

免疫组织化学

理论与技术

张保真 编译

西安医科大学

编写说明

免疫组织化学是近四十年来兴起的一门边缘科学，现多趋向称为免疫细胞化学。这一学科一经人们所掌握，就发挥了它的巨大推动力，推动着组织化学、免疫化学进一步发展，推动着微生物学、临床诊断学、免疫病理学、免疫药理学等各学科的相应发展，同时也促进医学临床各有关学科理论的提高。目前这一学科在国内已引起重视。这本书原是为卫生部办的部分医学院校组织胚胎师资进修班编写的，后又用于研究生班。为了适应广大读者需要，这次重加修改。不少章节是选出新近出版的外文书刊的资料直接译成的。主要参考书附于本书末后。同时根据编者体会，作了删节和补充。不当之处尚希批评、指正。

编者

1986年5月·西安

目 录

第一章	免疫组织化学的基本概念和发展简史	I
一	免疫组织化学的基本概念.....	1
二	免疫组织化学的发展简史.....	4
第二章	不同类型免疫染色概述	9
一	免疫荧光技术.....	9
二	免疫酶技术.....	13
三	免疫金属技术.....	20
第三章	抗原	28
一	抗原的含义.....	28
二	合成抗原.....	29
三	以组织和体液为来源的抗原.....	30
四	抗原的理化特性.....	34
五	抗原的稳定性.....	35
六	抗原提纯前细胞材料的处理.....	36
七	抗原提纯略述.....	37
八	抗原制备举例.....	38
第四章	抗体、免疫球蛋白	42
一	抗体的产生.....	42
二	免疫反应.....	45
三	抗体的特异性.....	49
四	单克隆抗体的制备.....	51

五	免疫球蛋白	53
第五章	抗体的提纯和保存	68
一	硫酸铵盐析法	68
二	DEAE纤维素层析法	69
三	凝胶过滤法	72
四	免疫吸附法	74
五	Sephrose免疫吸附剂抗体提纯法	78
六	抗体蛋白浓度的测定	81
七	抗体的保存	82
第六章	免疫组织化学中的非特异性反应	84
一	抗体方面造成的非特异性	85
二	染色带来的非特异性	89
三	来自组织切片的非特异性反应	94
四	特异性的对照检查	96
第七章	组织固定	102
一	固定的目的	103
二	固定的作用	103
三	抗原的隐蔽和揭露	105
四	常规固定剂	107
第八章	关于固定的若干问题	135
一	固定前和固定中的组织变化及处理	135
二	固定后出现的问题及其处理	140
三	固定剂的选择	142
第九章	包埋、切片	151
一	光镜切片制备	151
二	电镜切片制备	159

第十章 染色	165
一 消除内源性过氧化物酶	165
二 在染色前正常血清阻滞组织切片上的反应部位	166
三 改善组织的透过性	167
四 在抗体溶液中加入蛋白	167
五 稀释第一抗体溶液	168
六 检验抗体的工作稀释度	169
七 延长孵育时间	169
八 减少背景染色	170
九 逆转交联的作用	171
十 重叠染色	172
十一 过氧化物酶的组织化学	172
十二 碱性磷酸酶的组织化学	177
十三 对比染色	178
第十一章 免疫组织化学工作程序实例	181
一 材料的处理	181
二 免疫荧光技术	182
三 免疫酶的技术	184
四 免疫金技术	190
第十二章 免疫荧光双标记技术	191
一 用荧光色质标记两种IgG的方法	192
二 直接染色法	195
三 对照	196
四 抗原定位和固定方法的选择	197
第十三章 免疫酶双标记技术	200
一 单酶法和双酶法	200

