

高等学校试用教材

免疫细胞化学

——及其在生物学和医学中的应用

郑一守 杨秀珍 编著

南京大学出版社

R392.11

4

前 言

免疫细胞化学是近年来发展迅速的组织化学分支学科。它能使免疫学的特异性和敏感性与显微形态学的精密性结合起来。应用免疫细胞化学技术,不仅可以在显微水平或亚显微水平对抗原大分子作定位和定性识别,而且可以定量或半定量地测定抗体。由于它的独特优点,已在微生物学、免疫学、细胞生物学、神经生物学、病理学和肿瘤学等理论研究和临床方面得到广泛应用。

免疫细胞化学现已作为综合性大学生物系和医学院校有关专业本科生和研究生的一门必修课或选修课程。我校自1982年起开设“免疫细胞化学”课程,为此,曾编写了“免疫组织化学讲义”,经过多年的教学实践,深感“讲义”远不能适应本门学科发展的内容,因此,决定对“讲义”加以增补和修改,并结合多年的科学研究经验,正式编写“免疫细胞化学”一书,该书已列入1986—1990年国家教委理科教材规划。

在编写过程中,得到了姚鑫教授和朱洪文教授的热情鼓励和支持。中国科学院细胞生物学研究所施渭康副教授曾对本书前十章作了认真和细致的校阅,并提出不少宝贵意见。细胞所姚曾序教授对第十一章、上海第二医科大学郭寿延教授对第十四章、王宝美教授对第十八章作了校阅。南京大学医学院张祖暄教授校阅了第十六章和第十七章。作者的导师、中国科学院细胞生物学研究所姚鑫教授在百忙中、还对本书作了全面的审阅,为此,对上述教授的鼓励和帮助深表谢意。

还应提出的,本书编写中曾得到了南京大学出版社荣翠琴副编审和其它同志的帮助,在此一并表示谢意。

由于作者水平有限,难免挂一漏万,敬希读者批评与指正。

作 者 1990年5月

于南京大学医学院

目 录

第一章 绪论	1
一、免疫细胞化学发展简史.....	1
二、免疫细胞化学的基本原理.....	4
三、免疫细胞化学的染色方法.....	4
(一)直接法 (二)间接法 (三)不标记抗体法(桥联法)	
(四)过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)法 (五)亲和素-生物素复合物(ABC)法 (六)标记抗原法 (七)半抗原标记法 (八)葡萄球菌 A 蛋白(SPA)法	
四、免疫细胞化学方法学的特征.....	6
(一)特异性 (二)敏感性 (三)应用广泛性 (四)快速性 (五)定位的精确性	
五、免疫细胞化学反应的必要条件.....	8
(一)抗原 (二)抗体 (三)标记物 (四)对照	
六、存在的问题.....	9
(一)自发性或内源性非特异性染色反应 (二)固定和制片等操作过程引起抗原反应性的下降和细胞形态学的损害 (三)非特异性反应对特异性免疫染色的干扰	
参考文献.....	11
第二章 免疫试剂的制备	13
一、抗血清的制备.....	13
(一)抗原 (二)免疫动物 (三)佐剂 (四)免疫途径与剂量 (五)免疫动物的方法	
二、抗体和免疫球蛋白.....	20
(一)抗体的基本结构 (二)免疫球蛋白的分类	
三、抗体的分离和纯化.....	25
(一)盐析法 (二)层析和过滤法 (三)各类免疫球蛋白	

