断面完全在窗口内(阴影所示),有 10 个断面不完全处在窗口的边缘;b 显示利用计数原则被计数的 27 个断面(阴影所示)

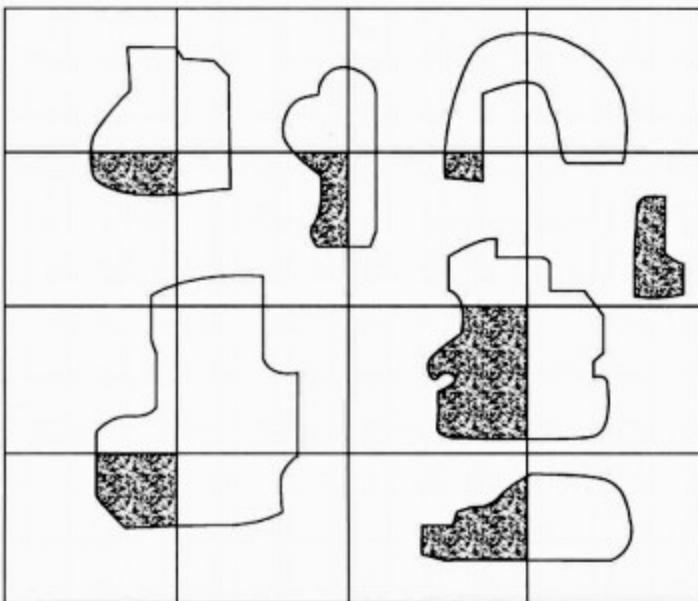


图 7-27 棋盘型计数框
将每一个小格当作一个计数框,
7 个断面均只被计数了一次

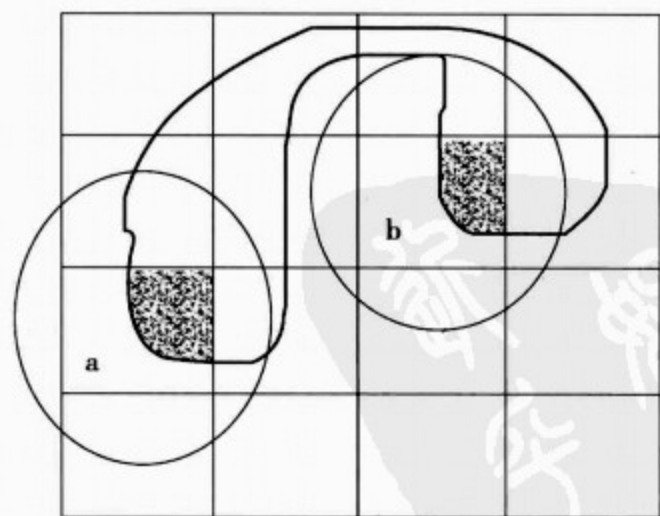


图 7-28 高估断面数的可能性图
如果结构非常不规则,很难判断是否属于同一结构的
不同断面,可能存在高估断面数。如图中一个断面
被计数框 a 计数一次,在计数框 b 再次被计数

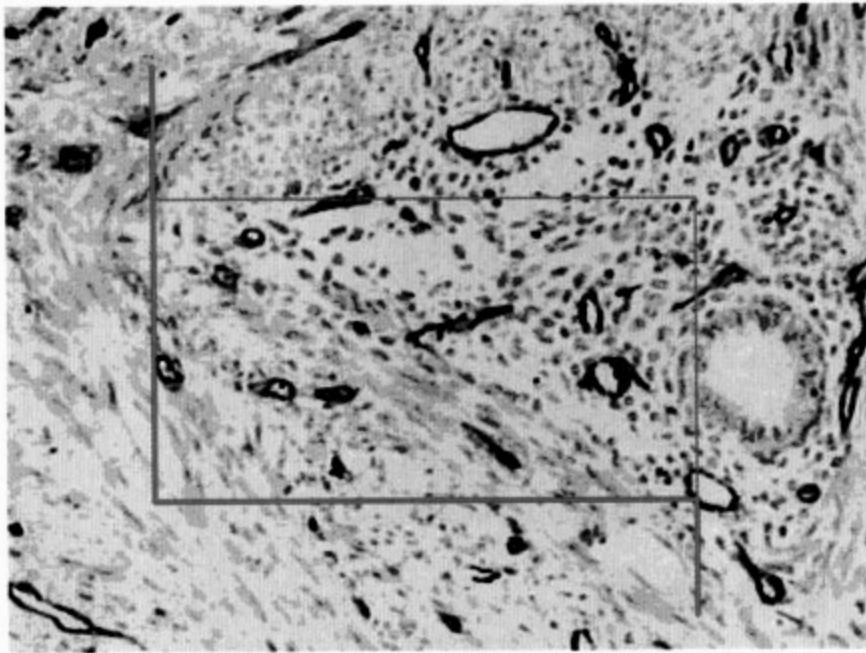


图 7-29 无偏计数框计数小血管断面图
经免疫组织化学染色小血管显示棕色,按照无偏计数框的计数原则计数,在整张照片中共有 15 个小血管断面被计数

$$Q_A = \sum Q / \sum A$$

以图 7-30 为例,假定计数框面积为 $8.8\mu\text{m}^2$,共 27 个断面,则 $Q_A = 3.1\mu\text{m}^{-2}$ 。以此种方式描述的最大优点在于它为不同观察者所得数据之间提供可比性。在病理学应用中,如对某一单位区域进行细胞组成分析时,以每种细胞的单位密度来计数比较,而不是计数某一未知大小和放大倍数区域内的细胞数量。此法所测得断面数的多少从一定程度上也取决于所选择视野的特征性。如果选择的视野仅取决于研究者的主观意识,那么,测得的断面数更多地代表了研究者的偏见而不是本张切片的特征。如图 7-32 所示,在一张切片中,如果选择 a 视野进行计数一定会比在 b 视野计数得到的断面数少。因此,对研究者来说,满足统计学要求的抽样,应是系统随机选择视野,不包含观察者的主观因素。由此可见,在整张切片上叠放系统随机计数框的优点是能够避免观察者出于偏见选择视野,同时也能增加计数效率。如果逐一视野进行计数,在选择视野时需随机抽样。

(二) 长度密度和总长度

线性特征结构在三维空间内的长度在二维切

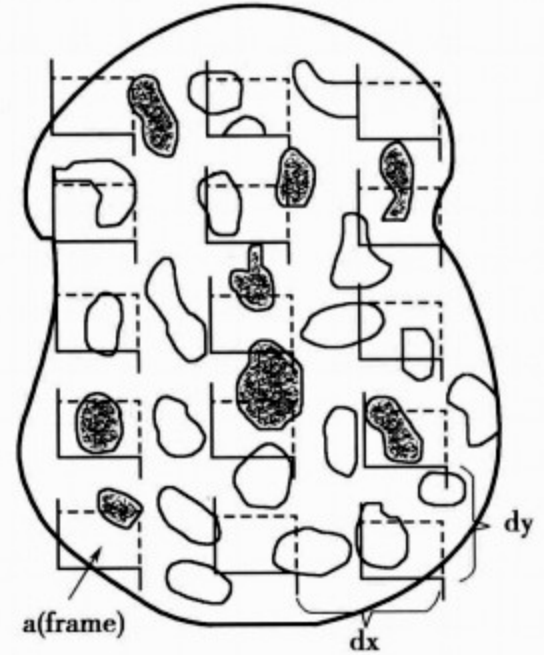


图 7-30 系统随机无偏计数框示意图
在所观察区域叠加系统随机无偏计数框,每个无偏计数框观察的范围是 $dx \times dy$,每个小的无偏计数框的面积为 $a(\text{frame})$,上图阴影显示计数到的断面数

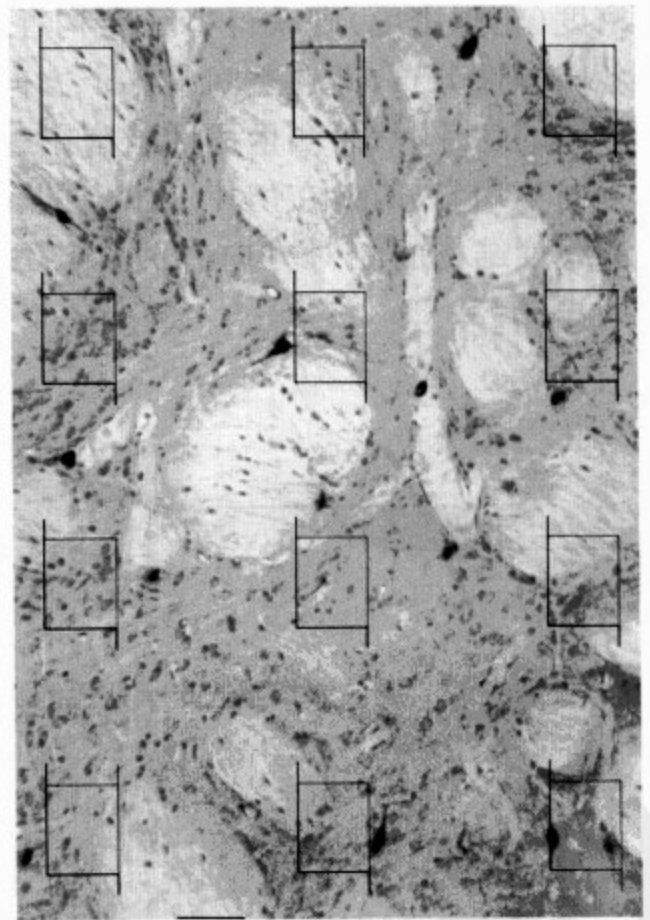


图 7-31 系统随机无偏计数框实例图
图中显示纹状体经振动切片机切片,原位杂交显示生长抑素 mRNA 阳性细胞,并进行核复染。在切片上叠放系统随机计数框,即可计数待测特征物

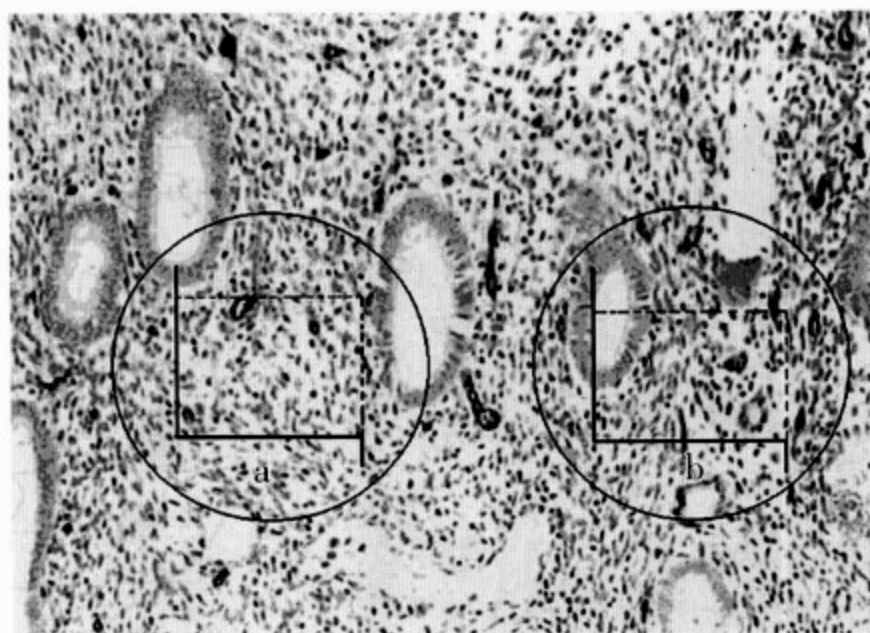


图 7-32 视野随机选择图

图中为免疫组织化学染色的组织切片,小血管呈棕色。如果依据研究者的主观意识可能会选择小血管出现较密集的视野 b 进行计数,而不会选择视野 a, 如此计数所得结果不可信。所以,在计数时一定要随机选择视野

面上表现为断面数(轮廓数)。因此,运用无偏计数框测量在二维切面上特征结构的断面密度(轮廓密度)则获得特征结构在三维空间内的长度。如果线性结构在三维空间内是各向同性分布,即在空间内各个方向均匀分布(如肾小体毛细血管球),可对组织做任何方向的切片,然后测量线性结构在三维空间内的长度。如果线性结构在三维空间内各个方向不均匀分布,在切片上出现的轮廓数除与线性结构的长度有直接关系外,还与切片和线性结构的相对方向有关(图 7-33,图 7-34)。此种情况需要在空间内的随机方向上抽样。

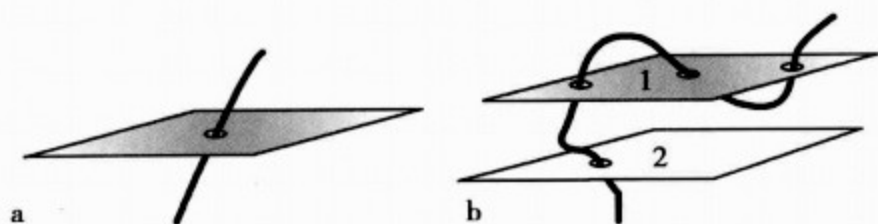


图 7-33 线性结构不同走行切面断面数比较图

a 沿着一个方向走行的线性结构在切面上只反映一个断面; b 走行方向不规则的一条线性结构在第一张切片上反映为 3 个断面,而在第二张切片上则为一个断面

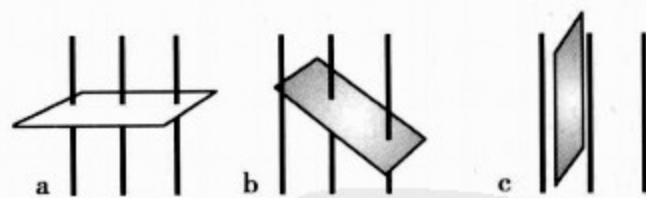


图 7-34 不同切面的断面数图

a、b、c 为同一组织块三个不同切面, a 切面可见 3 个断面; b 切面为 2 个断面; c 切面为 0 个断面

以研究大脑白质中有髓神经纤维的长度为例说明如何通过二维切片的观察获得长度密度和总长度。将按体视学抽样原则抽样得到的组织块进行小球包埋(图 7-25)。从其中随机切取一张切片,并随机抽取视野。在视野上随机放置无偏计数框,根据无偏计数框的计数原则计数待测线性结构的断面数。无偏计数框的计数原则是只计数完全在测试框内以及与测试框右边和上边(这两边线称计数线)有交叉的轮廓,而不计数与测试框左边、下边、

左边向上延伸线和右边向下延伸线(这些边线总称禁线)有任何交叉的轮廓(图7-35)。实际上,这些步骤与前面介绍的二维轮廓密度的测量步骤完全相同。在各向同性切片上获得轮廓密度,单位体积参照空间内特征物的长度密度(L_V)计算公式为:

$$L_V = 2Q_A = 2 \times \Sigma Q / \Sigma A$$

ΣQ 代表用无偏计数框计数的特征物断面总数, ΣA 代表在参照空间内使用的无偏计数框的总面积。

参照空间内特征物的总长度(L)的计算公式为:

$$L = L_V \times V(\text{ref})$$

$V(\text{ref})$ 代表参照空间的体积, L_V 代表单位体积参照空间内特征物的长度密度。

有髓神经纤维被计数的断面共 12 个,所利用计数框的面积为 $3.286 \times 10^3 \text{ mm}^2$,放大率为 22 000 倍,按照长度密度公式计算大脑白质有髓神经纤维的长度密度 $L_V = 2Q_A = 2 \times 12 \times 22\ 000 \times 22\ 000 / 3.286 \times 10^3 = 3.53 \times 10^6 \text{ mm}^{-2}$ 。假设在之前已经利用卡瓦列里原理得到大脑白质的体积 V_{wm} 为 110 mm^3 ,则大脑白质有髓神经纤维总长度 $L = L_V \times V(\text{ref}) = 3.53 \times 10^6 \times 110 = 3.92 \times 10^8 \text{ mm}$ 。然而,在实际应用时,不可能仅计数一个视野的有髓神经纤维断面数,所以,在计算长度密度时,是利用得到的总断面数除以利用的无偏计数框的总面积。

(三) 面积分数、平均面积、体积分数和总体积

研究特征结构在参照空间内含量多少的最简单方法是特征物在参照空间内所占比例。在二维切片中以特征物断面面积占参照平面面积比来表示,即面积分数 A_A ,计算面积分数的公式为:

$$A_A = \Sigma P(\text{structure}) / \Sigma P(\text{ref})$$

式中, $\Sigma P(\text{structure})$ 为测试点击中特征物断面的总个数; $\Sigma P(\text{ref})$ 为测试点击中整个参照空间的总个数。

如图 7-36 所示,在一个切面上叠放 0 维测试点(在计数时以测试点“+”的右上象限为准的是 0 维测试点),当它落在特征物断面内则计数。同时,需要指出的是,在实际应用中大多数情况下落在参照空间(整个观察视野)内的测试点总数是一定的,也就是说,如果在一个样本中选择几个观察视野,那么,落在参照空间内的总测试点数只需计数一次,即测试点落

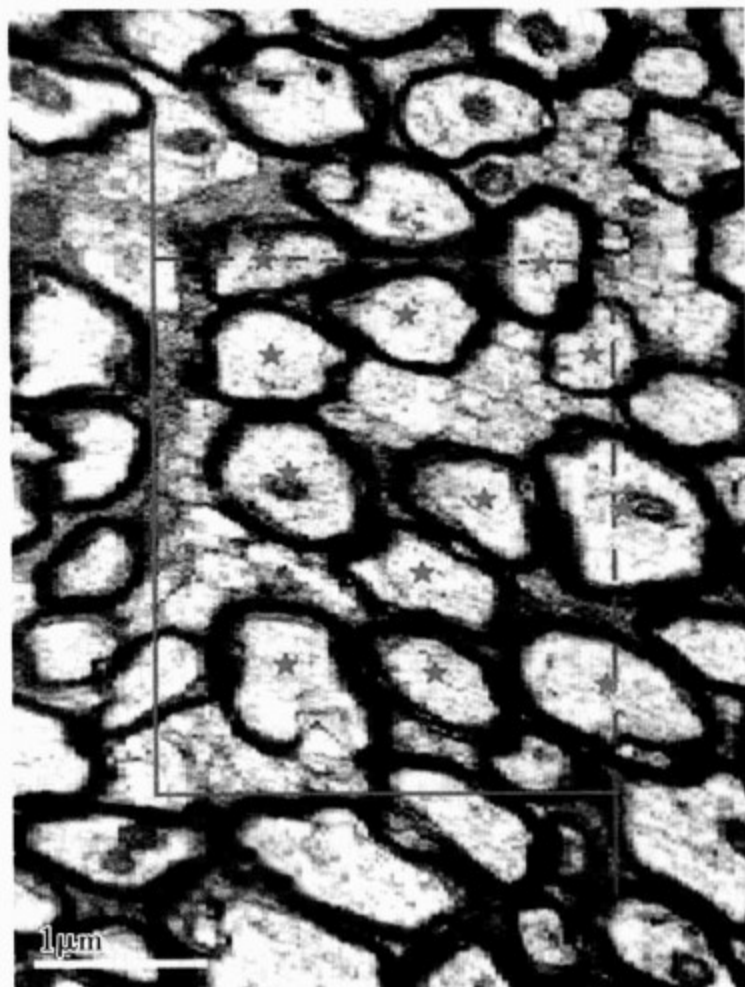


图 7-35 大脑白质透射电镜图

箭头所指有髓神经纤维断面,电子密度高的膜性结构为有髓神经纤维髓鞘,红星所示为有髓神经纤维被计数的断面,共 12 个

在观察视野内的个数再乘以观察的视野数。图 7-36 中所用的测点总数是 80, 击中特征断面的测点数是 18。同时, 在选择观察视野时, 需遵循系统随机或者单纯随机抽样过程。

另外, 研究者最为关心的问题是特征断面的面积, 亦即平均特征断面面积 $a(\text{profile})$ 。由于应用以上手段已得到相对面积和相对特征断面数, 解决此问题将会变得简单。平均特征断面面积 $a(\text{profile})$ 的计算公式为:

$$a(\text{profile}) = A_A / Q_A$$

注意此时所得的平均断面面积是一个比率, 是两个相互间没有关系值的比, 所计数击中目标断面测试点数, 不论这些目标断面是否被无偏计数框包括(图 7-36), 只有当需要得到切面中特征断面面积分布关系时, 才严格地只计数击中被无偏计数框计数的特征断面的测试点数, 而此时应该使用较密的测试点。

同理, 该特征物体与参照空间的体积比(体积分数 V_V) 等于通过该参照空间所作的切面上特征物的面积与参照空间面积之间的比值, 也等于通过特征物的测试线长度与通过该参照空间的测试线长度之间的比值, 还等于落在该特征物断面上的测试点数与落在参照空间断面上的测试点数的比值: $V_V = A_A = L_L = P_P$ (图 7-37)。

无论是用测试线还是用测试点进行的计数, 均可得出 $V_V = A_A = L_L = P_P$ 。单位体积参照空间内特征物的体积密度等于落在特征物上的测试点总数与落在参照空间内的测点总数的比值, 即 $V_V(\text{structure}/\text{ref}) = \sum P(\text{structure}) / \sum P(\text{ref})$ 。参照空间内特征物的总体积等于单位体积参照空间内特征物的体积密度乘以参照空间的体积, 即 $V(\text{structure}, \text{ref}) = V_V(\text{structure}/\text{ref}) \times V(\text{ref})$ 。

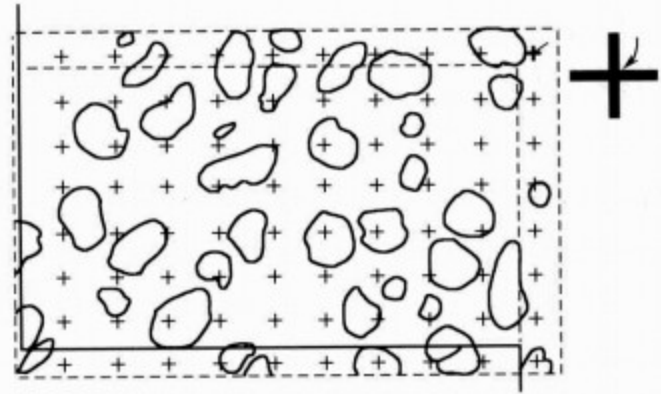


图 7-36 体积分数示意图

在一个切面上叠加 0 维测试点, 计数时以每个“+”的右上象限为基准, 当其落在断面上则进行计数。此处击中整个参照空间为 80 个点, 击中断面的为 18 个点

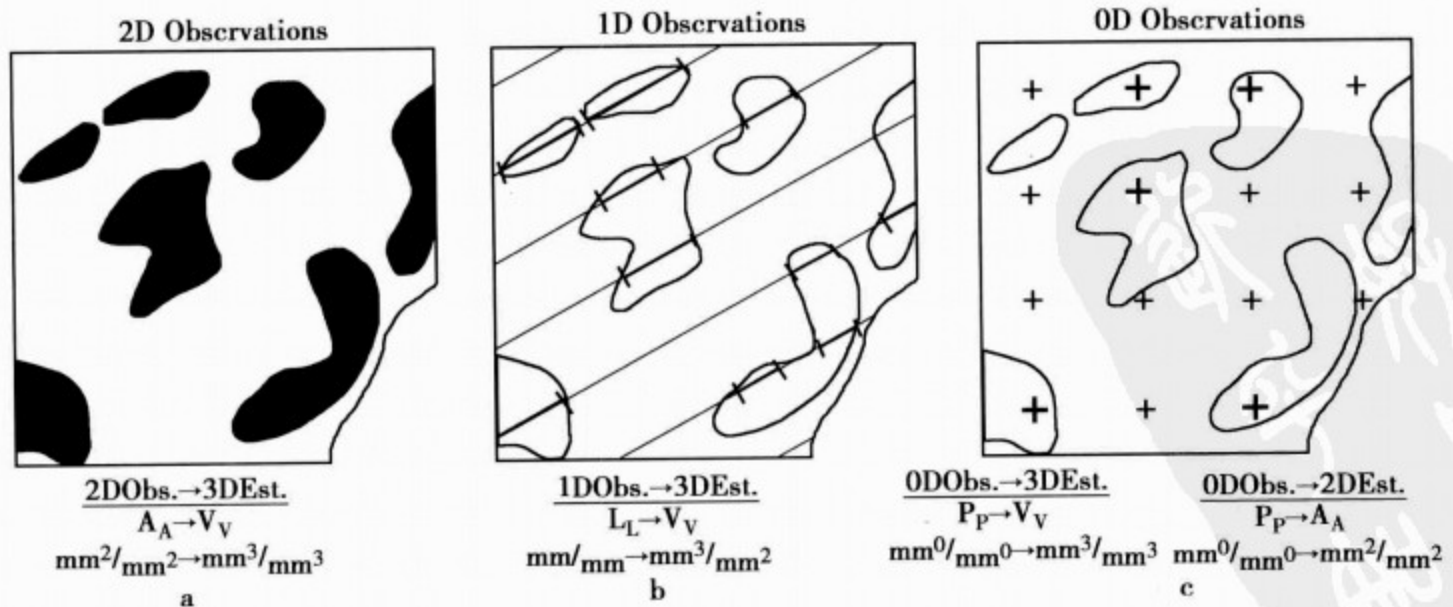


图 7-37 (a, b, c) 各项比值相等图

图中显示无论是用测试线还是用测试点进行计数, 均可得出 $V_V = A_A = L_L = P_P$

下面以计算大脑白质中有髓神经纤维的总体积为例进行体积密度和总体积的计算。同样,利用球切法所得到的视野(图 7-38),在其上随机叠放 0 维测试点。计数击中有髓神经纤维的总测试点数为 28,位于整个参照空间内的测点总数为 64,则大脑白质中有髓神经纤维的体积密度为 $V_v(nf/WM) = 28/64 = 0.44$ 。同样,假设我们利用卡瓦列里原理得到的大脑白质总体积为 110mm^3 ,则大脑白质中的有髓神经纤维的总体积 $V(nf, WM) = 0.44 \times 110 = 48.4\text{mm}^3$ 。同理,在进行计数时不可能只选择这样一个视野代表整个实验对象,所以,当进行很多组织块多个视野的计数后,有髓神经纤维的体积密度便是以击中白质中有髓神经纤维总测试点数除以击中参照空间(大脑白质)的总测试点数。

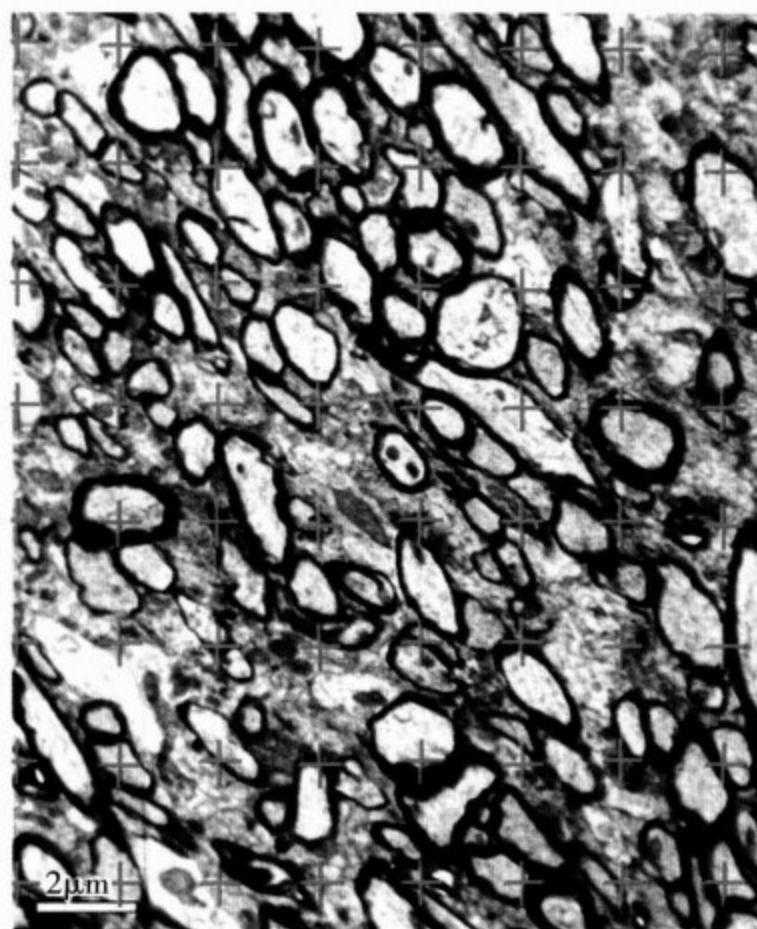


图 7-38 大脑白质透射电镜照片体积分数计数图
在此照片上随机叠放测试点,计数击中有髓神经纤维测点数为 28,击中整个参照空间(即整张照片)的测点数为 64(唐勇供图)

(四) 交叉点密度、边线密度、表面积密度和总表面积

在研究中还会遇到另外一种需要考察的指标是特征物断面的边界长度。欲把所观察的全部目标结构轮廓逐一追溯是非常耗时的做法,但是,利用如图 7-39 中所示的方法则会有效得多。在切片上叠放一个同时存在测试点、无偏计数框和已知长度的测试线共同组成的测试系统。计数测试线与轮廓相交时交点个数,记为 I ;同时已知测试线的总长度为 L 。利用交点总数与测试线的总长度计算出交点密度 I_L ,其计算公式为:

$$I_L = I/L$$

已知交叉点密度便可得到单位面积内待测轮廓边线的长度,即边线密度 B_A 。计算边线密度的公式为:

$$B_A = (\pi/2)I_L$$

如图 7-39 所示测试线的总长度 L ,所有测试点的个数为 P ,则两者的比率为 L/P ,也就是每个测试点对应的测试线的长度。同样计数测试线与轮廓的交点数 $I(\text{prof})$ 和击中测试点的所有测试点个数 $P(\text{sect})$,则计算边线密度的公式可以衍化为:

$$B_A = (\pi/2) \times (P/L) \times (I/P)$$

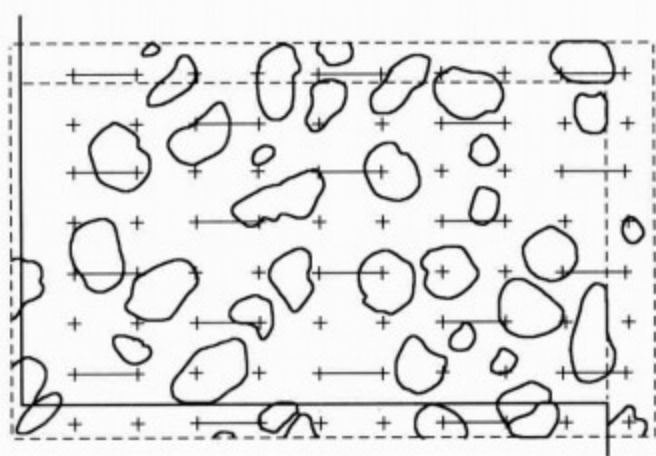


图 7-39 边线密度示意图

已知 L/P 为 0.41, $I(\text{prof})$ 等于 18, $P(\text{sect})$ 等于 80,按照衍生的公式计算得到 B_A 为 0.86

求得边线密度如同计算平均特征断面面积一样进行平均边线长度 $b(\text{profile})$ 计算。

同时利用得到的交叉点密度还能得出单位体积参照空间内特征物的表面积,即表面积密度 S_v 。单位体积参照空间内特征物的表面积密度等于测试线与特征物总交叉点数与参照空间内使用的测试线的总长度的比值乘以 2,即 $S_v(\text{structure, ref}) = 2I(\text{structure})/L(\text{ref}) = 2I_L$ 。

单位体积参照空间内特征物的表面积密度乘以参照空间的体积则得到参照空间内特征物的总表面积,即 $S(\text{structure, ref}) = S_v(\text{structure/ref}) \times V(\text{ref})$ 。

需要注意的是,虽然测试线与特征物的交叉点数与特征物的表面积有关,但是,切片与特征物之间相对方向的改变可以影响交叉点数的多少。因此,与长度研究一样,如果特征物在三维空间内不呈各向同性分布,需要在各向同性切片上计数测试线与特征物的交叉点数。

以图 7-40 为例说明如何运用表面积密度公式和总表面积公式进行计算。

(五) 数目测量

1. 物理体视框与光学体视框及其应用 如前所述,根据体视学原则可获得长度、体积和表面积等信息,这些方法只需一张切片即可,而在数目测量中需要两张平行切片,并且已知这两张切片相隔的距离。体视学探针,又称为体视框(disector),利用体视框进行粒子数目计数才是真正在三维空间中无偏计数粒子的过程。体视框分为两种:物理体视框和光学体视框。

