

免疫细胞和组织化学技术

第一节 概述

免疫细胞和组织化学技术又称免疫细胞化学，习惯简称为免疫组化，是指用标记的特异性抗体(或抗原)在组织细胞原位通过抗原抗体反应，对相应抗原(或抗体)以及其他物质进行定性、定位、定量测定的一项新技术。

1 基本原理

免疫组化技术利用抗原与抗体特异性结合的特点免疫组化技术利用抗原与抗体特异性结合的特点或半抗原注入另一种动物体内，使之产生与该抗原相应的特异性抗体；将抗体从动物血清中提出，结合上某种标记物，即成为标记抗体。用标记抗体与组织切片标本孵育(染色)，抗体则与细胞中相应抗原发生特异性结合，结合部位被标记物显示，借助显微镜(包括电子显微镜)可以观察到该物质的分布、含量。组织或细胞内凡是能作为抗原或半抗原的物质都可用免疫组化的方法进行检测，如多肽、蛋白质、受体、多糖、酶、激素、病原体等。

第二节 免疫荧光组织化学技术

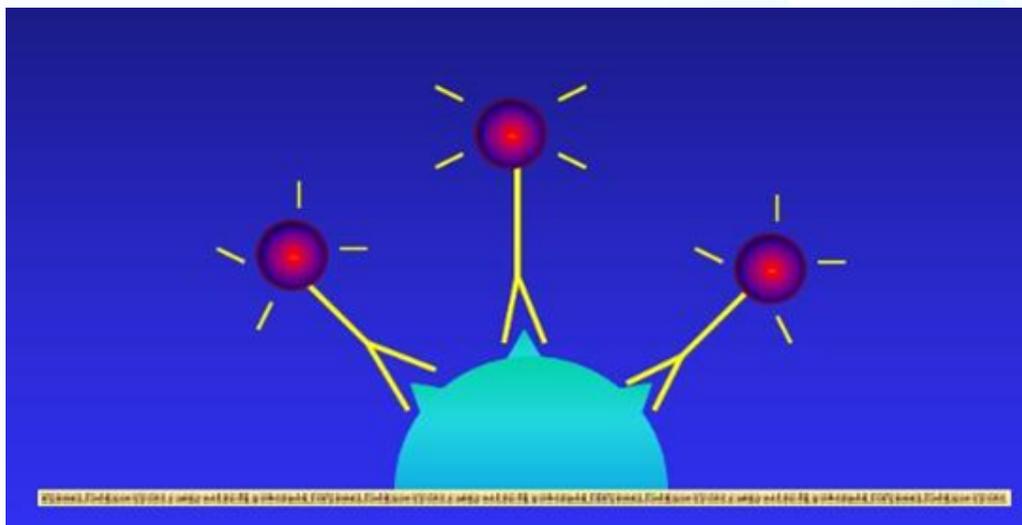
免疫荧光组织化学技术是根据抗原抗体反应的原理，先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物，再用这种荧光标记物与细胞或组织内的相应抗原(或抗体)起反应。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素，利用荧光显微镜观察标本，荧光素受激发光的照射而发出明亮的荧光，从而确定抗原或抗体的性质、位置，并可以利用定量技术测定其含量。用荧光抗体检查相应抗原的方法称荧光抗体法；用已知的荧光抗原标记物检查相应抗体的方法称荧光抗原法。

