

目 录

第一篇 免疫细胞化学技术基础	1
第一章 免疫化学基础	1
第一节 抗体结构.....	1
第二节 免疫球蛋白的同种异型和独特型.....	4
第三节 单克隆抗体和多克隆抗体.....	5
第四节 抗体亲和力和抗体亲合力.....	7
第五节 抗原-抗体反应的专一性和交叉性	8
第六节 抗体效价.....	9
第七节 抗体稀释.....	9
第八节 抗体解育.....	9
第九节 抗体反应率	10
第十节 抗体稳定性	10
第十一节 抗体保存	11
第十二节 抗体(Ig)的分离与纯化	11
第二章 细胞学基础	23
第一节 概述	23
第二节 细胞膜	24
第三节 细胞器	26
第四节 细胞核	30
第五节 细胞骨架	31
第三章 酶学基础	33
第一节 影响酶促反应的因素	33
第二节 免疫细胞化学技术中的常用酶	35
第三节 基质和显色原	37
第四章 免疫细胞化学技术质量控制	39
第一节 质量控制	39
第二节 背景控制	40
第三节 常见故障排除	43
第二篇 免疫细胞化学技术标本制备	49
第五章 标本制备基本技术	49
第一节 固定的基本原则	49

第二节	常用固定剂及选择方法	50
第三节	常用固定方法	52
第四节	组织切片的制备原则	57
第五节	常用标本制备技术	60
第六章	增强免疫细胞化学染色中抗原表达强度的方法	70
第一节	酶消化在抗原暴露中的作用	70
第二节	微波处理在抗原暴露中的作用	71
第三节	不同抗原组织准备方法的选择	75
第七章	组织分离技术	78
第三篇	免疫细胞化学技术及其应用	81
第八章	过氧化物酶-抗过氧化物酶技术	81
第九章	卵白素-生物素复合物技术	86
第十章	标记卵白素结合技术	90
第十一章	冰冻切片组织细胞抗原卵白素-生物素标记技术	94
第十二章	检测粘附或悬浮生长细胞的 ELISA 技术	98
第十三章	银增强免疫金技术	102
第十四章	流式细胞仪和荧光探针技术	105
第一节	概述	105
第二节	病理材料的脱蜡和处理	107
第三节	活细胞标记的间接免疫荧光技术	110
第四节	固定细胞标记的间接免疫荧光技术	112
第五节	DNA 荧光标记技术	115
第十五章	吞噬作用测定技术	117
第十六章	肌动蛋白丝分析技术	123
第十七章	化学引诱剂结合分析技术	127
第十八章	吞噬细胞氧化代谢分析技术	133
第十九章	共焦显微镜荧光分析技术	137
第二十章	抗体微束激光技术	142
第二十一章	核酸免疫细胞化学技术——碱性磷酸酶标记人染色体着丝点探针原位杂交技术	150
第二十二章	染色体库探针荧光原位杂交技术	155
第二十三章	细胞凋亡测定技术	160
第二十四章	免疫细胞化学技术在肿瘤鉴别诊断中的应用	164
附录		175
附录 1	常用试剂的配制	175
附录 2	人类白细胞分化抗原-CD 分子(1993 年)	180
附录 3	常用特异性抗体一览表	185

附录4 常用试剂盒一览表 191

第一篇 免疫细胞化学技术基础

第一章 免疫化学基础

第一节 抗体结构

抗体(antibody, Ab)是指能与相应抗原特异结合,并且有多种免疫学生物活性的球蛋白,它可经抗原物质刺激机体后由B淋巴细胞所产生。由抗体介导的免疫称为体液免疫,抗体与免疫球蛋白(Ig)可作为同义词使用,但通常将已知相应配体的Ig称为抗体。

最早研究抗体结构的是英国人R. R. Porter(1959年),他发现沉降系数为7S的兔抗体在半胱氨酸存在时,用木瓜蛋白酶(papain)水解,可得到三个片段,其中两个片段相互一致,并且能够与抗原结合。因此,将这两个片段称为抗原结合片段(antigen binding fragment, Fab);另一片段具有自凝集并结晶成网络的特性,称为可结晶片段(crystallizable fragment, Fc)。可结晶片段含有各种Ig的抗原决定簇(antigenic determinant),又称表位(epitope),而抗体的许多生物学功能均由可结晶片段介导。若以胃蛋白酶处理兔7S抗体,可产生一个沉降系数为5S的片段,而其余小片段被水解成多个小分子多肽,称为pFc',无任何生物活性。5S片段仍保持了原有抗体的二价活性,称为F(ab')₂。当该片段被还原和烷化,可断裂二硫键,得到沉降系数为3.5S的两个片段,其免疫特性与单价的Fab片段相同,即只能与一个抗原分子结合。现已肯定,脊椎动物从鱼类到哺乳类所有的免疫球蛋白都有四链基本单位,四条链的Y状结构是Ig的基本结构模式(见图1-1)。其中,两条为重链(heavy chain, H),另两条为轻链(light chain, L)。轻链可有两种类型,即 κ 型和 λ 型。同一抗体两条轻链总是同型的,非 κ 型即为 λ 型。同一个体 κ 型和 λ 型可同时存在,但不同种族 κ/λ 之比互不相同。小鼠中95%为 κ 型,马则95%为 λ 型,而人类的 κ/λ 之比约2:1。不仅 κ/λ 之比在免疫球蛋白各类型之间不同,而且在其亚类之间也不相同。 κ 型和 λ 型轻链均可与任何重链连接。

虽然各类免疫球蛋白的轻链相似,但重链是特异的。因此,根据重链恒定区(constant region, C区)不同,可将人体的重链分为五大类,分别命名为 γ , μ , ϵ , α 和 δ 链。以这五种重链所组成的Ig被分别称为IgG, IgM, IgE, IgA和IgD。Ig分子中,相同的两条重链通过二硫键连接呈Y型,两条相同的轻链通过二硫键连接在重链Y形双臂的两侧。电镜观察发现,Y形的两臂可伸展成180°,其结构中心点似乎有一“铰链”作用,故提出“铰链区”(hinge region)的概念,它位于 γ 链、 α 链和 δ 链的CH₁与CH₂之间。对该区的氨基酸序列分析发现,此区和Ig其他区域无类似性,具有较多的脯氨酸残基,以致“铰链区”肽链不形成 α -螺旋构型,使可变区(variable region, V区)内的超变区易与不同空间构型的抗原表位相吻合,也能使位于CH₂和CH₃的补体结合位点容易暴露而有利于补体的活化,也易被酶分子靠近而水解。