人类有五种感官:嗅、视、触、味、听。大多数情况下,我们不会对所接触的事物产生混淆,因为当我们接触到一种物体(如一条死鱼)时,至少同时会有嗅、视、触的感觉。对于客观物质也是同样,体视学家遇到客观事物时,也会同时会用体积、长度、表面积和数量这些三维特征来描述其特性,最终得到的数据均为在三维空间内的参考值,因此,在应用时探针的维数和二维切面上参数的维数相加均应等于 3。所以,如果用 0 维测试点在三维参照空间中测量体积分数,则最终得到三维参数体积。倘若测量粒子的数目,这个指标本身是 0 维,所以,欲真实得到其数目则必须在三维空间内使用三维测试系统进行计数。

Gundersen 教授 1984 年发明了三维体视框,即由一个测试平面和一个与之距离为 h 的对照平面组成。在测试平面上画有面积为 A_T 的无偏计数框。将它随机插入待测结构的三

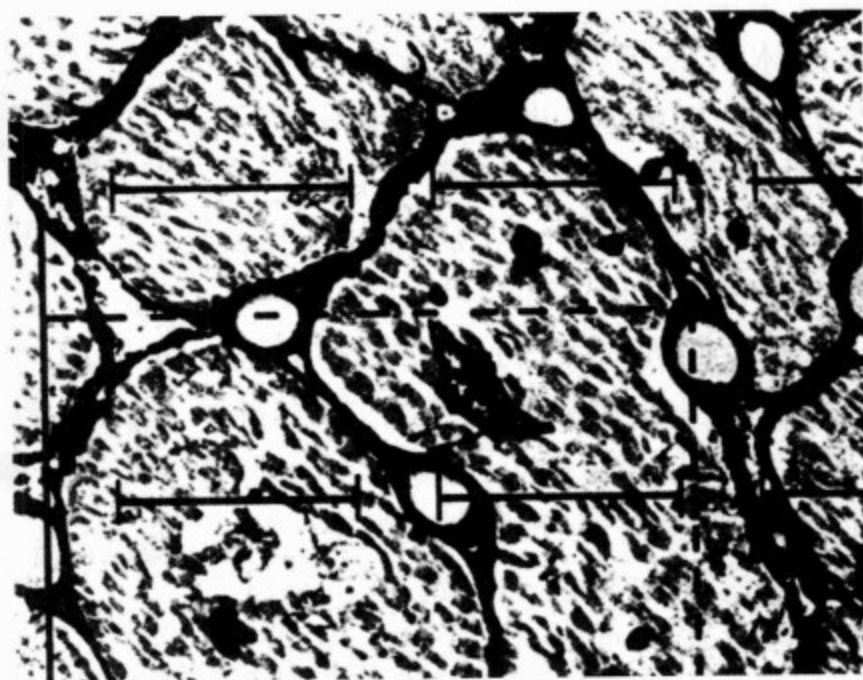


图 7-40 表面积密度示意图

图中显示的是从心肌组织切片上随机抽取的视野。在此视野上叠放由一组测试点和已知长度的一组测试线组成的测试系统。计数测试线与毛细血管交叉点数,运用相应公式即可计算出单位体积心肌组织中毛细血管的表面积密度

维空间内则可均匀选择或计数粒子。其计数原则为：抽选或计数那些被体视框测试平面所截，而又不被体视框对照平面所截的粒子。即只计数在测试平面形成轮廓，而在对照平面不形成任何轮廓的粒子。在测试平面计数时也要遵循无偏计数框计数法则(图 7-41)。体视框的中心思想是无论粒子大小，只有一次机会被一张切片相切而不被邻近的另一张切片相切。任何粒子在体视框的测试平面或对照平面上形成的轮廓，指的是“属于该粒子的轮廓”。对凸型粒子而言，在一个截面上最多只能形成一个断面，而对于那些形态极不规则的粒子而言，在一个截面上则可能形成多个断面，此时，这个粒子的轮廓则包括这些分离的断面以及其间的直线连线(图 7-42)。

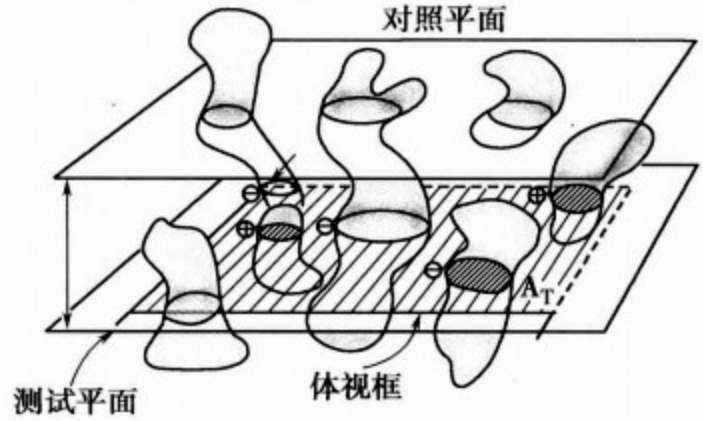


图 7-41 体视框示意图

图中可见按照体视框计数原则，只计数“+”阴影所示的粒子断面，“-”所示的粒子断面虽然在测试平面的无偏计数框内，但是，因为它的轮廓同样出现在对照平面内，所以不能被计数

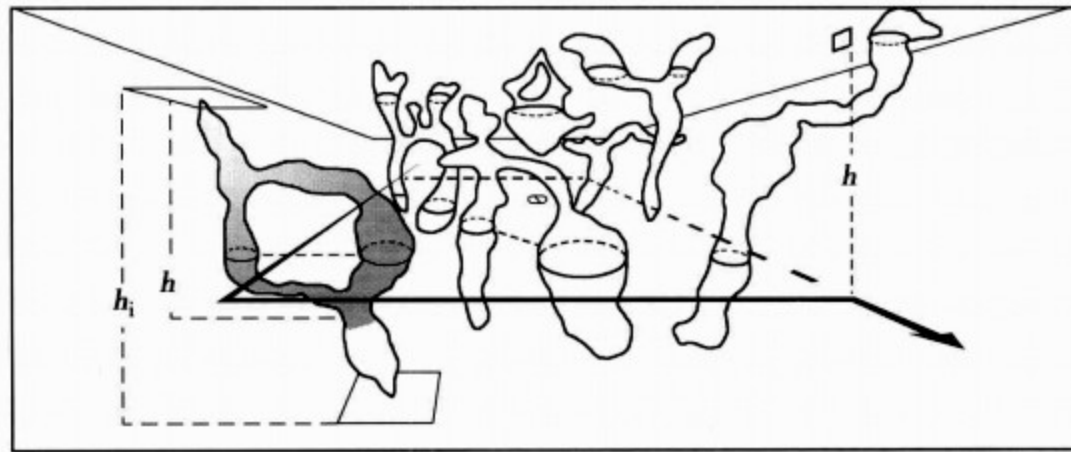


图 7-42 单位体积内粒子数目密度示意图

在测试平面有 4 个粒子被计数。体视框的计数原则为只计数在测试平面而没有出现在对照平面的粒子。这 4 个粒子中的 2 个粒子出现在对照平面，没有被计数。故被计数的是剩下的 2 个粒子。该体视框的体积为：无偏计数框面积(a)乘以体视框高度(h)。因此，单位体积内粒子的数目密度等于 2 除以体视框体积

体视框由两张平行切片组成，两张切片之间的距离为 h。在测试平面放置无偏计数框。其计数原则为计数完全位于计数框内的粒子或部分位于计数框内，但没有触及禁止线和延长线的粒子。当计数时，以属于同一粒子断面和其间的连接线组成的大轮廓为准，阴影所示的粒子不被计数(图 7-42)。

将利用体视框计数得到的粒子总数记为 $\sum Q$ ，利用体视框的总体积为 $\sum V(\text{dis}) = \sum a \times h$ ，则粒子的数目密度 N_v 计算公式为：

$$N_v = \sum Q / \sum V(\text{dis})$$

粒子总数 $N(\text{particles})$ ，等于粒子数目密度乘以参照空间的体积 $V(\text{ref})$ 。计算公式为：

$$N(\text{particles}) = N_v \times V(\text{ref})$$

体视框能正确地在三维空间内计数粒子是因为当一个粒子第一次出现在切面上则被计数。这一特征仅仅与粒子的存在有关,而与粒子的大小、形状和方向无关。在应用时,首先遵照前面介绍的抽样原则进行组织抽样,为保证利用体视框抽选或计数粒子的无偏性,在测试平面和对照平面之间的距离选择上有一定要求,一般距离不要大于任一粒子在垂直于测试平面方向上的直径,以避免粒子在这两个平面之间被遗漏。为准确辨认粒子,体视框的高度最好不超过粒子直径的 $1/3$ 。同时,在测试平面和对照平面上形成的粒子断面应能准确辨认是否是同一粒子形成。

物理体视框是利用两张或两张以上的连续切片,体视框的高度以不大于粒子直径的 $1/3$ 为宜。图 7-41,图 7-42 显示利用两张连续切片作为物理体视框进行粒子计数。如果切片的厚度为 $2\mu\text{m}$,那么,这两张切片构成的体视框高度则认为是 $2\mu\text{m}$;如果所用的两张切片之间间隔两张切片,连续切 4 张 $2\mu\text{m}$ 切片,用第一张和第四张作为对照平面和测试平面,则这个体视框的高度为 $6\mu\text{m}$ 。为充分利用所有的两张切片,最好先以一张切片作为测试平面(即在这张切片上叠加无偏计数框),另一张切片作为对照平面;再翻过来将原来作为对照平面的切片叠加无偏计数框作为新的测试平面,而原来的测试平面作为对照平面。这样,可以进行两次计数却只用切一次连续切片,既节约费用也增加效率。图 7-43 显示利用物理体视框进行海马突触计数。

Gundersen 教授 1988 年发明了光学体视框,即利用高数值孔径的油镜($NA=1.40$)在

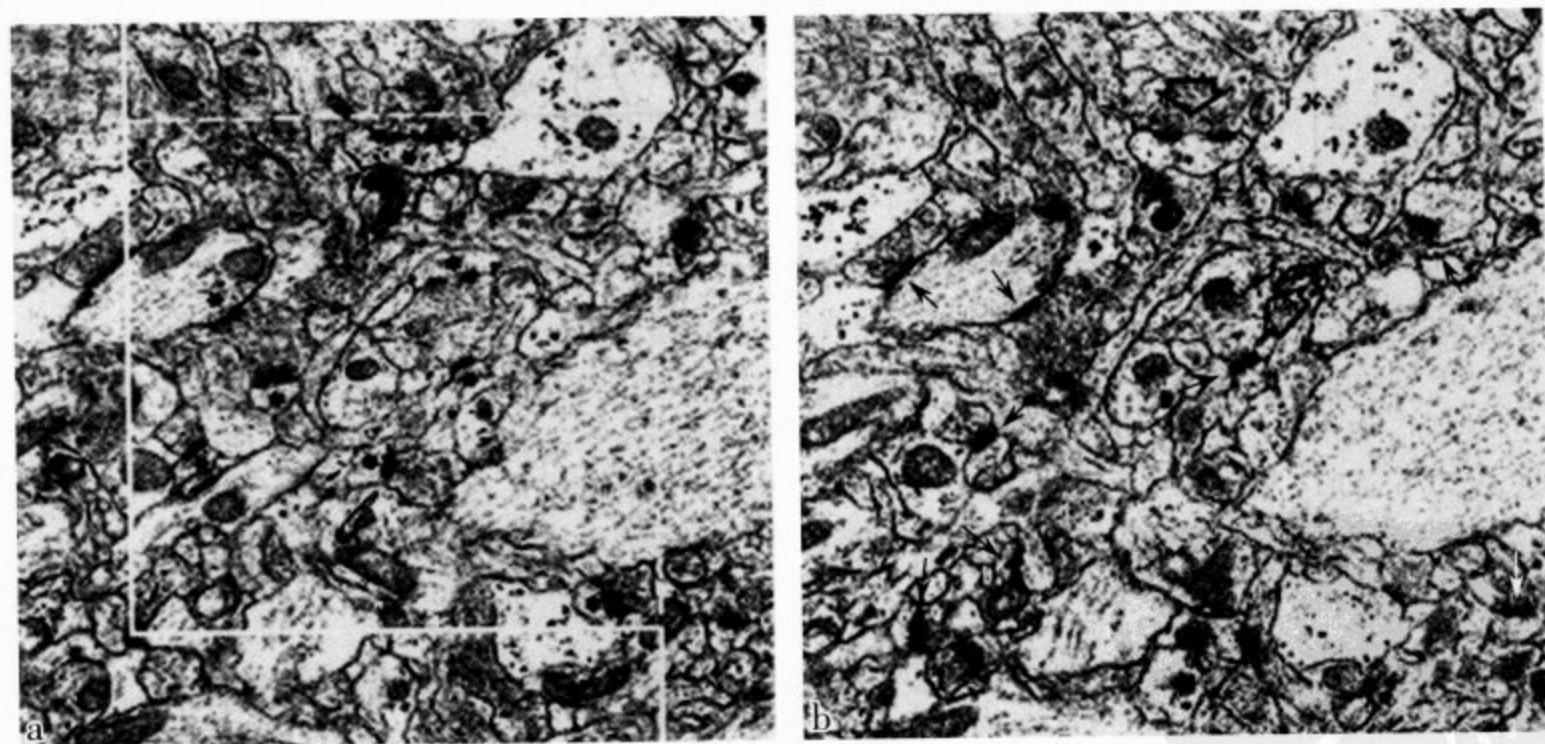


图 7-43 物理体视框计数法应用图

利用物理体视框计数海马突触数目,通过兔海马 CA1 放射层作两张连续超薄切片,在两张切片的同一区域拍摄两张电镜照片,构成物理体视框。物理体视框由测试平面(a)和对照平面(b)构成。无偏计数框随机叠放于测试平面,突触后膜用作计数单位。如果一个突触后膜满足以下条件,此突触则被计数:①完全位于计数框内或部分位于计数框内,但不与禁止线(实线)交叉;②突触后膜仅存在于测试平面而不存在于对照平面。此例中只有手指所指的突触被计数

厚切片内不断聚焦来进行粒子的抽取和计数。在一张厚切片内,运用高数值孔径的油镜可以从上到下连续“断层扫描”观察不同聚焦平面(即光学切片)。这些光学切片则构成光学体视框。从切片表面向下聚焦 $2\sim 3\mu\text{m}$ 后清楚聚焦的平面作为体视框的顶面(对照平面),已经在该平面内出现过的粒子不计数,然后向下不断连续聚焦计数新出现的粒子“头”端(图7-44)。应用此法很容易辨认粒子,同时效率也大大高于物理体视框。然而,对于光学体视框的应用,要求的条件较高,比如厚切片的制作,在进行免疫组织化学染色时需将很厚的切片染透,同时,需要使用高数值孔径的油镜,以及镜头在垂直方向上移动聚焦时,聚焦的距离应有指针测微器测量。同时所连接的采集图像系统应该可以有各种探针的直接叠加。这套光学体视框系统已由Olympus(丹麦)研制成功。图7-45是利用光学体视框研究神经元的实例。

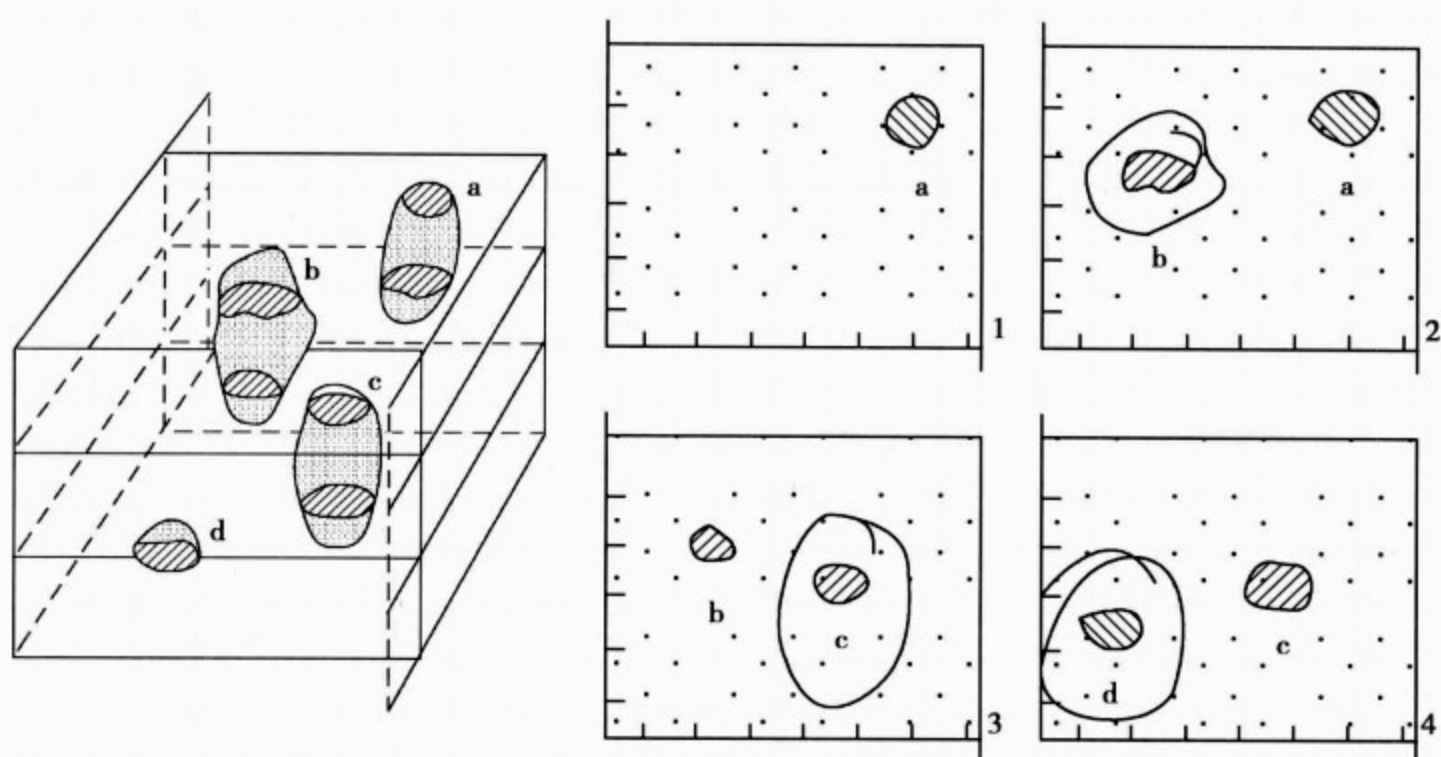


图 7-44 光学体视框示意图

假设 1 平面为聚焦的第一个平面,即对照平面,向下不断聚焦观察粒子,按照体视框计数原则 a 粒子不被计数,在 2、3、4 平面 b、c、d 粒子被计数

2. 分合法 在体视学方法中,无论是确定总体积、长度或表面积还是计数粒子总数,无一例外地需要知道参照空间的总体积。利用体视框进行粒子数目计算,最为关键的一点也是明确两张连续切片之间的距离,并根据这个距离和计数框的面积得到单位体积内粒子数目,并最终根据参照空间总体积得到粒子总数。

1986年,Gundersen教授把分合法(fractionator principle)原理引入生物医学定量研究中。分合法有别于前面介绍的密度和体积估计的二步法,分合法不要求获得参照空间的体积。在计数特征粒子的总数时,我们无法做到将整个组织结构,即参照空间内的粒子全部进行一次计数,而往往会从整个参照空间内选择一部分进行计数。分合法的原则包括已知的均匀随机抽样率、根据从抽样所得样本中计数的粒子数和均匀随机抽样率最终得到的粒子总数(N)。例如,将一个包含有特征粒子的器官切成未知数量、大小和形状的组织小块,系统随机地从这些组织小块中抽取一些样本进行粒子计数,并且明确抽样率为 $1/15$ 。因为采

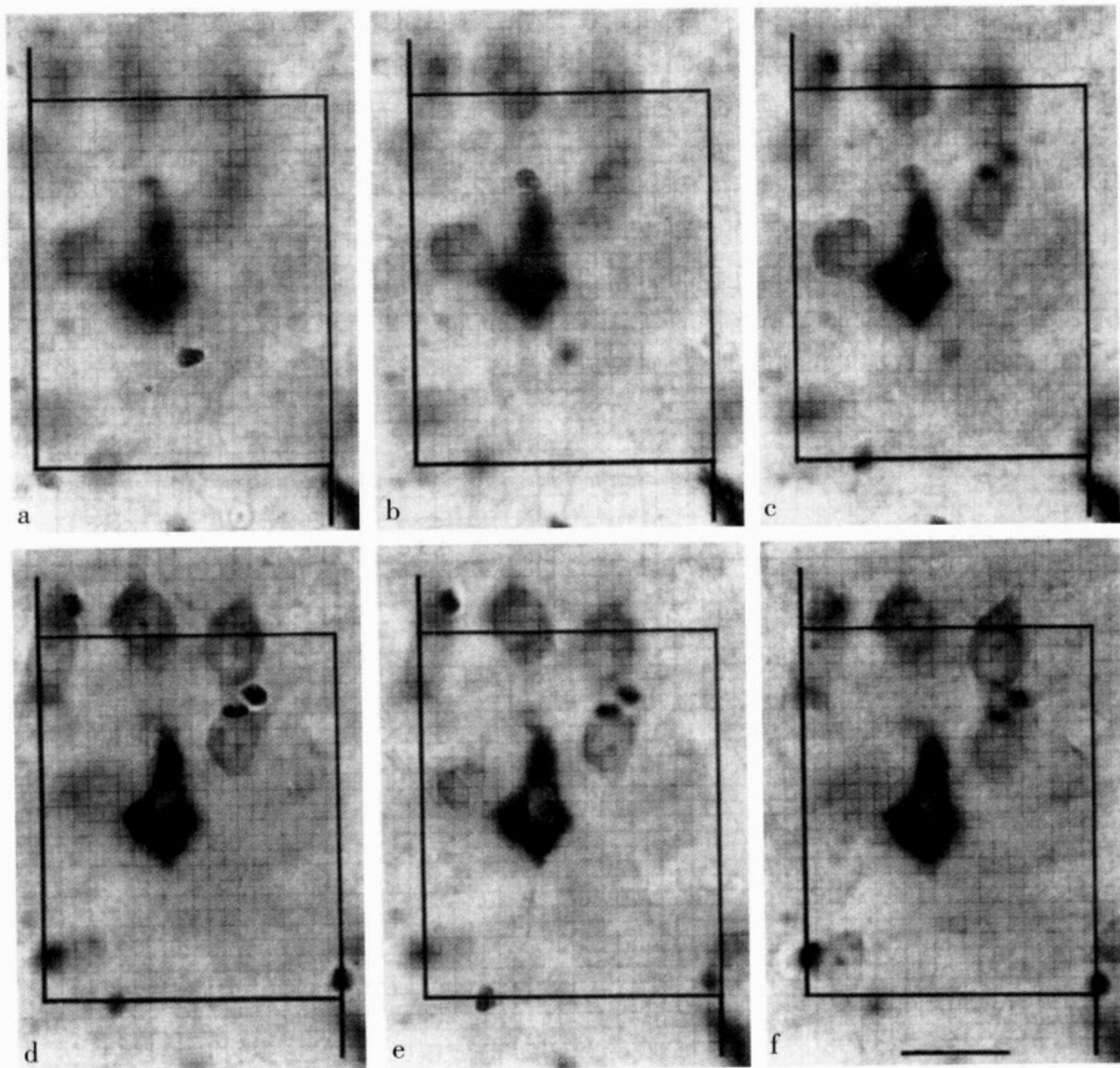


图 7-45 光学体视框计数实例图

图中显示经过原位杂交后的生长抑素 mRNA 阳性细胞, a~f 显示细胞随着镜头纵向移动从未聚焦到聚焦, 最后又再次模糊的过程。首先, 确定在此切片内使用体视框的高度, 如中间 $10\mu\text{m}$ 。通过移动显微镜焦距, 在计算机屏幕上出现连续的光学切片(a~f), 在体视框高度内, 当一个细胞第一次清楚地被聚焦并没有与计数框的禁止线有任何交叉, 此细胞则被计数

取的是系统随机抽样方式, 所以, 在整个器官中, 所有的特征粒子均有均等的机会被抽取。这样, 整个器官内粒子总数(N)便可以通过样本中粒子数目(N')和抽样率的倒数得到: $N = N' \times 15$ 。这一方法则是利用分合法无偏估计粒子总数的过程。抽样时可以两步或者更多步。一个包含有特征粒子的器官, 将其切成连续切片, 然后按照均匀随机抽样原则和一定抽样率进行抽样; 再将抽取的组织片连续切成组织条, 并按照同样的原则进行二次抽样; 将抽取的组织条切成组织小块, 我们不可能将所有的组织小块都进行样品制备以及切片计数, 所以, 只需要在这些样本块中按照同样原则抽取一部分即可。利用样本块进行连续切片, 在测试面叠加系统计数框, 每十个计数框计数一个即可, 计数框的抽样率可根据具体情况确定。

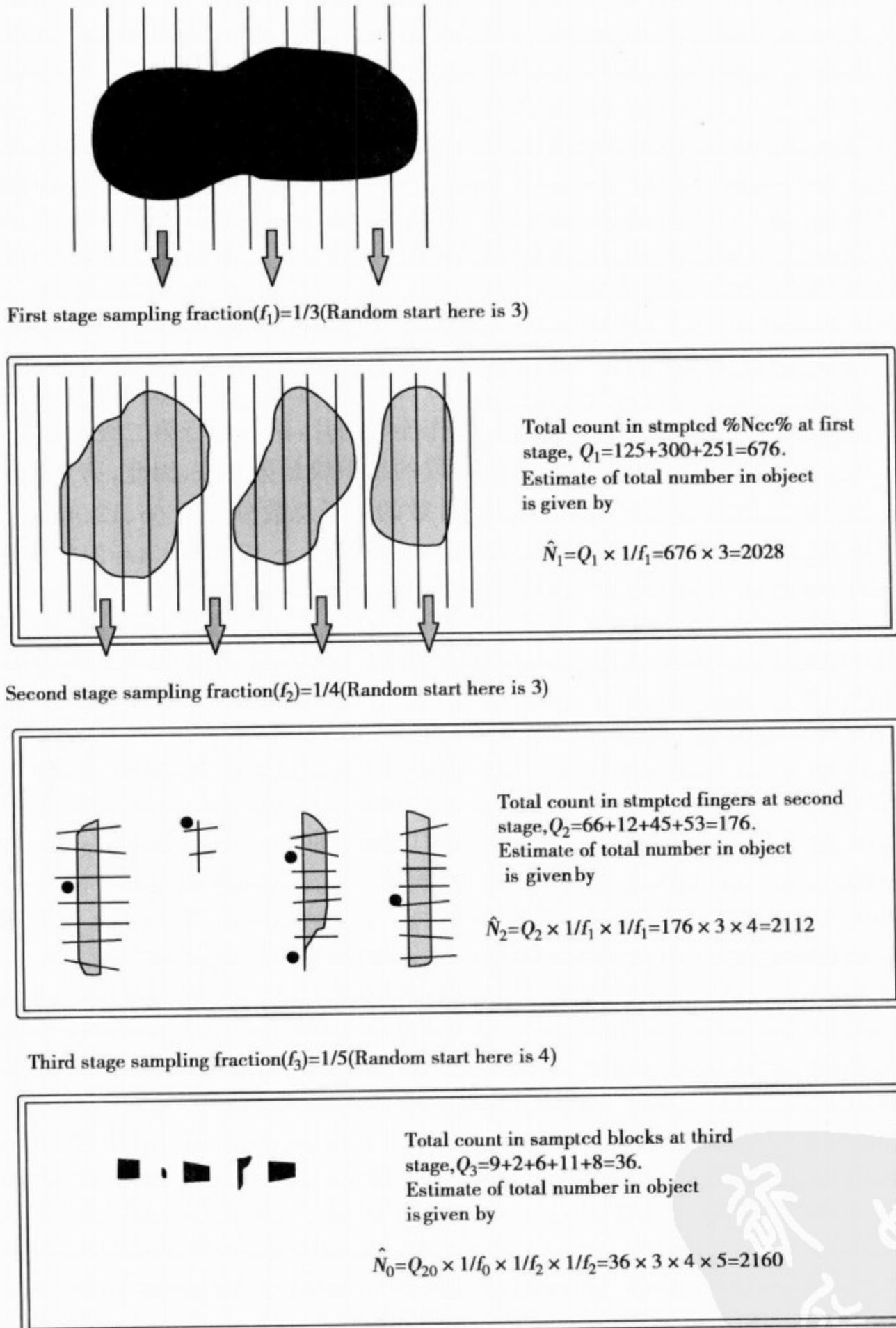


图 7-46 分合法示意图

通过器官作连续切片,每间隔 3 个组织块抽取 1 个组织块,第 1 个随机开始抽取的组织块是第 3 张。因此,组织块的抽样分数为 $1/3(f_1)$ 。从抽取的 3 个组织块中计数的粒子数目分别为 125、300、251,总和为 676(Q_1)

最后,将所得样本粒子数 N' 与每一次抽样率的倒数相乘便得到器官内特征粒子总数 N (图 7-46)。以如此方式进行粒子总数计算,即便像肝脏或者肾脏这样的器官也可以以 $1/10$ 为每次的抽样率,这样,将最后计数的样本粒子数乘以 $100\ 000$ 或 $100\ 000\ 000$ 即可。分合法最显著的特性在于不需要知道两个连续切片间厚度和放大率等数据,同时计算结果也与组织因皱缩或者肿胀造成的组织变形无关。在利用体视框进行粒子总数计算时,存在 $\Sigma V(\text{dis})/V(\text{ref})$ 之比,样本脱水、包埋和切片等是在进行参照空间体积测量之后进行,因此,需要对因组织处理过程造成的参照空间体积改变进行校正。而分合法克服了这一缺陷。当正常组织和病理组织对于脱水反应不同或者当进行石蜡包埋时,选择分合法是解决组织皱缩问题的最简单方法。

被测器官内粒子总数目(N_1)等于计数的粒子总数乘以抽样分数的倒数: $N_1 = Q_1 \times 1/f_1 = 676 \times 3 = 2028$ 。对图 7-46 中抽取的组织块再作连续切片,然后进行第二级等距随机抽样。每隔 4 张抽取 1 张组织块,第 1 个随机开始抽取的组织块是第 3 张,因此,第二级抽样的抽样分数是 $1/4(f_2)$ 。在 4 个抽取的组织块中计数的粒子总数分别为 66、12、45、53,总和为 176(Q_2)。该器官内粒子总数估计为: $N_2 = Q_2 \times 1/f_1 \times 1/f_2 = 176 \times 3 \times 4 = 2112$ 。对上面抽取的组织块继续作连续切片,然后进行第三级等距随机抽样,每隔 5 张抽取 1 张,第 1 个随机抽取的组织块为第 4 块,因此,抽样分数为 $1/5(f_3)$ 。在这 5 个抽取的组织块中计数的粒子分别为 9、2、6、11、8,总和为 36(Q_3)。该器官内粒子总数估计为: $N_3 = Q_3 \times 1/f_1 \times 1/f_2 \times 1/f_3 = 36 \times 3 \times 4 \times 5 = 2160$ 。

3. 光学分合法 光学分合法(optical fractionator)是分合法与光学体视框相结合的产物,是一种用于研究器官内待测粒子数目的体视学方法。某一器官内待测粒子总数目等于运用光学体视框最后计数的粒子数目(ΣQ^-)乘以切片抽样分数的倒数($1/\text{ssf}$),乘以面积抽样分数的倒数($1/\text{asf}$)和乘以高度抽样分数的倒数($1/\text{hsf}$),即 $N = \Sigma Q^- \times 1/\text{ssf} \times 1/\text{asf} \times 1/\text{hsf}$ (图 7-47)。图 7-48 是利用光学分合法进行海马树突棘数目研究的例子。

在抽取的组织切片上,每个视野在 x 轴和 y 轴上移动的距离为 Δx 和 Δy 。每个小框中左上角的小黑框 a/f ,为计数粒子数目的区域。因此,在切片上面积抽样分数为: $\text{asf} = (a/f)/(\Delta x \times \Delta y)$