二	免疫酶双染色的实际操作	208
三	关于染色中的若干技术问题	214
四	免疫酶双标记和免疫荧光双 标记技术优缺点的比较	216
五	免疫酶双标记技术的实际应用	217
第十四章	胶体金技术	220
一	胶体金的制备	220
二	蛋白吸附到胶体金上的实验	222
三	组织的处理	230
四	组织切片上的免疫金技术	231
五	金粒标记的定量	239
六	结语	240
第十五章	免疫铁蛋白技术	243
一	商品铁蛋白的提纯	243
二	用铁蛋白标记抗体	244
三	铁蛋白标记成功的验证	247
四	铁蛋白以及铁蛋白-Ig结合物的保存	248
五	铁蛋白-抗体结合物的提纯	249
六	材料处理	251
七	染色的方法步骤	253
八	铁蛋白粒计数	260
九	铁蛋白与荧光素双标记染色法	260
十	铁蛋白-凝集素结合物在免疫 细胞化学中的应用	262
第十六章	凝集素的组织化学及其在免 疫组织化学中的应用	264

一	凝集素结合物作为组织化学的标记	266
二	凝集素的应用	271
三	凝集素在组织化学和免疫组织化学中的进一步发展	273
第十七章	调节肽的免疫细胞化学	289
一	神经内分泌系统及其分布	290
二	神经内分泌系统总体调节肽和脑神经肽定位的检查	307
第十八章	去甲肾上腺素, 肾上腺素和5羟色胺的免疫细胞化学定位	323
一	NA, A, 和 5-HT合成细胞的查证	325
二	应用抗NA, A和5-HT等抗体的免疫细胞化学	326
第十九章	神经元的Golgi样免疫酶染色	343
一	实验程序	344
二	一般问题	352
第二十章	皮肤病学中的免疫细胞化学	355
一	皮肤活检材料取样和处理	355
二	发疱皮肤病	357
三	寻常天疱疮	360
四	妊娠疱疹	363
五	疱疹样皮炎	364
六	T-细胞在皮肤组织切片中的查证	366
第二十一章	自体免疫和间接免疫荧光技术	376
一	抗胰岛细胞的抗体	378
二	抗肾上腺皮质的抗体	381

三	抗生殖腺和胎盘中类固醇细胞的抗体	382
四	抗甲状腺抗体	382
五	重症肌无力时的免疫荧光技术	385
六	对抗肠粘膜细胞的自身抗体 ..	386
七	抗垂体细胞的自身抗体	389
八	抗后叶加压素生产细胞的抗体	390
九	全身性红斑狼疮的自身抗体	391
十	类风湿关节炎时的抗体	395
第二十二章 中间丝在组织病理学诊断中的应用		397
一	神经丝	398
二	胶质原纤维酸性蛋白	398
三	角蛋白	399
四	波形纤维蛋白和结蛋白	401

第一章 免疫组织化学的基本概念和发展简史

一、免疫组织化学的基本概念

免疫组织化学 (Immunohistochemistry) 应包括免疫细胞化学 (Immunocytochemistry), 因为组织学本来就包括细胞学。但是为了突出细胞在光镜下尤其电镜下的细微结构, 结合作者研究的课题, 近时期不少人常采用免疫细胞化学这一名称。

免疫组织化学是组织化学的一个分枝, 也可以说是组织化学的一个组成部分, 这个部分以引用免疫化学的原理为其特点, 同时还要具备组织化学的一般特征。

所谓组织化学, 是在保持组织、细胞的细微结构基本上不改变生活状态时结构的条件下来研究结构中的某些化学成分的分布和含量的, 以便进一步说明它们在组织、细胞中的机能意义。这些化学成分大多都是组织、细胞本来就有的, 它们参与组织、细胞的结构, 一部分则是从外部自然地或人为地引入的。人们应用组化的方法观察它们存在的位置和产生的影响。组织化学一定要求在显微镜下能够看到所要检查的那种化学物质。除本身就有颜色或电子散射的物质外, 在大多数情况下, 所看到的不是那种化学物质的本身, 而是由于该物质的存在经过化学反应生产出来的能看得见的产物。

这个产物所在的位置和数量能够代表该物质的位置和数量。人们要问，经过什么样的化学反应过程才能得出这样的产物？一般来说，是用生物化学的或有机、无机化学的原理创立出来的组织化学方法，处理要检查的组织块和组织切片或涂片，才能得出这样的产物。为了在组织切片、涂片中显示不同的化学物质，需要有不同的组织化学处理过程。每种化学物质都应该有它自己所特有的组化方法，也就是说，对每种化学物质来说，组化方法都应该有它的特异性。所谓组化方法的特异性 (specificity)，就是应用这种方法处理之后得出的产物只能代表某种物质而不代表其它。理论上这样要求方法的特异性，事实上并不那么简单。在组织化学发展当中，固然已建立了一些有特异性的方法，但是也有不少方法缺乏这样的特异性。这种特异性不严的方法，既能用它检查出我们所要检查的化学物质，也能使我们不要查的化学物质经过这样的化学反应过程之后得出阳性结果。因此，组织化学要求人们继续不断地创制出具有特异性的组化方法来。