由于从骨髓瘤患者血清中能够得到均一的免疫球蛋白,使人们在氨基酸序列水平上研

究其结构成为可能。已发现,免疫球蛋白的轻链可分成两个区。可变区或V区位于轻链氨基端1/2的功能区,其氨基酸序列为1~107,是轻链与抗原特异性结合的部位,在这段氨基酸序列上有着非常广泛的多变性;恒定区或C区位于轻链羧基端1/2的功能区,其氨基酸序列为108~214。尽管C κ 和C λ 的氨基酸序列不同,但它们在结构上具有同源性。重链的变化区位于其氨基端1/4或1/5的功能区。除V区外的重链其他部分为重链的恒定区,约占链长的75%。在重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的N端所观察到的氨基酸序列的可变性并不是均匀分布的,在某些氨基酸的位置显示出有极高度的可变性,这些区域称为超变区(hypervariable region)或互补决定区(complementarity-determining region, CDR)。不同轻链之间氨基酸序列的差异在V区内有三个,从氨基端开始,轻链的三个CDR分别称为CDR₁, CDR₂和CDR₃,其中以CDR₃的变异性最大。与轻链相似,重链V区内也有CDR₁, CDR₂和CDR₃三个互补决定区。CDR直接参与结合抗原位点的形成。与CDR相邻的是限制性可变区,又称为骨架残基(framework residues)或骨架区(framework region)。在该区域内,某些氨基酸残基和结构特征高度保守。重链的C区有三个相似的部分组成,其氨基酸序列基本相似,并且相似于轻链的C区,它是Ig肽链借链内二硫键联系、折叠形成一个个相似的致密主体结构,称为功能区(domain)。各功能区都有一定的生物活性,形成各类抗体的特异免疫功能。其中IgG, IgA和IgD的重链C区形成三个功能区(CH₁, CH₂和CH₃),而IgM和IgE的重链C区则多一个功能区(CH₄)。

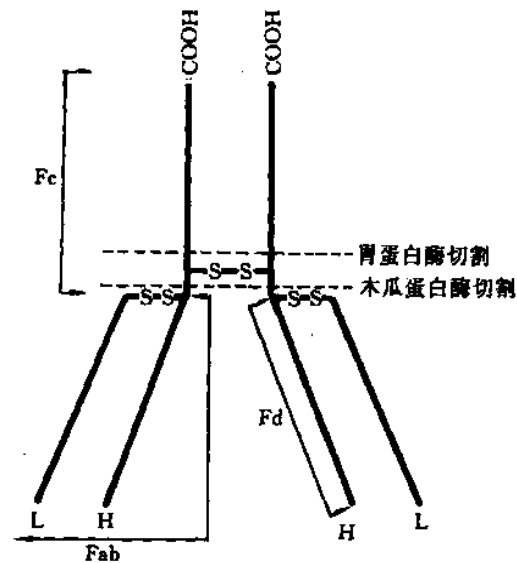


图 1-1 Porter 提出的兔 IgG 的基本四链结构

由于V区氨基酸序列之间有一定的类似性,故根据 κ 和 λ 轻链可变区及重链可变区的差异,可分成四种 κ 亚类(V κ I~V κ IV)和至少五种 λ 亚类(V λ I~V λ V)以及四种V_H亚类(V_HI~V_HIV)。在同一亚类中,除超变区外,各重链的V区氨基酸序列相似性可达80%~90%。由此可将V_H的氨基酸残基分成三种类型:①骨架残基,该区氨基酸残基相对保守;②亚类特异残基(subgroup specific residues),它们的变化与其亚类的差异有关;③3~4个超变区残基,其变异很大。

自从 Porter 阐明了抗体结合活性是在免疫球蛋白的 Fab 片段后,众多学者开始研究抗体结合位点的结构和位置。对 Ig 立体结构的分析发现,任何功能区多肽链的立体折叠均基本相似(见图 1-2)。这些肽链处于一系列折叠中,其走向与功能区的长轴平行,相邻肽链之间相互反平行走向,形成显著的两个反平行 β 折叠平面,靠链内二硫键和氢键稳定。在两层平面中间集中了疏水氨基酸残基,其中一个平面中有三条 β 构型折叠走向肽链,另一平行面有四条 β 构型折叠走向肽链,而原来分散于多肽链上的三个超变区通过肽链折叠走向,在立体结构上都分布于 Fab N 端 V 区的表面,形成一个凹形的抗体结合部位。抗原分子紧贴在由抗体结合位点形成的凹槽内,这些位点是由重链和轻链超变区中 10~20 个氨基酸残基的多接触点构成的。

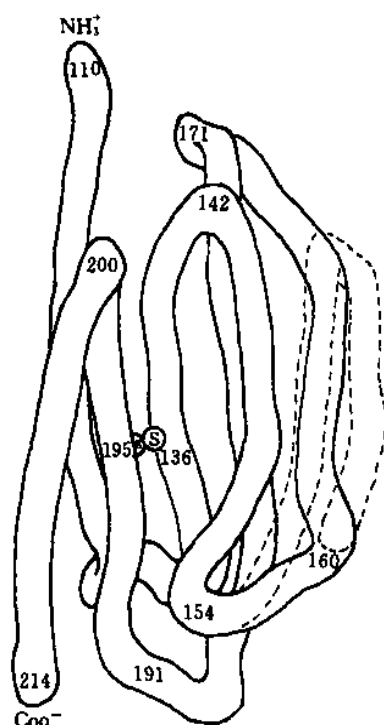


图 1-2 单个免疫球蛋白功能区多肽链的基本折叠

Fab 和本-周氏轻链双聚体在大小、形状和立体结构上都相似,由四个功能区组成,相当于 Fab 中重、轻链的 C 区和 V 区,C 区和 V 区之间有较大幅度的伸展性,称为转折区 (switch region),使 C 区和 V 区之间可有一定程度的扭转。Fab 分子两条链的功能区相互成对。Fab 的 C 区中,每一功能区四条反平行走向肽链组成的平面彼此相对在内侧,而 Fab 的 V 区中三条反平行走向肽链所组成的平面彼此相对在内侧。这样就使 Fab 超变区相互成对,形成凹槽,成为结合抗原的特异部位。根据小鼠 IgA 骨髓瘤 460 结合区的研究提示,结合的凹槽有能与两个抗原决定簇结合的位点,而这两个位点分开 1.2~1.4nm 距离。这些研究表明,一种抗体的个体结合区可以在结合区不同点结合若干个抗原决定簇。该多功能结合位点对于我们了解抗体特异性、抗体多样性的遗传调控具有很重要的意义。