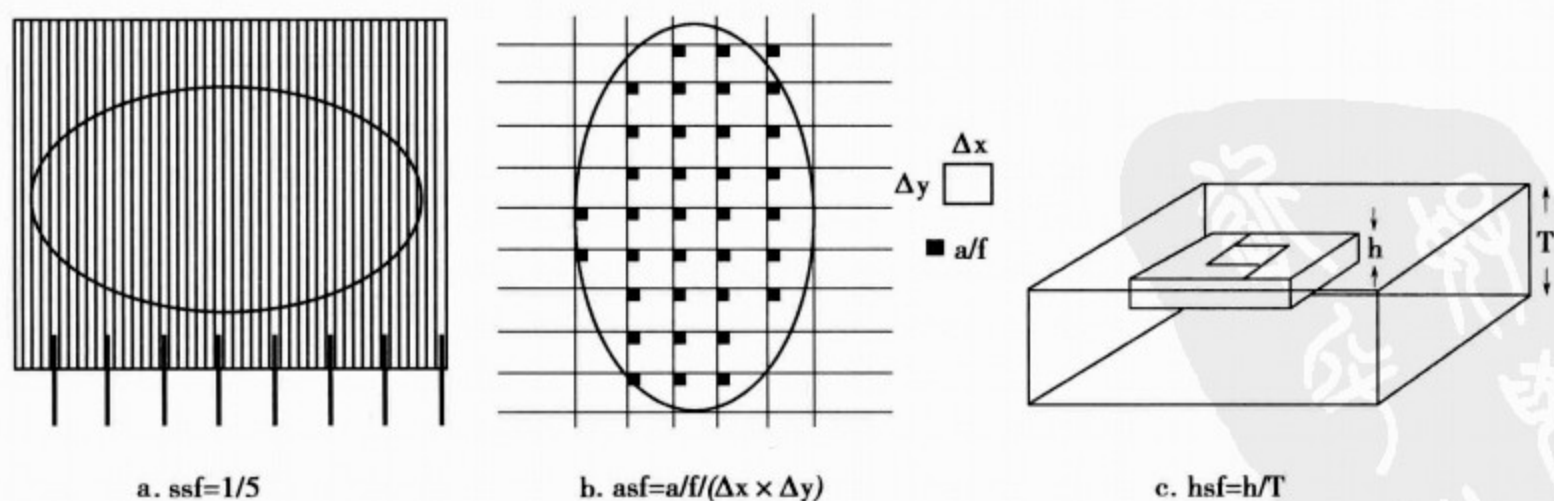


图 7-47 光学分合法原理示意图

a 为一系列连续切片,切片厚度为 T ,从切取的切片中系统随机抽取切片,每间隔 5 张切片抽取 1 张,第 1 张切片在 1 到 5 之间随机选择,因此,切片的抽样分数为 $1/5$

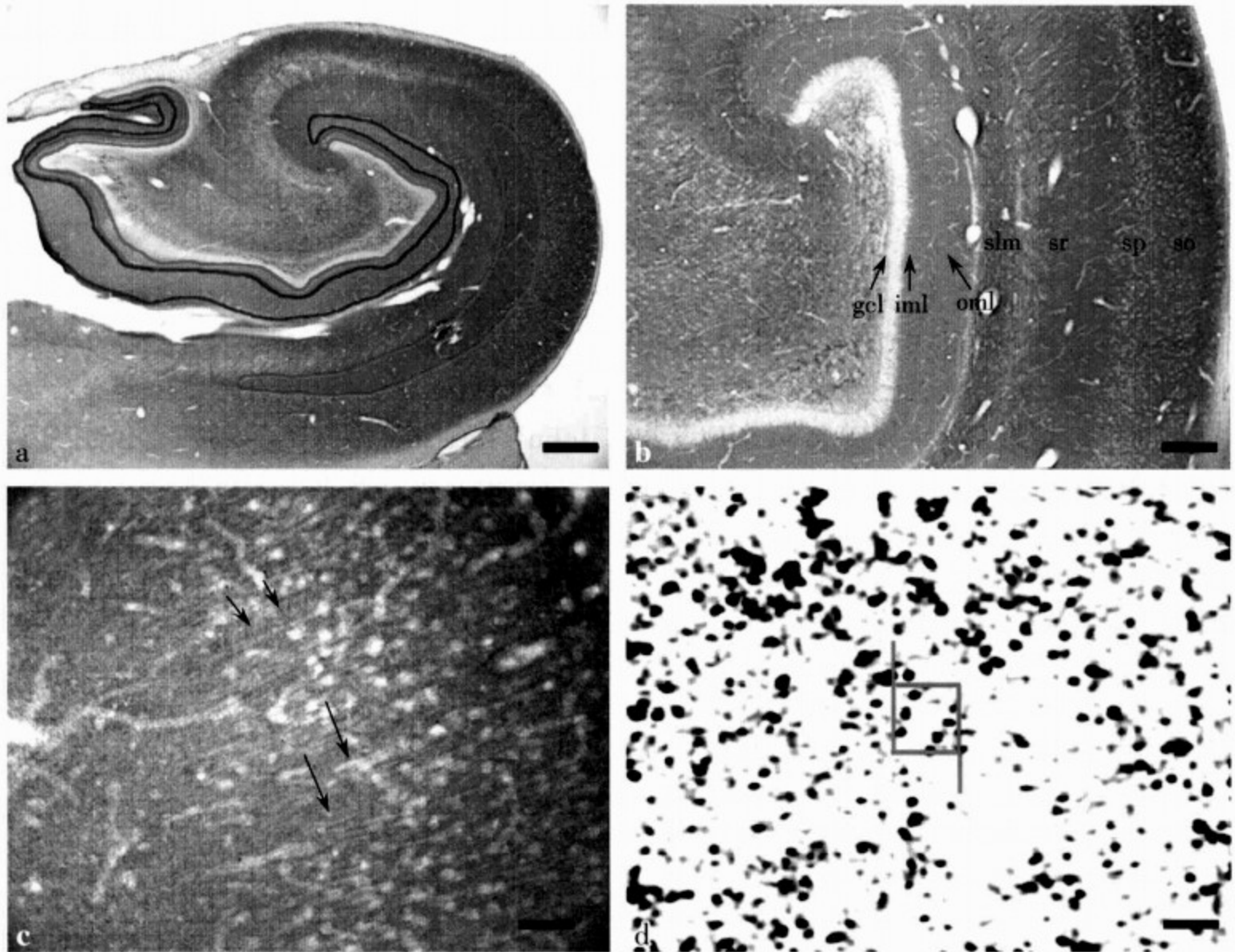



图 7-48 应用光学分合法计数海马树突棘数目示意图

首先实施猴海马连续切片,每隔 24 张切片抽取 1 张。在随机抽取的切片中,用抗树突棘抗体标记树突棘,运用光学分合法原理计算海马各区的树突棘数目。a:绿色区域为海马 CA₁ 放射层,红色区域为齿状回内分子层,蓝色区域为齿状回外分子层;b:海马不同区域内免疫反应强度不同;c:树突干处免疫反应阴性;d:体视学分析时组织图像所采用的放大倍数。图中所示的大量斑点为海马 CA₁ 放射层内免疫阳性反应树突棘,计数框为无偏计数框

Δy)。在每一个抽取的视野通过体视学软件系统设置扫描进入组织的高度,即光学体视框的高度(h)。因此,在 Z 轴方向组织的高度抽样分数为: $hsf = h/T$, T 为切片厚度(图 7-47C)。通过该结构总的抽样分数为: $ssf \times asf \times hsf$ 。

(唐 勇)

应用举例——体视学在雌激素替代治疗改善老年
大脑功能研究的应用

在许多国家,随着生活水平的提高和医学的迅速发展,人均寿命也在延长。妇女在绝经期以后的生存时间几乎占据成年时期的一半,然而,绝经期以后由于妇女卵巢功能衰退,认知能力下降,记忆力减退,严重影响生存质量,因此,这一问题引起各国学者的关注。美国西奈山医学中心著名神经科学专家 John Morrison 教授领导的研究小组早在 1999 年便开始这方面的研究,他们发现,雌激素替代治疗可以改善或完全消除老年猴大脑额叶和海马功能的降低(Rapp PR, et al, 2003)。正当此项研究取得一些进展时,我有幸进入 John Morrison 教授的实验室工作。为什么雌激素能改善老年动物大脑功能呢?这是当时研究小组共同面临的问题。John Morrison 教授决定实验以雌性年轻和老年恒河猴各 16 只为研究对象,对每只猴实施卵巢切除术,然后从雌激素替代治疗两年后对额叶皮质和海马的行为学测试和形态学定量研究入手。我负责的项目是设计如何能利用有限的标本获得足够数量用于电镜定量研究的组织块,以及满足各种免疫组织化学定量和体视学研究的组织学切片和足够数量用于额叶皮质和海马某一区域内神经元细胞内注射的组织片。由于得到这些卵巢切除后雌激素替代治疗两年的恒河猴脑标本非常不易,而且成本价格高,所以,如果一旦设计失误,再想重新获得这些标本几乎是不可能的。实验对这些标本的处理方式要求颇高,既要充分利用这些标本,又要满足体视学方法对形态学定量研究的要求,这对我来说,可谓是一个极大的挑战。经过调研和反复思考,终于决定运用体视学中等距随机抽样方法设计对这些脑标本的处理方式。首先,通过额叶皮质(海马)连续切 10 张 $50\mu\text{m}$ 厚的组织切片,第 1 张切片开始的位置在 $1\sim 50\mu\text{m}$ 之间随机选择;随后切 2 张 $200\mu\text{m}$ 厚的切片(用于神经元细胞内灌注)和 1 张 $400\mu\text{m}$ 厚的切片(用于电镜组织块的包埋);然后反复重复这一过程,直至完成整个前额叶皮质(海马)的切片。如此获得 $200\mu\text{m}$ 厚的组织片,采用细胞内注射灌注额叶皮质第三层神经元,并运用激光扫描共聚焦显微镜观察神经元及其突起,进行三维重建,最后对重建的神经元树突长度、树突棘的数目及树突棘的形态等进行定量研究,结果得出雌激素替代治疗可增加海马神经元树突棘的数量和长度(Hao J, et al, 2006, Hao J, et al, 2007)。我们利用所得的 $50\mu\text{m}$ 厚切片,以抗-Spinophilin 抗体作为树突棘标记物,运用体视学方法(光学分合法)发现额叶皮质和海马亚区树突棘数目的变化。从而得出:无论是年轻还是老年受试者,雌激素替代治疗可以显著增加神经元树突棘数目(Tang Y, 2004, Hao J, 2003)。用于电镜观察的组织块,按体视学原理在所要研究的区域内做随机抽样,把抽取的组织包埋成电镜组织块,在定量研究中确定了雌激素替代治疗后海马 CA1 区神经元的突触数目。剩余的电镜组织块构成标本库,成为以后电镜定量研究的标本来源。为回答雌激素替代治疗是通过何种途径影响神经元突触的可塑性,我们又进一步利用

电镜组织块完成了雌激素 α 受体的免疫组织化学定位和轴突终末、树突棘的雌激素 α 受体定量研究。由于运用体视学中等距随机抽样方法,最大限度利用了难以获得的珍贵脑标本,使这一美国国家卫生研究所资助一千万美元的重大课题得以完成,并取得了重要的研究成果。

(唐 勇)

参 考 文 献

1. Rapp PR, Morrison JH, Roberts JA. Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5708-5714.
2. Hao J, Rapp PR, Leffler AE, et al. Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys. *J Neurosci*, 2006, 26(9): 2571-2578.
3. Hao J, Rapp PR, Janssen WG, et al. Interactive effects of age and estrogen on cognition and pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex *PNAS*, 2007, 104(27): 11465-11470.
4. Tang Y, Janssen WG, Hao J, et al. Estrogen replacement increases spinophilin-immunoreactive spine number in the prefrontal cortex of female rhesus monkeys. *Cereb cortex*, 2004, 14(2): 215-223.
5. Hao J, Janssen WG, Tang Y, et al. Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J Comp Neurol*, 2003, 465(4): 540-550.



第八章 显微摄影技术

组织化学与免疫组织化学研究目的是将存在于组织或细胞中的待测物通过有色沉淀、荧光或高电子密度的物质显示出来,使看不见或分辨不清的待测物变为看得见,分得清。为长期保存研究结果,便于分析和交流,则需应用显微摄影技术将研究结果真实地记录下来。虽然摄影图像是一种二维平面图像,但是其明暗、色彩和形状与被摄物具有一一对应关系,就像人们亲眼目睹一般,其逼真性通常不会使人们怀疑摄影的真实性。摄影作为媒介实现视觉信息的传达,其功能在某些方面超越了文字和绘画,它比文字更具体和直观,比绘画更为精确,因此,一篇好的研究论文,无论是细胞水平,还是分子水平,甚至基因水平,越来越趋向于用好的图片来说话,以至于人们形成了看文章先看图片的习惯。“A image is worth a thousand words”说的就是这个道理。摄影术在其诞生之时就具有审美价值,对于注重“色彩”的组织化学与免疫组织化学则更不例外,尤其是多重免疫荧光标记与激光扫描共聚焦显微技术的应用,使免疫荧光技术迈进了一个“五彩缤纷”的科学艺术天地(图 8-1)。研究者在镜头前的空间创作与选择,使摄影既达到纪实的目的又有视觉艺术的效果。

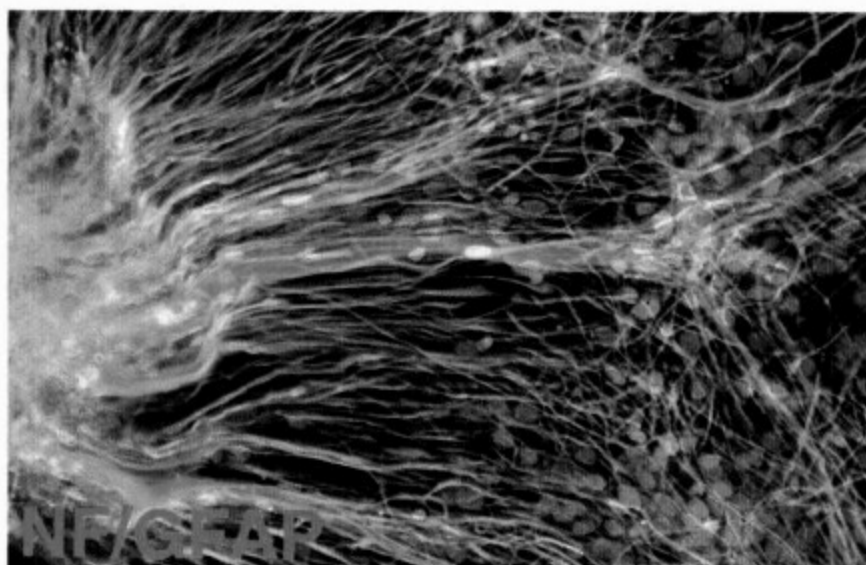


图 8-1 神经干细胞体外培养分化的免疫荧光细胞化学染色
(美国威斯康辛大学张素春教授供图)

显微摄影技术(photomicrography)是指利用显微照相装置,把显微镜下观察到的图像拍摄下来,制作成照片,或将图像信息传输和记录于其他仪器设备,以供进一步研究和分析。近年来,随着数码技术的日益提高和普及,克服了传统胶片显微摄影技术的不足,使显微摄影变得更为方便、高质量和高效。但利用数字影像处理软件对图像进行篡改伪造的案例也时有发生,这种行为与科学伦理道德要求完全背道而驰。“真实”是显微摄影的目的和生命,在此前提下,如何获取高质量图像则与显微摄影技术有密切关系。在科技高度发达的今天,尽管有很多先进的显微摄影设备相继问世,具有高性能及高自动化等特点,但是显微摄影技术是一门综合技术,即使是相同的设备,并不一定能获得同样质量的图片,因此,除有先进设备外,熟练掌握显微摄影原理和技术是非常必要的。

第一节 摄影基础

由于显微摄影是摄影学的一个分支,它们所用的一般原理和方法均相同,但是,显微摄

影是通过显微镜的光学系统成像,因此又有其特殊性。为能更好地学习显微摄影技术,有必要对摄影的基础知识作一般了解。

一、照相机镜头

镜头是照相机的关键部件,镜头的分辨率和色彩还原是鉴别镜头质量的重要标志之一。照相机的镜头由多片凸透镜和凹透镜与相应的金属零件组合而成。镜头的光学结构通常采用透镜片组表示(图 8-2)。凸透镜有会聚光线的的能力,凹透镜只能发散光线不能成像,它们相互作用,加强纳光性能,提高结像质量,减少相差。镜头之所以能成像是被摄物通过透镜聚成影像,当光线穿过透镜时,即向主轴折射,而后到达像屏上,会聚成影像,被摄物各个部分的位置和原物体完全相反,即上下颠倒,左右移位。

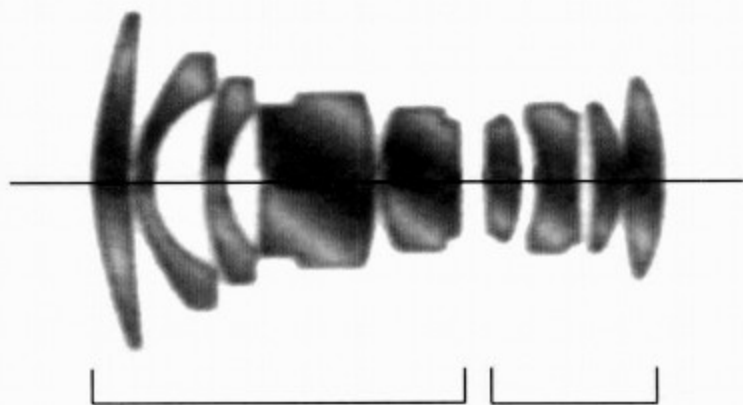


图 8-2 透镜片组

(一) 照相机镜头口径

镜头的口径又称“有效口径”,也就是镜头的最大光圈。镜头通光孔的口径越大,其通光量越多,镜头通光孔的口径越小,通光量越少,故镜头通光量的多少与镜头通光口径的大小成正比。但是,感光片接收光量多少除与通光孔大小有关外,还与镜头的焦距长短有关。所以,镜头口径通常采用最大光孔直径与焦距的比值来表示,如 50mm 焦距的镜头最大光孔直径是 25mm 时,用 1:2 表示,简称该镜头的口径为 F2;当它的最大光孔直径为 35mm 时,用 1:1.4 表示,该镜头的口径简称为 F1.4,由此可见, F 系数越小,表示镜头口径越大。口径越大的镜头,使用起来越方便,如可以在较暗的光线下快速曝光。

(二) 照相机镜头种类与焦距

镜头的焦点距离,简称焦距(focus),一般是以 f 或 F 等于某数来表示。如 50mm 焦距的镜头,其标志为 $f=50$, 或 $F=50$ 。

1. 标准镜头 所谓标准镜头是针对拍摄胶片的尺寸而言,底片越大,产生覆盖“标准”视场的影像所需镜头的焦距越长。换言之,底片大小的不同,使产生覆盖胶片的影像所需的镜头焦距也不同。如 60mm×60mm 的胶片对角线长度约为 80mm,因此,焦距为 80mm 的镜头是该胶片的标准镜头;又如 24mm×36mm 的胶片(135 胶片),标准镜头的焦距为 50mm 左右,依此类推。标准镜头的视场角度与人眼所看到的景物视场角度大致相同,故具有真实感。

2. 广角镜头 焦距短于底片对角线的镜头称为短焦距镜头或广角镜头,它比标准镜头焦距短,视场角度大。135 相机广角镜头的焦距一般为 17~35mm,焦距越短,视角越大(图 8-3),并且景深也随之增大。

3. 远摄镜头 远摄镜头又称长焦距镜头,是指焦距长于底片对角线的焦距镜头。以 135 相机为例,焦距在 200mm 以上,视角在 8° 以下(图 8-3),这类镜头在拍摄距离较远而又不宜靠近被摄物的情况下非常有用。

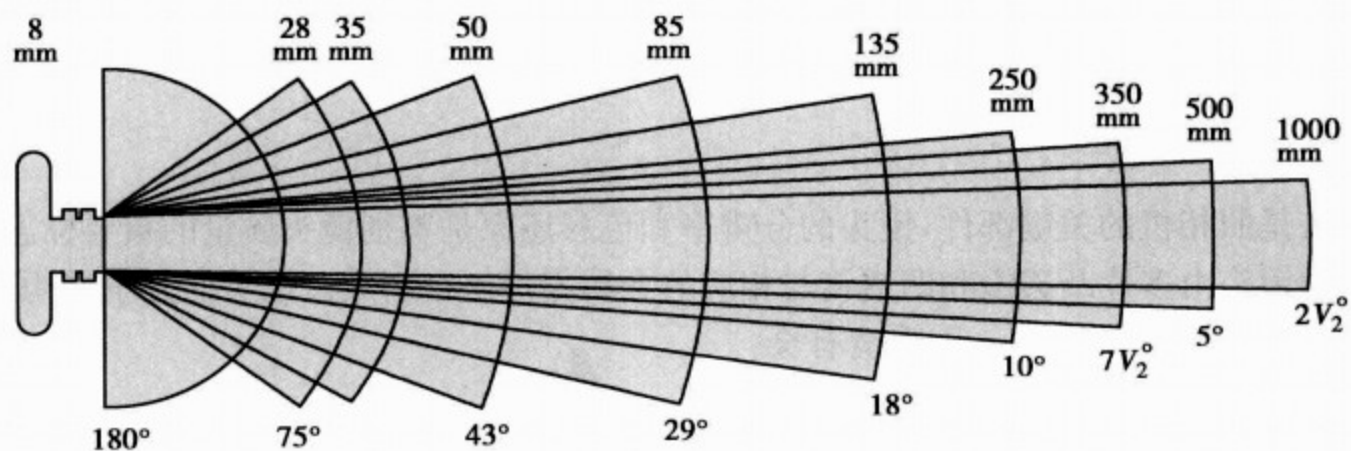


图 8-3 不同焦距镜头的视角

4. 中焦距镜头 中焦距镜头又称“肖像镜头”。焦距在 80~135mm, 小于 85mm 的镜头拍摄肖像容易变形, 而大于 135mm 的镜头拍摄肖像容易产生面部扁平。只有用中焦距镜头拍摄时, 拍摄对象才逼真和自然。

焦距在摄影中有五个主要功能, 如表 8-1 所示:

表 8-1 焦距的功能与作用

焦距长	焦距短	焦距长	焦距短
视角窄	视角宽	影像变形小	影像变形大
景物影像大	景物影像小	反差弱	反差强
景深短	景深长		

二、控制曝光

欲得到一幅理想照片, 使胶片正确曝光是其关键。影响胶片曝光的因素有三个: 即镜头光圈、快门速度和胶片感光度。这三个控制因素的组合决定曝光正确与否。前两者决定照射到胶片的光线多少, 后者决定胶片对光的反应速度。

(一) 光圈

光圈(aperture)是由若干金属薄片组成, 安装在镜头内部。可以均匀地自由开合, 以调节镜头的相对口径。控制进光量是光圈的主要作用, 光圈缩小, 相对口径也随之缩小; 光圈开大, 相对口径也随之开大(相对口径是指各级光圈直径与焦距之比)。在镜头壳侧面刻着光圈系数。标志相对口径的系数, 称为 f 系数, 通常称之为光圈系数。一般多数相机采用的数值为 $F1.4$ 、 $F2$ 、 $F2.8$ 、 $F4$ 、 $F5.6$ 、 $F8$ 、 $F11$ 、 $F16$ 、 $F22$ 、 $F32$ 等。数字越大, 光圈越小, 对于上述光圈数值, 可用“ 2^n ”次方计算任何两档光圈进光照度的倍率关系, n 为不同光圈之间相差的档数, 例如: $F2$ 与 $F8$ 相差 4 档, $2^4 = 16$, 这就说明 $F2$ 的进光照度是 $F8$ 的 16 倍。光圈的第二个作用是调节目深(拍摄对象的最近清晰点至最远清晰点之间的范围), 光圈小时, 景深长, 光圈大时, 景深短。光圈的第三个作用是调节焦深, 即焦点的深度。光圈的第四个作用是调节反差, 光圈大, 反差小, 光圈小, 反差大。光圈的第五个作用是调节分辨率。分辨率除由镜头本身质量决定外, 还受光圈大小的影响, 每只镜头均

有其最佳光圈,使用最佳光圈时,镜头的分辨率和影像反差均处于最佳状态,一般来说,把镜头的最大光圈数值收缩三档,则是该镜头的最佳光圈。如一只最大光圈数值是 F22 的镜头,收缩三挡,最佳光圈为 F5.6(图 8-4)。

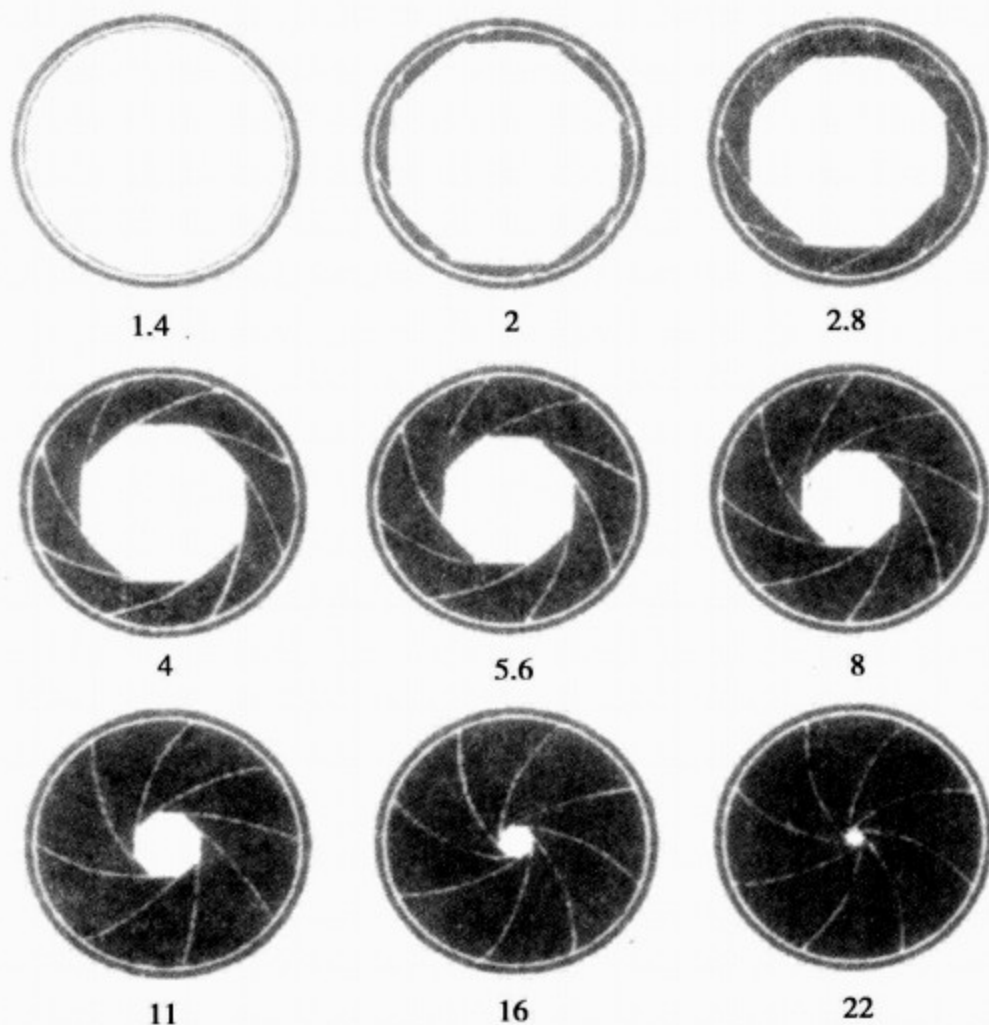


图 8-4 光圈系数与光孔的大小

(二) 快门

快门(shutter)是确定光圈的开启时间,用来控制感光片曝光时间长短的装置。快门的速度标记常见的有 1、2、4、8、15、30、60、125、250、500 及 1000 等,这些数字均是表示实际快门速度的倒数秒。快门开启时间长短与曝光量的多少成正比,如 1/50s 比 1/100s 时间长一倍,曝光量也多一倍。

从曝光均匀这一意义上来讲,使用小光圈慢速度,比使用大光圈快速度为好。从快门本身性质来讲,也是慢速度比快速度好,一般认为比较理想的快门速度为 1/60~1/100 秒。

由于光圈和快门是控制曝光的主要因素,因此两者的关系显得尤为重要。每档光圈系数(f 系数)或快门速度都是其相邻的 f 系数或快门速度光量的两倍或一半,如 f 11 是 f 8 通过光量的一半,但又是 f 16 的两倍;1/60 秒的快门速度是 1/30 秒光照时间的一半,但又是 1/125 秒的两倍。因此,f 系数和快门速度之间存在一种倒易律关系。如果快门速度降低(即允许更多光线照到胶片上),光圈必须缩小(即让少量光线照到胶片上),才能获得等量的曝光。下面的 f 系数与快门速度的组合会产生完全相同的胶片曝光量:f 16, 1/30; f 11, 1/60; f 8, 1/125; f 5.6, 1/250; f 4, 1/500。若使用这五组不同的曝光组合拍摄,可以获得五张曝光相同的底片。如何选择一组光圈和快门速度组合呢? 这要根据不同照片的需要进行,

如果需要获得较大的景深,可选用较小的光圈,但是要承担影像模糊的风险,如果要凝结运动物体的动作,选用较高的快门速度,但要牺牲一些景深。

(三) 胶片的感光度

胶片的感光度(sensitivity)也像光圈和快门一样影响曝光,高感光度胶片即快速胶片,比慢速胶片对光更敏感,所以需选用较小的光圈或较高的快门速度。对于胶片感光度的细节我们将在本节后面叙述。

三、景深

景深(depth of field)是指拍摄对象的最近清晰点至最远清晰点之间的范围。人们通常理解只要对被摄物体聚焦,即可拍摄,实际上在被摄物体周围还有一个清晰范围,并且这个清晰范围的大小由摄影者控制,而对景深的控制是摄影作品成败的重要因素之一。在被摄物前有一段清晰范围,称前景深;被摄物后的一段清晰范围,称后景深。从前景深到后景深总称为景深。景深受三个因素的影响,即光圈、镜头焦距和物距,三者相互配合方能达到拍摄所需要的景深。

(一) 光圈口径对景深的影响

光圈的作用之一是影响景深的大小,光圈越小,景深越长;光圈越大,景深越短。无论是一般摄影还是显微摄影,此原理应用甚广。

(二) 镜头焦距对景深的影响

镜头焦距越短,景深越长,镜头焦距越长,景深越短。如拍摄大画面风景时,为获取较长的景深和较宽的视角,常使用短焦距镜头;欲获得较大的影像和虚化的背景,常使用长焦距镜头。

(三) 物距对景深的影响

摄影者与被摄物体之间的距离简称“物距”。物距的变化与景深的变化成正比,物距越远,景深越长,物距越近,景深越短。

四、感光片

感光片(film)的主要功能是通过相机的光学镜头,把拍摄的景物在感光乳胶上记录下来。感光乳剂随着光线的强弱发生不同变化,而产生“潜影”,再通过冲洗,潜影则转变为可见的影像。感光乳剂是胶片成分中唯一具有感光作用的物质,乳剂的主要成分是卤化银和明胶,其中卤化银又称银盐,包括溴化银、碘化银和氯化银,其感光性能由强变弱。银盐受到光照后还原为银颗粒,在胶片上产生潜影。明胶的粘性能帮助卤化银附着在片基上。

(一) 彩色负片

这种感光材料经过拍摄及感光所得到的是与原景物相反的负像彩色底片,需要通过彩色相纸的洗印才能获得与原景物相同的彩色影像。由于它有相对较高的曝光宽容度,价格便宜,所以成为胶片使用率最高的一种。

(二) 彩色反转片

又称正像底片。这种感光材料是经过拍摄感光、反转冲洗,获得的与原景物颜色相

同的正像。其主要用途有两种,一是制成幻灯片,二是印刷制版。在用作印刷制版方面明显优于其他胶片,从画面的影像清晰度、色彩还原及细腻的程度均有突出表现。但是,彩色反转片的曝光宽容度和对光源的色温要求较高,所以要求曝光数值非常准确。

(三) 感光度

是指胶片的感光速度,也就是胶片对光线照射时反应能力的强弱。感光度与它所需要的曝光量成反比,感光度愈高,需要的曝光量愈少。感光度的高低主要取决于胶片乳剂的制备和加工工艺,一般情况下,感光度高,卤化银颗粒较大,对光线吸收能力强;反之,感光度低,卤化银颗粒较小,吸收光线的的能力弱。因此,在光线较弱的环境下拍摄,常使用快速胶片,但是,感光度的胶片产生的影像颗粒较大,质感欠细腻,所记录的色调等级多,反差小;而慢速胶片产生的影像颗粒要比快速胶片产生的更细,反差也相对较大,因而所形成的影像质感细腻,深受摄影爱好者的青睐。

目前,常用的感光度表示方法有:德国的“DIN制”、美国的“ASA制”和中国的“GB制”,其中“GB制”与“DIN制”表示的感光度数值相同。1980年开始实行国际标准感光度,以ASA和DIN为基础,符号为ISO,表示方法:ISO 100/21°、ISO 200/24°、ISO 400/27°。通常使用较多的是ISO 100/21°。

(四) 反差

观察一幅照片时,总能看到不同层次的深浅变化,照片中不同部分的明暗差别程度称之为反差,明暗对比强烈,则反差大;反之,则反差小。影响照片反差的因素首先是被摄物本身,被摄物各部分的亮度差与色彩饱和度直接影响反差的大小。在彩色对比中,黑白相邻、红绿相邻及蓝黄相邻等等对比色相邻时,只要它们的明度相等,它们的反差最高,使人感到对比强烈和鲜明。其次,如前所述,胶片感光度的高低、光圈和镜头焦距也会影响反差的强弱。