的分离和纯化 (四)特异性抗体球蛋白的分离方法	39
四、抗体的鉴定	39
(一)双向免疫扩散试验 (二)免疫电泳试验	
参考文献	43
第三章 单克隆抗体的制备	44
一、原理	45
二、方法	48
(一)免疫动物 (二)骨髓瘤细胞的选择 (三)脾细胞和骨髓瘤细胞的融合 (四)克隆化培养 (五)杂交瘤纯系细胞扩大培养和单克隆抗体的制备 (六)杂交瘤细胞的保存和复苏 (七)单克隆抗体的分离和纯化 (八)抗体活力的检测	
参考文献	55
第四章 免疫荧光技术	56
一、荧光的性质和特征	56
二、自发荧光	59
三、荧光色素	60
(一)荧光色素的性质 (二)适用于免疫学染色的荧光色素	
四、荧光物质的制备、纯度测定和贮存	65
五、荧光色素和蛋白质的结合	65
六、标记方法	67
(一)异硫氰酸荧光素(FITC)的标记 (二)四乙基罗达明(RB200)的标记 (三)二甲基氨基-萘-5-磺酸(DANS)的标记 (四)四甲基异硫氰酸罗达明(TMRITC)的标记	
七、标记抗体的纯化	70
(一)未结合荧光色素的去除 (二)过标记和未标记免疫球蛋白的去除 (三)组织制剂的吸收处理	
八、特异性纯化标记抗体	74
九、标记抗体的鉴定	75
(一)标记抗体的免疫化学性质鉴定 (二)标记抗体的免疫学性质鉴定 (三)标记抗体的特异性染色效价测定	

十、标记抗体的贮存	78
十一、标本的制备	79
(一) 涂片和印片的制备	(二) 冰冻切片
(三) 冰冻干燥切片	(四) 石蜡切片
(五) 细胞培养物的制片	
十二、标本的固定	81
(一) 固定剂	(二) 固定的条件
(三) 各种抗原的固定例示	
十三、固定标本的贮存	86
十四、免疫荧光染色	87
(一) 常用的染色方法	(二) 特殊的染色方法
十五、特异性试验	94
十六、标本的封固和保存	96
十七、荧光显微镜	96
(一) 光源	(二) 滤光系统
(三) 荧光显微镜	
十八、结果的纪录	102
参考文献	102
第五章 免疫铁蛋白法	105
一、标记试剂	105
(一) 铁蛋白	(二) 结合剂
(三) 免疫球蛋白	
二、铁蛋白与免疫球蛋白的结合	108
(一) XC 或 TC 的二步结合法	(二) 戊二醛结合法
三、结合物的纯化	111
(一) 硫酸铵盐析法	(二) 超速离心法
(三) 密度梯度离心法	
四、结合物的鉴定	113
(一) 双扩散试验	(二) 环状沉淀反应
五、标本的制备	114
六、固定	115
七、染色方法	117
(一) 直接法	(二) 间接法
(三) 特异性试验	
八、双重标记抗体(铁蛋白和荧光色素)	119

九、杂交抗体	120
(一)原理 (二)抗铁蛋白抗血清的制备及其抗体球蛋白的分离 (三)特异性抗血清的制备 (四)抗体片段[F(ab') ₂]的制备和杂交	
参考文献	123
第六章 酶免疫细胞化学技术	125
一、酶标记抗体法	128
(一)标记试剂 (二)标记方法 (三)辣根过氧化物酶(HRP)结合物的纯化 (四)结合物的定性和定量鉴定 (五)结合物中HRP与免疫球蛋白的定量和它们间的克分子比值的计算 (六)酶标记抗体的贮存 (七)底物 (八)不同方法制备的结合物的比较	
二、不标记抗体过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)法	152
(一)最初的不标记抗体法 (二)PAP法	
三、组织标本的制备	162
(一)固定 (二)组织脱水和包埋	
四、染色	168
(一)光镜观察用的酶标记抗体直接染色法 (二)光镜观察用的酶标记抗体间接染色法 (三)光镜观察用的PAP染色法 (四)塑料半薄切片染色法 (五)电镜观察用的免疫酶染色法	
参考文献	181
第七章 亲和素-生物素的免疫细胞化学技术	184
一、原理	185
二、材料	186
(一)生物素 (二)亲和素 (三)标记物 (四)抗血清	
三、标记方法	188
(一)生物素化蛋白质 (二)标记亲和素	
四、亲和素-生物素系统(ABS)免疫细胞化学检测类型	190
(一)生物素化抗体-标记亲和素(或标记链亲和素)间接法 (二)亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法	