第二节 免疫球蛋白的同种异型和独特型

一、Ig 同种异型(allotype)

Ig 同种异型表示同一种属不同个体间 Ig 分子结构上的差异,这种差异是由于 Ig 分子 C 区上某个或某些氨基酸残基的不同所造成的,它是由同一基因位点的等位基因所决定。目前已知,人类 IgG 的 γ 链和 IgA 的 α 链及轻链 κ 型具有同种异型标志,分别为 Gm, Am 和 Km。每种同种异型只在某一种 IgG 或 IgA 亚群中出现。因此,标记符号还应包括亚群的数字,如 IgG₁, IgG₂ 和 IgG₃ 分别为 G₁m, G₂m 和 G₃m。由于 Ig 同种异型之间氨基酸残基的变化发生在 C 区,故并不能影响抗体结合抗原的特性。

二、Ig 独特型(idiotype)

Ig 独特型是指每一形成抗体的克隆(clone)细胞所产生特异抗体上特有的氨基酸序列,即存在于两种具有相同的同种型和同种异型单克隆抗体分子上不同的抗原性差异,其位于抗体的抗原结合部位内或附近。因为每种特异抗体 V 区(V_H 和 V_L)上氨基酸序列都不相同,所以其结合抗原就表现出特异性。V 区上氨基酸序列的差异构成了其特有的抗原决定簇或独特的标记,即独特型。对外来抗原反应所产生的抗体的个体独特型,正常情况下不存在于动物的免疫球蛋白中,故它们本身就是潜在的免疫原,当这种抗体水平达到关键浓度时,就可能诱导出自发抗个体独特型抗体。

抗体分子的独特型或遗传变异是等位基因,以简单的孟德尔方式遗传。在轻链基因和重链基因杂合性的兔子中,任何一种免疫球蛋白分子将只携带每种基因的两种可能等位基因标志中的一种。因此,一种遗传型 a_1, a_2, b_1, b_2 动物将有 $a_1, b_1; a_1, b_2; a_2, b_1$ 和 a_2, b_2 特异的免疫球蛋白分子。每个分子的重链和轻链有相同的标志,这种现象称为独特型限制(allotypic restriction)。

了解独特型这一概念对进一步深入理解免疫应答的调控、淋巴细胞相互作用、细胞表面抗原受体结构和疫苗的制备等均有重要意义。

1. IgG 从量上来说, IgG 是最重要的血清免疫球蛋白,约占成人血清 Ig 总量的 75%。血清中 IgG 约占全身 IgG 总量的 50%,其余分布在各种组织中。根据 IgG 重链(γ 链)结构差异、二硫键数目和位置的不同,可将人类 Ig 分为 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 和 IgG₄ 四种亚类。各亚类之间最显著的差异之一是链间二硫键的位置和数量,其中 IgG₃ 特别明显,其重链之间二硫键达 11 个,并与 62 个氨基酸组成的长绞链区相连接,故 IgG₃ 相对分子质量比其他亚类大。由于这种结构上的特异性,各亚类固定补体的能力有差异,次序是 IgG₃ 大于 IgG₁ 大于 IgG₂, 而 IgG₄ 不能通过经典途径固定补体,但可激活补体旁路。四种亚类在正常人体血清中相对浓度是 IgG₁(66%), IgG₂(23%), IgG₃(7%) 和 IgG₄(4%)。

IgG 是主要的抗感染抗体,能中和毒素、病毒以及与细菌结合,起到调理、吞噬作用。它也是唯一能通过胎盘的抗体,对新生儿的抗感染起到主要作用。

金黄色葡萄球菌细胞壁的提取物蛋白 A(SPA)能与 IgG 的 Fc 段特异结合,这为 IgG 类的提取、酶标记、荧光标记等实验提供了良好的工具,但 IgG 各亚类与 SPA 结合的程度不尽相同。

2. IgA 占血清中免疫球蛋白总量的 15%~20%,而在全身的外分泌液中,如泪液、唾

液、初乳、奶液及呼吸道、胃肠道、生殖道等分泌液中,都含有大量的 IgA(为分泌型 IgA 或 sIgA)。人体每日合成的 IgA 可达 66mg/kg。

IgA 有单体和多聚体两种形式。分泌型 IgA 与血清型 IgA 结构明显不同,后者是以典型的两条链(两条 α 链,两条轻链)组成的单体结构。而 sIgA 主要是双聚体,也有少数三聚体。双聚体结构中除了具有两个四条链组成的 IgA 单体外,还有一个分泌片(secretory piece,相对分子质量60 000)和一个 J 链(相对分子质量15 000)共同组成。J 链通过二硫键与单体 IgA 结合,分泌片通过二硫键和非共价键结合在 IgA 单体的 Fc 区。分泌片由粘膜上皮细胞组成,它的存在有助于稳定 sIgA 二聚体,以免受蛋白酶水解。带有 J 链的 IgA 被浆细胞分泌后,经过粘膜上皮细胞时与分泌小体结合,形成完整的 sIgA,随分泌液分布于粘膜表面,作为“第一道免疫防线”。

IgA 在正常人血清中有两种亚类,即 IgA₁ 和 IgA₂。它们的 α 链上抗原性存在差异,并且二硫键连接方式也不同。血清中 IgA₁ 占优势,分泌液中两种亚类含量几乎相等。

3. IgM 是相对分子质量最大的免疫球蛋白(相对分子质量900 000),常被称为 19S 球蛋白或巨球蛋白。IgM 是由 5 个 7S 亚单位聚合成花环状多聚结构,每个完整的 IgM 分子由十条 μ 链、十条轻链和一条 J 链组成。IgM 分子中的重链(μ 链)中没有 α 链和 γ 链那种典型的绞链区结构,但其 C μ 功能区类似于绞链区部位。

IgM 从理论上说是多价的,即与抗原有 10 个可能结合的位点,但由于空间位阻效应而只能表现 5 价特性。尽管如此,IgM 仍能与多价抗原形成高功能亲和力的键,这在与多价抗原如侵犯血液的细菌和病毒的结合中是非常重要的。