免疫荧光组化技术染色方法分为：

直接法、间接法、补体法和双重荧光标记法。

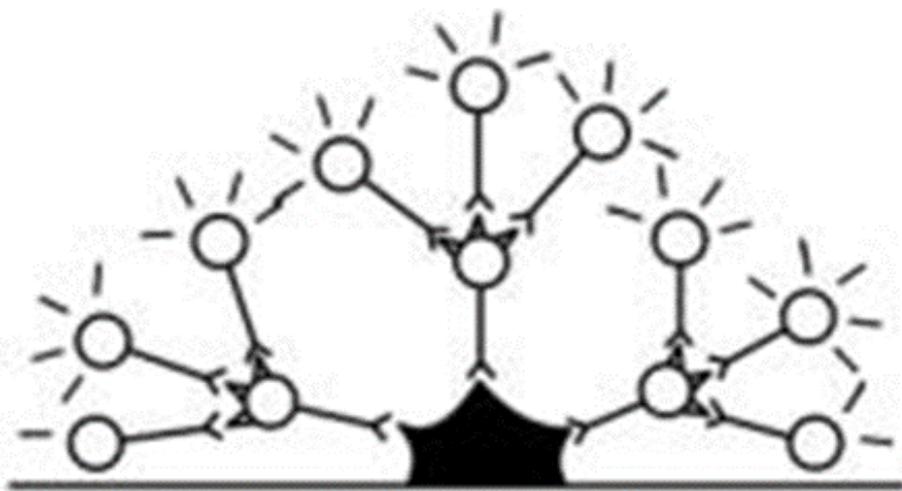
直接法

是免疫荧光组化技术最简单和基本的方法。把荧光抗体(或抗原)滴加于待检标本片上，直接与细胞或组织中相应抗原(或抗体)结合，洗涤后在荧光显微镜下即可见抗原(或抗体)存在部位呈现特异性荧光(图1)。此法常用于细菌、病毒等的快速检查和淋巴细胞表面抗原与受体的鉴定。



间接法

用已知抗体检测未知抗原时，先用特异性抗体(第一抗体，简称“一抗”)与相应抗原结合，再用荧光素标记的抗特异性抗体(第二抗体，简称“二抗”)与特异性抗体结合，在荧光显微镜下可见抗原抗体反应部位呈现明亮的特异性荧光(图2)。



补体法

(一) 直接检查组织内免疫复合物法

将抗补体C3的荧光抗体与组织切片中结合在抗原抗体复合物上的补体反应，形成抗原抗体补体复合物抗补体荧光抗体复合物，在荧光显微镜下呈现阳性荧光的部位就是免疫复合物的存在处，此法常用于肾穿刺组织活检诊断等(图3)。



(二) 间接检查组织内抗原法

将新鲜补体与第一抗体的混合液加在抗原标本切片上，经37℃孵育后，如发生抗原抗体反应，补体就结合在抗原抗体复合物上，再用荧光素标记的抗补体抗体与结合的补体反应，形成抗原—抗体—补体—抗补体荧光抗体的复合物。此法的优点是只需一种荧光抗体即可适用于各种不同种属来源的第一抗体。

第三节 免疫酶组织化学技术

免疫酶组化技术是通过运用抗原抗体特异性反应，借助酶组织细胞化学的手段，检测抗原或抗体在组织细胞内存在部位的一门新技术。其基本原理是预先将抗体与酶联结，制成酶标抗体，再利用酶对底物的特异性催化作用，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，然后借助光镜或电镜进行观察，以对细胞内或细胞表面的抗原或抗体进行定位。本方法敏感性高，染色标本可以长时间保存，已成为免疫组化最常用的方法之一。

直接法

基本原理是将酶标记的特异性抗体直接与待检测组织细胞内的特定抗原结合，再通过与酶的底物作用生成有色的不溶性产物，沉积在抗原抗体反应部位，从而对抗原进行定性、定位以及定量研究。