五、常用滤色镜的作用

滤色镜是摄影中常用的附件,它对光波可以进行有选择的吸收和透射处理。在讲述滤色镜之前,需对原色光和补色光等概念作一般了解。

(一) 原色光和补色光

白色光是由红色光、绿色光和蓝色光三种光等量混合而形成。我们所见到所有景物的色彩均是它们对红、绿、蓝三色光的透射、反射和吸收造成的。所以,红、绿、蓝是一切色光的基本色光,简称三原色(图8-5a)。在三原色中两种相邻色等量混合,得出一种新的颜色,称为补色,即:红加绿等于黄;蓝加绿等于青;红加蓝等于品红;同样,两种补色相混合,得出一种原色,即:黄加品红等于红;黄加青等于绿;品红加青等于蓝。有两种色光相加能够产生白光,这两种色光称之为互补色(见图8-5b)。说明互补的两色光之间对比强烈,色反差大。绿光加品红光等于白光即:绿与品红互为补色;黄与蓝互为补色;红与青互为补色。

(二) 滤色镜的特性

1. 吸收特性 吸收滤色镜的补色,也就是说,滤色镜的补色不能通过。

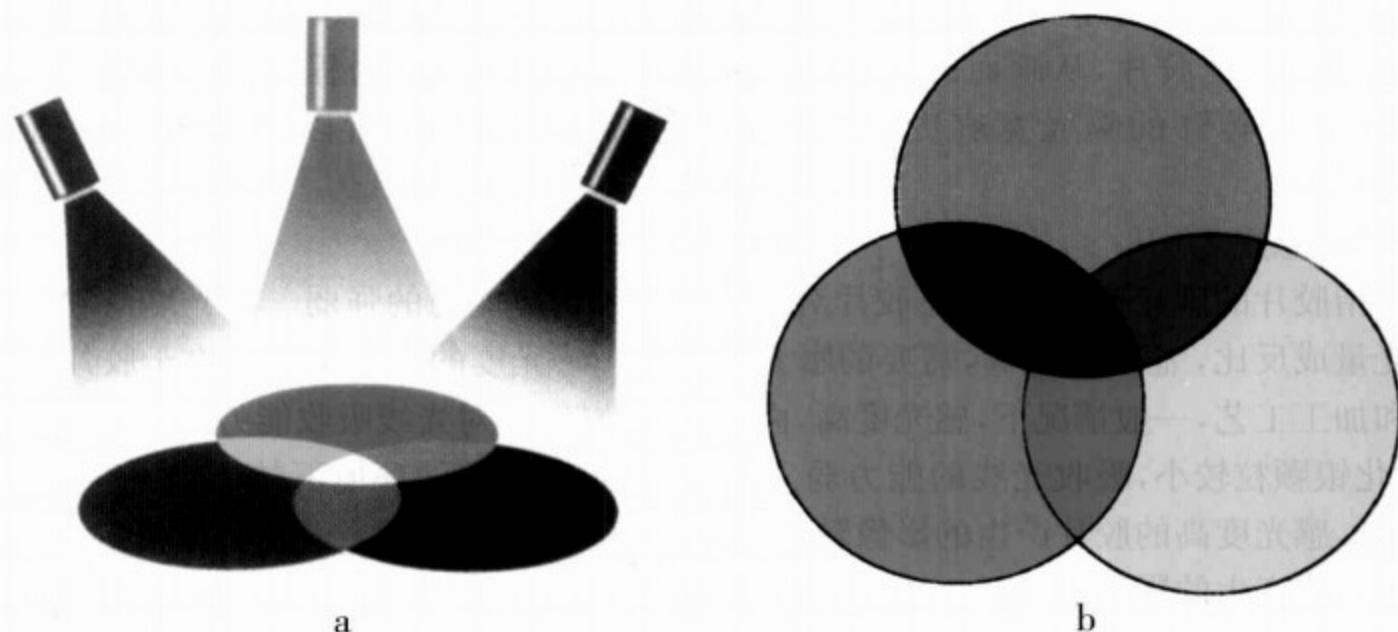


图 8-5 加色光效应(a)和减色光效应(b)

2. 限制特性 滤色镜限制一部分色光通过,被限制的是它补色的临界色和间色。比如红色滤色镜,全部吸收青色,使它在底片上密度最小,而对蓝色和绿色则有所控制,在底片上稍有密度。

3. 通过特性 滤色镜能通过与其滤色镜相同的色光。

由于各种滤色镜深浅不一,其阻光率也有差别。一般浅滤色镜均有阻止和限制紫外线的作用。但是能让其他光均匀地通过。

(三) 滤色镜在摄影中的应用

1. 校正颜色对比 利用滤色镜吸收、通过和限制三种特性,来校正颜色的对比,使摄影效果更符合人眼的视觉习惯与经验,这是使用滤色镜的一个重要目的。

2. 调整反差 利用三原色对比和互补色对比,加强色彩的饱和度,以增加反差。

3. 消除或突出某种颜色 使用滤色镜有两种方法:其一是使用间色滤色镜,如蓝、红两色的 HE 染色组织标本,可用紫色滤色镜使两色兼顾;其二是采用两次曝光,先用蓝色滤色镜做一次曝光,再用红色滤色镜做一次曝光,这样两者均得到充分显现。

4. 滤色镜的校正色温作用 如果由于光的色温与底片的性能不相符,则要加用滤色镜进行校正,使光源色温与感光片性质相适应。用于此用途的滤色镜称为补偿滤色镜或称转换滤光器。比如显微摄影时常用日光片在灯光下拍照,需加青蓝色滤色镜。如灯光片在日光下拍照,需加橘黄色滤色镜。加校正滤色镜以后,需根据滤色镜的密度适当增加曝光时间。

六、色温

色温,是指色质,即白光的程度(所谓白光就是日光、灯光和天空光等等)。讲色温时,常常把铁块的加热过程作为例子,就是说,将铁块加热时,它的颜色由红→橙→黄→白→青白色。铁块发热发光的过程所引起的光色质的变化是以色温来标志的,最初发热时色温低,呈青白色时色温高。英国物理学家 Kelvin 最早发现,他将黑体以绝对温度 -273°C 时开始加热,随着温度增高而开始出现色光变化。为了纪念 Kelvin 把这种变化单位以他的名字命

名,即 Kelvin,而把 -273°C 称为 Kelvin 0° ,写作 0°K ,以后每增加 1°C ,便称为 1°K ,1967 年以后,将 $^{\circ}\text{K}$ 改为 K。

色温的概念有两点应该注意:第一,光源的色温与光源的实际温度无关。例如钨丝灯的色温是 3200K,如果在光源前面加一个橘黄色滤色镜,它的色温则降低到 2500K。第二,色温这一概念只适用于符合“黑体”发光规律的色光,即从红到青白这一光系,只适用于白光,而不能用色温来表示绿光、紫光或品红光等。色温计只能测白光,而不能测色光。

彩色摄影欲求得彩色平衡,胶卷有日光型和灯光型之分,日光型胶卷适合于 5400K 的色温下拍照,色温宽容度为 $\pm 1200\text{K}$,而灯光型胶卷适合于 3200K 下拍照,色温宽容度为 $\pm 700\text{K}$ 。如果使用日光型胶卷在灯光下拍摄(不加滤镜),冲洗出来的照片出现暖黄色,其原因是胶卷所要求的色温与拍摄光源的色温不平衡所致。一般情况下,日光片在日出后,日落前两小时至午间均为色温宽容度范围之内。如果使用日光片在显微镜的钨丝灯光下拍照,需加青蓝色滤色镜提高色温,以获得色温平衡。色温高时,拍摄的照片偏蓝色,色温低其照片偏黄橙色。

第二节 显微摄影基础

一、显微镜的几何光学成像原理

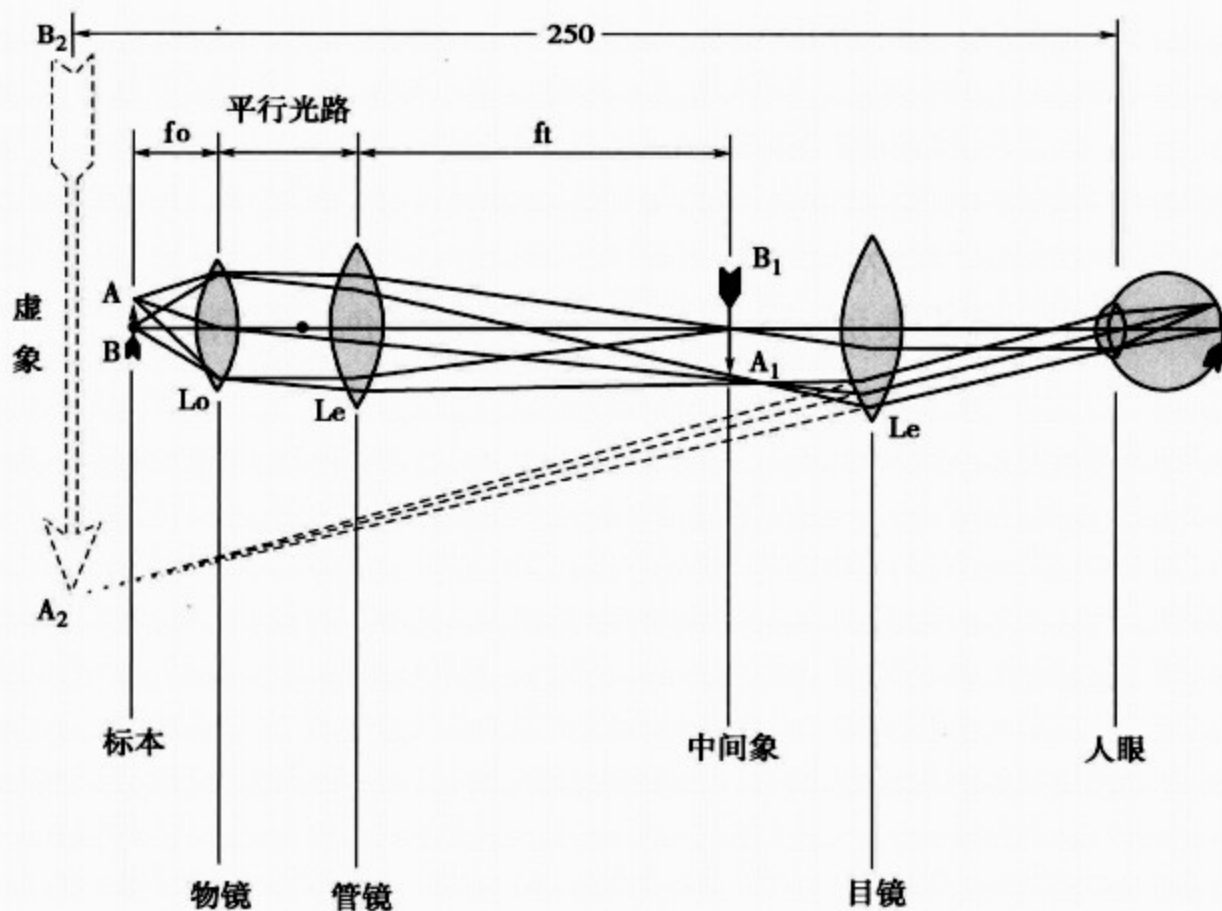
显微镜包括光学、照明和机械三个系统。决定显微镜质量好坏的是光学系统,由目镜、物镜和聚光器等组成。样品通过物镜形成倒置实像,然后通过目镜在人的眼球视网膜上形成直立实像,此像通过目镜反向延长,在显微镜中一定距离处形成倒置虚像,虚像和视网膜上的实像完全重合(图 8-6)。

二、分辨率与放大率

分辨率 (resolution) 又称解像力,为在 25cm 明视距离处能分辨清楚尽可能靠近的两点的能力。辨认两点之间的距离愈小,则分辨本领愈高,人眼的分辨率约为 0.2mm,而显微镜的分辨率 R 计算公式为: $R=0.61\lambda/\text{NA}$, 式中 λ 为所用的光线波长,NA 为数值孔径 (numerical aperture, NA)。

由此可见,决定显微镜分辨率的主要有两个因素,一是数值孔径,二是波长。数值孔径愈大,波长愈短,能分辨清两点距离愈小,显微镜的分辨率愈高。数值孔径是物镜前透镜与被检物体之间介质的折射率 (n) 和孔径角 (θ) 半数的正弦之乘积,用公式表示如下: $\text{NA}=n\sin\theta/2$ 。孔径角又称镜口角或入射角,是物镜光轴上的物体点与物镜前透镜的有效直径所形成的角度(图 8-7)。光学显微镜最大分辨率约为 $0.2\mu\text{m}$,约等于可见光最短波长的一半,在这种分辨率水平观察到的结构,称为显微结构。

放大率 (magnification) 又称放大倍数,是指被检验标本经物镜放大,再经目镜或摄影目镜放大后,人眼所看到的最终图像的大小与原物体大小的比值,是物镜和目镜(或摄影目镜)



$M_o = f_t / f_o$ M_o :代表物镜放大倍数
 f_t :代表管镜焦距
 f_o :代表物镜焦距

图 8-6 光学显微镜成像原理示意图

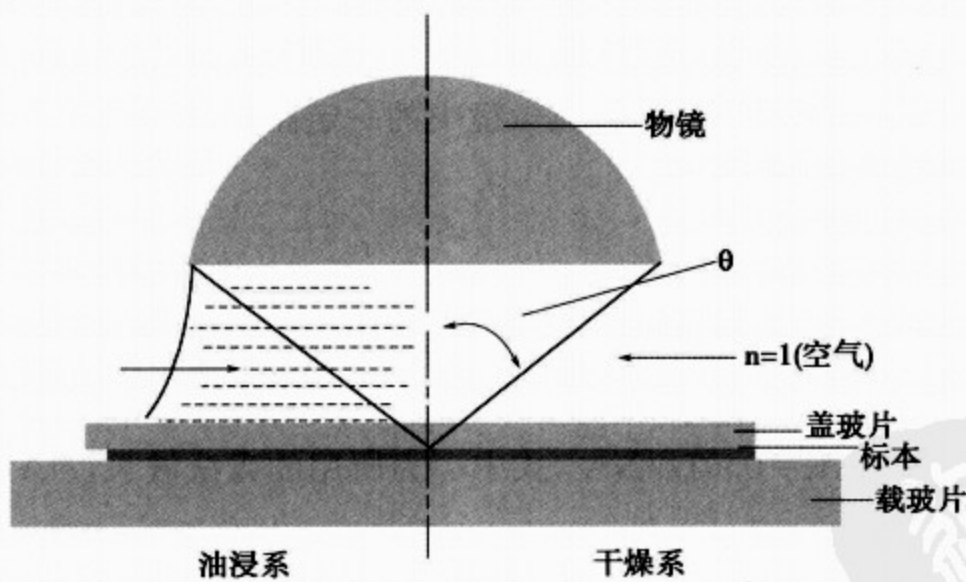
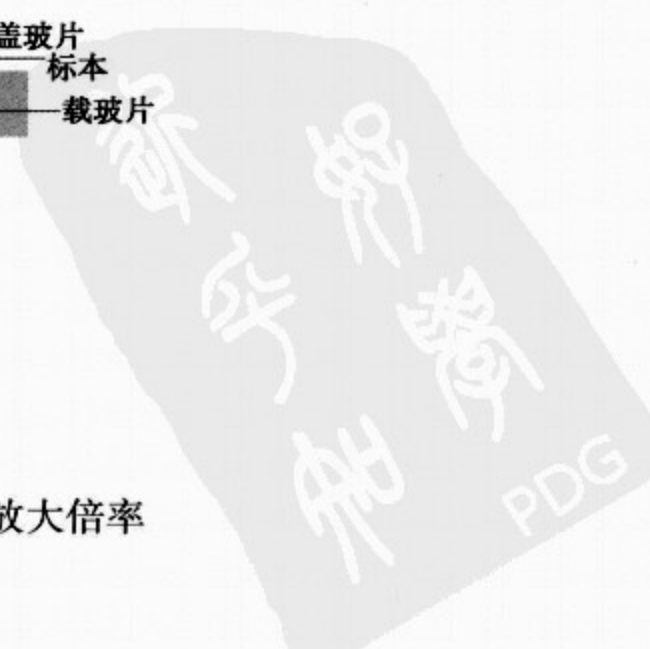


图 8-7 数值孔径图解

放大倍数的乘积,用公式表示为:

$$M = m_1 \times m_2 (\times m_3) \left\{ \begin{array}{l} M: \text{总放大倍率} \\ m_1: \text{物镜的放大倍率} \\ m_2: \text{目镜或摄影目镜的放大倍率} \\ m_3: \text{中间放大倍率} \end{array} \right.$$



三、显微镜的主要部件

(一) 视场光阑和孔径光阑

视场光阑和孔径光阑是显微镜上的两个重要装置(图 8-8),它们在镜检时,尤其在显微摄影中,对获得清晰的物像和高质量的显微照片发挥重要作用,但是在实际使用时往往被忽视,甚至根本不知道它们存在的价值。

1. 视场光阑 在正置显微镜,视场光阑一般都装在显微镜主机的底座上,它的作用主要是根据不同倍率的物镜,对视场照明范围进行调节,即控制照野,提高显微图像的清晰度。如果视场光阑过大,其照野超过视场直径,视场以外的光线经玻璃和标本的反射和不规则的散射,产生多余的眩光,进入视野内,造成影像反差减弱,降低了影像的清晰程度。反之,光阑收缩过小,其照野小于视场直径时,视野四周被遮挡,不能观察和拍摄到全部物像。

视场光阑的调节方法:

(1) 将视场光阑收缩到最小位置,在标本平面中心处看到一个呈正多边形的光斑,此为视场光阑的像。

(2) 通过升降聚光镜完成视场光阑的对焦。

一般镜检时,从双目镜中观察,调节视场光阑,使照明区域与目镜视场相外切。显微摄影时,从调焦目镜中观察,将视场光阑开到比摄影范围标记略大的位置。

2. 孔径光阑 孔径光阑位于聚光镜的透镜组之间,聚光镜前焦点平面处。通过拨杆或调节环进行控制,并在聚光镜外壳上标有刻度,与所用物镜的数值孔径相对应。孔径光阑具有使影像的分辨率、反差、焦深和镜像亮度处在最佳状态的作用。如孔径光阑开过大,会产生眩光,使影像景深小,反差降低,影响影像的清晰度;反之,则使物镜的数值孔径不能充分利用,降低显微照片的分辨率,同时,因入射光孔过小,会出现衍射现象,使显微照片的图像失去真实性。一般认为,当孔径光阑调整至物镜数值孔径的 60%~80% 的位置时能获得良好的显微图像。但在对染色较浅、对比度低的标本进行观察和照相时,最好把孔径光阑关得再小一些,而对那些染色较深、对比度高的标本,则将孔径光阑开得大一些为好。

调节孔径光阑的三种方法:

(1) 先将标本调准焦点后,从双目镜筒中抽出一个观察目镜,通过镜筒直接观看孔径光阑的像,对孔径光阑进行调节。这种方法非常直观,可直接看到孔径光阑的变化,但须注意



图 8-8 显微镜光学系统组成

经常抽出目镜会使灰尘落入镜筒内。

(2) 根据所用物镜的数值孔径,经计算后,将孔径光圈拨杆定在聚光镜数值孔径标记的相应位置。这种方法简便易行,对显微镜无危害。

(3) 可以从调焦目镜中边观察影像,边调整孔径光阑,当影像的反差、景深和清晰度处于最佳状态时停止。这种方法操作简便,调节迅速,但是掌握这种方法并能达到准确无误的程度,必须具备丰富的显微摄影实践经验。

(二) 聚光镜

聚光镜(condenser)又称聚光器,其作用在于将光源发散的光,有效地聚焦在标本上,以产生与物镜相适应的光束,造成一个明亮而又均匀的视场。它同时也影响分辨率、对比度、景深和光亮度,而这些因素又直接影响显微成像的质量,因此,它的作用非常重要。聚光镜的种类有多种,同时根据物镜数值孔径的大小,对聚光镜的要求也不同。

1. 阿贝聚光镜 多用于普通显微镜,因德国科学家阿贝(Ernst Abbe)设计而得名,由两片透镜组成,有较好的聚光能力,但是在物镜数值孔径高于0.60时色差(由于各种光的波长不同,在通过透镜时,折射率不同所造成的相差)、球差(由于透镜的球形表面造成的相差)则显示出来。

2. 消色差聚光镜 高级研究型显微镜常配有此种聚光镜。由一系列透镜组成,对色差和球差的校正程度颇高,能得到理想的图像,其数值孔径达1.4,因此,它不适用于4倍以下的低倍物镜,否则照明光源不能充满整个视场。

3. 旋出式聚光镜 此聚光镜的特点是在使用低于4倍的物镜时,由于视场大,光源所形成的光锥不能充满整个视场,造成视场边缘部分黑暗,仅中央部分被照亮。欲使视场充满照明,则需将聚光镜上的透镜从光路中旋出。

(三) 物镜

物镜是显微镜最重要的光学部件,它直接影响成像质量和各项光学技术参数,是衡量一台显微镜质量的重要标准。

物镜种类很多,如根据物镜相差校正程度可分为消色差物镜(achromatic objective, Ach)、半复消色差物镜(A semi apochromatic objective,常用FL表示)和复消色差物镜(apochromatic objective, Apo)。如在各种消色差物镜中增加一块半月形厚透镜,以达到纠正场曲的缺陷,分别称为平场消色差物镜、平场半复消色差物镜和平场复消色差物镜。

消色差或平场消色差物镜在绿光和白光下显微照相时,能获得好的影像效果。半复消色差或平场半复消色差物镜在成像质量上远好于消色差物镜。在彩色显微照相时,选用半复消色差物镜,从成像质量和经济上均为最佳选择。复消色差、平场复消色差物镜拥有更大的数值孔径,分辨率高,像质好,有更高的有效放大率,适用于高级研究型镜检和显微照相。除此以外,还有特殊用途的物镜,如:

1. 带校正环物镜(correction collar objective) 在物镜中部装有调节环,当转动调节环时,可调节物镜内透镜组之间的距离,从而校正由于盖玻片厚度不标准引起的覆盖差。调节环上的刻度为0.11~0.23,表明可校正盖玻片从0.11~0.23mm厚度之间的误差。

2. 带虹彩光阑的物镜(iris diaphragm objective) 在物镜镜筒内的上部装有虹彩光阑,外方也有调节环,转动时可调节光阑孔径大小,此种物镜是高级油浸物镜,它的作用是在暗

视场镜检时,往往由于某些原因而使照明光线进入物镜,使视场背景不够黑暗,造成镜检质量下降。这时调节光阑大小,使背景变黑,被检物更明亮,增强镜检效果。

3. 反射荧光物镜 一般的物镜由于吸收紫外线并产生自发荧光,容易造成镜头老化。反射荧光物镜是针对上述情况专门设计的物镜,其特点是紫外线透过率高,不产生荧光,而且不易老化。

4. 偏光物镜 偏光显微镜用来检查标本所具有的偏振性。在光学系统中,有关光学元件即使只有很小的应变,也会对偏振光产生不良的影响,并破坏像质。所以,在偏光物镜的设计中,要求尽量将应变控制到最小。微分干涉物镜的应变也比较小,介于普通物镜和偏光物镜之间。

5. 微分干涉物镜 要求介于一般物镜和偏光物镜之间。

6. 相差物镜(phase contrast objective) 这种物镜是相衬镜检术的专用物镜,其特点是在物镜的后焦平面处装有相位板。

7. 无盖玻片物镜(no cover objective) 有些被检物,如涂片等,其上不能加用盖玻片,故在镜检时应使用无盖玻片物镜,否则,图像质量将明显下降,特别是在高倍镜检时更为明显。这种物镜外壳上常标刻 NC,同时在盖玻片厚度的位置上无 0.17 的字样,而标刻着“0”。

8. 长工作距离物镜 此种物镜是倒置显微镜的专用物镜,是为了满足组织培养,悬浮液等材料的镜检而设计。

综上所述,各种物镜均有专门用途,有些型号在使用时需作一些调节,才能达到该物镜的全部功能。为了正确使用物镜,必须了解物镜镜筒上的数字与字母的含义(图 8-9)。

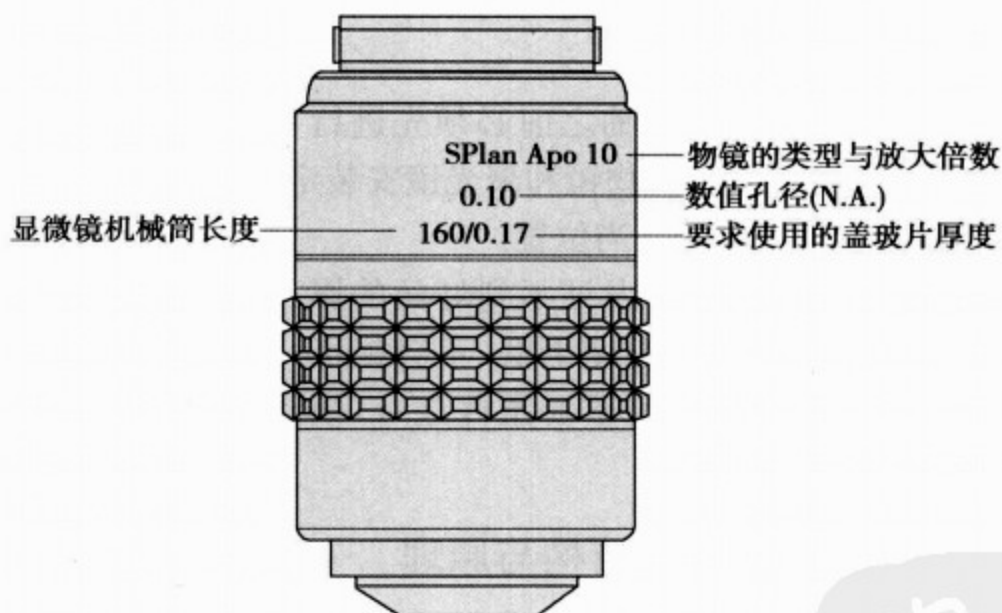


图 8-9 物镜的标识

(四) 目镜

因其靠近观察者的眼睛,故称为目镜。目镜安装在镜筒的上端,各种目镜的口径尺寸均相同,根据需要可以互换使用,但一般与物镜配套使用。

目镜的作用是放大物镜所产生的初级影像,同时矫正物镜成像中的像差、色差与照度,使初级影像形成可见的虚像。目镜只起放大镜的作用,并不增加显微镜的分辨率。有些目镜内装有测微尺或指针(可用头发自制),用于显微测量或指示。摄影目镜的作用是为物镜的色差和像差作光学补偿,使投射到感光底片或芯片上图像的四周与中心都尽可能在一个

焦点平面上。用于显微摄影取景和对焦的目镜称为取景目镜。随着数码显微摄影的普及,取景和对焦可直接在数码相机液晶显示屏或电脑显示屏上进行。

四、柯勒照明

柯勒照明(Köhler illuminator)是由德国科学家 August Köhler(图 8-10)于 1893 发明的一种显微照明方法,其要点是使光源的照明光线经集光镜聚光后,将灯丝影像聚焦在孔径光阑平面处,聚光镜再将此光点投射到被检物平面上,并在物镜后焦点平面处聚焦,这样在标本平面只能见到视场光阑的影像,而不能见到灯丝影像。这是一种近乎理想的照明方法,已成为显微观察和摄影的重要前提,也是显微摄影必须掌握的操作技术。

柯勒照明的操作步骤

1. 首先将待检切片置于载物台上,用 4 倍或 10 倍物镜调准焦点,目的是确定载物台的位置。
2. 再将聚光镜的孔径光阑与视场光阑收缩到最小位置。
3. 上下移动聚光镜,使视场光阑的影像清晰地呈现在标本平面上。
4. 旋转聚光镜上定心旋钮,将视场光阑的影像调整到视野中心位置处,使光学合轴。
5. 需要特别注意的是,在光学合轴之前必须先进行显微镜机械轴的合轴调整。认真检查物镜和聚光镜安装定位是否正确。
6. 调整视场光阑和孔径光阑到适当位置。

用柯勒照明观察标本时,在视野内见不到灯丝的影像,所以整个视野内亮度非常均匀,温度也低,不会损坏标本。而均匀的照明是显微摄影时的重要条件之一,缺点是视野内亮度较临界照明弱一些。

五、几种常用特殊显微镜的结构与原理

除普通光学显微镜外,还有根据光学原理和生物学研究需要而设计的特殊显微镜,如荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、相差显微镜和微分干涉显微镜等,前两者在组织化学和免疫组织化学技术中应用甚广,已在第四章阐述。后两者主要用于活细胞以及未染色细胞或组织的观察,下面将简单介绍后两者。

(一) 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)是由荷兰物理学家 Frits Zernike 教授(图 8-11)应用光衍射和相位差



August Köhler
(1866—1948)

图 8-10 德国科学家 August Köhler 教授



Frits Zernike
(1888—1966)

图 8-11 荷兰物理学家 Frits Zernike 教授

形成的明与暗之差的干涉原理于 1932 年发明的,并因此于 1953 年荣获诺贝尔物理奖。此种显微镜最大的特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。

1. 相差显微镜原理 相差显微镜基本原理是把透过标本的可见光光程差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,同时被延迟了 $1/4\lambda$ (波长),如果再增加或减少 $1/4\lambda$,则光程差变为 $1/2\lambda$,两束光合轴后干涉加强,振幅增大或减小,使反差提高。在显微镜结构上,相差显微镜有两点不同于普通光学显微镜,即增加了环形光阑(annular diaphragm)和相位板(annular phase plate)(图 8-12)。

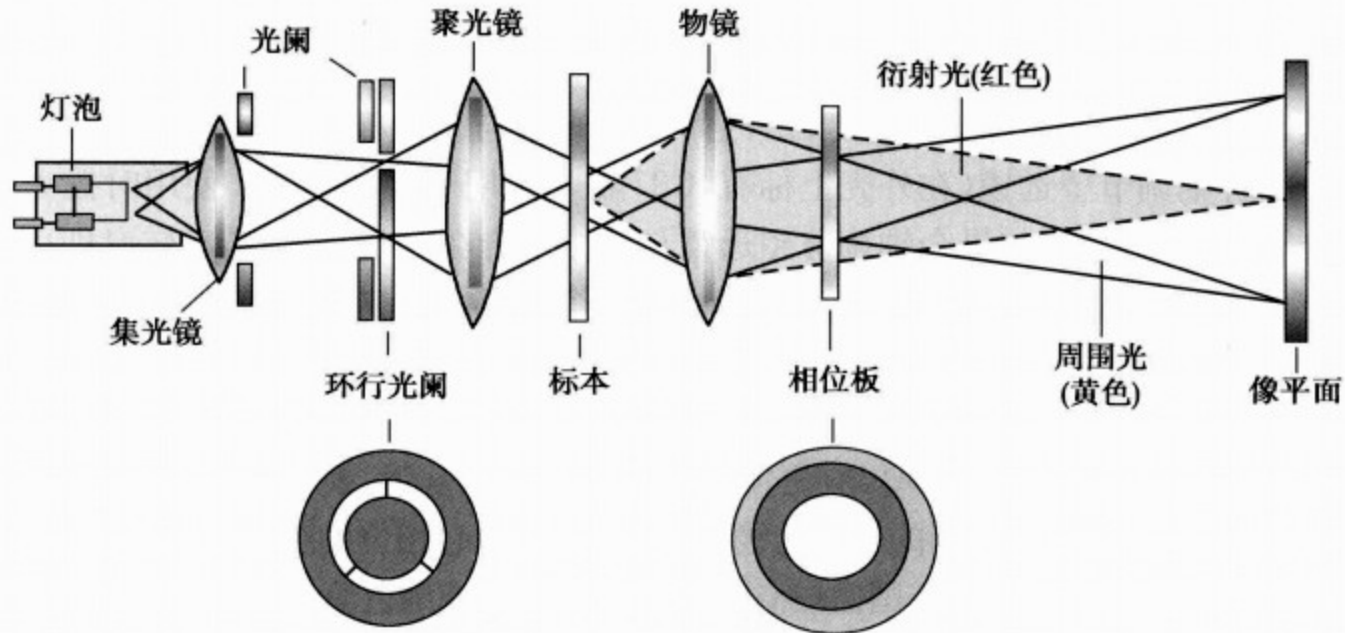


图 8-12 相差显微镜结构示意图

(1) 环形光阑:位于光源与聚光器之间,作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥,聚焦到标本上。

(2) 相位板:在物镜中加入涂有氟化镁的相位板,可将直射光或衍射光的相位推迟 $1/4\lambda$ 。

2. 相差显微镜的结构特点 相差显微镜与普通光学显微镜的基本结构相同,所不同的是它具有四部分特殊结构:即环状光阑、相位板、合轴调节望远镜及绿色滤光片。

(1) 环状光阑:具有环形开孔的光阑。位于聚光器的前焦点平面上,光阑的直径大小是与物镜的放大倍数相匹配,并有一个明视场光阑与聚焦器一起组成转盘聚光器。在使用时只要把相应的光阑转到光路即可。

(2) 相位板:位于物镜内部的后焦平面上。相位板上有两个区域,直射光通过的部分称“共轭面”,衍射光通过的部分称“补偿面”。带有相位板的物镜称相差物镜,常以“Ph”字样标在物镜外壳上。