4. IgE 正常人血清中 IgE 浓度最低(0.1~0.4mg/L),但它在过敏反应中发挥重要作用。IgE 相对分子质量约为190 000,其中糖基含量达 12%。IgE 的重链 ϵ 的相对分子质量为 72 000,它的 C 区也同 μ 链一样有四个功能区,但在 ϵ 链的 C 端无额外的半胱氨酸残基。IgE 的 C ϵ 结构域能够同肥大细胞表面受体结合,激活肥大细胞,引起过敏反应。

5. IgD 该类球蛋白最初发现于骨髓瘤蛋白中,在正常人血清中含量很低(20~50 mg/L)。由于它对热不稳定,易被酶降解,故对其结构和化学特性认识较晚。现已明确,IgD 的相对分子质量约为180 000,其重链 δ 链相对分子质量约为69 000,糖基含量约 9%~18%,人类的 δ 链区只有三个功能区 and 相应的绞链区。该绞链区由 64 个残基组成,是 Ig 中绞链区最长的一个。有资料表明,IgD 可能在 B 淋巴细胞表面起抗原受体的作用。

第三节 单克隆抗体和多克隆抗体

每个抗体分子的结构特异性,决定了其只能与同一类抗原决定簇结合。理论上每个抗体产生细胞克隆株所分泌的抗体属同一类,其结构和免疫化学性质均相类似,即只能识别抗原分子表面同一类特异性抗原决定簇。因此,每个细胞及其分裂繁殖后所形成的细胞集群称为该细胞的克隆细胞株,其产生的抗体称为单克隆抗体(monoclonal antibody,McAb)。

目前,最常用的方法是将抗原免疫后的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(myeloma cell)融合,建立能定向分泌抗该抗原的单克隆抗体杂交瘤细胞株(hybridoma cell),其过程可由图 1-3 表示。此外,也有人试图利用基因工程方法制备单克隆抗体。

杂交细胞的克隆化选择和长期生长,保证了其抗体产物的单克隆性、单特异性和永久产

生等特性,从而使人们从以往制备及应用异种抗血清时所遇到的限制和困难中解放出来。目前,单克隆抗体在医学上得到了广泛的应用。在基础研究方面,它可作为研究抗原物质结构与功能关系,研究淋巴细胞的活化、增殖和分化以及研究免疫分子等的探针,并可用于抗原物质的分离与提纯等;在疾病诊断方面,它可作为诊断试剂,用于各种病原体的诊断,肿瘤的诊断、分型及定位,主要组织相容性复合物(MHC)抗原的分型和ABC等血型的鉴定,激素、酶、药物等生物活性物质的测定,自身免疫病的诊断等;在疾病治疗方面,它可用作被动免疫治疗制剂,作为生物导向治疗的载体或用于移植排斥反应的预防性处理等;在疾病预防方面,它可作为独特型疫苗,用于传染病的预防等。

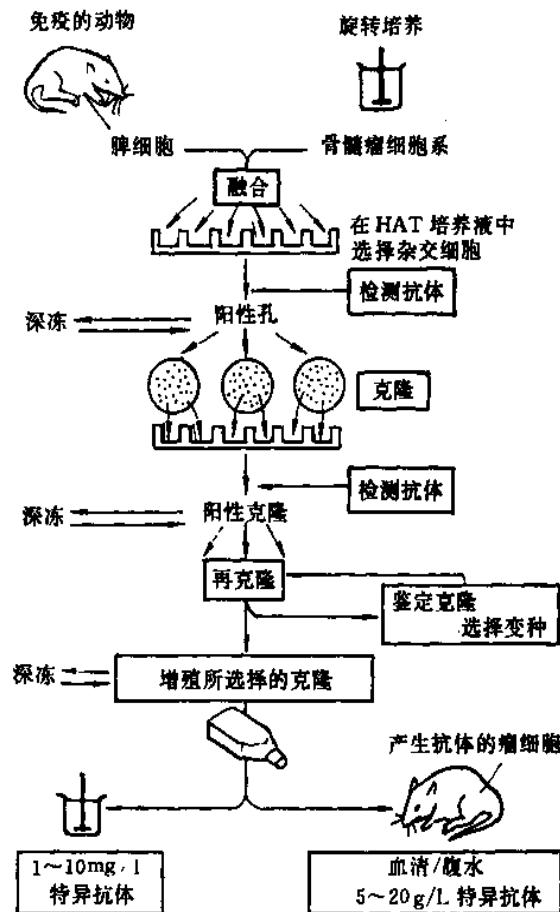


图 1-3 产生及克隆分泌抗体杂交瘤的常规步骤

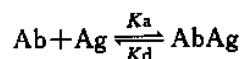
单克隆抗体应用于人类疾病的诊断和治疗,无疑最理想的是产生人而不是鼠或其他啮齿类动物源性抗体。由于目前制备的单克隆抗体多为鼠源性,对于人体则属于异种蛋白。因此,这在很大程度上限制了它的临床应用。虽然人体产生免疫球蛋白的细胞已与小鼠骨髓融合,并产生嵌合体杂交瘤,但大多数这类杂交细胞由于选择性地丢失了人体染色体,因而有高度不稳定的倾向。为此,制备高度稳定的、能分泌预先确定抗原的、有特异性单克隆抗体的人-人杂交瘤细胞具有重要意义。目前,已能利用两次杂交瘤(hybrid-hybridoma)技术制

备出一种双特异性抗体(bispecific antibody, BIAB),这种抗体也可用化学偶联或基因工程方法来获得。该抗体是将两种抗体分子与抗原分子结合的亲和性及特异性结合于一种分子上,在结构上是双价的,而功能上是单价的,即两个 Fab 各结合不同的抗原决定簇。这在免疫细胞化学和免疫测定法方面的应用是非常有意义的,它可省略酶标记或其他标记物的过程,并可达到或超过常规方法的灵敏度,使操作过程简化,且在大批量测试时易标准化。

多克隆抗体是由不同的细胞产生,其免疫化学特性不同,他们能够识别抗原表面多种抗原决定簇。以抗原免疫动物后,其血清中提取的抗体为多克隆性质,这是因为一种抗原分子上往往具有数种甚至数十种以上的抗原决定簇。所以,尽管每一细胞克隆产生的抗体仅针对其中的一种抗原决定簇,但体内免疫环境是多细胞克隆混合的世界,从而产生的抗体为多克隆性质。

第四节 抗体亲和力和抗体亲合力

抗体亲和力(affinity)指的是抗原决定簇和同源抗体结合位点间的反应力,即分子间吸引与排斥力的总和。抗体的亲和力越高,与抗原决定簇结合就越牢固,所形成的抗原-抗体复合物就越不易解离。亲和力是抗体与抗原决定簇一级结合能的热力学表达,可以用平衡常数 K (mol/L)来表示。其平衡反应的定量关系可以下面的方程式表示:



Ab 为游离抗体, Ag 为游离抗原, AbAg 为抗原-抗体复合物, K_a 和 K_d 分别为结合和解离常数。平衡时结合率和解离率相等,因此:

$$K_a[Ab][Ag] = K_d[AbAg]$$

$$\therefore \frac{K_a}{K_d} = K = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$

这里 K 是平衡常数。

同样 $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ 。

式中, ΔG° ——标准状态下的自由能变化, R ——气体常数, T ——热力学温度, K ——平衡常数。

ΔG° 小于零时(即 K 大于1)比 ΔG° 大于零时(即 K 小于1),反应进行得更为完全。因此,一种高亲和力抗体比低亲和力抗体其 ΔG° 值更易为负值。

免疫动物之间其抗血清中存在的多克隆抗体不仅对抗原决定簇的识别不同,而且对同一类抗原决定簇的亲和力也有差异。

亲和力这一概念也可从其固有性(intrinsic)和功能性(functional)两个方面来描述。所谓亲和力的固有性质是由该抗体重链可变区与其特异性有关的氨基酸序列所决定的。但是,仅认为抗体的亲和力越强,其特异性就越高则并不完全。因为抗原-抗体的结合包括了氢键、离子和库仑作用、范德华力及空间吸力或空间斥力作用的总和,这些是构成抗体亲和力固有性的主要方面。此外,疏水键也具有稳定免疫复合物的效应,而抗原-抗体之间并不产生共价键。

从免疫细胞化学来说,以功能性来描述抗体亲和力并不严格。一般认为将两种效价和体

积均相等的抗体与抗原共同孵育,首先达到最大染色密度的抗体则功能性更强。

抗体亲合力(avidity)虽然部分地取决于亲和力,但也与其他因素有关,如抗体效价、抗原效价和与结合有关的其他非特异性因素等。它可被称之为“功能性亲和力”,也同样表示了抗原-抗体之间结合的牢固程度。一个抗体的亲合力常影响生物学上抗原结合功能的能力,它涉及了除一级抗体-抗原结合以外的某些其他因素。

抗原免疫动物以后,其数量上的增长表现为效价增高,而质量的上升则表现为亲和力成熟。低剂量免疫原虽能提高亲和力成熟的效率,但会导致抗体的低效价;反之亦然。由于抗原-抗体之间的反应是可逆的,因此在免疫细胞化学实验中,组织表面所形成的简单的抗原-抗体复合物可能会在漂洗过程中解离。但这种解离的难易程度在各种抗体之间存在差异,一般认为,低盐离子浓度和降低温度能减轻抗原-抗体复合物中由于两者的解离而引起的染色强度偏弱。显然,对这些问题,具备高亲和力的抗体比低亲和力抗体更加优越。

由于多克隆抗体能识别不同抗原决定簇,造成其亲和力表现参差不齐,过度的漂洗并不会导致严重的失染。但是,单克隆抗体仅识别专一的抗原决定簇,其亲和力较为均一,如果抗体亲和力较低,过度漂洗往往导致抗原-抗体解离而失染。因此,选择高亲和力的单克隆抗体在免疫细胞化学实验中非常重要。在对切片标本漂洗过程中,应尽量避免高盐离子浓度、较高温度和较低 pH 值等减弱抗原-抗体结合程度的因素。

抗体的亲和力还与其形成不溶性免疫复合物有关,亲和力越高,形成沉淀的能力越大。然而,免疫细胞化学实验中,抗体形成沉淀能力的大小并不重要,因为组织表面的抗原位点相对固定,容易观察。

影响抗体亲和力的因素有多种,其中包括免疫刺激物的性质、遗传因素、淋巴细胞功能在质和量方面的状况、营养与激素、网状内皮的功能与游离抗体以及抗原-抗体复合物的影响等。目前,这些影响因素的作用机制尚不清楚,有待于深入研究。

第五节 抗原-抗体反应的专一性和交叉性

抗原-抗体反应的专一性是指针对抗原上特殊抗原决定簇的抗体不能与第二种抗原决定簇互补。这种专一性使机体产生的某种病原体的抗体可以对其起反应并对其产生免疫力,但不能对无关的病原体起反应。由于一个抗原上存在有多个抗原决定簇,因此分析抗体的特异性应从单一决定簇入手。抗体能选择性地与特异抗原决定簇结合取决于两个因素,即抗体的亲和力及检测方法的敏感度。

当抗原 A 的某些抗原决定簇和第二种抗原 B 中的某些抗原决定簇相同时,那么一部分抗原 A 的抗体分子也将与抗原 B 反应。此外,如果抗 A 的血清对抗原 B 上的另一个决定簇也有很弱的识别,那么抗血清对其将产生交叉反应。有学者从分子水平将抗原的交叉反应性分为两大类,第一类交叉反应性是指抗原上的两个配体(即决定簇)均可与同一抗体分子的同一抗原结合部位结合,然而亲和力有所不同;第二类交叉反应性是指抗原决定簇分别与抗体中的不同抗体分子起反应而表现出的交叉反应性,这一类交叉反应的产生是由于不同的抗原有不同的配体,当两种抗原的配体均分别与抗体中的不同亚类分子起反应时,即可表现有交叉反应性。这种情况仅可见于抗体为不均一的条件下,即见于多克隆抗体而非单克隆抗体。

第六节 抗体效价

从免疫细胞化学角度来说,抗体效价(titer)是指抗体在保持其最佳特异性染色,并且具备最小背景染色条件下的最高稀释倍数。抗体效价代表了参与抗原-抗体反应体系中抗体的绝对数量,而抗体质量的优劣则由抗体亲和力大小来表现。在多克隆血清中,抗体水平可以每毫升抗体中所存在的抗原沉淀的微克数量来表示。但这对于免疫细胞化学的实际应用并无必要,因为免疫细胞化学实验中应用较多的为单克隆抗体,而单克隆抗体在其制备过程中已较容易地测定过特异性抗体的绝对浓度,并已稀释成了实验所需求的基本浓度。此外,抗体效价还受到抗体亲和力制约。如果保持某一抗体效价恒定,则亲和力较高的抗体与组织抗原的结合更为迅速,抗原-抗体孵育时间更短,染色反应更为强烈。然而,如果为了提高抗体效价而从多克隆抗体中提取单一免疫球蛋白组分的话,实践证明,这样做很可能会造成更多的非特异性反应,而加深背景染色。