五、特异性试验	194
(一)阴性对照 (二)阳性对照 (三)内源性酶和内源性生 物素的去除	
参考文献	195
第八章 免疫金技术	197
一、胶体金的性质	198
二、胶体金的制备	199
(一)白磷还原法 (二)白磷还原改良法 (三)柠檬酸钠 还原法 (四)柠檬酸钠-鞣酸还原法	
三、胶体金的鉴定	202
四、免疫金探针的制备	203
(一)待标记蛋白质的准备 (二)确定标记时所需要的最适 量蛋白质	
五、免疫球蛋白-胶体金结合物的制备	205
(一)免疫球蛋白(IgG)的准备 (二)免疫球蛋白最适量的 确定 (三)胶体金标记免疫球蛋白 (四)胶体金-免疫球 蛋白结合物的纯化	
六、葡萄球菌A蛋白-胶体金结合物的制备	207
七、免疫金探针的鉴定	208
八、组织标本的制备	208
九、胶体金免疫光镜染色	209
(一)间接染色法 (二)免疫金-银(IGSS)法	
十、胶体金免疫电镜染色	213
(一)包埋前免疫染色 (二)包埋后免疫染色 (三)包埋后 双重标记染色	
参考文献	216
第九章 双重标记染色法	217
一、双重免疫荧光法	217
二、双重免疫酶技术	218
(一)单酶法 (二)双酶法	

三、双重免疫荧光法与双重免疫酶法的比较	224
四、双重免疫酶法操作步骤	224
(一)过氧化物酶标记抗体多重染色法	
(二)不同种属动物特异性抗体的双重染色法	
参考文献	226
第十章 亲和细胞化学	228
一、标记凝集素定位的类型	229
(一)直接法 (二)间接法	
二、标记凝集素的制备	232
(一)荧光标记凝集素 (二)酶标记凝集素的制备	
三、标记糖的制备	234
四、酶消化处理解除被封闭的糖反应位点	234
(一)胰蛋白酶消化 (二)神经氨酸酶消化	
五、对照试验	235
(一)阳性对照 (二)阴性对照	
参考文献	236
第十一章 免疫细胞化学在微生物学中的应用	237
一、在细菌学中的应用	237
(一)金黄色葡萄球菌 (二)链球菌 (三)淋病奈瑟氏球菌	
(四)脑膜炎双球菌 (五)肺炎双球菌 (六)志贺氏菌属	
(七)脆弱类杆菌 (八)沙门氏菌 (九)巴斯德氏菌	
(十)布鲁氏杆菌 (十一)流行性感胃杆菌 (十二)百日	
咳博德氏杆菌 (十三)棒状杆菌 (十四)分枝杆菌	
(十五)炭疽杆菌 (十六)梭状芽胞杆菌 (十七)军团菌	
(十八)霍乱弧菌 (十九)梅毒螺旋体 (二十)钩端螺旋体	
(二十一)衣原体	
二、在病毒学中的应用	255
(一)脊髓灰质炎病毒 (二)柯萨奇病毒 (三)口蹄疫病毒	
(四)委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (五)日本脑炎病毒	
(六)登革热病毒 (七)肾综合症出血热病毒 (八)Borna	
脑炎病毒 (九)流感病毒 (十)腮腺炎病毒 (十一)新	