相位板上镀有两种不同的金属膜:吸收膜和相位膜。吸收膜常为铬、银等金属在真空中蒸发而镀成的薄膜,它能把通过的光线吸收 $60\% \sim 93\%$,相位膜为氟化镁等在真空中蒸发镀成,它能把通过的光线相位推迟 $1/4$ 波长。

根据需要,两种膜有不同的镀法,从而制造出不同类型的相差物镜。如果吸收膜和相位膜均镀在相反的共轭面上,通过共轭面的直射光不但振幅减弱,而且相位也被推迟 $1/4\lambda$,衍

射光通过物体时相位也被推迟 $1/4\lambda$, 这样就使得直射光与衍射光维持在同一个相位。根据相长干涉原理, 合成光等于直射光与衍射光振幅之和, 因背景只有直射光的照明, 所以通过被检物体的合成光比背景明亮。此效果称负相差, 镜检效果是暗中有明。

如果吸收膜镀在共轭面, 相位膜镀在补偿面上, 直射光仅被吸收, 振幅减少, 但相位未被推迟, 而通过补偿面的衍射光的相位, 则被推迟了两个 $1/4\lambda$, 因此衍射光的相位要比直射光相位落后 $1/2\lambda$ 。根据相消干涉原理, 如此通过被检物的合成光比背景暗, 此效果称正相差, 即镜检效果是明中有暗。

(3) 合轴调节望远镜: 是相差显微镜的重要装置。环状光阑的影像必须与相位板共轭面完全吻合, 才能实现对直射光和衍射光的特殊处理。否则应被吸收的直射光被泄漏掉, 而不该吸收的衍射光反被吸收, 应推迟的相位不能被推迟, 则达不到应有的相差效果。由于环状光阑是通过转盘聚光器与物镜相匹配, 因而环状光阑与相位板常不同轴, 为此, 相差显微镜配备一个合轴调节望远镜(在外壳上标有“CT”符号), 用于合轴调节。使用时拨去一侧目镜插入合轴调节望远镜(如果合轴调节望远镜与镜体整合在一起, 只需转动转盘即可), 旋转合轴调节望远镜的焦点, 便能清楚看到一明一暗两个圆环。再转动聚光器上环状光阑的两个调节钮, 使明亮的环状光阑圆环与暗的相位板上共轭面暗环完全重叠。如明亮的光环过小或过大, 可调节聚光器的升降旋钮, 使两环完全吻合。如果聚光器已升到最高点或降到最低点而仍不能矫正, 说明玻片太厚, 应更换。调好后取下望远镜, 换上目镜即可观察和拍照。

(4) 绿色滤光片: 由于使用的照明光线波长不同, 常引起相位的变化, 为获得良好的相差效果, 相差显微镜要求使用波长范围比较窄的单色光, 通常是用绿色滤光片来调整光源的波长。

3. 相差显微镜的使用范围、操作步骤及注意事项

(1) 使用范围: 相差显微镜能观察透明样品的细节, 适用于对活体细胞生活状态下的生长、运动、增殖情况及细微结构的观察, 而很少直接用于组织化学与免疫组织化学的观察与摄影, 但有时可利用相差显微镜对染色标本的结构进行快速观察, 以帮助确定阳性部位在组织或细胞中的定位。

(2) 操作步骤

- 1) 根据观察标本的性质及要求, 挑选适合的相差物镜。
- 2) 将标本片放到载物台上。
- 3) 进行光轴中心的调整。
- 4) 取下一侧目镜, 换上合轴调节望远镜, 调整环状光阑与相位板上的共轭面圆环完全重叠吻合(图 8-13), 然后取下合轴调节望远镜, 换回目镜。在使用中, 如需要更换物镜倍数

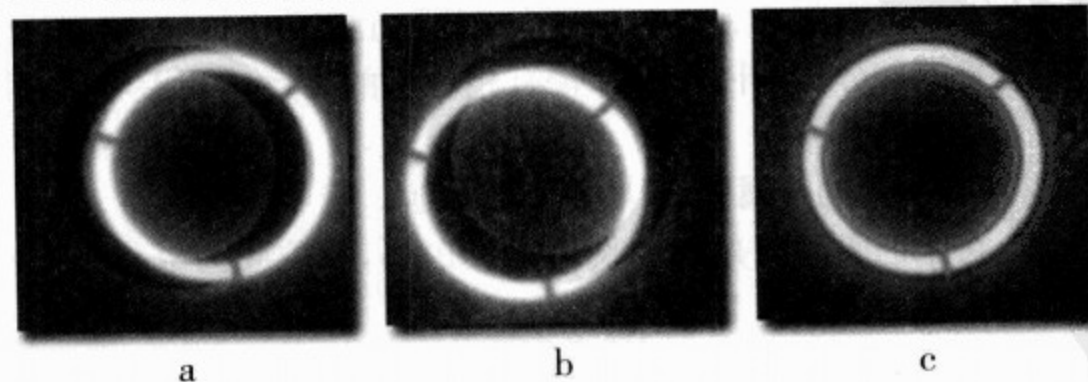


图 8-13 合轴调节示意图

时,必须重新进行环状光阑与相位板共轭面圆环吻合的调整。

5) 放上绿色滤光片,即可进行观察和拍照。

(二) 微分干涉显微镜

微分干涉显微镜(differential interference contrast microscope, DIC)是1952年由波兰物理学家 Georges(Jerzy) Nomarski(图 8-14)在相差显微镜原理的基础上发明的。因此, DIC 显微镜又称 Nomarski 相差显微镜(Nomarski contrast microscope),其优点是能显示样本结构的三维立体投影影像。与相差显微镜相比其标本可略厚,折射率差别更大,故影像的立体感更强。此显微镜用于免疫组织化学染色显微摄影时,不用复染也能很好地显示组织的整体结构(图 8-15)。



Georges(Jerzy)Nomarski
(1919—1997)

图 8-14 波兰物理学家 Georges(Jerzy)
Nomarski 教授

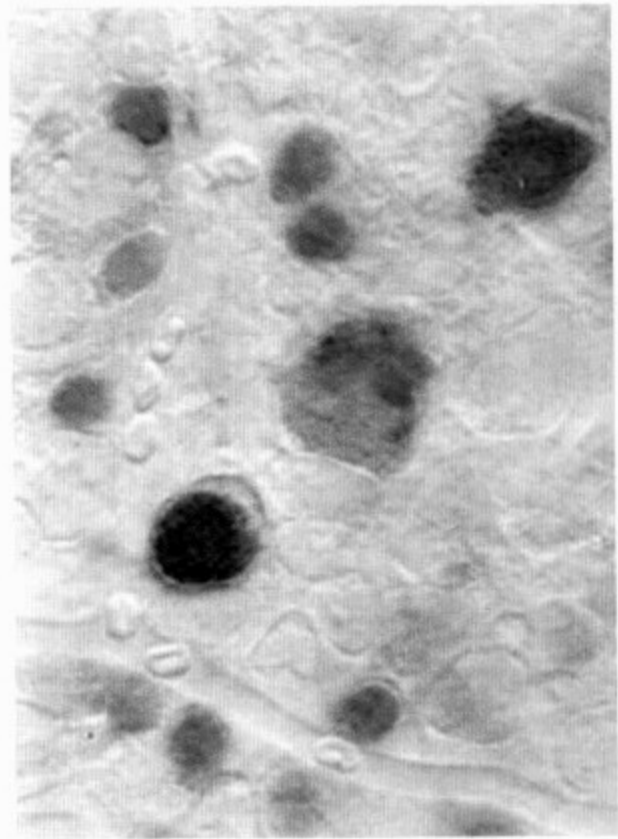


图 8-15 微分干涉显微图像
小鼠视网膜免疫组织化学染色(周国民供图)

1. 微分干涉显微镜的原理及结构 微分干涉显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜,技术设计要复杂得多(图 8-16)。微分干涉利用偏振光,有四个特殊光学组件:偏振器(polarizer)、微分干涉棱镜、微分干涉滑行器和检偏器(analyzer)。偏振器直接安装在聚光系统的前面,使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了石英 Wollaston 棱镜,即微分干涉棱镜,此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光(x 和 y),两者成一小夹角。聚光器将两束光调整为与显微镜光轴平行方向。最初两束光相位一致,在穿过标本相邻的区域后,由于标本的厚度和折射率不同,引起两束光发生光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个 Wollaston 棱镜,即微分干涉滑行器,它把两束光波合并成一束。这时两束光的偏振面(x 和 y)仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置,即检偏器。在光束形成目镜微分干涉影像之前,检偏器与偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光,从而使两者发生干涉。x 和 y 波的光程差决定透光的多少。光程差值为 0 时,没有光

穿过检偏器;光程差值等于波长一半时,穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上,标本结构呈现出明暗差。为使影像的反差达到最佳状态,可通过调节微分干涉滑行器的纵行微调来改变光程差,光程差可改变影像的亮度。调节微分干涉滑行器可使标本的细微结构呈现出正或负的投影形象,通常是一侧亮,而另一侧暗,便造成了标本的人为三维立体感,类似大理石上的浮雕(图 8-17)。

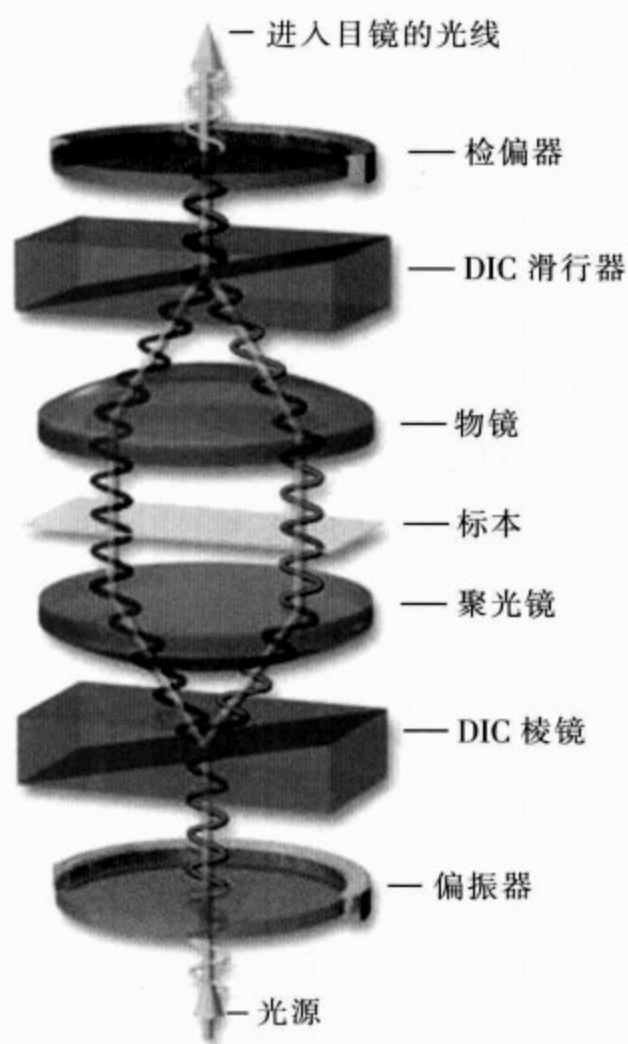
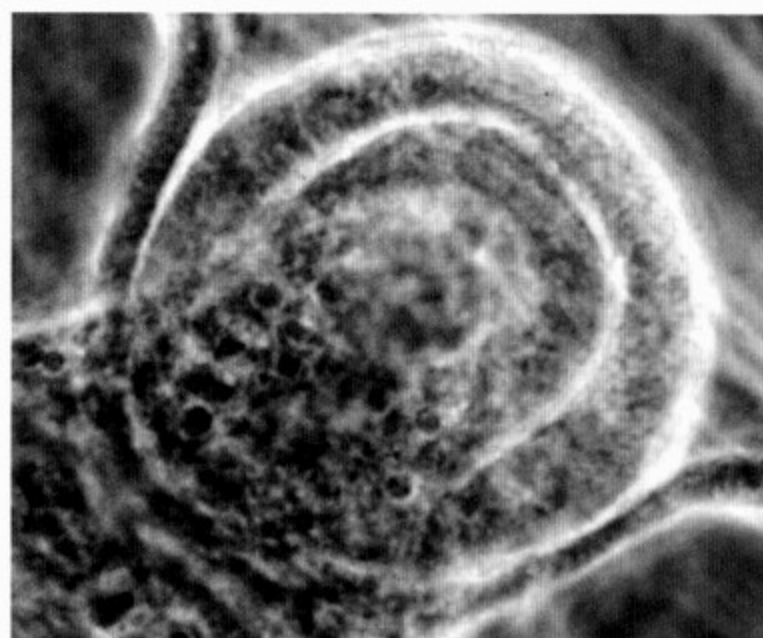
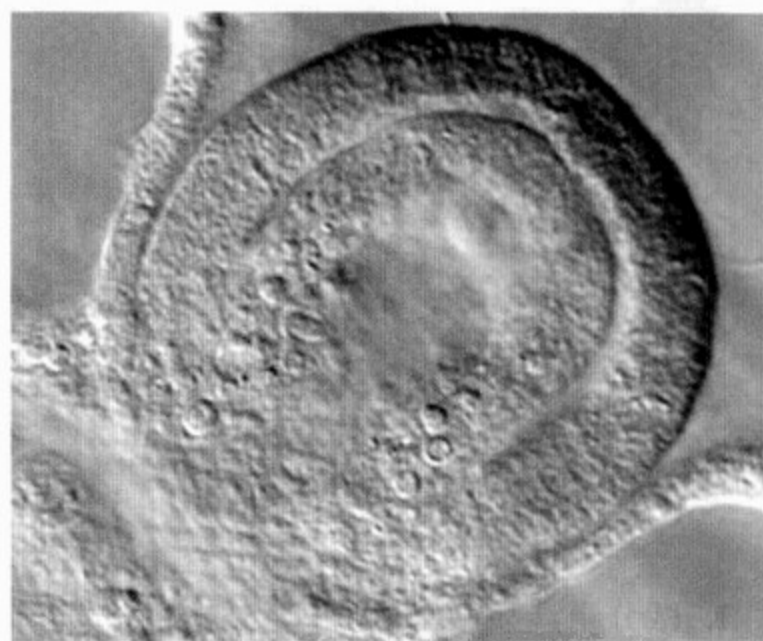


图 8-16 微分干涉显微镜原理示意图



a



b

图 8-17 相差(a)与 DIC(b)显微图像比较图(周国民供图)

2. 微分干涉显微镜的调节

- (1) 必须在柯勒照明系统已调好的基础上才能调好微分干涉显微镜;
- (2) 先用 10 倍物镜,以明视野确定好能把样品看清晰的物镜调焦位置;
- (3) 把偏振器摆入照明光路中,注意其取向应为东→西方向;
- (4) 把聚光镜转盘转到与 10 倍物镜对应使用的位置上,即微分干涉 0.3~0.4;
- (5) 在物镜后方或物镜转换器上插入 10 倍物镜使用的微分干涉插片;
- (6) 把检偏器插入成像光路中,注意其取向应为南→北方向;

- (7) 换上待观察的透明样品,开亮光源把样品调焦清晰;
- (8) 调节微分干涉插片,使微分干涉相衬的影像达到最佳效果,也就是浮雕效果最为明显;
- (9) 同时可调节聚光镜的孔径光阑,使反差的效果也达到最佳;
- (10) 然后再细微调样品的细节,可见样品中不同层面上的结构;
- (11) 如果把补色器插入,并同时调节微分干涉插片,可在视野中看到不断变化的绚丽色彩,即红、橙、黄、绿、蓝、紫、粉红、粉紫及金黄色。

适用范围:透明或不能染色的组织切片,厚度可达 $100\mu\text{m}$ 左右,培养中的活组织和活细胞、小生物等。

第三节 显微摄影技术应用

根据使用显微镜或研究目的需要,显微摄影技术可分为普通显微摄影和特殊显微摄影,后者包括荧光、激光扫描共聚焦、相差和微分干涉等。一台高性能的显微镜往往可以将多种功能整合在一起,同时对固定或活细胞和组织进行多种形式的摄影。根据记录的媒介不同,显微摄影技术又有传统(胶片)和数码之分,而且从某种程度上来说,由于后者具有便捷、高效等优点,大有取代前者的趋势。尽管如此,显微摄影的基本原理和技术永远不会过时。下面将分别对普通显微摄影技术、特殊显微摄影技术和数码显微摄影技术进行介绍。

一、普通显微摄影技术应用

(一) 显微镜的使用环境

1. 显微镜在观察和拍摄过程中,由于外界震动和人为走动,容易造成拍摄图像模糊。所以要远离震动源,并选用牢固防震的桌子。

2. 从窗户射入的亮光会影响对焦的准确性,而如果室内光线太亮,也会使散射光进入目镜,影响观察。所以应将显微镜靠近墙边放置,使头顶上的照明光线微弱地射到显微镜的前面。

3. 将显微镜放在较清洁和干燥的环境中,平时用防尘罩盖上。另外还要注意防潮防霉。

(二) 摄影前准备

1. 光路合轴调节 使光轴与光束处于同一轴线上。

2. 柯勒照明调节 使观察的视野获得均匀而又充分的照明;防止杂散光对照相系统产生影响;使被摄物不受热,影像清晰。

3. 物镜与目镜合理组合 依标本的不同和显微摄影要求,物镜与目镜的组合有一定规范。

4. 色温的设定

(1) 调节电压到照相的位置(约 9V);

(2) 将中灰滤色镜(ND)和色温平衡滤色镜(NCB)放入光路中。

5. 瞳距及屈光度的调节

- (1) 放入标本,用 10 倍物镜对焦;
- (2) 调节光瞳间距,使左右两个视场像合二为一;
- (3) 调节屈光度以适应观察者的视力,调节的方法随所用目镜的不同而异。

6. 聚光镜调节中心

- (1) 用 10 倍物镜对焦后,把视场光阑关到最小;
- (2) 上下调节聚光镜,直至视场光阑像最清晰为止,使视场光阑成像在焦平面上;
- (3) 旋动两个聚光镜对中螺杆,将视场光阑像调到视场正中;
- (4) 放大视场光阑,使它与视场圆外切。

注意:如视场光阑调不出清晰的焦点,须检查标本载玻片的厚度。要求在 0.9~1.2mm 之间。

7. 观察时的调节

- (1) 将欲观察标本置于载物台上,使选用的物镜进入光路,并对标本对焦;
- (2) 调整聚光镜,并按上一步骤对视场光阑进行调节;
- (3) 将孔径光阑缩至物镜数值孔径的 60%~80%。

8. 调焦和取景

(1) 首先用 10 倍物镜对标本对焦,然后才可转动物镜转换器改换 40 倍和 100 倍等物镜,否则,刚开始就使用高倍物镜有可能损坏标本切片;

(2) 显微摄影的调焦方法:既可通过摄影附件的聚焦望远镜对焦,也可以通过取景目镜进行,方法均为转动调节圆环,使取景框中的双十字达到最清晰程度;

(3) 当使用 1 倍到 4 倍物镜时,由于倍数越低、景深越大,对焦也越困难,在这种情况下,可使用调焦望远镜;

(4) 从取景目镜中找到需要拍摄的景物,如果视野中的标本组织不适合构图,应调整景物方向,常用的方法是转动显微镜载物台或相机,使景物的方向与取景框相一致。

(三) 显微照相的操作步骤

1. 根据不同标本,选用适合标本的胶卷进行拍摄,如胶卷从冰箱中取出,应使胶卷先恢复到室温再使用。

2. 打开照相机后机盖,装入胶卷,转片齿轮的齿牙必须确实地装入到胶卷的齿孔里。

3. 如使用自动卷片相机,则胶卷自动卷到第一张的位置,此时查看底片张数显示的数字是否为 1,否则,说明底片未能卷上,需重复上一步骤。

4. 如为手动卷片,则按“Wind”键,此时查看倒片手柄是否转动,如转动,则胶卷已卷上,再按“Wind”键到第一张的位置,如不转动,则重复上一步骤。

5. 在自动曝光控制器上设定所选用胶卷的度数和补偿指数,并确定采用 1% 的中央点测光或 30% 的中央面测光。

6. 对标本对焦并调节视场光阑和孔径光阑,以取得合适的反差。视场光阑应略大于取景框。

7. 调整曝光的时间,最好的曝光时间是 0.06~0.25 秒。彩色摄影时,不要用改变电压来调节,而用 ND 滤光镜来调整时间。

8. 调整取景器的双十字,使之清晰,再对取景器中的标本对焦。
9. 按下快门键,曝光完毕以后,仔细听一下底片是否有转动的声音。
10. 详细记录各项拍摄参数

(四) 胶卷的选用

显微摄影胶卷的选择应根据标本的颜色和用途而定。一般情况下,对无色或单色标本,选用 ASA 50~100 的快速全色黑白胶卷。拍摄暗背景的标本(如免疫荧光染色标本),由于曝光时间长,可选用高感光度胶卷。照彩色标本时,可选用的彩色胶卷分为日光型和灯光型两种,一般市售胶卷多为日光型。而日光型彩色片需要色温在 5500~6500K,使用时必须加用色温滤色片校正,如加用升色温的平衡滤色镜(一般为蓝色),使钨丝灯光色温转换为太阳光的色温,才能将组织标本的颜色还原到接近原来的颜色。否则照片偏色。

显微照相要求有极好的色彩还原性、高分辨率和鲜艳的颜色反差,对于观察和拍摄普通组织切片使用的普通光学显微镜均为透射光明场照明,因此,不必使用感光度过高的胶卷,建议使用感光度为 ISO 100 或更低的胶卷。当拍摄暗场(相差、偏振光或荧光)时,曝光时间要增加,在多数情况下,选用高感光度胶卷,因为需要感光速度快,虽然影像颗粒大一些,但不会有很大影响。

同一个胶片厂生产的不同型号感光片彩色还原不同。同一个型号但不同批号及不同乳剂号的感光片,它们之间的彩色还原也有轻微的差别。当你开始彩色显微摄影时,最好进行试拍,找出最佳条件,然后再正式进行彩色摄影。

(五) 显微照片放大倍数的标注方法

显微照片放大倍数的标注方法有两种:倍数表示法和比例尺表示法。倍数表示法简单清楚,但容易出现计算错误,使照片图像的放大倍数与实际数值相差甚远。倍数标注法常常存在一些误区,最常见的则是用观察倍数,即物镜与目镜倍数的乘积来表示显微照片的放大倍数,如常常以 100×、200×、400× 等来表示。很显然,这与显微照片的实际放大倍数是有很大的差异的,因为显微照片的放大倍数除了与物镜和摄影目镜的倍数有关外,还与底片的尺寸、印制照片的放大倍数及排版印刷的缩放大小有关系。显微照片放大倍数的正确的计算公式应是:照片长度÷底片长度×底片图像放大倍数,底片图像放大倍数为摄影目镜倍数×物镜倍数×摄影目镜系数。其中,摄影目镜系数一般为 1,但不同牌号的显微镜,配备不同型号的摄影目镜,其系数可能各不相同。由此可见,经此公式计算出来的显微照片的放大倍数很少会是整数。

比例尺表示法主要是用来测量样品放大前的实际长度或直径,比较直接和客观。现在常用的数码显微摄影系统的软件中均带有内标功能,操作时根据物镜和摄影目镜的倍数进行设置,在拍摄出来的照片上则会显示出一个一定长度的标尺(bar)。

二、特殊显微摄影技术应用

特殊显微摄影与普通显微摄影相比,除原理与方法基本相同外,还有需要特别注意的地方。

1. 荧光显微摄影特点

(1) 由于荧光显微镜光源采用高温的高压汞灯和紫外光,均对人体有害,必须选择安全

和便于操作的显微镜进行操作和观察。

(2) 不同的荧光标本必须选用正确的激发滤片才能观察到,所以,观察前必须了解制备荧光染色标本时所用荧光素的波长。

(3) 拍摄时,对显微镜一般也采用“柯勒照明法”进行调节,为增强反差,可尽量关小视场光阑,但注意不要令视场产生渐晕。曝光时一般采用1%点测光。

(4) 建议拍摄时使用高感光度胶卷,如ISO 400胶卷,但感光度更高的胶卷(指ISO值大于400的胶卷)其底片的颗粒会显得过于粗大,反差变小。

(5) 荧光有衰退的特性,一般要有合适的防止措施。如染色后应及时观察,在拍摄和观察间隙,使用光闸阻止激发光对荧光标本的照射,防止荧光衰退。

2. 相差显微摄影特点

(1) 视场光阑与聚光镜的孔径光阑必须全部开大,而且光源要强。

(2) 载玻片和盖玻片的厚度应遵循标准,不能过薄或过厚。

(3) 切片不能太厚,一般以5~10 μm 为宜,否则会引起其他光学现象,影响成像质量。

3. 微分干涉显微摄影特点

(1) 因微分干涉的灵敏度高,制片表面不能有污物和灰尘。

(2) 具有双折射性的物质,不能达到微分干涉衬镜镜检的效果。

(3) 倒置显微镜应用微分干涉时,不能用塑料培养皿。

三、数码显微摄影技术

数码显微摄影是数字技术发展一定阶段的产物,是对传统摄影体系的一场革命。其发展历史虽然不长,却正以独特的魅力改变着传统摄影观念、摄影技巧和方式。这种崭新的摄影系统,运用数码信息处理手段,在影像的摄取、制作与运用等方面,比传统摄影更灵活、更简便、更有效,发展前景不可估量。但是,数码摄影是在传统摄影的基础上发展起来的,与传统摄影相比有许多共性,而且,传统摄影形成的影像立体感和质感使数码摄影望尘莫及。因此,传统摄影仍以它特有的长处,吸引着一批摄影者用之创作。

(一) 数码摄影的基本原理

传统摄影是靠胶片上银盐的光化学反应来记录通过光学镜头的影像,而数码摄影却是将通过光学镜头的影像信号转换为可由电脑处理的数码信息(即数字信息)。数码摄影记录影像不使用传统的感光材料——胶卷,而是采用CCD等影像传感器来接收影像信号,并把接收的这些电子信号直接转换为数码信号储存在磁盘上。储存数码影像的磁盘便直接可供电脑处理。数码摄影涉及一些传统摄影涉及不到的概念,如影像传感器、数码变焦及白平衡等等,了解这些概念与应用要点对学习数码显微摄影技术十分必要。

1. 影像传感器 影像传感器是数码相机最核心的部件之一。它可接受通过数码相机光学镜头的影像信号,并形成影像的模拟电流信号,再经模拟/数码转换处理后记录在影像储存卡上。目前,数码相机中主流的影像传感器为CCD,但是,另一种影像传感器CMOS也日益增多。

(1) CCD: CCD(charge coupled device), 意为光电耦合元件。

1) CCD成像原理:

CCD是由数十万至数百万只微型光电二极管构成的固态电子元件,通常排列成小面积的长方形,用于接受进入镜头的成像光线。在CCD上每一只光电二极管都能记录下投射到它表面的光线强度。光越强,产生的电荷越多,拍摄曝光后,被摄物反射的不同明暗部位在CCD上产生不同强弱的电荷,再经模/数转换成数码图像数据储存在相机中的储存媒介上供使用。CCD本身只能记录光线的强弱,无法分辨颜色,然而摄影不仅有黑白颜色的需求,更有彩色的需求,那么CCD又是采用什么办法来记录彩色影像的呢?简单地说,是采用滤光器。目前,大部分数码相机的CCD上采用红、绿、蓝三原色的单色滤光器,即采用加色法彩色合成原理来记录彩色影像,也有部分高档数码相机的CCD采用黄、品红、青三补色的单色光滤光器,即采用减色法彩色合成原理来记录彩色影像。

2) CCD像素、内插值与CCD面积:CCD上每一只光电二极管记录到投射在它表面的光线强度,构成影像的最小单位,故每只光电二极管即为一个像素。不难理解,像素越高,构成的影像清晰度也越高。数码相机的像素有两种常见的表示方法:①陈列表示法:即“横纵像素的乘积”,例如,像素 640×480 ,像素 1024×768 ;②总量表示法:如像素100万,像素300万等。这两种表示方法的实质相同,只是前者的表示法比后者更精确。CCD像素决定了CCD成像的分辨率,因此通常被用于划分数码相机档次的主要依据之一。但是,CCD像素并不是衡量CCD质量的唯一标准。CCD本身的制造水平、CCD面积和CCD颜色深度等性能对数码相机的影像质量也十分重要。

对于CCD来说,内插值处理只是将CCD的像素总量通过某种软件进行一定程度的软化模糊处理,再在影像相同部位的空隙进行填充来增加像素。这种经内插处理后,CCD本身像素并没有改变,也不能从根本上提高影像的最终质量。例如,CCD本身像素300万,经“内插”标称像素总量达到500万。这种500万的内插值与本身具有500万像素的CCD质量不能等同。因此,在对像素总量的了解上,应注意是否有内插值,还是未经“内插”的值。

在数码摄影中,CCD替代胶卷起感光作用。胶卷的感光面积相对不变,如135胶卷是 $24\text{mm} \times 36\text{mm}$,120胶卷是 $56\text{mm} \times 70\text{mm}$ 。而CCD面积在不同的数码相机中变化较大。其常见的表示法有两种,一是采用面积的长乘宽表示法,如 $18.4\text{mm} \times 27.6\text{mm}$ 等,常用于高档专业型数码相机CCD面积的表示;二是采用面积的对角线长度表示,如 $2/3$ 英寸、 $1/3$ 英寸等,常用于普及型和业余型数码相机CCD面积的表示。对于CCD的面积不能按常规胶卷画幅对影像质量的正比关系来类比。常规胶片画幅越大,放大照片的质量越好。这是因为放大同样尺寸的照片,底片越大,放大的倍率越小的缘故。而CCD转存在储存媒介的数码影像质量是以CCD的像素来决定的。CCD的质量有优劣之分,在同等质量的前提下,把CCD面积与像素结合起来考虑所产生的影像质量,如在同等工艺技术前提下,像素相同,面积不同,其影像分辨率是相同的,但整体影像质量则是面积大的为好。这主要是因为面积大的CCD噪音(会引起影像的杂点)较低,信号动态范围较广(影像层次过渡较平滑)。

(2) CMOS:CMOS(complement metal oxide semiconductor),意为“互补型金属氧化物半导体”,它的作用如同CCD。是一种较成熟而普遍的半导体光敏元件,在计算机中早已得到应用,是计算机的一种重要芯片。近年来用于数码相机。是一种颇有发展前途的影像传

感器。

CMOS 传感器的集成度高,可以把许多电路集成在单一芯片上,例如,信号处理、模/数转换、放大电路及时钟驱动等,而这些电路在 CCD 的数码相机上均为分离的芯片。因而,CMOS 成本低,耗电少。CMOS 的主要缺点,一是噪音较大,易在数码影像上引起杂点;二是敏感性较低,影响“ISO”感光度的提高。但是,运用高科技的降噪技术能克服或减少 CMOS 的缺点,使其应用日趋广泛。

2. 镜头焦距和数码变焦

(1) 镜头焦距:在数码相机中是指镜头中心至影像传感器平面的距离。在传统相机中,使用最普遍的是 135 相机,它的镜头焦距概念如前所述,即 50mm 属于标准镜头;30mm 左右属于广角镜头;200mm 左右属于远摄镜头。这些焦距带来的镜头属性只针对 135 相机而言,对数码相机则不适用。由于大部分数码相机用于成像的影像传感器面积小于 135 胶卷的底片,因而这些数码相机属于标准镜头、广角镜头和远摄镜头的焦距数也要比 135 相机短得多。再则,数码相机影像传感器的面积多种多样,因此,数码相机的厂家通常会针对其传感器的面积与镜头焦距标出相当于 135 相机的等效焦距,从而使摄影者容易联想该相机的拍摄视角与景深效果的性能。因此,摄影者对数码相机的镜头焦距应该关心的是它相当于 135 相机的等效焦距,而不是它的具体镜头焦距数。

(2) 数码变焦:数码相机有光学变焦和数码变焦之分,光学变焦与传统相机的变焦镜头功能和调节方法相同;数码变焦实质上是在镜头原视角的基础上,在成像的 CCD 影像信号范围内截取一部分影像进行放大,使影像达到充满画面的效果。例如,镜头为 40~100mm 的数码相机,当使用 100mm 焦距拍摄时,如果它具有 2 倍数码变焦功能,则意味着实际产生 200mm 焦距的成像范围,这种成像范围实际上是在 100mm 焦距的成像范围内截取一部分而已。不难理解,当把它的成像放大成一定尺寸的照片时,则会发现采用数码变焦的效果不如未经数码变焦的效果,如同传统摄影中将底片剪裁一部分的放大效果一样,明显不如整幅未经剪裁的放大效果。因此,对于追求高清晰照片效果的摄影者来说,大可不必去考虑相机是否具有数码变焦功能,当然,如果对影像清晰度要求不高时,可考虑使用数码变焦。