一个理想的组化方法不是单纯地有了特异性就够了，还需要具备其它的条件。那就是，第一，要有很高的灵敏度 (sensitivity)，即使在组织、细胞中有很少量要检查的物质，也能灵敏地把它查出来；第二，要在化学处理过程中不至于造成要查的化学物质变动它的位置或丧失它的数量；第三，要在化学处理之后使要检查的化学物质形成的反应产物易于识别，与其周围形成鲜明的对比 (contrast)；第四，要不损伤其周围的形像；第五，要求反应产物颗粒微细，定位精确，在光镜下、电镜下成像清晰。至于其它条件，如操作步骤要简便，需要的时间要少，也是要给予密切注意的。

根据以上条件的要求，新的组化方法不断在出现，这不仅提高了组化方法的精确度，而且还扩大了组化的范围，增加了所能显示的物质类别。其中最突出的，要算免疫组织化学的技术了。

免疫组织化学技术之所以成立，是立足于生物化学特别是免疫化学的理论，立足于组织、细胞内的某些化学物质或结构成分能够作为抗原（antigen），以此抗原诱导出它的特异性抗体（antibody），在此抗体上标记上荧光色质，或者标记上酶，或者标记上在电镜中产生电子散射的化合物，用这样带了标记的抗体去孵育组织切片或涂片，结果，抗体与切片或涂片中的相应抗原结合，借标记物存在的位置和数量，得以认识抗原在组织、细胞中的定位和分布。如果标记物是萤光色质，在萤光显微镜下能够看到；是电子散射化合物，在电镜下；是酶，用酶的催化底物孵育，得出有色的反应产物，在光镜下能够看到或计量。组织、细胞中的某种化学物质不一定用作为抗原，也许它本来就是抗体，这时就标记它的抗原，用抗原去找组织、细胞中的抗体结合，同样能得到抗体的定位。不过，这后一种情况是比较少有的。

当免疫组化方法能够很好地满足上述条件的时候，它有很高的特异性而不影响抗体或抗原的免疫活性；它有很强的灵敏度；它不带来受检物质的移位和流失；它在组织、细胞中形成的免疫结合产物借标记而明显可见，与周围构造之间对比清晰；它不损伤组织、细胞的原来结构；它进一步发展到电镜水平。由于免疫化学有超越一般生物化学的许多特点，借此特点使得一般组织化学中原来无法显示和观察研究的化学物质、组织结构成分、微生物个体等能够被显示出来

和观察研究，大大扩充了组织化学的范围，而且现在已经广泛应用到基础医学各个学科以及临床检验中去了，受到了全世界生物学界的注视。

二、免疫组织化学的发展简史

1933年 Heidelberg 等把R盐偶氮联苯胺 (R-salt-azobenzidine) 结合到卵白蛋白上，使之成为有颜色的抗原。一年后 Marrak 把R盐的有色物质标记到抗伤寒，抗霍乱的抗体上，然后将抗体与相应的微生物结合，从而使抗原—抗体复合成为粉红色的。Coons 曾经重复过 Marrak 的实验。用的是家兔抗肺炎球菌血清，发现肺炎球菌虽被凝集，但其粉红色却达不到满意的程度。于是他改用 Creech 和 Jones (1940, 1941)^{1,2} 提出的荧光标记法，用几种芳香族碳氢化合物的异氰酸盐 (isocyanates) 结合到不同的蛋白质上去，得出能发强荧光的产物。他们能发现家兔抗Ⅲ型肺炎球菌的血清能结合上发荧光的β蒽基脲基衍生物(β-anthryl carbamid. derivative)，这一衍生物标记的血清只能凝集Ⅲ型肺炎球菌，被凝集的球菌发出肉眼和镜下可见的蓝色荧光。以后不久发现，结合到蒽基脲基衍生物上的血清蛋白发出的蓝色荧光很难同组织自发的蓝色荧光相区别，于是制备和改用4—异氰酸荧光素结合到抗体上。这一结合不但能保存下抗体的免疫活性，而且在高倍稀释下也能发生强烈的黄绿色荧光，以