城鸡瘟病毒	(十二)副流感病毒	(十三)麻疹病毒	
(十四)犬瘟热病毒	(十五)牛瘟病毒	(十六)狂犬病病毒	
(十七)猿猴空泡病毒	(十八)腺病毒	(十九)单纯疱疹病毒	
(二十)水痘——带状疱疹病毒	(二十一)呼吸道合胞体病毒	(二十二)巨细胞病毒	(二十三)小鼠白血病毒
(二十四)E.B.病毒	(二十五)多瘤病毒		
参考文献			281
第十二章 自身免疫病的免疫细胞化学研究			286
一、非器官特异性自身抗体			287
(一)抗核抗体	(二)抗细胞质抗体		
二、器官特异性自身抗体			292
(一)抗甲状腺抗体	(二)重症肌无力症病人的自身抗体		
(三)抗胰岛细胞的自身抗体	(四)抗肾上腺皮质的自身抗体		
(五)抗胃壁细胞抗体和抗胃泌素抗体	(六)抗心肌抗体		
(七)肾小球性肾炎	(八)其它器官特异性自身抗体	(一)	
参考文献			299
第十三章 免疫细胞化学在细胞生物学中的应用			301
一、抗体形成细胞发育的研究			301
二、酶的定位			305
(一)氧化还原酶	(二)水解酶	(三)其它酶的研究	
三、细胞内其它成份的研究			311
参考文献			315
第十四章 细胞骨架的免疫细胞化学研究			317
一、微丝			317
二、微管			320
三、中间丝			321
(一)角蛋白	(二)波形纤维蛋白	(三)结蛋白	(四)神经丝蛋白
(五)胶质纤维酸性蛋白			
四、中间丝与肿瘤病理学			326
(一)角蛋白在肿瘤病理诊断中的应用	(二)结蛋白和波形纤维蛋白在肿瘤诊断中的应用	(三)胶质纤维酸性蛋白和	

神经丝蛋白在肿瘤诊断中的应用 (二十)

参考文献	333
------------	-----

第十五章 内分泌学的免疫细胞化学研究336

一、脑垂体336

- (一)促性腺激素细胞 (二)促甲状腺激素细胞 (三)促生长激素细胞 (四)促肾上腺皮质激素细胞 (五)催乳素细胞

二、胚胎发育期间垂体中不同的激素细胞的分化及其在脑中的分布346

三、胰岛346

四、甲状腺349

参考文献349

第十六章 单胺类神经递质的免疫细胞化学研究352

一、儿茶酚胺354

- (一)多巴胺 (二)去甲肾上腺素 (三)肾上腺素

二、组织胺360

三、5-羟色胺361

参考文献370

第十七章 神经肽的免疫细胞化学372

一、催产素和加压素372

二、黄体化激素释放激素377

三、促甲状腺激素释放激素380

四、生长抑素382

五、P 物质385

六、胆囊收缩素389

七、血管活性肠肽392

八、脑啡肽和内啡肽395

九、胰多肽和多肽 YY398

参考文献399

第十八章 肿瘤标记404

一、激素405

(一)人绒毛膜促性腺激素	(二)人胎盘生乳素	(三)垂体激素	(四)甲状腺激素	(五)胰腺内分泌细胞肿瘤的激素	
二、酶					414
(一)碱性磷酸酯酶	(二)前列腺酸性磷酸酯酶	(三)组织胺酶	(四)溶菌酶	(五)神经元特异性烯醇化酶	
(六)其它酶					
三、肿瘤胚胎性蛋白质					418
(一)癌胚抗原	(二)甲胎蛋白				
四、免疫活性细胞及其肿瘤的标记					421
(一)淋巴样组织细胞	(二)淋巴组织肿瘤				
五、肿瘤相关抗原					426
参考文献					430

第一章 绪 论

一、免疫细胞化学发展简史

免疫细胞化学是近年来发展迅速的组织化学分支学科。它是利用各种标记物连结到抗体(或抗原)分子上,以检测和定位组织内相应抗原(或抗体)的技术。

免疫细胞化学使免疫学的特异性和敏感性与形态学的精密性紧密地结合起来,它不仅可以在显微水平、亚显微水平或分子水平三个层次定性识别和定位抗原,而且还可定量地测定体液中的成份和可溶性抗原。在医学和生物学各个领域已得到广泛的应用。