3. 相当感光度 所谓“相当感光度”是指相当传统胶卷的感光度。对传统相机来说,感光度是胶卷的性能。数码相机起感光作用的影像传感器是在相机上内置固定的,拍摄者在使用过程中不能随意更换,所以影像传感器的“感光度”也是数码相机的主要性能之一。采用相当感光度而不直接采用感光度的概念,是因为数码相机中影像传感器感光度的概念并非完全指它对光线的敏感性能。拍摄时影像传感器产生的信号在进行模/数转换前需要进行放大,当提高数码相机感光度拍摄时,影像传感器输出的信号并未改变,只是改变了信号的放大倍率,实际上并未影响到影像传感器本身。

传统胶卷的影像质量(主要是清晰度和色彩还原)通常与感光度成反比,这种影响在数码相机上也类似,这是由于当提高感光度拍摄时,会引起更多的“噪音”。“噪音”增多是由于传感器的信号被放大时,干扰电流也被放大。“噪音”在画面上表现为杂点增多。

4. 白平衡 白平衡功能是一种针对不同光照环境的颜色纠正功能,也就是让白色物体在不同光照环境下依然呈现白色的功能。它的作用类似传统相机彩色摄影中校正色温滤光镜,用以获取准确的色彩还原。数码相机有自动、自定义和手动白平衡功能,自动白平衡对

光线色温自动控制范围通常在 2500~6500K 之间,基本上能满足大多数拍摄场所的需要。如果现场色温超出上述范围时,利用手动白平衡功能便能有效解决这一问题。另外,还可以使用自定义白平衡,方法是在想要使用的光源下,将相机镜头对准白纸(或白色物体),通过相机相应调节按钮的操作,设定白平衡,以获得该光线下的色温平衡。这种调节适用于有经验的摄影者精细调整或特殊表现意图的调整。

5. 液晶显示屏 液晶显示屏是数码相机区别于传统相机的主要特征之一,它有许多优点和便利,由于液晶显示屏面积大多在 1.8~2 英寸(对角线长度),显示的像素大多在 6 万至 10 万之间,故不能显示出图像细节,但是,从其用途来说,已能满足基本需要。需要注意的是:在明亮环境光线下显示屏上的图像反差会比实际要小;而在暗弱光线下,所显示的图像反差要比实际大,这样,会使人们产生一种错觉,认为液晶显示屏显示的图像效果如同实际效果,而对曝光不足的光线情况视而不见。此外,在拍摄时开启或关闭液晶显示屏对耗电来说大不一样,后者耗电量约为前者的三分之一。液晶显示屏在数码相机上主要有三种用途:

- (1) 用于拍摄时的取景屏。
- (2) 拍摄后可以在显示屏上检查或预览拍摄效果,以决定取舍。
- (3) 在显示屏上可显示该数码相机的性能及功能菜单,供选择调节。

6. 连拍延迟 所谓连拍延迟包含两种情况:一是当按下快门到相机完成曝光之间有 1 秒左右延迟;二是拍摄一幅画面后要稍待片刻(约 5 秒左右)才能拍摄第二幅画面。产生连拍延迟的原因是在拍摄后需要进行一系列的数据处理。目前,数码相机均具有“连拍功能”,在该功能下拍摄时,通常只能采用较低像素进行拍摄。不难理解,拍摄的像素越高,形成影像的文件就越大,所需数据处理的时间也就越长。

7. 储存媒介 数码相机的影像传感器把影像的光信号转变为电信号,再进而转变为数码信号记录在储存媒介上。采用何种储存媒介及其容量和性能也是数码相机的主要性能之一。数码相机的储存媒介有内置固定式和外置装卸式两类。外置式是数码相机储存媒介的主流,种类较多,不断有新产品开发。目前常用的有 CF 卡、SM 卡、PC 卡、MMC 卡、SD 卡和记忆棒等,每种都有其自己的特性。常用储存容量从几十 MB 至数个 G,可储存数百张照片。

8. 图像文件的储存格式 在电脑的应用程序中,文件格式是指保存和输入各种数据时所采用的方式。影像文件格式定义了影像数据的储存方式,从而使其他应用程序能够识别和使用影像。由于不同的图像软件所能处理的文件格式不同,因此,常需要进行图像格式的转换。此外,同一幅图像也可以用不同的图像文件格式进行储存,但由于不同格式之间所包含的图像信息不完全相同,故文件大小也有很大差别。因此,摄影者在使用时应选择适当的图像文件格式。在图像储存格式中,与数码摄影直接相关的主要是 JPEG、TIFF 和 RAW。

图像文件压缩形式有两类:一是无损压缩,即计算机程序将图像信息完整无损地还原出来,这类图像文件格式主要有 TIFF 和 RAW 等;二是有损压缩,通过计算保持画面中颜色变化部分的信息,但是,删除了图像中颜色突然变化部分的信息,这部分的信息通过观察时所产生的自然错觉来“填补”丢失的颜色信息,所以,仅靠肉眼难以辨别出被压缩数码图像在质量上的损失。有损压缩图像文件格式主要有 JPEG 等,其中 JPEG 格式是目前数码相机最常用的图像文件格式,JPEG 2000 是 2000 年推出的 JPEG 升级版,它的可压缩比例比

原先的 JPEG 提高约 30% 左右。同时支持有损压缩和无损压缩,原先的 JPEG 只能支持有损压缩。而无损压缩对高质量数码影像的获取具有重要的实用价值。

(二) 数码显微摄影技术应用

数码显微摄影随着数字技术的发展而迅速发展。目前,多数普通或特殊功能显微镜均带有数码摄影装置或 CCD 装置。使用此类显微镜进行拍摄时,不仅要遵循一般显微摄影的基本要求,对显微镜进行调节(如普通显微摄影技术中的摄影前准备和特殊显微镜摄影操作要点),还需遵循数码摄影的基本原理来进行操作。在数码显微摄影中需掌握以下要点:

1. 影像质量与图像储存格式的选择 各种显微镜的数码摄影装置对于拍摄影像质量均有若干可调种类,不同数码相机的这种可调种类有所差别。影像质量的选择包括对拍摄记录影像的分辨率、压缩比和清晰度等。在不同的数码相机上,这些调节的具体显示方法会有所不同。以日本 Olympus 生物显微镜所带的 C-5060 型 500 万像素数码相机为例,RAW 图像数据的分辨率为 2592×1944 ; TIFF 非压缩图像格式的分辨率从高到低为六种类型,包括 2592×1944 、 2592×1728 、 2288×1712 等; JPEG 低压缩与高压缩图像格式分辨率各有三种。这种影像质量的选择,直接影响储存卡可拍摄的画面多少,选择的影像质量越高,可拍摄的画面越少,反之则越多。进行影像质量选择的思考点主要根据拍摄目的来决定。如果拍摄后准备用于论文的照片,则宜用 JPEG 高质量拍摄模式,需打印的彩色照片尺寸越大,对像素的设定也应该越高;如果拍摄后准备用于出版图书,则宜选用 TIFF 非压缩图像格式。进行拍摄时,只要储存卡的容量能满足拍摄需要,尽可能采用高分辨率(高像素)、低压缩或不压缩的原则来拍摄。在影像质量的选择中,还会涉及图像储存格式问题。关于 TIFF 和 JPEG 格式如前所述,RAW 数据是尚未进行处理的图像数据,要将其作为图像显示时,需要使用 Camedia Master 软件。此软件可从 Olympus 主页下载。

2. 相当感光度的调节 多数数码相机的相当感光度既能自动调节,又能手动调节。可调范围因数码相机不同而异。ISO 自动调节时,视场光线明亮,相机则采用较低感光度拍摄;视场光线暗弱,相机则采用较高感光度拍摄。但这种自动调节幅度一般较小,在 ISO 100 左右。手动调节可在 ISO 80、100、200、400 等之间。对数码相机感光度的选择使用原则与选择传统胶卷的感光度相同,即只要能满足拍摄需要,选低不选高。只有在使用低感光度无法拍摄时(如荧光显微镜下的拍摄),方选用高感光度。因为数码相机拍摄时采用的感光度越高,其“数码噪音”也越大,表现在影像上则是杂点增多。

3. 曝光模式的调节和曝光补偿的使用 一般数码显微摄影常用的曝光模式有全自动程序曝光(P);光圈优先式自动曝光(A),即拍摄者手动选择光圈,相机自动调节快门速度;快门优先式自动曝光,即拍摄者手动选择快门速度,相机自动调节光圈。除以上这些自动曝光模式外,还有手动曝光模式(M),即光圈和快门速度均由拍摄者调节。对于缺乏摄影经验的人来说,使用全自动程序自动曝光最为简便。以日本 Olympus 生物显微镜所带的 C-5060 型 500 万像素数码相机为例说明如何使用光圈优先和快门优先曝光模式,如果使用全自动程序自动曝光时,半按下快门键,液晶显示屏上显示的光圈值为最小(F2.8),快门速度指示闪烁,表明曝光过度;或显示的光圈值最大(F8.0),快门速度指示闪烁,表明曝光不足,此时选用光圈优先模式调节光圈值。使用全自动程序自动曝光时的另一种情况是半按下快门钮时,液晶显示屏上显示的光圈值最大,并指示闪烁,表明曝光过度;显示的光圈值最

小,并指示闪烁,表明曝光不足,此时选用快门优先调节快门速度。

无论采用哪种自动曝光模式,当拍摄的主体背景有大面积明亮或白色时,使暗的被检物点布在明亮视场中,此时相机往往以主体的亮背景为标准曝光,而使暗被检物曝光不足,故选择+0.5~+2档曝光补偿加以校正;相反,当拍摄主体背景有大面积黑暗时(如使用荧光显微镜时),使亮被检物点布在暗视场中,此时,相机往往以主体的暗背景为标准曝光,而使亮被检物曝光过度,难以分辨其细节,故选择-0.5~-2档曝光补偿加以校正。自动曝光补偿的可调范围通常为±2档,每次以0.5档或1/3档递增或递减。数码相机影像传感器在曝光宽容度方面远不如传统相机的胶卷,这是由于半导体电路本身过载能力的局限所致。因此,在遇到上述有大面积过亮或过暗背景拍摄情况时,采用几种不同的自动曝光补偿进行拍摄,然后保留理想的照片,删去较差的照片,应该是明智的选择。

4. 闪光模式的调节 带有内置闪光灯的数码相机,通常有三四种闪光模式可供选择。在拍摄前应根据需要进行选择调节。以日本 Olympus 生物显微镜所带的 C-5060 型数码相机为例说明其常用情况。

(1) 自动闪光:是数码相机的默认设置。在这种模式下,当视场光线不足时,闪光灯则自动闪亮。当视场光线能满足相机曝光需要时,闪光灯则不闪亮。在普通显微摄影时,闪光灯的照明并不能增加光源亮度,反而会影响柯勒照明,影响拍摄效果。所以,当闪光灯闪亮时,提示光线不足,可适当调节灯光强度或 ND 滤光镜,使闪光灯不闪亮。

(2) 补光闪光:又称强制闪光模式。不管视场光线如何,闪光灯在每次拍摄时均闪亮。在显微摄影时这种闪光模式不必使用。在一般摄影时主要用于白天室外的逆光拍摄和白天室内以窗户为背景的拍摄。

(3) 关闭闪光灯:调节到关闭闪光模式时,闪光灯在任何情况下均不会闪亮。这种闪光模式常用于倒置相差显微镜和荧光显微镜摄影。因为使用自动闪光模式时,在暗视野下,闪光灯会自动闪亮,影响拍摄效果。

5. 白平衡模式的选择 近年来出厂的带有摄影装置的普通显微镜均装有内置青蓝色滤色镜,以提高色温,保持色温平衡。因此,在显微彩色摄影时,无需特殊调节白平衡,白平衡处于自动调节模式。如果不是灯光过强或过暗,此种模式均适用。但是,在光线过强或过暗超出自动调节白平衡范围的情况下,拍摄的照片偏蓝或偏黄,提示色温失衡,可通过调节光亮强度使色温平衡。

6. 注意拍摄延迟 使用数码相机的初学者须注意两点:一是按下快门键后,快门不能立即动作,因此不能立即移动标本,否则一定会导致拍摄失败;二是当拍好一张时,不能立即拍摄第二张,要等相机的拍摄计数灯(插卡读写指示灯)跳闪停止,说明储存已完成,方可拍摄下一幅画面。如果拍完一张,不准备马上拍下一张时,切忌在上一张影像储存结束前关闭电源,否则不仅会失去正在储存的画面,甚至会导致储存卡上所有已拍画面的丢失。同样,当相机显示电能耗尽,显示需充电信号时,应立即停止拍摄,以免造成类似损失。

7. 聚焦模式的调节 普通显微摄影装置的聚焦模式有自动聚焦和手动聚焦可供选择。自动聚焦精确度很高,操作简便迅速,所以通常选择自动聚焦模式。在聚焦操作中应先让被摄主体处于中央自动聚焦目标区域内,轻轻按下快门键一半,此时,自动聚焦指示灯会点亮,然后再按下快门。手动聚焦只是用于少数会使自动聚焦失灵的被摄体。任何自动聚焦系统

都会存在一些令其难以自动聚焦的被摄体,应注意从使用说明中了解相机在哪些情况下自动聚焦失灵。

8. 数码相机的维护 数码相机是精密的现代摄影器材,操作不当易出故障,不注意维护也会对相机造成损害,缩短其使用寿命。对数码相机维护要点有以下三方面:

(1) 严格按相机使用说明进行操作。数码相机上可操作的按钮比传统相机要多,不熟悉时,务必认真阅读相机使用手册,严格按操作要求进行操作,切忌随意摆弄,否则易导致故障。

(2) 数码相机上的镜头和液晶显示屏会沾染灰尘和手指印等,应注意经常清洁。清洁时,可先用吹气球吹去灰尘,然后用擦镜纸或擦镜布轻擦,不宜随便使用面巾纸或手帕等物清洁。

(3) 数码相机内部电子部件和电路较多,应十分注意防潮、防水及防灰尘。使用中应注意随时盖上镜头盖。剧烈的震动与碰撞均会导致相机内部结构的精密性受到影响,镜头和外观也会受到伤害,故应尽量避免。数码相机的关键部件 CCD 或 CMOS 芯片等对强磁场和电场颇为敏感。强磁场和电场会影响这些部件性能的正常发挥,直接影响拍摄质量,甚至导致相机出现故障。因此,数码相机在使用与保存时,均应远离强磁场和电场。不要把数码相机放置在有强磁性感应的器材设备附近。

(周国民 周莉)

参 考 文 献

1. 贲长恩,李叔庚.组织化学.北京:人民卫生出版社,2001.
2. 贝蒂.荧光原位杂交技术.王瑛,张诗武,译.天津:天津科技翻译出版公司,2003.
3. 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术.北京:人民军医出版社,2003.
4. 成令忠,钟翠平,蔡文琴.现代组织学.第3版.上海:上海科学技术文献出版社,2003.
5. 程时,彭学敏.生物医学电子显微镜技术.北京:中国医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1997.
6. 杜卓民.实用组织学技术.第2版.北京:人民卫生出版社,1997.
7. 黄丽华.生物光谱学实验.合肥:中国科学技术大学出版社,2005.
8. 李楠,尹岭,苏振伦.激光扫描共聚焦显微术.北京:人民军医出版社,1997.
9. 李楠,王凤翔,周春喜.荧光探针应用技术.北京:军事医学科学出版社,1998.
10. 梁英杰.免疫组织化学技术制片的规范和质量控制.中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(2):262-264.
11. 林勇,刘庆莹,朱长庚,等.白细胞介素-2对大鼠海马脑电图和胶质细胞的影响免疫——组织化学和显微图像分析等方法的研究.解剖学报,1998,1(4):22-27.
12. 凌晓光,吴强,徐振山,等.应用生物芯片扫描仪定量分析组织芯片荧光信号的可行性研究.安徽医科大学学报,2006,41:181-184.
13. 刘爱平.细胞生物学荧光技术.合肥:中国科学技术大学出版社,2007.
14. 马大烈,白辰光.免疫组织化学阳性标记结果的观察和判断.临床与实验病理学杂志,2003,19(5):557-559.
15. Wulf B Storch.免疫荧光基础.阮幼冰,译.北京:人民卫生出版社,1996.
16. 宋怀宇,赵启韬,王万忠.激光共聚焦显微镜对肝组织纤维化程度的荧光定量分析.中华消化杂志,2003,23(7):437-438.
17. 宋平根,李素文.流式细胞术的原理和应用.北京:北京师范大学出版社,1992.

18. 苏慧慈. 原位杂交. 北京:中国科学技术出版社,1994.
19. 王春梅,黄晓峰,陈志南. 激光扫描共聚焦显微镜技术. 西安:第四军医大学出版社,2004.
20. 王伯云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术. 北京:人民卫生出版社,2000.
21. 王丽,张秋金,林齐心,等. 初论免疫组化标准化(一). 诊断病理学杂志,2003,10(5):113-115.
22. 王丽,张秋金,林齐心,等. 初论免疫组化标准化(二). 诊断病理学杂志,2003,10(6):173-175.
23. 王廷华,齐建国. 组织细胞化学理论与技术. 北京:科学出版社,2005.
24. 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术及应用. 第2版. 北京:人民卫生出版社,2000.
25. 袁兰. 激光扫描共聚焦显微镜技术教程. 北京:北京大学医学出版社,2004.
26. 曾星,章国来,梅玉屏,等. 猪苓多糖对膀胱癌细胞癌基因蛋白表达的影响. 中国肿瘤临床,2003,30(2):81-83.
27. 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京:人民军医出版社,2000.
28. 杨刚,基础摄影. 郑州:郑州大学出版社,2004.
29. 张苏中,薛华克. 摄影技巧. 杭州:浙江摄影出版社,2000.
30. 颜志刚. 数码摄影教程. 上海:复旦大学出版社,2004.
31. Bonvicini F, Filippone C, Manaresi E, et al. Peptide nucleic acid-based in situ hybridization assay for detection of parvovirus B19 nucleic acids. *Clinical Chemistry*, 2006,52(6):973-978.
32. Brown, TA. *Genomes*. 2nd ed. New York and London:Garland Science,2002.
33. Bruce A, Alexander J, Julian L, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York and London:Garland Science,2002.
34. Du J, Tao-Cheng JH, Zerfas P, et al. The K^+ channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience*, 1998,84(1):37-48.
35. Castano P, Marcucci A, Miani A Jr, et al. Central and peripheral neurons structures as seen at the confocal scanning laser microscope. *J Microsc*. 1994,175(3):229-237.
36. Gao Peng, Zhou Geng Yin, Liu Yuan, et al. Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *World Journal of Gastroenterology*. 2004,10(20):2936-2939.
37. Harvey L, Arnold B, Lawrence ZS, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York:W. H. Freeman & Co. 2000.
38. Li H, Ohishi H, Kinoshita A, et al. Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett*, 1997,223(3):153-156.
39. Mason WT. *Fluorescent and luminescent probe for biological activity*. London: Academic Press,1993.
40. Richard P Haugland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. 6th ed. Michelle TZ Spence: Molecular Probes, Inc,1996.
41. Wang YJ, Chen GH, Hu XY, et al. The expression of calcium /calmodulin-dependent protein kinase II- α in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and its links with AD-related pathology. *Brain Research*. 2005,1031:101-108.
42. Turner PC, McLennan AG, Bates AD, et al. *Instant notes in molecular biology*. Oxford: Bios Scientific publishers limited,2001.
43. Tom S, Read AP. *Human Molecular Genetics 2*. 2nd ed. New York and London:Garland Science,1999.

第九章 组织化学与免疫组织化学实验指导

组织化学与免疫组织化学是颇富实践性的常用技术。对于初学者来说,学习和理解其理论知识是掌握这门技术的先决条件。但是,如果在此基础上不进行实际动手操作,其理论知识犹如纸上谈兵,全无用武之地。所以,为使学生在实验课中能得到规范和有效的技能训练,本章根据组织化学与免疫组织化学的主要内容设计了十项常用实验。

实验一 组织标本石蜡切片和冰冻切片的制备

(一) 石蜡切片和 HE 染色标本制备

【实验目的】

通过制备石蜡切片,掌握组织标本切片制备的基本方法和操作技能,并为下一步常规 HE 染色、组织化学或免疫组织化学染色做准备。

【实验原理】

石蜡切片标本制作是组织学最基本方法,包括从取材、固定到脱水、包埋和切片等一系列过程。最终是以石蜡代替组织内的水分,组织被包埋在石蜡块中,使组织具有与石蜡相同的硬度,以便于切片。对于各种器官的一般组织学观察,最常用的染色方法是苏木精-伊红染色(hematoxylin & eosin staining, HE 染色)。其基本原理是:苏木精为碱性染料,它主要使细胞核内染色质与胞质内的核糖体染成紫蓝色。伊红是酸性染料,主要使细胞质和细胞外基质中的成分染成粉红色。易被碱性或酸性染料着色的性质分别称为嗜碱性和嗜酸性。

【仪器与试剂】

乙醚、10%福尔马林溶液、乙醇、二甲苯、石蜡、苏木精、伊红、中性树脂、黏附剂。旋转切片机、毛笔、染色缸、载玻片、盖玻片、烤箱、恒温箱、天平、酸度计、定时钟、解剖器械和普通光学显微镜。

苏木精染液配制(Harris 苏木精染色法):

甲液:苏木精	1g
无水酒精	10ml
乙液:硫酸铝钾	20g
蒸馏水	200ml

先将苏木精加热溶解(甲液)后,密封待用,再将硫酸铝钾加热溶解(乙液)至沸,去火,待溶液仍处于小沸腾状态时再将甲液徐徐倾入其中,全部混合后,再使溶液在短时间内加热至沸腾,去火,最后,将 0.5g 氧化汞缓慢加入溶液中(因氧化汞倒入后,溶液会迅速膨胀易沸出容器外而发生危险,故氧化汞一定要慢慢少量分次加入,切忌急躁)。此时液体变为深紫色,

待氧化汞全部放入后,再将溶液加温至沸腾片刻,立即将溶液放入流动的冷水中,并缓缓地连续摇晃至溶液完全冷却为止。隔夜后过滤,加入冰醋酸(按5%比例)混匀,再过滤后保存于冰箱内备用。

0.5%伊红染液(用蒸馏水配制)

【实验步骤】

用于组织化学和免疫组织化学的石蜡切片制备与常规 HE 染色的制片过程基本相同,下面以 HE 染色的石蜡切片为例叙述其步骤:

1. 取材 将乙醚或三氯甲烷棉球与小鼠同时密封于玻璃容器内,待小鼠完全麻醉后取出脱臼处死,迅速解剖小鼠,取下所需组织并修成一定形状大小,投入预先备好的固定液中。取材时,需先熟悉动物脏器的解剖关系,取材部位要准确,直接选取病变部位或所需部位,且动作要快而轻,时间过长或机械损伤组织,均会影响组织切片的染色效果及改变组织细胞的正常形态。放入固定液前,一般可用生理盐水洗去多余的血液或肠管中的内容物等。

2. 固定 取出的组织块一般用10%福尔马林溶液固定24~48小时,用于免疫组织化学染色的组织用多聚甲醛4℃固定,不超过24小时。固定方式因实验目的不同而异,如在某些实验中需灌注固定。固定效果的好坏直接影响组织的染色情况,因此,要注意固定的时间和温度等条件。固定时间的长短可因组织大小和结构性状不同而改变。

3. 固定后修块 固定中的组织,因在取材过程中,组织柔软造成组织切口边缘的损伤或不平整,故在固定过程中需进一步修整,即修块。修整后重新放入固定液中继续固定。

4. 包埋 固定好的组织最终要入石蜡包埋,而石蜡与水不相溶,故需脱去组织中的水分。常用梯度乙醇溶液作为脱水剂。脱去水分后组织中的乙醇仍与石蜡不相溶,故还需使用透明剂二甲苯置换乙醇。

(1) 脱水:用梯度乙醇脱水,脱水时间的长短与组织块大小和结构有关。一般过程如下:70%、80%、90%和95%乙醇各3~4小时,100%乙醇Ⅰ和100%乙醇Ⅱ各2小时。

(2) 透明:常用二甲苯置换组织中的乙醇,其时间长短与组织大小和结构有关。一般过程:二甲苯Ⅰ10分钟,二甲苯Ⅱ30分钟(操作者可灵活掌握此步骤的时间)。脱水和透明一定要充分,如不充分,不利于浸蜡,易使石蜡与组织之间形成夹层,给切片造成困难。脱水和透明的时间也不能过长,过长会使组织变得过硬,不便于浸蜡,且易引起切片时的脆裂。

(3) 浸蜡:经透明的组织要入溶融的石蜡中浸透,一般需经三次,浸蜡前,准备好熔蜡杯,放入熔蜡箱,熔蜡待用。一般准备四杯,第一杯为二甲苯:石蜡=1:1,浸透30分钟;第二、三杯为纯石蜡,各浸透1小时;第四杯为纯石蜡,浸透30分钟,然后用此杯熔蜡包埋。较理想的浸蜡温度是石蜡刚融化的温度。用于免疫组织化学染色的组织浸蜡温度不宜过高,一般在60℃以下。浸蜡时间不能过长或不足。

(4) 包埋:入新的石蜡中冷却。包埋时,先把熔蜡倒入包埋器中,在蜡还未冷却凝固时,迅速置入浸透石蜡的组织块。置入前要分清组织的各个面,将所需断面朝下。包埋有腔的组织时,需平放或立放,以获得所需断面。

(5) 修块:石蜡凝固后,组织便包封在石蜡内,这时需把包有组织的蜡块修成一定形状以便切片。并可在适当的地方作上标记,便于日后辨认。修块时,组织周围留有约2mm石蜡边。蜡边与组织边不能靠得太近亦不能太远,近则不易连片,远则费刀。并且要把各个面

修平整,以便于连续切片。

5. 切片 修好的蜡块装在切片机上,即可进行连续切片。切片刀对组织的倾角以 10° 为宜。一般组织切片的厚度在 $5\sim 7\mu\text{m}$,也可根据染色需要切成不同厚度,但一般不超过 $10\mu\text{m}$ 。将蜡带光泽面向下铺于温水上,待蜡片伸展平整后,即可用长镊轻轻分离每一蜡片,再将涂有蛋白-甘油的载玻片(用于免疫组织化学染色的载玻片需使用多聚赖氨酸等黏片剂替代蛋白-甘油)深入水中,从蜡片下面捞起,用细针调整蜡片在载玻片的位置。

6. HE 染色

(1) 烤片:烤片的目的是将带有蜡的组织切片牢固地粘在载玻片上,保证在染色过程中不使切片脱落。切片在 $56\sim 60^\circ\text{C}$ 的恒温箱中至少放置 1 小时才能达到此目的,用于 HE 染色的切片可在 60°C 温箱中过夜,而用于免疫组织化学染色的切片,通常烤片温度和时间是 $58\sim 60^\circ\text{C}$ 2~3 小时。

(2) 脱蜡:为适于水溶性染色剂染色,必须去掉组织中的石蜡。用二甲苯脱蜡过程:二甲苯 I 15 分钟;二甲苯 II 15 分钟。

(3) 梯度乙醇水化:因为二甲苯与水不相溶,而乙醇分别与水及二甲苯相溶,故使用下行梯度乙醇使组织水化。无水乙醇 I 10 分钟→无水乙醇 II 10 分钟→95%乙醇 5 分钟→90%乙醇 5 分钟→80%乙醇 5 分钟→70%乙醇 5 分钟。

(4) 水洗:把组织片放入自来水中浸泡 5 分钟,使组织充分水化,并可洗去多余的乙醇。

(5) 苏木精染色:苏木精是水溶性染料,水化后的组织片直接放入苏木精染液中 3~5 分钟,以使细胞核着色。

(6) 水洗:组织片直接放入自来水中,一则可以洗去多余的苏木精染液,二则可以加强苏木精的着色程度,因为苏木精是碱性染料,而自来水为弱碱性。显微镜下观察细胞核着色程度,如果细胞质和细胞核仍不能区分,或细胞质着色,需把切片放入 1%盐酸乙醇中分色数秒,再水洗进行观察,直至分化合适为止。分化后的切片再入蒸馏水中 5~10 分钟。

(7) 伊红染色:组织片直接入伊红染液 10 分钟左右,使细胞质着色。然后先用自来水洗去多余的染液,再换蒸馏水洗净。

(8) 分色:以 95%乙醇对伊红分色,至胞浆或结缔组织等呈桃红色。分色时间要短,因为伊红易脱色。

(9) 上行梯度乙醇脱水:70%乙醇片刻→80%乙醇片刻→90%乙醇 5 分钟→95%乙醇 10 分钟→无水乙醇 I、II 各 10 分钟。

(10) 透明:将组织片中的乙醇用二甲苯置换出来。二甲苯 I、II 各 10 分钟。透明时,时间一定要充足,确保乙醇完全被置换出来,使组织片清澈透明。

(11) 封片:透明后的组织片,用绸布擦去多余的二甲苯,直接滴加中性树脂,压上盖玻片,即可镜检。注意:滴加树脂要快,以免组织干燥影响观察效果;树脂不必太多,盖住组织即可;压盖玻片时,镊子夹住盖玻片使其一端先接触树脂,再轻轻盖好,以防止出现气泡。

【实验结果】

细胞核染成紫蓝色,细胞质以及细胞外的胶原纤维等成分染成淡粉红色或淡红色,红蓝对比鲜明。若苏木精染色过深,则细胞质和胶原纤维等成分带有蓝色。若苏木精染色过淡,则细胞核带有红色,对比不鲜明。

(二) 冰冻切片标本制备

【实验目的】

通过制备冰冻切片,掌握其基本操作方法,并为下一步组织化学或免疫组织化学染色做准备。

【实验原理】

冰冻切片是将组织块在低温下迅速冷冻变硬,在恒冷箱切片机内把组织切成 $2\sim 5\mu\text{m}$ 的薄切片。恒冷箱切片最突出的优点是不经脱水、包埋和脱蜡等处理,简便而快捷。由于无需高温处理标本,故能完好地保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性和抗原的免疫活性。尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜组织及已固定的组织均可冰冻切片。

【仪器与试剂】

液氮罐、液氮、丙酮、干冰等,恒冷箱切片机。

【实验步骤】

1. 组织冷冻 根据研究目的取下所需组织(如切取小鼠肝脏 $1.0\text{cm}\times 1.0\text{cm}\times 0.5\text{cm}$ 大小的组织块),用滤纸吸去多余水分,将组织块平放于用锡纸特制小盒(直径约 2cm)或软塑料瓶盖内,加适量 OCT 包埋剂浸没组织, 4°C , $20\sim 30$ 分钟。

2. 包埋 常用干冰-丙酮包埋法:将 $150\sim 200\text{ml}$ 丙酮装入小保温杯内,逐渐加入干冰,直至饱和,不再冒泡时,温度可达 -70°C 。将含有组织块的小盒轻轻放到干冰制冷后的丙酮液面上(不要使丙酮进入包埋液中),待数十秒后,组织冻结即可置于恒冷箱内以备切片,或置于 -80°C 低温冰箱内贮存备用。也可将新鲜组织标本在恒冷箱切片机的快速冷冻台上迅速冻凝组织块,直接切片。或者采用液氮法:将小块组织置于小盒或者软塑料瓶盖内,缓缓将小盒平放于保温杯内液氮表面,液氮即开始气化沸腾(切勿将组织块浸入液氮内),约 $10\sim 20$ 秒后,取出组织块,锡箔纸包好,做标记,放入 -80°C 冰箱保存备用。

3. 切片 取出组织支承器,放平摆好组织,周边滴上包埋剂,置于冷冻台上冰冻。如非常小的组织应先在支承器上滴包埋剂让其冷冻,形成一个小台后再放上小块组织,滴上包埋剂。将冷冻好的组织块夹紧于支承器上,启动粗进退键,转动旋钮,将组织修平。调好所需的厚度,原则是细胞密集的组织薄切,纤维多细胞稀的组织可稍微厚切,一般在 $5\sim 10\mu\text{m}$ 之间。

切片时将防卷板轻置于切片刀上,调整其上缘使其与刀口几乎平齐。匀速摇动切片机手柄进行切片,组织片平行滑入刀与抗卷板之间,平整地躺在持刀器的铁板上。这时便可掀起防卷板,用经黏片剂处理的载玻片轻轻平行接触切片(切勿抖动),切片则会吸附到载玻片上。用毛笔刷去片屑(从刀背向刀刃方向,反向会损伤刀刃),放下防卷板,重复切片。切片后室温干燥或风吹 30 分钟以上干燥,即可直接进入染色或冻存。染色前,从冰箱内取出切片,置室温干燥 10 分钟,再经冷丙酮固定 $5\sim 10$ 分钟(未固定者),PBS冲洗 3 次,即可进入组织化学和免疫组织化学染色程序(HE染色可用甲醛、冰醋酸和 95% 酒精快速固定 $1\sim 2$ 分钟)。

4. 注意事项

(1) 防卷板、切片刀和持刀架应保持干净,需经常用毛笔挑除切片残余,有时需要每切一张切片后清洁一次。因为这些地方为切片通过和附贴之处,如果有残余包埋剂粘于刀或

板上,将会破坏甚至撕裂切片。

(2) 用于附贴切片的载玻片,应置于室温存放,不能存放于冷冻处。因为当附贴切片时,从室温中取出的载玻片与冷冻箱中的切片形成温度差,这种温度差会产生一种吸附力,使切片与载玻片牢固地附贴在一起。