第七节 抗体稀释

通常,生产厂家在抗体出厂前均预先稀释,或者建议根据不同的操作方法、孵育时间和温度作最适稀释。如果缺乏这些数据,则必须通过测定效价来决定免疫细胞化学实验所用的最佳稀释比例。正确的稀释将带来高质量的染色效果,一般可先确定孵育时间,并保持恒定,然后通过系列稀释来决定最佳稀释点。根据标本大小,一般每种液体使用0.2~0.4ml已足够。但应注意,抗体的最佳稀释常不能单独以染色最深来确定,而宁愿以最小背景染色条件下最强的特异性染色来确定,即适宜的最大信号-噪声比率。由于甲醛固定和石蜡包埋可能会破坏许多抗原决定簇,故尽管使用高浓度抗体也不能弥补因固定造成的免疫复合物的破坏。

当实验中所用试剂均需稀释,并期望这些试剂之间有一个最佳配伍时,可列一个稀释方案表格,以便寻找各试剂间最佳的稀释度配伍。有时在系列稀释中,染色效果均相似,此时应当考虑成本问题。应该注意的是,在免疫细胞化学实验中,精确定义最佳信噪比在PAP法和APAAP法中比ABC法更为严格,这可能是由于ABC法不能很好区别组织抗原浓度的高低。如要获取一个容量很小而稀释度很高的抗体时,可采用两步进行。例如,要制备1:1000稀释的抗体1.0ml,可先制备1:10稀释的抗体100 μ l(10 μ l+90 μ l),然后取出10 μ l加入稀释液990 μ l即可。多余的1:10稀释抗体可冰冻保存备用。

第八节 抗体孵育

抗体孵育是一个多因素作用过程,包括时间、温度、pH值和抗体效价,其中一个因素的变化将会影响其他因素,以下主要讨论孵育时间和温度。

一、孵育时间

抗体的孵育时间和其效价呈负相关,即抗体效价越高,孵育时间越短。实验中,一般先暂定一个适宜的抗体孵育时间,然后确定抗体的最佳稀释度。

抗体的孵育时间可在1.5min至48h不等,但一般以20~30min最为常用。为使抗体能在

1. 5min 内与抗原有一个足够强的反应和结合,则必须采用高亲和力及相当高浓度的抗体,但应该注意降低那些会引起非特异背景染色的各种因素。而48h 的孵育可采用更高的抗体稀释度,更为经济。对低亲和力或低效价的抗体,延长孵育时间可促进抗原和抗体的反应,但超过一定时间后,即使再孵育也不会获得更好的效果。一般情况下,孵育时间少于20min,抗原和抗体的反应难以充分进行。因此,摸索适宜的孵育时间甚为重要,不适宜的孵育时间会从总体效果上对染色产生影响。

二、孵育温度

与室温相比,37℃时抗原、抗体能更快、更充分地反应,因此一些研究者更喜欢较高的孵育温度。提高孵育温度应增加抗体的稀释度,如果不增加稀释度,则孵育时间应缩短。4℃常被用作过夜或更长时间孵育。采用梯度温度或37℃孵育时,应将标本置于保湿盒内,以防水分蒸发使样本干涸。同样,将组织标本在干燥的室温环境中孵育时,也必须置于保湿盒中。

第九节 抗体反应率

抗体分子及其复合物的形状和大小对免疫细胞化学实验并无影响,不论是IgM(相对分子质量900000)还是PAP(相对分子质量400000~430000)或APAAP(相对分子质量约560000),抗体对组织穿透不足的现象并不常见,甚至在对细胞核内或细胞质抗原的染色过程中,也罕见穿透不足的现象。但是,对组织标本进行过分固定将使抗体对其穿透产生困难。

尽管在理想条件下,抗体与其配体(抗原)反应非常迅速,但在免疫细胞化学实验中,这种理想的条件很少能达到。因此,应根据组织固定情况,适当调整抗体浓度、温度和孵育时间等因素。由于临床工作的特殊需要,努力缩短操作时间显得越来越重要。高亲和力和高浓度的抗体可获得相当快的反应速率,从而极大地缩短抗体孵育时间。实践表明,某些情况下仅将抗体浓度提高2~3倍,就可将孵育时间从30min 缩短至90s,并且其特异性染色效果毫不逊色。但在这么短时间孵育中,实际上仅有一小部分抗体发挥了作用。因此,孵育温度一旦被确定之后,就应保持恒定,否则染色效果重复性将很差。

第十节 抗体稳定性

在非冷冻条件下,处于分离状态下的抗体比与其他血清蛋白相混合的抗体更缺乏稳定性。经过纯化的抗体稳定性在很大程度上依赖于纯化和使用抗体的方法,若纯化时将抗体暴露于低pH值、极低或极高的盐浓度条件下,将严重影响其稳定性;而变性的抗体常会形成凝集或沉淀。这些变化是由于抗体溶液中IgG分子间疏水作用所致,而这种疏水作用在免疫细胞化学实验中将会增加抗原-抗体的非特异性结合。因此,从IgG中去除这些凝集和沉淀聚合物对免疫细胞化学实验来说甚为重要,一般可用离心或过滤的方法去除。

抗体的稳定性也同样显著地受到纯化和储存方法的影响,尤以IgG_{2b}和IgM特别敏感。使用戊二醛(glutaraldehyde)也可能会引起蛋白质凝集,与戊二醛发生凝集作用的部分包括赖氨酸的ε-氨基组分和N末端的α-氨基组分。由于IgG分子中有多个戊二醛反应位点,故在其凝集过程中,凝集的抗体疏水性增加,使已固定的组织中疏水性位点之间相互作用更为增强。而使用可溶性酶-抗酶免疫复合物,如PAP和APAAP,可避免这些问题。

除了以上提到过的某些条件下可引起免疫复合物的解离之外,当加入过量的抗原于抗原-抗体沉淀中也同样能够部分或全部溶解免疫复合物。已沉淀的酶-抗原免疫复合物中加入大量的酶会影响复合物过量的游离酶和抗体之间的平衡,而导致沉淀的解聚和溶解。出现这样的结果是由于形成了简单的可溶性复合物所致,以 PAP 为例,该可溶性复合物呈 V 形,其包括两个抗体分子和三个辣根过氧化物酶分子,而 APAAP 则包含了一个抗体分子和两个碱性磷酸酶分子。