很久以来,生物学家和医学家一直希望能在显微镜下看到各种抗原成分在组织细胞中的分布和定位,研究这些物质的结构与功能间的关系。由于组织化学只能识别细胞中的核酸、酶、脂肪、多糖和蛋白质等化学成分,不能特异性地识别具有免疫活性的抗原大分子,而免疫学的方法只能在试管中或其它体外实验中认识这些抗原,但无法准确定位这些抗原大分子在组织细胞中的位置。因此,在 30 年代,Reiner 和 Heidelberger 等就尝试把偶氮染料连结到抗体分子上,但由于这种标记抗体的灵敏度太低,无法用来识别细胞中的微量抗原物质^[1,2]。几乎同时,又有人用荧光物质作为追踪物连结到抗体分子上,然而这些物质对抗体活力有较大的损害而无法使用。

40 年代初,Albert H. Coons 等首次成功地用荧光色素(异氰酸荧光素)标记抗体,并用它来追踪感染肺炎球菌的小鼠组织中的肺炎球菌多糖体抗原,由此创造了免疫荧光技术^[3,4]。在当时,曾被看作是一项很艰难的工作,经过许多工作者的努力,特别是 1958 年, Riggs 等制备了新的稳定的荧光标记物——异硫氰酸

荧光素^[5]；Goldstein 等成功地创立了用凝胶柱过滤法纯化荧光标记抗体和去除非特异性染色^[6]，使免疫荧光技术逐步发展成为独立完整的方法学而得以推广。

50 年代末，重金属标记物如铁蛋白被引入电镜研究中以显示抗原^[7]，这标志着从细胞水平的研究深入到了超显微结构水平的研究。但由于各种技术原因，这些重金属还不是理想的标记物。

60 年代中期，又发展了酶标记抗体技术，这可以说是一项技术上的革命。由于这种技术进步而使免疫荧光技术发展成为免疫细胞化学。Nakane 及其同事(1966)首创了酶标记抗体的方法^[8]。同年，Graham 和 Karnovsky 报道了用于光镜和电镜的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, 简称 HRP)的组织化学方法^[9]，不久，其他工作者发现了某些能使酶与抗体结合后仍能高度保持生物学活性的结合剂，同时应用了标准的酶组织化学检测方法，进一步促进了酶标技术的发展^[10~11]。这种技术不仅可以应用于光镜对抗原或抗体作细胞水平的研究，并且可用于电镜作超微结构中的抗原定性识别和定位。此外，利用产生可溶性产物的酶解底物又可用作抗原或抗体的定量测定^[12~13]。

酶标记技术特异性强、灵敏度高、重复性好和不需要如荧光显微镜和放射免疫测定所需要的特殊仪器，也不会受到放射性污染而比较安全。后来，又由其他研究者继续发展，特别是 Mason 等，Sternberger 和 Cuculis 创立了不标记抗体法和过氧化物酶-抗过氧化物酶(peroxidase-antiperoxidase 简称 PAP)法，大大提高了方法的灵敏度和特异性^[14~16]，因此，近 20 多年来，该技术发展迅速和得到广泛应用，日益受到人们的注目。

70 年代中期，在免疫细胞化学领域中，又发展了一种应用生物素-亲和素系统的新型检测技术。这种技术具有特异性强、灵敏度高和稳定性好等优点。特别是 80 年代初，Hsu 等建立了亲和素-生物素复合物法(avidin-biotin complex method 简称

ABC)^[17]。这是一种简便和相当灵敏的免疫细胞化学方法,ABC法检测的灵敏度甚至比 PAP 法还高,是目前最敏感的免疫细胞化学方法之一。由于 PAP 法和 ABC 法具有高度敏感性,可以用于常规制备的石蜡切片,作为一般诊断手段。