①Creech HJ and Jones RN, J. Amer chem Soc., 62, 1970, 1940

②Creech HJ and Jones RN, Ibid 63, 1661, 1941

之与组织荧光相区别。把荧光抗体溶液加到有活动性相应抗原存在的组织切片上，由于抗原、抗体之间的特异亲和力，荧光抗体能从溶液中分离出来，结合到抗原上去，成为能发荧光的抗原—抗体复合物。在荧光镜下看到了发荧光的复合物存在之处，也就是找到了抗原的定位。这样，Albert H. Coons¹等就创立了荧光抗体法，或称做荧光抗体技术 (fluorescent antibody technique)，这一技术开辟了研究蛋白组织化学的崭新园地，使组织化学家借助于免疫反应的极高特异性能够给有抗原性的蛋白质在组织、细胞中定位。到现在，荧光抗体技术已有四十多年的历史了。40年代和50年代荧光抗体技术有了新的改进，使免疫组织化学所要求的上述几个条件逐渐得到一定程度的满足。一些学者如：Cherry, Goldman和Carski(1960)², White (1960)³, Borek (1961)⁴, Beutner (1961)⁵, 对于它的改善和进步

①Coon, A. H., Creech H. J. and Jones R. N., Proc Soc Exp Biol Med 47:200, 1941

②Cherry, W. H., Goldman, M. and Carski, T. R., Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable disease. Washington; U. S. Government Printing Office 1960

③White, R. G. in "Tools of biological Research" Ed. Aktins, H. J. B., Blackwell, Oxford, p. 89, 1960

④Borek, F., Bull, WHO, 24, 249, 1961

⑤Beutner, E. H., Bact Rew 25, 49, 1961

及时地进行了概括和论述。

到了60年代在技术改进上有了更加新的发展，那就是不用荧光色质而用酶标记到抗体上的免疫酶技术 (immuno-enzymatic technique)。在这方面,Paul K. Nakane及其同事 (1966)¹作为这个方法的创始人是有贡献的。酶本身不能看见，必须用酶的底物进行一般组织化学的孵育，才能在酶的所在处，亦即抗原处，形成镜下可见的有色产物。此法一经创始，迅速引起其他研究者们继续发展。如Avrameas等 (1968, 1969)²，Sternberger等 (1970)⁴。Ludwig A. Sternberger等创立了未标记抗体酶桥法和创制成过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物，大大加强了免疫酶法的灵敏度，因此是有功绩的。在他的影响下，免疫组织化学从一个饶有兴趣但不能完全信赖的状态进而成长为一个不可缺少的工具，帮助人们进行诊断和了解更多关于细胞内、外的基本情况。

70年代许多关于免疫组织化学、免疫细胞化学的新方

- ① Nakane pk and Pierce GB. J. Histochem. Cytochem, 14: 929—931, 1966
- ② Avrameas, S. Bull. Soc. Chim. Biol. 50: 1169., 1968
- ③ Avrameas, S. Immunochemistry 6, 43, 1969
- ④ Sternberger, L. A, Hardy, P. H. Jr, Caculis, J. J, Meyer, H. G: J. Histochem. Cytochem. 18: 315, 1970

法、新成就相继出现，例如，Beutner (1971)¹, Sternberger(1974)², Nakane (1975)³, Nairn (1976)⁴, Kuhlmann (1977) 等人⁵都有著名的著作。

除萤光色质标记、酶标记之外，还有其他金属类物质也可以用来标记抗体（或抗原）以显示免疫反应的抗原（或抗体）。1959年 Singer⁶ 提出用铁蛋白(ferritin)标记抗体而不损失抗体的免疫特异性。铁蛋白需要通过交联剂才能结合到抗体上。六十年代研究了不同的交联剂以选择其中最适用的交联剂，如 2, 4-二异氰酸甲基次酚 (TC) 和二次重氮化联苯胺(BDB)等，因为铁蛋白分子的芯子含有铁，能够进行电子散射，故能在电镜下看到它显像。免疫铁蛋白法自从创立以来，至今仍在沿用，能被用来显示细胞表面抗原。