第十一节 抗体保存

为了让抗体能在实验中获得最佳效果,严格遵守操作规程和抗体适宜的保存条件是绝对必要的。尽管绝大多数商品化试剂保证其稳定性可达数月甚至数年,但必须按照说明书上的条件,否则难以达到预期效果。要注意每一批试剂均应有生产日期、批号、失效期,有时还要记录启用日期。

抗体的保存有两个重要条件应首先考虑,即储存容器和储存温度。储存容器应由不吸附蛋白质的材料制成,常用的有聚丙烯、聚碳酸酯和硼硅酸盐玻璃。如果储存的抗体中蛋白浓度很低($10\sim 100\text{mg/L}$),就应另加隔离蛋白,以减少容器对抗体蛋白的吸附,隔离蛋白常用 $0.1\%\sim 1.0\%$ 的牛血清白蛋白。此外,容器的材料应为洁净和无色,以便操作者能更好地观察和吸取其中的液体。

相对于其他储存条件来说,温度更为重要。使用的冰箱或冷柜的显示温度应正确,并保持恒定。贵重试剂应保存在有报警和应急备用电源装置的储藏箱内。绝大多数已稀释的抗体应保存在 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的条件下,以免冻融对抗体蛋白产生有害效应。抗体原液和已分离的免疫球蛋白组分应保存于 -20°C 条件下,并避免反复冻融。冷冻的抗体溶液应置于室温中缓慢地解冻,应绝对避免用高温快速解冻。由于商品化单克隆抗体或试剂盒在出厂前均经稀释,故以保存于 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下为宜。

根据实验需求,抗体溶液应尽量以小容量分装,这样做可避免试剂大量污染或失效。除污染外,还应尽量避免过热和过量光线直射给抗体带来的不良影响。操作中应使用干净的吸管或塑料吸头。抗体溶液从储藏箱中取出后,应置于一盛冰块或冰水的容器中操作,吸取完毕后应尽快放回储藏箱内保存。被细菌污染的抗体常会出现假阳性结果,应将污染的抗体溶液及其他试剂弃之。为防止细菌污染,可于抗体溶液中加入 0.02% 叠氮钠。此外,还可将抗体经真空冷冻干燥后置 -20°C 以下的冰箱中作长期保存,保存期可达 3~5 年。

第十二节 抗体(Ig)的分离与纯化

一般条件下,较为常用的抗体分离纯化方法是盐析技术加上各种层析分离方法。目前,较新的方法有等电聚焦电泳分离技术等。以下就盐析和层析技术作一个简要介绍。

一、抗体盐析分离技术

盐析技术中最为常用的是硫酸铵分段盐析技术,该技术一般用来从血清中提取抗体粗制品,由于其具有快速、价廉及能够对较稀的蛋白溶液进行浓缩等特点而被普遍应用。盐析技术的原理是利用盐离子争夺蛋白质分子的水化膜,使其降低水溶性而沉淀析出。硫酸铵的

浓度应根据特定蛋白质分子表面性质、极性侧链、多肽链的长短和溶液的 pH 值及温度而定,欲达到硫酸铵饱和浓度,一般加入固体硫酸铵,这样能降低溶液的总容积。但由于固体硫酸铵需长时间搅拌以溶解,可能会在溶液和空气界面上引起蛋白质变性,而且局部的高浓度硫酸铵还可能引起不必要的蛋白沉淀。由于硫酸铵稍偏酸性,当加入固体硫酸铵时应及时测定和调整蛋白质溶液的 pH 值。因此,在蛋白质盐析实验中以加入饱和硫酸铵缓冲液为妥。一般可将饱和硫酸铵溶液认为是100%浓度,对绝大多数抗体的纯化目的而言,血清与饱和硫酸铵以等体积混合即为50%硫酸铵浓度。20℃时饱和硫酸铵溶液的密度为1.235 g/cm³,该密度对用离心法去除沉淀蛋白质已足够低了。硫酸铵通过其能够升高中点温度(mid-temperature)而避免蛋白质折叠,保持蛋白质在溶液中的稳定性,该效应被认为是盐和水分子相互作用的结果。沉淀的蛋白可用小容量的缓冲液来溶解,并可更长时间保存而不会失去结合能力或被水解,4℃条件下盐析使蛋白质完全沉淀约需3~8h。沉淀蛋白经离心后收集,然后以适当体积的缓冲液溶解后置-80℃保存。此外,也可用透析法脱盐后作进一步纯化。

尽管硫酸铵分段盐析法是一种简便而实用的免疫球蛋白富集方法,但该方法不能作为独立的纯化方法,而应当结合层析技术作进一步分离纯化,因为沉淀的蛋白质中尚含有众多的杂蛋白。大多数情况下,残存的高浓度盐会对抗体的进一步纯化或使用产生干扰。所以,应该用透析法去除残存的硫酸铵盐。

1. 材料

(1) 血清或腹水(100ml)。

(2) 硼酸盐缓冲液(BBS):含200mmol/L 硼酸,160mmol/L 氯化钠。将硼酸247.3g、氯化钠187g 和10mol/L 氢氧化钠75ml 溶解于蒸馏水4L 中,用10mol/L 氢氧化钠调整 pH 值至8.0,加蒸馏水至终体积为20L。

(3) 饱和硫酸铵:硫酸铵800g 溶解于热 BBS 1L 中,用一号滤纸(Whatman)过滤并冷却至室温,精密试纸测定,保证溶液 pH 值为8.0,4℃保存。