1971 年, Faulk 与 Taylor 报道了用胶体金标记抗体检测细胞表面抗原。胶体金与免疫球蛋白或葡萄球菌 A 蛋白等生物大分子连结成的结合物不仅能在光镜下观察,而且可在电镜下识别抗原,检测分辨率甚高。胶体金标记技术克服了酶标抗体或 PAP 法的反应产物弥散、超显微定位欠精确和铁蛋白标记抗体法有较明显的非特异性吸附等缺点。胶体金标记技术的建立,开拓了免疫细胞化学一个新的广阔前景^[18]。

近年,一些工作者将标记葡萄球菌 A 蛋白和凝集素等生物大分子应用于免疫细胞化学领域亦获得成功。免疫细胞化学不仅随着各种新的理想的标记物的发现和标记方法的完善而发展,而且,由于近年来各种组织标本的处理方法,特别是固定和制片等技术的改进和提高,也大大地推动了免疫细胞化学的进展和应用。

目前,特别是单克隆抗体的应用,免疫细胞化学不仅仅只是能证明其他方法所发现的生物活性物质,而且已能独立地探索和研究一些未知化学结构的新的生物活性物质,并为研究这些物质的生成、分布以及与功能间的相互关系提供依据。例如, Sternberger 等应用免疫细胞化学技术,首先发现外周神经系统中髓磷脂相关的糖蛋白,后来,用生化分析方法证实了上述结果。

免疫细胞化学已在免疫学和形态学间开创了一个新的研究领域,不论在理论研究或是应用研究方面都取得了丰硕成果。从 1967 年以来,曾多次召开了有关国际会议,出版了专著和专集^[19~29],促进了这门技术科学的发展。随着物理学、化学、免疫学和生物化学以及组织化学技术的进展,免疫细胞化学将会更加完备和发展成为一门成熟的技术学科。

二、免疫细胞化学的基本原理

免疫细胞化学是将免疫学反应原理和化学方法结合起来,使各种标记物连接到抗体分子上,在适当条件下,与组织切片或细胞涂片中相应的抗原结合成抗原-抗体复合物,通过对标记物的检测来准确识别和定位特异性抗原的方法。如果要检测抗体,也可以通过标记相应的抗原,使标记抗原与抗体结合而定位出抗体。但由于抗原成分很复杂,标记条件随着抗原不同而很不一致,实验工作中会遇到很多困难,所以,一般不常用。因为免疫球蛋白既是抗体,又是良好的抗原,所以可通过标记抗免疫球蛋白抗体(第二抗体)的方法来检测未知抗体。

由于所用的标记物不同,检测标记物的方法亦各异。如检测荧光色素时,需要用能产生紫外光或蓝紫光的强光源激发荧光色素,产生肉眼能看到的荧光。铁蛋白和胶体金等重金属则直接利用它们在电镜下的电子不透性,当电子流穿过时能产生电子散射,而在电镜荧光屏上显影。而酶则利用它对特异性底物具有催化能力,把底物转变为有色沉淀,在显微镜下进行观察。如果所用的底物是二氨基联苯胺,经辣根过氧化物酶催化后产生的棕色产物,经钼酸处理,得到能引起电子散射的钼黑,就能在电镜下观察和定位抗原。

三、免疫细胞化学的染色方法

虽然,所用的标记物是多种多样的(目前常用的是荧光素和HRP),但最基本的染色方法是直接法和间接法以及由此衍生的各种染色法。

(一) 直接法 以荧光素或酶(或其它标记物)标记的特异性抗体与标本中的相应的待检抗原反应,直接进行免疫染色,并在显微镜或电镜下观察,以鉴别待检抗原。

直接法操作简便快速,特异性强,但灵敏度较低,其突出缺点是需要标记每一种特异性抗体,这是相当不方便的,而且,此法不

能检测未知抗体。

(二) 间接法 它是用标记的抗免疫球蛋白(Ig)抗体鉴定未知抗原或未知抗体的方法。首先,用特异性抗体与标本中的待检抗原反应,然后,用一种抗特异性抗体同种属动物 IgG 的标记抗体作染色处理,在显微镜或电镜下可以定位出标本中的待检抗原。