(3) 应视不同组织选择不同的冷冻温度。如切未经固定的脑组织、肝组织和淋巴结时,冷冻箱中的温度不能过低,一般 $-10\sim-15^{\circ}\text{C}$ 左右,如切甲状腺、脾、肾和肌肉等组织时,一般在 $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$ 左右,含脂肪的组织应调至 -25°C 左右,切含大量脂肪的组织时应调至 -30°C 。

(刘慧雯)

实验二

DNA 的 Hoechst 33258 和 DAPI 荧光组织化学染色

(一) DNA 的 Hoechst 33258 荧光组织化学染色

【实验目的】

掌握 DNA 的 Hoechst 33258 荧光组织化学染色方法的原理、实验步骤和应用。

【实验原理】

Hoechst 是一种 DNA 荧光染料,能通过完整的细胞膜与活细胞或固定细胞双链 DNA 小槽处的 A-T 碱基结合,发出亮蓝色荧光,可作为正常细胞核的荧光显示剂。当细胞发生凋亡时,膜通透性增强,进入凋亡细胞中的 Hoechst 荧光染料增多,且凋亡细胞膜上的 p-糖蛋白泵功能受损,不能有效地将 Hoechst 排出细胞外,加之凋亡细胞染色体 DNA 的结构发生改变,易于与染料结合,结果使染料在细胞内积聚增多,所以凋亡细胞的蓝色荧光明显增强。虽然正常细胞和凋亡细胞均可被 Hoechst 着色,但根据荧光强度和细胞核形态可将两种细胞加以区分:正常细胞核呈圆形,Hoechst 染色浅且均匀,而凋亡细胞核浓染呈颗粒状或块状的亮蓝色荧光,且核呈分叶或碎片状;也可通过稀释染料的浓度加以区分:正常细胞核的荧光明显变淡,而凋亡细胞的核仍呈较强荧光。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 活细胞或固定的组织细胞。

2. 试剂

(1) 0.01mol/L PBS (pH 7.4) 200ml

(2) Hoechst 33258 基液

Hoechst 33258 1mg

0.01mol/L PBS (pH 7.4) 5ml

(3) Hoechst 33258 工作液 (终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Hoechst 33258 基液 125 μl

0.01mol/L PBS (pH 7.4) 50ml

3. 器材 温箱、冰箱、载玻片、微量移液器、移液器吸头、湿盒、染色缸、小烧杯、玻璃棒、

荧光显微镜或流式细胞仪。

【实验步骤】

1. 准备活细胞或固定的组织细胞；
2. 0.01mol/L PBS 漂洗 5 分钟；
3. Hoechst 33258 工作液染色, 室温 5~15 分钟；
4. 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟；
5. 甘油/PBS(1:9)混合液或水溶性封片剂封片, 荧光显微镜或流式细胞仪观察。

【实验结果】

正常细胞核为圆形, 呈均匀蓝色荧光(图 3-4); 凋亡细胞核或胞质中出现浓染致密的颗粒或块状亮蓝色荧光, 且核呈分叶或碎片状。

注意事项

(1) 常用的 Hoechst 染料为 Hoechst 33342 和 Hoechst 33258, 前者更容易透过细胞膜, 故常用来进行活细胞 DNA 含量分析(如细胞周期分析)。

(2) 染活细胞时, 不同种类的细胞摄入 Hoechst 效率存在一定差异, 故染色强度亦不尽相同, 在进行流式细胞术分析时, 可见不同信号峰, 而固定细胞 Hoechst 染色不存在此现象。

(3) 荧光物质易发生淬灭, 随时间延长荧光强度减弱, 染色后应尽快观察。

(4) 应用防淬灭封片剂封片可延缓淬灭, 但仍需避光保存。

(二) DNA 的 DAPI 荧光组织化学染色

【实验目的】

掌握 DNA 的 DAPI 荧光组织化学染色方法的原理、实验步骤和应用。

【实验原理】

4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 为一种特异性 DNA 荧光染料, 能透过活细胞和固定细胞的细胞膜与细胞核中的双链 DNA 小槽、特别是 A-T 碱基紧密结合, 产生较 DAPI 自身强 20 余倍的蓝色荧光。与其他几种 DNA 荧光染料相比, DAPI 的荧光强度虽然较 Hoechst 低, 但光稳定性强, 且与双链 DNA 结合的灵敏度优于溴化乙啶(ethidium bromide, EB) 和碘化丙啶(propidium iodide, PI), 因此, DAPI 是研究者喜爱的一种核染料。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 新鲜或固定的组织细胞等。

2. 试剂

(1) 0.01mol/L PBS(pH 7.0)

0.1mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 34ml

0.1mol/L Na_2HPO_4 66ml

NaCl 0.9g

双蒸水 900ml

(2) DAPI 基液

DAPI 0.5mg

双蒸水 5.0ml



(3) DAPI 工作液

DAPI 基液	50 μ l
0.01mol/L PBS	50ml

3. 器材 温箱、冰箱、载玻片、微量移液器、移液器吸头、湿盒、染色缸、小烧杯、玻璃棒、荧光显微镜或流式细胞仪。

【实验步骤】

1. 培养细胞或新鲜组织的冰冻切片,先经冷丙酮或 4%多聚甲醛固定 10 分钟(也可不固定),固定的组织细胞直接进行下一步骤。

2. 0.01mol/L PBS 漂洗 5 分钟。

3. 倘若进行细胞核复染,将少量 DAPI 工作液滴加在免疫荧光染色的贴壁细胞或组织切片上,覆盖样品即可;倘若做流式细胞术分析,悬浮细胞离心后至少加入待测样品体积 3 倍的 DAPI 工作液,混匀。

4. 室温避光孵育 5~20 分钟。

5. 0.01mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。

6. 甘油/PBS(1:9)液或水溶性荧光封片剂封片。

7. 根据实验目的进行荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。

【实验结果】

正常细胞核圆形,边缘清晰,荧光染色均匀,细胞质无荧光;而凋亡细胞因膜通透性增加,对 DAPI 的摄取能力增强,所产生的蓝色荧光也明显增强,且细胞核边缘不规则,核染色体浓集,着色重,常伴有细胞核固缩,核小体碎片增加等,所以,可根据荧光强度和细胞核的形态等鉴别凋亡细胞与正常细胞。

在有支原体污染的细胞胞质和细胞表面可见孤立的点状荧光;在感染痘苗病毒的细胞质中存在独特的“星状”荧光丛(star-like fluorescent clusters),腺病毒感染早期胞质中也可出现蓝色荧光。

注意事项

(1) DAPI 基液最好用双蒸水配制, -20 $^{\circ}$ C 避光可长期保存。

(2) DAPI 对人体有害,操作时需注意防护。

(周德山)

实验三 脂类的异丙醇油红 O 法染色

【实验目的】

掌握脂类的异丙醇油红 O 法染色的基本原理和实验步骤。

【实验原理】

油红 O 属于偶氮染料,是很强的脂溶剂和染脂剂,易与甘油三酯结合呈小脂滴状。脂溶性染料能溶解于组织和细胞中的脂类,在脂类中的溶解度较大,当组织切片置入染液时,染料则离开染液而溶于组织内的脂质(如脂滴)中,使组织内的脂质着色。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 肥胖大鼠肝脏。
2. 试剂 0.4%油红 O 异丙醇饱和液, 60%异丙醇, Mayer 苏木精, 甘油明胶, 40%甲醛, 10%无水氯化钙。

油红 O 染液配制:

0.4%油红 O 异丙醇饱和液	12ml
蒸馏水	8ml

两者混匀, 过滤后即可使用。

3. 器材 立式染色缸、玻璃棒、滤纸、漏斗、盖片、镊子、烧杯、量筒、盖玻片。

【实验步骤】

1. 切片用福尔马林-钙固定 10 分钟, 蒸馏水洗;
2. 60%异丙醇浸洗;
3. 油红 O 染液 10 分钟 (染液可回收再利用);
4. 60%异丙醇浸洗, 蒸馏水洗;
5. 入 Mayer 苏木精复染;
6. 自来水洗 (蓝化) 1~3 分钟, 蒸馏水洗;
7. 甘油明胶封片。

【实验结果】

脂滴呈橘红色, 核呈蓝色 (图 3-6)。

(苏红星)

实验四 钙-钴法显示碱性磷酸酶

【实验目的】

通过对大鼠肾或小肠碱性磷酸酶定性和定位, 掌握常用碱性磷酸酶显示方法的原理和实验步骤。

【实验原理】

碱性磷酸酶在碱性环境下将磷酸盐底物 (β -甘油磷酸钠) 分解, 产生磷酸离子被孵育液中氯化钙捕获, 生成磷酸钙沉淀, 加入硝酸钴, 生成无色磷酸钴, 加入硫化铵, 生成棕黑色硫化钴颗粒沉淀, 以显示酶活性部位。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 大白鼠肾或小肠恒冷箱切片, 厚 $7\mu\text{m}$ 。
2. 试剂 3% β -甘油磷酸钠、2%巴比妥钠、2%无水氯化钙、2%硫酸镁、2%硝酸钴、0.5%硫化铵、Mayer 苏木精染液、甘油明胶。

孵育液配制:

3% β -甘油磷酸钠	2ml
2%巴比妥钠	2ml

2%无水氯化钙	3ml
2%硫酸镁	2ml
蒸馏水	1ml

混匀,调 pH 值至 9.4,过滤后使用。

3. 器材 烧杯、染缸、镊子、滤纸、漏斗、吸量管、玻棒、洗耳球、载玻片。

【实验步骤】

1. 切片标本入 37℃ 孵育液内(孵育液在 37℃ 水浴内预热 5 分钟)孵育 5~10 分钟;
2. 流水洗 2 分钟后入蒸馏水洗;
3. 入 2%硝酸钴 5 分钟;
4. 流水洗 5 分钟后入蒸馏水洗;
5. 入 0.5%硫化铵 2 分钟;
6. 流水洗 5 分钟后入蒸馏水洗;
7. Mayer 苏木精染色;
8. 自来水洗蓝化 1~3 分钟后入蒸馏水洗;
9. 甘油明胶封固。

【实验结果】

肾近曲小管刷状缘或小肠上皮纹状缘处呈黑色沉淀(图 3-10),显示碱性磷酸酶活性。血管壁也显示此酶活性。细胞核呈蓝色。对照实验:去底物结果为阴性。

(苏红星)

实验五 偶氮偶联法显示酸性磷酸酶

【实验目的】

通过对大鼠肾或小肠酸性磷酸酶定性、定位,掌握常用酸性磷酸酶显示方法的原理和实验步骤。

【实验原理】

在酸性环境下,酸性磷酸酶将底物萘酚衍生物磷酸酯即磷酸萘酚 AS-BI 分解,释放出萘酚 AS-BI,萘酚 AS-BI 立即与六氮化对品红偶联,生成红色偶氮染料,以显示酸性磷酸酶活性。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 大鼠肝、肾、小肠冰冻切片,厚 7 μ m。
2. 试剂 磷酸萘酚 AS-BI、二甲基亚砷、4%对品红盐酸盐、4%亚硝酸钠、0.1mol/L 醋酸钠、Mayer 苏木精、甘油明胶。

六氮化对品红缓冲液的配制:

4%对品红盐酸盐	0.3ml
4%亚硝酸钠	0.3ml

密闭下混匀静置 1 分钟,待溶液变为淡黄色后加入 0.1mol/L 醋酸钠 9.4ml 调节

pH 5~5.5。

孵育液配制：

磷酸萘酚 AS-BI	5mg
二甲基亚砷	0.2ml
六氮化对品红缓冲液	10ml

混匀过滤。

3. 器材 烧杯、染缸、镊子、滤纸、漏斗、玻棒。

【实验步骤】

1. 切片入孵育液 37℃, 30 分钟；
2. 蒸馏水洗；
3. Mayer 苏木精复染核；
4. 自来水蓝化 1~3 分钟后入蒸馏水洗；
5. 甘油明胶封片。

【实验结果】

酸性磷酸酶存在的部位显示红色。在肝组织中,以胆小管周围酸性磷酸酶活性最高,着色最深。在肾组织中,以肾近曲小管上皮细胞酸性磷酸酶活性最高;在小肠组织中,以小肠绒毛柱状上皮细胞酸性磷酸酶活性最强。

(苏红星)

实验六 胆碱酯酶染色——Karnovsky-Roots 法

【实验目的】

掌握 Karnovsky-Roots 法显示组织和细胞中的胆碱酯酶活性的原理、实验步骤和应用。

【实验原理】

广义的胆碱酯酶包括乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶,二者均能将非特异性底物碘化硫代乙酰胆碱水解为硫代胆碱,进而使铁氰化物还原为亚铁氰化物,后者再与铜离子结合生成棕褐色的亚铁氰化铜沉淀,以显示酶活性的存在。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 新鲜或多聚甲醛固定的神经组织。

2. 试剂

A 液:0.1mol/L 冰醋酸

冰醋酸

0.574ml

双蒸水至

100ml

B 液:0.1mol/L 醋酸钠

三水醋酸钠

2.72g

双蒸水至

200ml

A+B 混合液:



A 液	22ml
B 液	178ml
C 液:0.1mol/L 枸橼酸钠	
二水枸橼酸钠	2.94g
双蒸水至	100ml
D 液:30mmol/L 无水硫酸铜	
无水硫酸铜	0.48g
双蒸水至	100ml
E 液:5mmol/L 铁氰化钾	
铁氰化钾	0.1645g
双蒸水至	100ml
孵育液配制:	
A+B 混合液	6.5ml
C 液	1.0ml
D 液	1.0ml
双蒸水	1.0ml
E 液	1.0ml
碘化硫代乙酰胆碱	5mg

用前新鲜配制,依次加入上述液体,充分混匀,溶液呈透明的黄绿色。

3. 器材 温箱、载玻片、微量移液器、移液器吸头、湿盒、染色缸、小烧杯、玻棒等。

【实验步骤】

1. 新鲜组织冰冻切片或铺片,经 4%多聚甲醛固定 15~30 分钟,而固定的组织制作切片或铺片后可直接漂洗;
2. 生理盐水漂洗 3 次,每次 5 分钟;
3. 孵育液 37℃孵育,30~60 分钟,必要时,更换一次孵育液;
4. 生理盐水漂洗,终止酶催化反应;
5. 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后镜检,亦可用水溶性封片剂封片。

【实验结果】

含胆碱酯酶的部位均显示棕褐色沉淀。

(周德山)

实验七 还原型辅酶 II-黄递酶(NADPH-d)染色

【实验目的】

掌握还原型辅酶 II-黄递酶(NADPH-d)染色法显示神经系统中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的原理和实验步骤。

【实验原理】

NADPH-d 能将辅助因子 β -NADPH 提供的电子转移至底物氯化硝基四氮唑蓝 (NBT), 使之还原为不溶解的紫蓝色沉淀, 通过观察沉淀的部位和颜色深浅推断酶的分布及酶活性的强弱。现已证实 NOS 与 NADPH-d 在神经系统的分布极其相似, 两者可能是同一物质, 故 NADPH-d 组织化学方法已广泛用于神经系统的 NOS 检测。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 新鲜或多聚甲醛固定的各种含神经的组织。
2. 试剂 β -NADPH、NBT、0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)及 Triton X-100。

孵育液的配制:

β -NADPH	5mg
NBT	2.5mg
Triton X-100	15 μ l
0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)	5ml

3. 器材 温箱、冰箱、载玻片、微量移液器、移液器吸头、湿盒、染色缸、小烧杯、玻棒、pH 计等。

【实验步骤】

1. 未固定的新鲜组织冰冻切片或铺片, 先经 4% 多聚甲醛固定 15~30 分钟, 已固定的组织切片或铺片可直接漂洗。
2. 生理盐水漂洗 3 次, 每次 5 分钟。
3. 孵育液 37 $^{\circ}$ C 孵育, 15~45 分钟, 必要时中间可更换孵育液。
4. 生理盐水漂洗 5 分钟, 终止酶反应。
5. 脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后镜检, 亦可直接用水溶性封片剂封片。

【实验结果】

含 NOS 活性部位显示为紫蓝色沉淀, 可根据颜色深浅推测酶活性的强弱。

(周德山)

实验八 免疫组织化学实验——SABC 法

【实验目的】

掌握免疫组织化学 SABC 法的基本原理、实验步骤和注意事项。

【实验原理】

亲和素—生物素—过氧化物酶复合物法 (avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC 法) 是将亲和素作为“桥”与生物素化二抗和生物素结合的酶连接起来, 使抗原与抗体反应信号放大, 以增加敏感性。该法将第二抗体以生物素标记, 亲和素与生物素标记的过氧化物酶混合成 ABC 复合物。染色时, 标本中的抗原先与第一抗体结合, 后者再与生物素标记的第二抗体结合, 然后加入 ABC 复合物, 结合到第二抗体的生物素上, 最终形成的复合物网络大量的酶分子。因为目前常用的亲和素是从链霉菌 (Strept) 培养物中提取, 因此, 称为

链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC法)。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 组织石蜡切片。

2. 试剂

(1) 二甲苯 脱蜡 I 和 II;透明 I 和 II。

(2) 乙醇 无水乙醇 I 和 II,95%、90%、80%及 70%乙醇。

(3) 蒸馏水,0.01mol/L PBS(pH 7.4),3%甲醇-H₂O₂,中性树脂,0.3% Triton X-100,黏片剂。

(4) 第一抗体(特异性抗体)。

(5) SABC-HRP 试剂盒:包括①与二抗同动物种属的非免疫血清;②生物素化二抗(购买时要选择与一抗相匹配的二抗);③SABC液(链霉亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物)。

(6) 3,3-二氨基联苯胺(DAB)。

(7) 苏木精染液。

试剂配制见附录一。

3. 器材 温箱、烤箱、冰箱、载玻片、盖玻片、微量移液器、移液器吸头、吸管、湿盒、染色缸、免疫组化笔、记号笔、EP管、滤纸条、吸水纸及搅拌器等。

【实验步骤】

1. 烤片 温度和时间为 58~60℃,2~3 小时。

2. 脱蜡和水化 切片在染色缸中分别在二甲苯 I 和 II 中浸泡 15~30 分钟,依次经过下行梯度乙醇至水。在无水乙醇 I、II 中分别浸泡 5 分钟,95%、90%、80%及 70%乙醇中分别浸泡 2 分钟,PBS 漂洗 3 分钟×3 次,放置蒸馏水中待用。

3. 抗原修复 需修复的抗原要求此步骤,请参见第四章。

4. 细胞膜打孔 切片置于 0.3% Triton X-100 中室温浸泡 25 分钟,PBS 漂洗 3 分钟×3 次。

5. 灭活内源性过氧化物酶 蒸馏水配置新鲜 3%甲醇-H₂O₂(3ml 纯甲醇中加入 30% H₂O₂ 3ml,现用现配),室温 10 分钟,PBS 洗 2 分钟×3 次。

6. 正常血清封闭液(与二抗同种动物来源的血清)20μl,室温孵育 10~20 分钟,甩去多余液体,不洗。

7. 滴加一抗(用 PBS 稀释为工作浓度)20μl,37℃ 2 小时或 4℃过夜,PBS 洗 2 分钟×3 次。

8. 滴加二抗(SABC 试剂盒中通常为即用型)20μl,37℃ 20 分钟,PBS 洗 2 分钟×3 次。

9. 滴加 SABC 液 20μl,37℃孵育 20 分钟,PBS 洗 3 分钟×3 次。

10. 室温 DAB 显色,镜下控制显色程度,一般 5~10 分钟,蒸馏水洗涤。

11. 苏木精复染 5~10 秒,自来水返蓝,上行梯度乙醇脱水分别 2 分钟,透明用二甲苯 I 和 II 各 10 分钟,树脂封片后镜下观察。

【实验结果】

免疫反应阳性物染为棕色,细胞核染为蓝色(图 4-4)。

注意事项

1. 载玻片要清洗干净;涂黏片剂防止脱片,做好载玻片的正反面标记;烤片时间要充

分、适当,至少 60℃烤 2 小时以上。

2. 脱蜡要彻底,室温较低时可以在温箱内脱蜡,或者延长脱蜡时间。
3. 滴加液体、冲洗和擦拭时避免碰到组织切片,操作轻柔,PBS 冲洗要充分。
4. 浓缩型试剂稀释后要混匀。抗原和一抗、一抗和二抗的种属关系要匹配。滴加试剂量视组织块大小而定,应覆盖整个组织。
5. 切片放于湿盒内,勿使切片干燥。
6. 设阳性对照和阴性对照。
7. 标本数量较多需要分批进行免疫组化染色时,实验条件需保持一致。
8. 由于肝脏、肾脏和脑组织的内源性生物素含量较高,如果染色后背景较深并且已经排除其他可能原因,应使用内源性生物素阻断剂。

(周 莉)

实验九 免疫荧光细胞化学染色(间接法)

【实验目的】

掌握间接法免疫荧光细胞化学技术的原理和实验步骤。

【实验原理】

用特异性抗体(第一抗体)与细胞中的相应抗原反应,洗去未与抗原结合的抗体,再用荧光标记的第二抗体与结合在抗原上的第一抗体结合,形成抗原—抗体—荧光抗体复合物。由于荧光素在荧光显微镜下经过特定波长的光照射激发后能发射出荧光,借此可对抗原进行定位和定量。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 培养细胞或细胞涂片标本。

2. 试剂

(1) 4%多聚甲醛(或冷丙酮),0.01mol/L PBS(pH 7.4), Triton X-100,5%牛血清清蛋白(BSA),黏片剂;

(2) 与二抗同动物种属的非免疫血清;

(3) 第一抗体(特异性抗体);

(4) FITC 标记的第二抗体(与一抗种属相匹配);

(5) Hoechst 333442 工作液(配制见实验二)。

试剂配制见附录一。

3. 器材 温箱、烤箱、冰箱、载玻片、盖玻片、微量移液器、移液器吸头、吸管、湿盒、染色缸、免疫组化笔、记号笔、EP 管、滤纸条、吸水纸及搅拌器等。

【实验步骤】

1. 取出细胞贴附生长的小盖片或晾干的细胞涂片,用预热的 PBS 冲洗 2 次;
2. 4%多聚甲醛(或冷丙酮)固定 5~10 分钟,晾干;
3. 0.01mol/L PBS(pH 7.4)漂洗 5 分钟×3 次;

4. 0.3% Triton X-100, 室温, 20 分钟, PBS 漂洗 3 分钟 × 2 次(细胞膜抗原可省略此步骤);
5. 非免疫血清孵育, 室温, 10 分钟;
6. 5% 牛血清清蛋白孵育, 室温, 10 分钟;
7. 滴加特异性一抗(如小鼠抗大鼠波形蛋白单克隆抗体, 1:200 稀释度) 37℃ 孵育, 30 分钟或 4℃ 过夜, PBS 漂洗 5 分钟 × 3 次;
8. 滴加抗小鼠 FITC-IgG (1:100), 37℃ 孵育, 30 分钟(避光), PBS 漂洗 5 分钟 × 3 次;
9. Hoechst 333442 工作液复染细胞核 15~20 分钟(不是必需步骤);
10. 甘油磷酸缓冲液封片, 荧光显微镜下观察;
11. 阴性对照可用正常鼠血清代替一抗。

【实验结果】

免疫反应阳性细胞的胞质呈现绿色荧光(图 4-15)。

注意事项

1. 如标本为组织切片, 甲醛固定, 一般需抗原修复。
2. 对容易脱片的组织或细胞固定后晾干的时间可延长至 2 小时以上。
3. 市售的荧光标记二抗多数含有 50% 甘油, 故抗体的工作效价相应提高一倍。
4. Hoechst 333442 工作液复染细胞核时, 把标本晾干再加染液效果更佳。

(周 莉)

实验十 半抗原标记 cRNA 探针原位杂交组织化学染色

【实验目的】

掌握应用半抗原标记 cRNA 探针原位杂交组织化学染色显示组织或细胞内 mRNA 的原理和实验步骤。

【实验原理】

在以体外转录方式合成 cRNA 探针时, 如在转录体系中加入地高辛标记的 rNTP 原料, 则能合成带有地高辛的 cRNA 探针, 其中与待测 mRNA 序列互补的反义 cRNA 探针按照碱基配对原则与待测 mRNA 结合形成杂交体, 然后用碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体与杂交体上的地高辛进行免疫反应, 最后用碱性磷酸酶的底物显示抗原抗体复合物上的碱性磷酸酶活性而检测特定 mRNA。而与待测 mRNA 序列相同的正义 cRNA 探针因不能与待测 mRNA 形成杂交体而呈阴性反应, 可做为阴性对照。

【材料、器材与试剂】

1. 材料 新鲜或多聚甲醛固定的组织切片。
2. 试剂
 - (1) 二甲苯: 脱蜡 I 和 II, 透明 I 和 II;
 - (2) 乙醇: 下行和上行梯度乙醇(无水乙醇 I 和 II, 95%、90%、80% 和 70% 乙醇);

- (3) DEPC 水;
- (4) 0.1mol/L PB(pH 7.4),0.01mol/L PBS(pH 7.4);
- (5) 0.1mol/L PB 配制的 4%多聚甲醛;
- (6) 0.1mol/L PB 配制的 0.3% Triton X-100;
- (7) 0.1mol/L 甘氨酸,1 μ g/ml 蛋白酶 K;
- (8) 0.25%醋酸酐;
- (9) 20 \times 枸橼酸盐缓冲液(SSC);
- (10) 4 \times SSC 配制的 50%去离子甲酰胺;
- (11) 地高辛标记的反义和正义 cRNA 探针;
- (12) 杂交缓冲液;
- (13) 1mg/100ml RNA 酶;
- (14) 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 Fab 片段;
- (15) TSM1 和 TSM2 缓冲液;
- (16) 碱性磷酸酶缓冲液;
- (17) NBT 和 BCIP 显色液。

试剂配制见附录二。

3. 器材

温箱、烤箱、冰箱、载玻片、盖玻片、EP 管、天平、微量移液器、移液器吸头、吸管、湿盒、染色缸、封口膜和普通光学显微镜。

【实验步骤】

1. 杂交前处理

(1) 石蜡切片在染色缸内分别经二甲苯I和II脱蜡 10 分钟,依次经下行梯度乙醇水化,在无水乙醇I和II中各 5 分钟,95%、90%、80%及 70%乙醇中各 2 分钟,0.01mol/L PBS 漂洗 3 分钟 \times 3 次,高压灭菌双蒸水或 DEPC 水漂洗 3 分钟;新鲜组织冰冻切片、培养细胞涂片或爬片在 4 $^{\circ}$ C 丙酮中固定 20~30 分钟后晾干;灌注固定组织冰冻切片直接进行以下操作。

- (2) 0.1mol/L PB 漂洗 5 分钟 \times 2 次。
- (3) 0.3% Triton X-100(0.1mol/L PB 配制)10~15 分钟(室温)。
- (4) 1 μ g/ml 蛋白酶 K 30 分钟(37 $^{\circ}$ C)。
- (5) 0.1mol/L 甘氨酸 5 分钟(室温)。
- (6) 4%多聚甲醛(0.1mol/L PB 配制) 5 分钟(室温)。
- (7) 0.1mol/L PB 漂洗 5 分钟 \times 3 次。
- (8) 0.25%醋酸酐 10 分钟。
- (9) 4 \times SSC 5 分钟。
- (10) 2 \times SSC 10 分钟。
- (11) 滴加预杂交液(不含探针)于切片上或切片入预杂交液(漂浮法),于密封湿盒内 42~45 $^{\circ}$ C 下预杂交 30 分钟~2 小时。

2. 杂交

- (1) 杂交液配制:在杂交缓冲液中加入适量地高辛标记反义 cRNA 探针,使探针终浓度

为 $0.5\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$, 空白对照不加探针, 阴性对照加入相同浓度地高辛标记正义 cRNA 探针;

(2) 将混匀后的杂交液滴加在切片上, 每片约 $20\mu\text{l}$, 或将切片漂浮于杂交液中, 于密封湿盒内 $41\sim 45^\circ\text{C}$ 下杂交 $12\sim 24$ 小时。

3. 杂交后处理

- (1) $5\times\text{SSC}$ 漂洗 15 分钟(45°C);
- (2) $4\times\text{SSC}$ 冲洗 15 分钟(37°C);
- (3) $2\times\text{SSC}$ (含 50% 去离子甲酰胺)漂洗 15 分钟(37°C);
- (4) $2\times\text{SSC}$ (含 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA)冲洗 10 分钟(37°C);
- (5) $1\times\text{SSC}$ 冲洗 15 分钟(37°C);
- (6) $0.5\times\text{SSC}$ 冲洗 15 分钟(37°C);
- (7) $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS 室温漂洗 3 次, 每次 5 分钟。

4. 显色

- (1) 碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体 Fab 片段($1:500\sim 1000$)室温下孵育 4 小时;
- (2) $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 5 分钟 $\times 4$ 次;
- (3) TSM1 漂洗 5 分钟 $\times 2$ 次;
- (4) TSM2 漂洗 5 分钟 $\times 2$ 次;
- (5) NBT 和 BCIP 显色液中室温下显色 30 分钟 ~ 2 小时, 显微镜下观察显色情况以决定终止或延长显色时间;
- (6) $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS 冲洗 5 分钟 $\times 2$ 次;
- (7) 明胶甘油封片, 也可经上行梯度乙醇短暂(每步数秒钟)脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。

【实验结果】

NBT 和 BCIP 显色液显色后, 用反义 cRNA 探针杂交的阳性细胞胞质内呈现深蓝色或紫蓝色反应产物; 空白对照或用正义 cRNA 探针杂交的细胞应无蓝色反应产物。

注意事项

1. 黏贴切片前, 载玻片要清洗干净, 高温处理, 使其不含 RNA 酶, 并进行硅化处理。为防止组织或细胞标本在杂交过程中脱落, 载玻片要涂抹铬矾明胶或多聚赖氨酸等黏附剂。
2. 石蜡切片脱蜡要彻底。
3. 操作时(特别是在杂交前处理和杂交过程中)必须戴手套, 避免 RNA 酶污染。
4. 各种试剂应用高压或过滤方法灭菌, 除去 RNA 酶。
5. 最佳探针浓度和杂交温度应针对不同探针和靶核酸通过预实验摸索确定。
6. 设阳性对照和阴性对照。
7. 切片放于密封湿盒内反应, 防止切片干燥。
8. NBT 和 BCIP 显色液应在临用前配制。

(李 和)

附录一 免疫组织化学染色常用试剂配制

(一) 固定液

1. 4%多聚甲醛-0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3)

(1) 试剂

多聚甲醛	40g
0.1mol/L 磷酸缓冲液	至 1000ml

(2) 配制方法:称取 40g 多聚甲醛,置于三角烧瓶中,加入 500~800ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB),加热至 60℃左右,持续搅拌(或磁力搅拌)使粉末完全溶解,通常需滴加少许 1mol/L NaOH 才能使溶液清亮,最后补足 0.1mol/L PB 于 1000ml,充分混匀。该固定剂适于光镜免疫细胞化学染色。另外,该固定剂较温和,适于组织标本的较长期保存。

2. Bouin's 液及改良 Bouin's 液

(1) 试剂

饱和苦味酸	750ml
40%甲醛	250ml
冰醋酸	50ml

(2) 配制方法:先将饱和苦味酸过滤,加入甲醛(有沉淀者禁用),临用前加入冰醋酸,混合后存于 4℃冰箱中备用。改良 Bouin's 液即不加冰醋酸。该固定液为组织学和病理学常用固定剂之一,对组织的穿透力较强,固定较好,结构完整。但因液体偏酸(pH 3~3.5),对抗原有一定损害,且组织收缩较明显,故不适于组织标本的长期保存。此外,操作时应避免吸入或与皮肤接触。

3. Zamboni's (Stefanini's)液

(1) 试剂

多聚甲醛	20g
饱和苦味酸	150ml
Karasson-Schwlt's PB	至 1000ml

(2) 配制方法:称取多聚甲醛 20g,加入饱和苦味酸 150ml,加热至 60℃左右,持续搅拌使充分溶解,过滤,冷却后加 Karasson-Schwlt's PB 至 1000ml 充分混合(Karasson-Schwlt's 磷酸缓冲液的配制方法见后)。该固定液适于电镜免疫细胞化学,对超微结构的保存较纯甲醛为优,也适于光镜免疫细胞化学染色,为实验室常用固定剂之一。在应用中通常采用 2.5%多聚甲醛和 30%饱和苦味酸,以增加其对组织的穿透力和固定效果,保存更多的组织抗原。固定时间为 6~18 小时。

4. Karnovsky's 液(pH 7.3)

(1) 试剂

多聚甲醛	30g
------	-----

25%戊二醛	80ml
0.1mol/L PB	至 1000ml

(2) 配制方法:先将多聚甲醛溶于 0.1mol/L PB 中,再加入戊二醛,最后加 0.1mol/L 的 PB 至 1000ml,混匀。

该固定剂适于免疫电镜细胞化学,4℃短时间固定比在较低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存组织的抗原性和细微结构。固定时最好先灌注固定,然后浸泡固定 10~30 分钟,用缓冲液漂洗后即可树脂包埋或经蔗糖溶液后用于恒冷箱切片。