- ① Beutner, E.H. Ann. N. Y. Acad. Sci, Vol. 177
1971
- ② Sternberger, L. A. Immunocytochemistry [Prentice-Hall Inc, New Jersey 1974
- ③ Nakane, P.K. Localisation of hormones with the peroxidase labeled antibody method, in "Methods in Enzymology" Eds. O'Malley, B. W. and Hardman, J.G. Vol. 137, 133 1975
- ④ Nairn, R. C. "Fluorescent Protein Tracing" 4th Ed Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1976
- ⑤ Kuhlmann WC. prog, Histochem, Cytochem, 10, 1, 1977
- ⑥ Singer, S.J. Nature Lond, 183, 1523, 1959

与铁蛋白同类型的尚有胶体金。Faulk 和 Taylor (1971)¹ 是免疫胶体法 (immunocolloid methods) 的创始人。胶体金不需用特殊的交联剂就可以迅速、稳定地吸附蛋白, 而对蛋白的生物活性不引起显著变化。它不但能吸附凝集素 (lectin)、酶和吸附用于摄取与运输研究的示踪分子, 而且在免疫细胞化学的技术进展中还用于吸附到抗体、蛋白和抗原上。胶体金不像铁蛋白那样容易使树脂包埋的电镜切片污染。金粒细小, 便于在电镜下进行定量研究。由于制备方法不同, 可以得到不同大小的金粒, 标记不同抗原的抗体, 由此发展出免疫金染色法的多标记技术。基于上述优点, 近年来免疫胶体金技术越来越受到重视。

总括起来说, 现时代的免疫组织化学, 免疫细胞化学, 正在依靠技术的不断发展, 同时依靠免疫学、免疫化学和组织化学的不断进步, 有着日新月异的变化, 受到人们广泛的重视, 越来越多的渗透到基础医学和临床医学各个学科中去。例如 Casar Milstein (1979) 等² 制成了单克隆抗体 (monoclonal antibodies) 后就促进了免疫细胞化学技术的最新发展。特别在肾脏病、淋巴瘤、皮肤病等的诊断中, 在微生物的查证中, 免疫细胞化学技术均起到了卓越的作用。我国已有不少单位和个人应用免疫组化原理和技术取得显著成绩。可以肯定地说, 这门新兴的边缘学科是很有发展前途的。

①Faulk, W. P., and Taylor, G. M. *Immunochemistry* 8: 1081, 1971

②Milstein, C. Galfre, G. Secher, D. S. and Springer, T. *Cell Biol. Internatl. Rep.* 3: 1, 1979

第二章 不同类型免疫染色概述

为了要对免疫组化的原理和技术方法先有一个全面概括的了解，这里专辟本章作一介绍。

免疫组织化学的染色方法很多。最原始地概括为直接法和间接法；直接法是用标记了的抗体(或抗原)去结合组织里的抗原(或抗体)，正如第一章中介绍免疫组织化学的基本概念时所说的那样。间接法是在直接法不能令人满意的情况下，在用过与组织里的抗原(或抗体)相对应的抗体(或抗原)溶液孵育以后，才用带有标记的物质进行染色，染得的结果，不是因为间接的关系减弱了显示抗原定位的强度或灵敏度，相反而是增强。直接法单纯，除此之外，其它一切都属间接法。

若按标记物的类别来分，有免疫荧光技术，免疫酶技术和免疫金属技术，各以荧光色质、酶，金属或金属蛋白为标记。每种类型的免疫染色又各有直接法和间接法，直接法总是占极少数，间接法花样多。当我们对每个常说的染色方法有一个概括的了解之后，就可以分章分节地阐述从这些方法引出的共同问题和特殊问题。

一、免疫荧光技术

在免疫荧光技术 (immunofluorescence technique) 中，标记抗体(抗原)的是荧光色质 (fluorochromes)，常