直接法具有操作简便、快速、特异性强、非特异性背景反应低等优点，常应用于检查肾活检标本中的抗体或补体成分，亦用于系统性红斑狼疮等结缔组织疾病的检查。

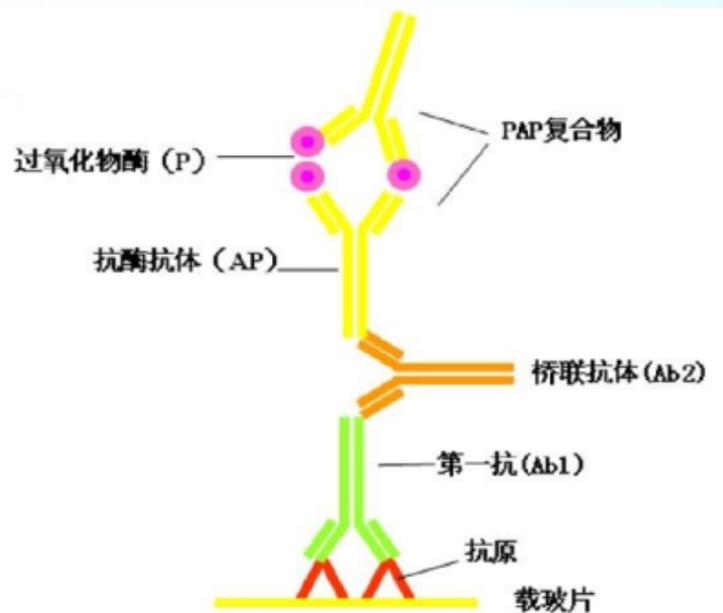
间接法

基本原理是先用特异性抗体(一抗)与组织中的抗原反应,再用酶标记的抗特异性抗体(二抗)与一抗反应,形成抗原—抗体—酶标抗抗体复合物,最后通过酶的底物显色。

因为对于同一种属动物不同种类的第一抗体,只要用一种酶标抗体就能显示不同特异性抗原的存在。因此,间接法与直接法相比更具有实用性,在酶标抗体染色中最为常用。

PAP 法

基本原理是特异性抗体(一抗)与组织中的抗原结合后,将桥抗体(二抗)结合其上,桥抗体再与酶及其抗体制成的复合物(PAP)连接起来,最后经过底物的呈



PAP 酶免疫组织化学 (PAP 法) 原理示意图

双桥 PAP 法

该法是PAP法的改良，操作与单桥法基本相似，所不同的是切片经单桥 PAP 复合物孵育后，漂洗，再孵育桥抗体和PAP 复合物(均可稀释1倍)，即切片经两次桥抗体、两次PAP孵育。

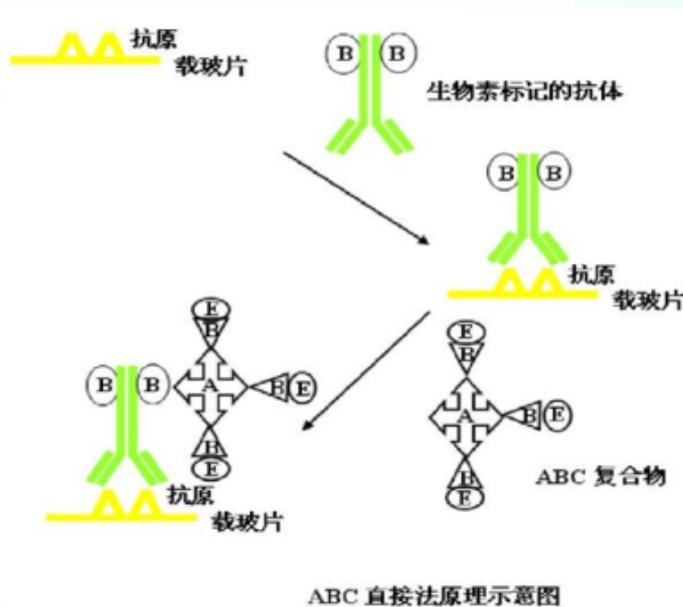
双桥法可结合更多的PAP于抗原分子上，从而使敏感性增强，对于组织细胞中微量抗原的检测具有实用价值。

第四节 亲和免疫组织化学技术

亲和免疫组化技术是利用两种物质之间的高度亲和特性，将酶、荧光素等标记物与亲和物质连接，对抗原或其他靶物质进行定位和定量的方法。

ABC 技术

其原理是先将生物素与HRP结合，形成生物素化的HRP，再与卵白素按一定比例混合，即形成ABC复合物。然后将生物素化的二抗与特异性一抗结合，再与ABC复合物连接，形成抗原—特异性抗体—生物素化二抗—ABC复合物，最后进行显色反应定位。



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/738000113071007007>