5. PFG 液(parabenzquinone-formaldehyde-glutaraldehyde fixative, PFG)

(1) 试剂

对苯醌	20g
多聚甲醛	15g
25%戊二醛	40ml
0.1mol/L 二甲酸钠缓冲液	至 1000ml

(2) 配制方法:先以 500ml 左右的二甲酸钠缓冲液溶解对苯醌及多聚甲醛,然后加入戊二醛,最后加入二甲酸钠缓冲液至 1000ml 充分混合。

对苯醌与戊二醛及甲醛联合应用,既可阻止醛基对抗原的损害,又不影响超微结构的保存,故适用于免疫电镜组织化学研究。

6. 四氧化锇(锇酸 osmic acid, OsO₄)

将洗净装有 OsO₄ 的安瓿加热后,迅速投入装有溶剂的棕色瓶中,使安瓿遇冷自破。也可用钻石刀在安瓿上划痕,洗净后再放入瓶中,盖好瓶塞,用力撞击安瓿,待其破后加溶剂稀释。为保证充分溶解,应在用前几天配制。

(1) 1% OsO₄ 缓冲液

① 先配 2% OsO₄ 水溶液:取 1g OsO₄ 安瓿清洁打破后置于一清洁棕色玻璃瓶内,加 50ml 双蒸水,溶解 24 小时,储存于通风橱内备用。

② 配制 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.3)

A 液:0.2mol/L NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	31.2g
双蒸水	至 1000ml
B 液:0.2mol/L Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	71.63g
或 0.2mol/L Na ₂ HPO ₄	28.39g
双蒸水	至 1000ml

取 11ml A 液, 39ml B 液,充分混合即为 0.2mol/L 的 PB(pH 7.3)。

③ 1% OsO₄ 缓冲液配制

取 5ml 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.3),加 5ml 2%OsO₄ 水溶液,即 1% OsO₄ 缓冲固定液。

(2) 1% OsO₄/0.1mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)

试剂

2% OsO ₄ 水溶液	10ml
0.2mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)	10ml

配制方法:取 2% OsO₄ 储备液 10ml 与等量 0.2mol/L 二甲胂酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)充分混合即可。

OsO₄ 是免疫电镜组织化学研究必需的后固定剂。尽管 OsO₄ 主要为脂类固定剂,但也可与肽类及蛋白质起作用,形成肽—蛋白质或肽—脂交联。过氧化物酶的反应产物经 OsO₄ 处理后,电子密度增高,适于电镜研究。但由于 OsO₄ 的反应产物对光及电子有较明显的吸收能力,因此,在免疫细胞化学染色前常需除去铁。在光镜水平常用 1% 的高锰酸钾除去铁,在电镜水平则常用过氧化氢来处理以除去铁。

(二) 缓冲液

免疫细胞化学染色中应用的缓冲液种类较多,即使是同种缓冲液,其浓度、pH 及离子强度等也常常不同。在此介绍几种最常用缓冲液的配制。

1. 0.01mol/L(pH 7.2~7.6)磷酸盐缓冲液(phosphate buffer sodium, PBS)

(1) 配方 1

试剂	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.48g
NaCl	42.5g
蒸馏水	至 5000ml

(2) 配方 2

A 液:0.2mol/L NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	31.2g
双蒸水	至 1000ml
B 液:0.2mol/L Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	71.63g
双蒸水	至 1000ml

取 19ml A 液,81ml B 液,充分混合即为 0.2mol/L 的 PB(pH 约为 7.4~7.5);取 0.2mol/L 的 PB 50ml,NaCl 8.5~9g(约 0.15mol/L),加双蒸水至 1000ml,即为 0.01mol/L 的 PBS(pH 7.2~7.6)。

PB 和 PBS 是免疫细胞化学实验中最常用的缓冲液,0.01mol/L 的 PBS 主要用于漂洗组织标本、稀释抗体和血清等,其 pH 应在 7.25~7.35 之间,否则需要用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调整。0.1mol/L 的 PB 常用于配制固定液及蔗糖等。一般情况下,0.2mol/L PB 的 pH 值稍高些,稀释成 0.01mol/L 的 PBS 时,常可达到要求的 pH 值,若需调整 pH,通常是调 PB 的 pH。

2. 0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)

(1) 试剂

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	60.57g
1N HCl	约 420ml
双蒸水	至 1000ml

(2) 配制方法:先以少量双蒸水(300~500ml)溶解 Tris,加入盐酸后,用 1N 的 HCl 或 1N 的 NaOH 将 pH 调至 7.6,最后加双蒸水至 1000ml。此液为储备液,于 4℃ 冰箱中保存。免疫细胞化学中常用的 Tris-HCl 缓冲液浓度为 0.05mol/L,用时取储备液稀释 10 倍即可。

该液主要用于配制 Tris 缓冲生理盐水(TBS)和 DAB 显色液。

3. Tris 缓冲生理盐水(tris buffered saline, TBS)

(1) 试剂

0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液	100ml
NaCl	8.5~9g (0.15mol/L)
双蒸水	至 1000ml

(2) 配制方法:先以双蒸水少许溶解 NaCl,再加 Tris-HCl 缓冲液,最后加双蒸水至 1000ml,充分摇匀,使 Tris 终浓度为 0.05mol/L。

4. Triton-TBS

(1) 试剂

Triton X-100	10ml(1%)或 3ml(0.3%)
0.5mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.6) 或(0.2mol/L 的 PB)	1000ml(50ml)
NaCl	8.5~9g
双蒸水	至 1000ml

(2) 配制方法:先以双蒸水少许溶解 NaCl 后,加入 Triton X-100 及 Tris 缓冲液,最后加双蒸水至 1000ml,充分摇匀。该液常用浓度为 1%及 0.3%,前者主要用于漂洗标本,后者主要用于稀释血清。

5. Karasson-Schwlt's 磷酸盐缓冲液

(1) 试剂

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.31g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33.77g
双蒸水	至 1000ml

(2) 配制方法:同前。

该缓冲液主要用于配制 Zamboni's 固定液。

6. 枸橼酸缓冲液

(1) 枸橼酸缓冲液(pH 3.5)

枸橼酸	2.55g
枸橼酸钠	2.35g
双蒸水	至 100ml

(2) 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)

枸橼酸(0.1mol/L)	21.01g
双蒸水	至 1000ml
枸橼酸钠(0.1mol/L)	29.41g
双蒸水	至 1000ml

使用时取 0.1mol/L 枸橼酸 9ml 和 0.1mol/L 枸橼酸钠 41ml,再加入双蒸水 450ml,即配成 0.01mol/L 的枸橼酸缓冲液(pH 6.0±0.1)。用于微波修复抗原。

7. 0.1mol/L(pH 7.4)二甲胍酸缓冲液

(1) 试剂

0.2mol/L 二甲胍酸钠	500ml
0.1N HCl	28ml
蒸馏水	至 1000ml

(2) 配制方法:先称取二甲胍酸钠(MW:214)42.8g,加蒸馏水至1000ml,使其成为0.2mol/L的二甲胍酸钠溶液;再取HCl 1.7ml加蒸馏水至1000ml,配成0.1mol/L,最后取0.2mol/L二甲胍酸钠溶液500ml及0.1mol/L HCl 28ml混合,加蒸馏水至1000ml,即为0.1mol/L的二甲胍酸钠缓冲液。此缓冲液常用于免疫电镜组织化学。

(三) 常用消化液

1. 0.1% 胰蛋白酶(trypsin)

(1) 试剂

胰蛋白酶	0.1mg
0.1% 氯化钙(pH 7.8)	100ml

(2) 配制方法:先配制0.1% CaCl₂,用0.1mol/L NaOH将其pH调至7.8,然后加入胰蛋白酶溶解备用。免疫组织化学染色前将胰蛋白酶消化液在水浴中预热至37℃,载有标本的玻璃片也在TBS中预热至相同的温度,孵育时间约5~30分钟。主要用于细胞内抗原修复。

2. 0.4% 胃蛋白酶(pepsin)

(1) 试剂

胃蛋白酶	400mg
0.1mol/L HCl	100ml

(2) 配制方法:同胰蛋白酶。消化时间在37℃约为30分钟。主要用于细胞间质或基底膜抗原修复。

(四) 显色液

1. 3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)

(1) 试剂

DAB(常用四盐酸盐)	50mg
0.05mol/L TBS	100ml

(2) 配制方法:先以少量0.05mol/L (pH 7.6)的TBS或者0.01mol/L PBS(pH 7.2~7.6)溶解DAB,然后加入余量TBS或PBS,充分摇匀,使DAB终浓度为0.05%,1ml分装冻存。染色前溶化,加入30% H₂O₂ 1μl,使终浓度为0.01%。

注意:DAB溶解要完全,否则未溶解的颗粒沉积于标本上影响观察;DAB浓度不宜过高,否则,显色液呈棕色,增加背景染色。另外,DAB有致癌作用,操作时应戴手套,尽量避免与皮肤接触,用后及时彻底冲洗接触DAB的实验用品,最好经洗液浸泡24小时后再使用。

2. 3-氨基-9-乙基卡唑(3-amino-9-ethylcarbazole, AEC)显色液

(1) 试剂

AEC	20mg
二甲基甲酰胺(DMF)	2.5ml
0.05mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)	50ml
30% H ₂ O ₂	25ml

(2) 配制方法:先将 AEC 溶于 DMF 中,再加入醋酸缓冲液充分混匀。临显色前加入 30% H_2O_2 。切片显色时间为 5~20 分钟。该显色液作用后,阳性部位呈深红色,加以苏木精或亮绿等作为背景染色,则效果更佳。由于终产物溶于乙醇和水,故需用水溶性封片剂封固。

3. 四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐显色液(nitro-blue-tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, NBT/BCIP)

A 液(5% NBT):称取 0.5g NBT 溶于 10ml 70% 的 DMF(二甲基甲胺)内,充分混合,常存于 4℃,也可装成小份, -20℃ 保存,用前复温。

B 液(5% BCIP):称取 BCIP 0.5g 溶于 10ml 100% 的 DMF 内,混匀,4℃ 或分装存于 -20℃,用前恢复至室温。

取 A 液 40 μ l,加入到盛有 10ml 0.1mol/L Tris-HCl(pH 9.5 0.1mol/L NaCl, 5mmol/L $MgCl_2$) 管内,充分混匀;再加入 B 液 40 μ l,轻轻混合即可。最好用前新鲜配制。当 NBT/BCIP 两者存在时,在碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)作用下,NBT 被还原形成显微镜下可见的蓝色或紫色沉淀。

(五) 黏附剂

1. 多聚左旋赖氨酸(poly-l-lysine, PLL)

(1) 试剂

多聚赖氨酸	5g
双蒸水	至 1000ml

(2) 配制方法:称取多聚赖氨酸,溶于水,充分混合即可,此液浓度为 0.5%,可适当稀释成 0.01%~0.5%,4℃ 保存,也可 -20℃ 备用。多聚赖氨酸可反复冻融。

2. APES: 3-Amino propyltriethoxy silane

即 Vectabond 试剂,是 Vector 公司新推出的一种新型玻片黏附剂。该试剂与一般黏附剂不同,它是通过对玻璃表面起化学修饰作用,改变其表面的化学物理特性,使组织切片牢固地贴于玻璃片上,贴上后不易脱落,保留时间较长。一个试剂盒(7ml)可配成 350ml 工作液(用丙酮配制)。处理载玻片前(事先酸处理)用染色缸装好各种液体,按下列程序进行:

干净载玻片→丙酮 5 分钟→Vectabond 试剂工作液(7ml Vectabond + 350ml 丙酮):将载玻片用镊子夹住浸入 Vectabond 试剂 1~2 次→蒸馏水 5 分钟×2 次→干燥(37℃ 过夜)→用铝箔包好,室温存放备用。上述方法处理的载玻片一般可存放半年以上。

3. 铬矾明胶液

(1) 试剂

铬矾	0.5g
明胶(Gelatine)	5g
H_2O	1000ml

(2) 配制方法:在 1000ml 的烧杯或烧瓶中,以 500~800ml 水加温溶解明胶,待其完全溶解后,再加入铬矾。注意温度过高易使明胶烧糊,包被玻片时最好控制水温在 70℃。如有明显残渣,过滤后使用。

4. 甲醛-明胶液

(1) 试剂

40%甲醛	2.5ml
明胶	0.5g
蒸馏水	至 100ml

(2) 配制方法:用少许蒸馏水(约 80ml)加热溶解明胶,待完全溶化后,加入甲醛,最后补充蒸馏水至 100ml 混匀即可。

(六) 封固剂

1. 甘油-磷酸盐缓冲液

(1) 试剂

甘油	90ml
0.01mol/L PBS	10ml

(2) 配制方法:按比例将甘油和 PBS 充分混合后,置 4℃,冰箱静止,待气泡排除后方可使用。

2. 甘油-TBS

(1) 试剂

甘油	75ml
0.01mol/L TBS	25ml

(2) 配制方法:按比例将甘油和 TBS 充分混合后,置 4℃,冰箱静止,待气泡排除后方可使用。

3. 甘油-明胶(冻)

(1) 试剂

明胶	1g
甘油	12ml
蒸馏水	100ml
香草酚	少许

(2) 配制方法:称取 1g 明胶于温热(约 40℃)蒸馏水中,充分溶解后过滤,再加入 12ml 甘油混合均匀。为防腐加入少许香草酚。

4. 液体石蜡

液体石蜡因含杂质少,很少引起非特异性荧光,故常用于荧光组织化学及荧光标记时标本的封固。

5. 中性树脂

中性树脂有商品出售,可直接应用。若感过于粘稠,也可加少量二甲苯稀释后应用。用于多种染色方法均不易褪色,尽量使其为均匀的一薄层。注意:二甲苯不可加得太多,二甲苯挥发后,片子上出现许多干燥空泡,影响观察,遇有这种情况,可用二甲苯浸泡掉盖玻片后重新封固。

(七) 其他

1. Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)

(1) 试剂

牛血清白蛋白(BSA)	1ml
0.01mol/LPBS	100ml
Triton X-100	0.3mg

(2) 配制方法:取 1mg 牛血清白蛋白用 0.01mol/L PBS 100ml 溶解后,加入 0.3mg Triton X-100 混匀即可。

2. 配制 30% TritonX-100 储备液

(1) 试剂

Triton X-100	28.2ml
0.1mol/L PBS(pH 7.3)或 0.05mol/L TBS(pH 7.4)	72.8ml

(2) 配制方法:取 Triton X-100 及 PBS(或 TBS)混合,置 37~40℃水浴中 2~3 小时,使其充分溶解混匀。用前取该储备液稀释至所需浓度。



附录二 原位杂交试剂配制

1. 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水

DEPC	1ml
双蒸水	1000ml

经猛烈振摇后室温下静止数小时,然后高压灭菌备用。

2. 多聚左旋赖氨酸(poly-l-lysine, PLL)

0.5%储备液:

多聚赖氨酸	25mg
DEPC 水	5ml

充分混合后分装成 1ml 在 -20°C 存放。此储备液可反复冻融。

0.1%工作液:

0.5%多聚赖氨酸	1ml
DEPC 水	50ml

充分混合,静止待气泡消失。

3. 0.24%明胶-铬明矾液

先称取明胶 2.4g 溶于 800ml DEPC 水中,加热搅拌助溶,待明胶完全溶解后,加入铬明矾,溶解后补充 DEPC 水至 1000ml 即可使用。包被载玻片时,明胶-铬明矾液温度最好保持在 60°C 左右。

4. 1mol/L 二硫苏糖醇(DTT)

称取 3.09g DTT 溶于 20ml 0.01mol/L 醋酸钠(pH 5.2)中,过滤除菌后分装成小份, -20°C 储存。DTT 和含 DTT 的溶液不能高压处理。

5. 10%十二烷基磺酸钠(SDS)

称取 100g SDS 加入 90ml 双蒸水中,加热至 68°C 促进其溶解并加浓盐酸调 pH 值至 7.0,冷却后加双蒸水至 1000ml,分装后室温保存。不需灭菌。

6. 1mol/L 亚精胺

称取 1.02g 亚精胺,溶于 3ml 双蒸水中,加双蒸水至 4ml,高压灭菌后分成小份 -20°C 储存。

7. 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)

将 186.1g EDTA 加入 800ml 双蒸水中,加热至 60°C ,再加 20g NaOH,完全溶解并冷却至室温后用 10mol/L NaOH 调 pH 至 8.0,并加双蒸水至 1000ml。高压灭菌后室温保存备用。

8. 50% 葡聚糖硫酸酯

取 10g 葡聚糖硫酸酯于 10ml DEPC 水中,搅拌促进其溶解, 37°C 放置 1 小时使气泡完全上浮消失,加 DEPC 水至 200ml。分装成小份, -20°C 储存备用。

9. 100%去离子甲酰胺

将市售甲酰胺通过正、负离子交换树脂进行层析,过滤除菌后分装成小份, -20°C

保存。

10. 2%变性鱼精 DNA

称取 2g 变性鱼精 DNA 溶于双蒸水中,用 18 号注射用针头抽吸 10 次以达到剪切目的。煮沸 10 分钟,在冰浴中迅速冷却,分装成小份 -20°C 保存。

11. 0.1%蛋白酶 K

准确称取 10mg 蛋白酶 K 溶于 10ml 灭菌双蒸水或 DEPC 水,充分混合后分装成小份, -20°C 存放,用时再取出解冻,用毕余者弃去。

12. 1mol/L 甘氨酸

甘氨酸	75g
双蒸水或 DEPC 水	1000ml

13. 0.25%醋酸酐

三乙醇胺	13.2ml
NaCl	5.0g
浓 HCl	4.0ml
DEPC 水	1000ml
醋酸酐(临用前加)	2.5ml

14. Tris-EDTA(TE)缓冲液

2mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	5ml
0.5mol/L EDTA(pH 8.0)	2ml
双蒸水	1000ml

高压灭菌后室温保存。

15. 40×Denhardt's 液

聚蔗糖(Ficol 1400)	0.2g
聚乙烯吡咯烷酮(PVP)	0.2g
牛血清白蛋白(BSA)	0.2g
双蒸水	25ml

完全溶解后过滤灭菌,分装成小份, -20°C 保存。

16. 30×枸橼酸盐缓冲液(SSC)

NaCl	262.95g
枸橼酸钠	132.3g
双蒸水	1000ml

定容前以 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,定容后高压灭菌保存。

17. 杂交缓冲液

100% 去离子甲酰胺	5ml
50% 葡聚糖硫酸酯	2ml
40×Denhart's 液	0.25ml
1mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	0.1ml
5mol/L NaCl	0.6ml



0.5mol/L EDTA(pH 8.0)	0.2ml
2% 变性鱼精 DNA	0.125ml
1mol/L DTT	0.1ml
双蒸水	1.625ml

混匀后分成小份, -20℃保存备用。

18. TSM-1

1mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	100ml
5mol/L NaCl	20ml
1mol/L MgCl ₂	10ml
双蒸水	1000ml

混匀后室温储存。

19. TSM-2

1mol/L Tris-HCl(pH 9.5)	100ml
5mol/L NaCl	20ml
1mol/L MgCl ₂	50ml
双蒸水	1000ml

混匀后室温保存。

20. 5%硝基四氮唑蓝(NBT)

取 100mg 的 NTB 溶于 2ml 70% N,N-二甲基甲酰胺, 混旋促进其溶解, -20℃储存。

21. 5% 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸盐(BCIP)

取 100μg BCIP 溶于 100% 的二甲基甲酰胺中, 加 6μl 0.1mol/L NaOH, 调 pH 至 7.0, 再加 0.12ml 双蒸水, -20℃存放。

22. NBT 和 BCIP 显色液

5% NBT	80μl
5% BCIP	40μl
TSM2	9.88ml

临用前混匀后即可用于碱性磷酸酶的显色。



[G e n e r a l I n f o r m a t i o n]

书名 = 组织化学与免疫组织化学

作者 = 李和等主编

页数 = 233

出版社 = 人民卫生出版社

出版日期 = 2008.09

SS号 = 12095878

DX号 = 000006595384

URL = <http://book.szdnnet.org.cn/bookDetail.jsp?dxNumber=000006595384&d=DE5E70BE380C72FD33946EFB9C4F21D6>

封面
书名
版权
前言
目录

第一章	绪论	
	第一节	组织化学发展的基础
		一、细胞生物学发展与组织化学
		二、生物化学发展与组织化学
		三、免疫学发展与组织化学
		四、分子生物学发展与组织化学
	第二节	组织化学发展简史
		一、组织化学的兴起
		二、现代组织化学的发展
		三、我国组织化学发展概况
	第三节	组织化学技术基本要求
		一、组织化学的分支和分类
		二、组织化学技术的基本要求
第二章	组织化学与免疫组织化学染色样品制备	
	第一节	取材
		一、组织标本取材
		二、细胞标本取材
		(一) 培养细胞
		(二) 涂片法
	第二节	固定
		一、组织和细胞的固定方法
		(一) 浸润法
		(二) 灌流固定法
		二、常用固定剂和固定方法
		(一) 组织常用固定剂和固定方法
		(二) 培养细胞常用固定剂和固定方法
	第三节	包埋和切片
		一、石蜡包埋
		(一) 包埋前脱水
		(二) 透明
		(三) 浸蜡
		(四) 包埋
		(五) 修块
		二、切片
		(一) 石蜡切片
		(二) 冰冻切片
		(三) 振动切片
		三、防脱片处理步骤
		(一) 载玻片和盖玻片的处理
		(二) 黏附剂的使用
		(三) 免疫组织化学染色中常见脱片原因
	科学史话——幽门螺杆菌与胃溃疡	
第三章	组织化学	
	第一节	核酸组织化学
		一、Feulgen反应
		(一) 原理
		(二) Schiff液的配制
		(三) Feulgen反应步骤

- 二、吖啶橙染色
 - (一) 吖啶橙区分活细胞DNA和RNA的荧光组织化学染色法
 - (二) 吖啶橙原位区分组织细胞DNA和RNA的荧光组织化学染色法
- 三、Hoechst 33258染色
- 四、DAPI染色
- 五、溴化乙啶和碘化丙啶染色法
 - (一) 溴化乙啶染色
 - (二) 碘化丙啶染色

第二节 脂类组织化学

- 一、乙醇苏丹黑B染色法
 - (一) 染色程序
 - (二) 注意事项
- 二、油红O染色法
 - (一) 油红O染液的配制
 - (二) 染色程序

第三节 酶组织化学

- 一、酶组织化学的基本原理及一般原则
 - (一) 酶组织化学的基本原理
 - (二) 酶显示方法
 - (三) 酶组织化学对组织处理的基本要求
- 二、常用酶组织化学染色方法
 - (一) 磷酸酶
 - (二) 三磷酸腺苷酶
 - (三) 羧酸酯水解酶
 - (四) 氧化酶和脱氢酶
 - (五) 一氧化氮合酶

第四节 凝集素组织化学

- 一、凝集素的标记物
- 二、染色程序
 - (一) FITC标记凝集素的组织化学染色程序
 - (二) 辣根过氧化物酶标记凝集素的组织化学染色程序
 - (三) 生物素标记凝集素的组织化学染色程序

第五节 荧光组织化学

- 一、组织细胞荧光分类
 - (一) 自发荧光
 - (二) 诱发荧光
 - (三) 酶促荧光
 - (四) 荧光染色
 - (五) 免疫荧光
- 二、生物胺荧光组织化学
 - (一) Falck-Hillarp 甲醛诱发荧光法
 - (二) 乙醛酸诱发生物单胺荧光法
 - (三) 邻苯二醛显示组胺荧光法

科学史话——周期蛋白的发现

第四章 免疫组织化学技术

第一节 免疫组织化学基本原理

- 一、直接法
- 二、间接法
- 三、亲和免疫组织化学
 - (一) 亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物法
 - (二) 链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶法

第二节 免疫组织化学染色步骤

- 一、SABC法免疫组织化学染色步骤

- (一) 石蜡切片免疫组织化学染色
- (二) 冰冻切片免疫组织化学染色
- (三) 培养细胞免疫细胞化学染色
- 二、S A B C法与其他免疫组织化学染色方法比较
 - (一) S P法或S A P法
 - (二) E n V i s i o n T M S y s t e m s
 - (三) M a x V i s i o n法
- 三、免疫组织化学染色结果评价
 - (一) 以抗原表达模式定位
 - (二) 阳性染色结果定量
- 四、讨论
 - (一) 实验计划
 - (二) 抗体的稀释度
 - (三) 滴加抗体注意事项
 - (四) 抗体的保存
 - (五) 对照实验
 - (六) 免疫组织化学技术应用的基本原则
 - (七) 疑难问题剖析

第三节 免疫组织化学双重染色

第四节 免疫荧光组织化学技术

- 一、荧光的基本知识
 - (一) 荧光
 - (二) 荧光物质的特性和种类
- 二、免疫荧光组织化学基本原理及方法
 - (一) 基本原理
 - (二) 基本方法
- 三、免疫荧光组织化学染色步骤
 - (一) 直接法
 - (二) 间接法
 - (三) S A B C - C y 3法
 - (四) 双重染色法
 - (五) 膜抗原荧光抗体染色法
 - (六) 补体法
 - (七) 荧光抗体再染色法
- 四、非特异性荧光染色的消除
- 五、生物荧光显微镜
 - (一) 荧光显微镜的分类及主要组成
 - (二) 荧光显微镜的基本操作及注意事项
- 六、激光扫描共聚焦显微镜
 - (一) 激光扫描共聚焦显微镜基本原理
 - (二) 激光扫描共聚焦显微镜操作步骤及注意事项
 - (三) 组织芯片中免疫荧光染色的定量分析

应用举例——免疫荧光组织化学双重染色在神经元发生研究中的应用

第五章 原位杂交组织化学

第一节 原位杂交组织化学基本原理

- 一、核酸的化学组成与基本结构
- 二、D N A变性与复性
 - (一) 变性
 - (二) 复性

第二节 核酸分子杂交

第三节 核酸分子探针

- 一、探针的种类
 - (一) 基因组D N A探针

- (二) cDNA 探针
- (三) cRNA 探针
- (四) 寡核苷酸探针

二、探针的标记

- (一) 探针标记物
- (二) 探针标记方法

第四节 原位杂交组织化学基本程序

一、标本制备

- (一) 取材
- (二) 固定
- (三) 切片

二、杂交前处理

- (一) 增强组织通透性和核酸探针穿透性
- (二) 减低背景染色

三、杂交反应

- (一) 双链DNA 探针和靶DNA 变性
- (二) 杂交液
- (三) 探针长度
- (四) 探针浓度
- (五) 杂交温度和时间
- (六) 杂交严格度

四、杂交后处理

五、杂交体检测

- (一) 放射性核素标记探针的检测
- (二) 非放射性标记探针的检测

六、对照实验

- (一) 组织对照
- (二) 探针对照
- (三) 杂交反应对照
- (四) 检测系统对照

第五节 原位杂交组织化学技术进展

一、原位PCR 技术

二、荧光原位杂交技术

三、胚胎原位杂交技术

四、双重和多重原位杂交技术

- (一) 放射性核素和非放射性标记探针的双重标记原位杂交
- (二) 非放射性标记探针的双重标记原位杂交
- (三) 两种放射性核素标记探针的双重标记原位杂交

五、原位杂交结合免疫组织化学技术

六、电镜原位杂交技术

- (一) 电镜原位杂交的特点
- (二) 常用电镜原位杂交技术的基本程序

七、肽核酸原位杂交

科学史话——割裂基因的发现

第六章 电镜组织化学与免疫电镜技术

第一节 电镜技术

一、透射电子显微镜基本原理

二、超薄切片技术

- (一) 固定
- (二) 脱水
- (三) 浸透与包埋
- (四) 超薄切片制作

三、观察与记录

第二节 电镜组织化学技术

一、基本原理

- (一) 酶组织化学反应过程
- (二) 酶反应底物的特异性
- (三) 捕捉反应

二、样品制备

三、结果观察

第三节 免疫电镜技术

一、免疫电镜技术的特点

- (一) 组织取材与固定
- (二) 染色方法
- (三) 包埋
- (四) 对照实验

二、几种常用电镜免疫染色技术

- (一) 免疫铁蛋白电镜技术
- (二) 免疫酶电镜技术
- (三) 免疫胶体金电镜技术
- (四) 免疫纳米金电镜技术

第七章 组织化学与免疫组织化学定量分析技术

第一节 显微图像分析

一、显微图像分析系统组成

二、基本术语和常用测量参数

- (一) 像素与灰度
- (二) 色彩
- (三) 光密度
- (四) 长度
- (五) 面积

三、吸光和发光组织样品的常用测量参数

- (一) 吸光组织细胞样品的测量
- (二) 发光组织细胞样品的测量

四、显微图像分析处理程序

- (一) 制作切片样品
- (二) 获取图像
- (三) 图像分割
- (四) 测量
- (五) 统计分析
- (六) 结果输出

五、显微图像分析应用中的注意事项

- (一) 设计在先，测试在后
- (二) 测试样本的代表性
- (三) 实验操作过程的一致性
- (四) 图像分析系统输入条件的一致性
- (五) 图像分析系统现有参数的局限性
- (六) 二维定量信息的局限性

第二节 流式细胞术

一、流式细胞仪的工作原理

二、流式细胞术在组织化学与免疫组织化学中的应用

- (一) 流式细胞术的常用样品制备方法
- (二) 免疫荧光标记样品
- (三) 流式细胞术数据处理与分析
- (四) 运用流式细胞仪计数细胞应注意的问题

第三节 激光扫描共聚焦显微镜技术

一、激光扫描共聚焦显微镜在组织化学和免疫组织化学中的应用

- (一) 光学切片
- (二) 三维图像重建
- (三) 荧光标记物的定位和定量分析
- 二、激光扫描共聚焦显微镜定量分析的优势
- 三、注意事项
 - (一) 制备高特异性和高效价的荧光抗体
 - (二) 标本制作要求
 - (三) 定量研究的要求

第四节 体视学

- 一、体视学的基本概念及基本原则
 - (一) 二维图像与三维结构之间的关系
 - (二) 几何探针
 - (三) 卡瓦列里原理
 - (四) 随机抽样
- 二、常用体视学方法在免疫组织化学中的应用
 - (一) 特征物断面计数与轮廓密度
 - (二) 长度密度和总长度
 - (三) 面积分数、平均面积、体积分数和总体积
 - (四) 交叉点密度、边线密度、表面积密度和总表面积
 - (五) 数目测量

应用举例——体视学在雌激素替代治疗改善老年大脑功能研究的应用

第八章 显微摄影技术

第一节 摄影基础

- 一、照相机镜头
 - (一) 照相机镜头口径
 - (二) 照相机镜头种类与焦距
- 二、控制曝光
 - (一) 光圈
 - (二) 快门
 - (三) 胶片的感光度
- 三、景深
 - (一) 光圈口径对景深的影响
 - (二) 镜头焦距对景深的影响
 - (三) 物距对景深的影响
- 四、感光片
 - (一) 彩色负片
 - (二) 彩色反转片
 - (三) 感光度
 - (四) 反差
- 五、常用滤色镜的作用
 - (一) 原色光和补色光
 - (二) 滤色镜的特性
 - (三) 滤色镜在摄影中的应用

六、色温

第二节 显微摄影基础

- 一、显微镜的几何光学成像原理
- 二、分辨率与放大率
- 三、显微镜的主要部件
 - (一) 视场光阑和孔径光阑
 - (二) 聚光镜
 - (三) 物镜
 - (四) 目镜
- 四、柯勒照明

五、几种常用特殊显微镜的结构与原理

(一) 相差显微镜

(二) 微分干涉显微镜

第三节 显微摄影技术应用

一、普通显微摄影技术应用

(一) 显微镜的使用环境

(二) 摄影前准备

(三) 显微照相的操作步骤

(四) 胶卷的选用

(五) 显微照片放大倍数的标注方法

二、特殊显微摄影技术应用

三、数码显微摄影技术

(一) 数码摄影的基本原理

(二) 数码显微摄影技术应用

参考文献

第九章 组织化学与免疫组织化学实验指导

实验一 组织标本石蜡切片和冰冻切片的制备

(一) 石蜡切片和H E 染色标本制备

(二) 冰冻切片标本制备

实验二 DNA的Hoechst 33258和DAPI荧光组织化学染色

(一) DNA的Hoechst 33258荧光组织化学染色

(二) DNA的DAPI荧光组织化学染色

实验三 脂类的异丙醇油红 法染色

实验四 钙 - 钴法显示碱性磷酸酶

实验五 偶氮偶联法显示酸性磷酸酶

实验六 胆碱酯酶染色——Kamovsky - Roots法

实验七 还原型辅酶 - 黄递酶 (NADPH-d) 染色

实验八 免疫组织化学实验——SABC法

实验九 免疫荧光细胞化学染色 (间接法)

实验十 半抗原标记cRNA探针原位杂交组织化学染色

附录一 免疫组织化学染色常用试剂配制

(一) 固定液

(二) 缓冲液

(三) 常用消化液

(四) 显色液

(五) 黏附剂

(六) 封固剂

(七) 其他

附录二 原位杂交试剂配制