(4) 200mmol/L 碳酸氢钠,5mmol/L EDTA。

(5) 色谱纯蒸馏水。

(6) 20%乙醇(色谱纯)。

(7) 透析滤膜(透析袋)。

(8) 10~50ml 圆底聚碳酸酯离心管。

(9) 100ml 烧杯。

(10) 10ml 吸管。

(11) 4L 容量的三角烧瓶。

(12) 超滤器和超滤膜(直径43mm,PM30)。

(13) 氮气钢瓶。

(14) 层析柱。

(15) 层析系统:包括蠕动泵、部分收集器、紫外线监测仪、记录仪。

(16) 0.22μm 针筒过滤器。

(17) 缓冲液过滤装置。

(18) 离心机(50ml 离心管,转速10000r/min)。

(19) 真空泵。

(20) 紫外线分光光度计及石英比色杯。

2. 方法

1) 硫酸铵沉淀和透析

(1) 于4只50ml的离心管中分别加入血清或腹水25ml, 4℃条件下10000r/min离心30min, 去除液体中的较大颗粒。

(2) 上清液移至100ml的烧杯中, 用BBS调整容量至96ml。

(3) 取96ml溶液分别装于6个50ml洁净离心管中(每管装16ml), 加入冷饱和硫酸铵16ml, 用吸管轻轻搅拌。

(4) 置于冰浴中3h。

(5) 4℃条件下10000r/min离心30min。

(6) 取出上清液, 以最小容量(约30ml)BBS溶解沉淀。

(7) 将透析袋置于碳酸氢钠或EDTA溶液中浸泡, 并90℃加热30min, 不断用光滑的玻璃棒进行搅动。

(8) 用数份去离子水漂洗透析袋, 然后放入20%乙醇中, 置于4℃条件下。

(9) 用去离子水漂洗透析袋, 去除乙醇。

(10) 将透析袋的一头扎紧, 检查密封是否良好。

(11) 将免疫球蛋白粗制品溶液装入透析袋中至一半容量, 然后扎紧袋口。

(12) 将透析袋放入盛有冷BBS 1L的烧杯中透析。透析过程中, BBS要更换4次, 每次透析时间不少于4h。

2) 蛋白质浓缩和储存

(1) 取出透析后的蛋白溶液并测其蛋白含量, 将蛋白溶液100μl用BBS 900μl稀释。以BBS为空白, 280nm处读取稀释后溶液的光吸收值。如果比色杯光径为1cm, 那么1mg/ml浓度的蛋白溶液的吸光度为1.4左右。该值为比例常数。

(2) 用超滤装置将蛋白溶液浓缩至10g/L(用氮气在冰浴下进行)。

(3) 测定抗体蛋白的最终浓度。若置于4℃条件下保存, 可放置数周; 而置于-80℃条件下, 则可保存数月甚至数年之久。

3) 快速蛋白液相层析(FPLC)

(1) 将BBS用0.45μm孔径滤膜的过滤装置进行过滤, 用真空泵抽吸30min以去除缓冲液中的气体。

(2) 将蛋白标本用0.22μm的针筒滤器过滤, 然后加于层析柱上。

(3) 用BBS以0.5ml/min的流速进行洗脱, 并监测280nm峰值。每一部分收集0.5~1.0ml, 免疫球蛋白大约在30min被洗脱。

(4) 收集IgG部分, 并测其280nm光吸收值以确定蛋白浓度。

(5) 以BBS 50ml淋洗层析柱。若要短期保存(数日), 层析柱可在BBS的条件下储存; 如欲长期保存, 可用75~80ml的水淋洗层析柱, 然后再用20%乙醇50ml淋洗, 并卸下层析柱, 两头套上盖子密封, 以防凝胶干燥固缩。

3. 注释

(1) 由于BBS具有抑制细菌生长的特性, 故不失为一种良好的保存抗体的缓冲液。但

应注意,当将抗体加入活细胞中时,BBS的最终体积不要超过10%。

(2) 蛋白纯化过程中所用的水质,对抗体分子长期保持完整性和层析柱等的使用寿命非常重要,应该具备较低的紫外线吸收值,以便不影响所需蛋白质的检测和去除对层析柱有影响的物质。因此,宜使用色谱纯水。此外,用石英玻璃蒸馏水装置制备的双蒸馏水经过滤后也同样可以使用,但该双蒸馏水有时会含有一些不溶解的有机物质,可能会干扰蛋白质的测定。

(3) 血清在盐析前应56℃加热15min以灭活补体,腹水首先应该用玻璃棉过滤。

(4) 所有操作均应在较低温度或冰浴下进行,以避免蛋白变性和分解。

(5) 盐析时硫酸铵应逐滴加入并适时温和地搅拌,以避免硫酸铵在局部因形成高浓度而沉淀不需要的蛋白,这在盐析某种盐浓度范围很窄的酶蛋白时尤应注意。吸取蛋白溶液时应该注意避免气泡,因为气泡可能会引起蛋白质变性。

(6) 硫酸铵分段盐析法是一种较粗的抗体纯化技术,为了方便,盐析时间可延长至过夜。

(7) 如果为了得到更纯的蛋白质沉淀,可反复多次进行盐析。

(8) 用吸管或滴管吹打管壁的蛋白质沉淀时不能有气泡。将移出的蛋白质沉淀置于冰冷的缓冲液中30min,则沉淀更容易被溶解。

(9) 用甘油处理和保存的透析袋在使用前应预先用水漂洗干净。接触透析袋时应戴手套,以避免蛋白酶污染及透析袋破损。

(10) 透析用烧杯应足够大,便于能够自由搅动。但不能煮沸透析袋,否则会改变其极性。透析过程中,任何情况下都不应使透析袋干燥。

(11) 为保证透析袋密封,两端最好用夹子夹紧,并盛水来试验其密封性。

(12) 透析袋中应留有足够空间,以适应透析时液体进入后体积的增加。

(13) 透析后,蛋白溶液可能仍带有乳白色,这是正常现象。对于变性沉淀的蛋白,应当用离心技术予以去除。

(14) 硫酸铵分段盐析可能会造成一些杂蛋白沉淀,故280nm光吸收值仅作为测定抗体浓度的一种参考。欲进一步确定IgG含量,可用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以标准IgG分子为对照,用考马斯亮蓝染色,检测免疫球蛋白含量和纯度。

(15) 用甘油处理和保存的超滤膜在使用前应进行处理。即将膜光滑面朝下,在蒸馏水中漂洗数小时,然后膜光滑面朝上装入超滤器。超滤膜可置于20%的乙醇中保存,并能反复使用。

(16) 为能在连续的范围获得精确的光吸收值,用于比色的样品应进行大于10倍的稀释,且稀释后的样品光吸收值不能超过1.5。根据抗体种类,最佳的储存浓度在1~10g/L。应避免反复冷融抗体,以防变性。

(17) 应避免将气泡打入层析柱,否则紫外线监测器将会出现一个非蛋白峰值。

(18) 层析样品以1:3稀释后上样为最佳。

(19) 一般情况下,层析完毕后应将柱子卸下,并用蒸馏水洗去色谱仪中的盐分,包括真空泵、管道和紫外线检测器等,然后用20%乙醇清洗后保存。柱子使用情况应予记录,以便确定是否应该更换填充料或清洗层析柱。

二、离子交换层析法

离子交换层析是一种快速、廉价的抗体纯化方法,可用于不同来源、不同标本的抗体纯