间接法的灵敏度明显高于直接法,而且只要有一种抗免疫球蛋白的标记抗体,就可检测由同一种属动物制备的各种特异性抗体和相应的抗原。其缺点是特异性不如直接法,而且染色所需要的时间较直接法长一倍。

(三) 不标记抗体法(桥联法) 当标本中抗原相继经特异性抗体(兔)和抗免疫球蛋白抗体(羊抗兔 Ig)反应后,接着,先后加入抗酶抗体(兔抗HRP)和酶(HRP)进行反应,最后,用酶特异性底物作显色处理。所加的第二抗体(羊抗兔 Ig)是过量的,使这种作为“桥”的抗体中仅一个 Fab 片段与特异性抗体发生反应,剩留一个游离的 Fab 片段与抗酶抗体结合,最后,作为抗原起反应的抗酶抗体再与 HRP 结合,形成抗原-特异性抗体-抗免疫球蛋白抗体-抗酶抗体-酶的复合物,通过酶分解底物,在抗原处产生有色沉淀。

此法的所有步骤都是利用免疫学反应,不需要制备标记抗体,避免了标记过程的许多弊病,提高了灵敏度,但因难以获得纯的抗酶抗体,常会出现非特异性反应的干扰。目前已被 PAP 法所代替。

(四) 过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)法 将不标记抗体法中的第三步与第四步合并为一步,即事先制成纯的可溶性 PAP,当标本经特异性抗体和过量的第二抗体(抗免疫球蛋白抗体)处理后,用 PAP 温育处理,最后用酶特异性底物显色。

因事先可获得纯的可溶性 PAP,此法的特异性和灵敏度大为提高,可用于常规的石蜡切片染色和作回顾性研究及活检诊断,它是目前最常用的免疫细胞化学染色法之一。

(五) 亲和素-生物素复合物(ABC)法 这种方法基于复合物中

的亲合素具有结合四个生物素的能力。当标本经特异性抗体处理后,复经生物素化抗体(第二抗体)和 ABC 处理,ABC 中亲合素的三个结合部位与生物素化酶结合,剩下一个游离的结合部位与第二抗体中的生物素结合,最后,用酶特异性底物作显色处理。

此法是目前最敏感的免疫细胞化学方法,它的灵敏度大于 PAP 法,而且背景清晰,与阳性反应的对比度极佳。

(六) 标记抗原法 标本中待检抗原与特异性抗体反应后,复经标记抗原染色,当标记抗原与抗体相对应而结合,即可检出标本中的特定抗原或特异性抗体。

此法特异性强,但标记需要大量纯抗原,而且,每种抗原的性质不一样,标记条件不一,实际操作是很费时的。

(七) 半抗原标记法 标本中待检抗原首先与半抗原标记的特异性抗体结合,接着用酶(或其他标记物)标记抗半抗原的抗体处理,使酶标记抗体与半抗原反应。

因特异性抗体可结合较多的半抗原,而每一个半抗原又与相应的抗半抗原抗体反应,因而提高了检测方法的灵敏度。

它还可与 PAP 法相结合,即第二层抗体是采用抗半抗原的单克隆抗体,然后再用 PAP 作温育处理。

(八) 葡萄球菌 A 蛋白(SPA)法 SPA 能与多种哺乳动物免疫球蛋白的 Fc 段结合,SPA 可用各种标记物标记,当标本经特异性抗体温育反应后,即可用标记 SPA 作染色处理。

这是一种能直接或间接地检测不同种属动物组织细胞和血清中的抗体或抗原,不必制备各种相应的标记抗体。标记 SPA 的非特异性低,而且制备简便和标记试剂稳定。

四、免疫细胞化学方法学的特征

(一) 特异性 免疫学的最大特点之一是特定抗原只与相应的抗体起特异性免疫反应,而与其他无关抗体不发生反应。标记抗体是一种保存了对抗原有高度特异性活力的免疫球蛋白。因此,不同