

免疫酶组织化学技术

Immunoenzyme histochemical method

免疫酶组化技术

- 1966年Nakane首建酶标抗体法
- 1970年Stenberger等改进并建立非标记免疫酶法（免疫过氧化物酶法）

免疫学：抗原抗体免疫反应

+

酶组织化学反应：酶与底物+生色原
(有色产物)

免疫酶组化技术

- 概念
 - 以酶作标记物标记抗体（或抗原），通过共价键连结
 - 通过抗原抗体反应形成免疫复合物
 - 利用酶催化底物的反应显色，形成不溶性有色物
 - 借光镜或电镜观察细胞和组织中抗原抗体存在部位

免疫酶组化技术的优点

- | | 免疫荧光 | 免疫酶组织化学 |
|-----------|-------|-----------|
| ■ 特异性 | 强 | 强 |
| ■ 灵敏性 | 较高 | 高，能衬染，定位好 |
| ■ 显微镜 | 荧光显微镜 | 普通显微镜 |
| ■ 标记抗体有效期 | 较短 | 较长 |
| ■ 染色标本保存期 | 很短 | 较长 |
| ■ 电镜研究 | 不能 | 能 |

酶标抗体的制备

- 原理
 - 与荧光素标记抗体不同
 - 需借助桥—偶联剂的作用，将酶连接到抗体—免疫球蛋白分子的氨基或羧基上，即形成酶标抗体
 - 直接法—将酶标记于特异性抗体上
 - 间接法—将酶标记于第二抗体上

酶标抗体的制备

- 偶联剂具备的基本特征
 - 偶联剂连结酶和抗体必须不可逆—共价键连接
 - 偶联剂不影响酶、抗体活性
 - 不因偶联剂的加入，而使酶标抗体与组织成分发生非特异性结合

酶标抗体的制备

- 对标记酶的要求
 - 酶易于纯化，纯度高，可溶性好
 - 酶标记后不影响酶和抗体的活性，标记后酶结合物在中性PH液内要稳定
 - 易于被细胞化学方法检出，能在光镜或电镜观察
 - 酶分子量不宜太大，以利于透入细胞
 - 酶反应产物须稳定，不易弥散，定位良好
 - 被检组织中，不应存在与标记酶相同的内源性酶

酶标抗体的制备

- 常用标记酶
 - 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP)
 - 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP)
 - 酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, ACP)
 - 葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GO)
 - B-D-半乳糖苷酶 (B-D-Galactosidase)
 - 乙酰胆碱脂酶 (Acetylcholine esterase)
 - 苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase)

- 葡萄糖淀粉酶(Glucoamylase)
- 溶菌酶(Lysozyme)
- 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

酶标抗体的制备

■ 制备方法（以HRP标记抗体为例）

- 戊二醛法
- 过碘酸钠氧化法

酶标记抗体的制备

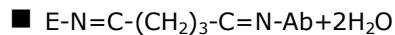
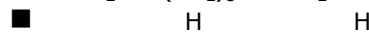
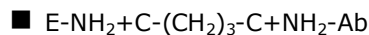
■ 戊二醛法原理

- 戊二醛为双功能交联剂，二个醛基分别与HRP或抗体共价结合，将酶连接在抗体上
- 戊二醛标记抗体法受酶分子上活性氨基数限制，其标记率低，并对酶活性有一定影响

酶标记抗体的制备

■ 戊二醛标记抗体反应式

■ 酶 戊二醛 抗体蛋白



酶标抗体的制备

■ 戊二醛法

■ 一步法

- 酶+抗体+戊二醛—酶标记抗体

■ 二步法

- 酶+戊二醛（过量）—结合物
- 再加抗体（过量），使戊二醛与抗体蛋白的氨基交联—酶标抗体

酶标记抗体的制备

■ 过碘酸钠氧化法原理

- 过碘酸钠（Sodium periodate）不是偶联剂
- 是借助过碘酸钠的氧化作用，把酶联结于抗体上，此法仅适合于含糖较丰富的酶（如HRP）的标记
- HRP分子的糖本身与酶活性无关，利用过碘酸钠氧化这些糖分子内糖基—>醛基（CHO），后者与抗体蛋白的游离氨基（NH₂-P）反应—>酶标抗体

酶标记抗体的制备

酶标记抗体的制备

■ 过碘酸钠氧化法注意

- 标记时注意过碘酸钠的浓度
- 防止过度标记而丧失抗体效价，控制氧化时间

酶标抗体的制备

■ 酶标抗体的纯化

■ 目的

- 去除未标记的抗体蛋白、游离酶、酶二聚体及偶联剂，以免影响酶标抗体的敏感性
- 酶多聚体量多—>与组织非特异性吸附—用凝胶过滤法分离
- 非标记抗体：能竞争与组织特异性抗原结合—用琼脂糖亲和层析法去除

酶标抗体的制备

■ 酶标抗体的鉴定

- 紫外分光光度测定 / 对流电泳 / 酶联吸附试验 / 组化抗原检测法

常用标记酶及其底物的呈色反应

■ 辣根过氧化物酶（HRP）

- 从辣根中提取的植物性过氧化物酶

- 分子量较小 (40KD), 稳定性较好
- 底物: H_2O_2 (受氢体)
- 供氢体: DH_2 为无色还原型染料, 经氧化还原反应后, 呈有色氧化型染料 (受氢体, 底物)
- $DAB-H_2+H_2O_2 \xrightarrow{HRP} DAB+2H_2O$
(供氢体, 生色原) 棕色沉淀

常用标记酶及其底物的呈色反应

- 辣根过氧化物酶 (HRP)
 - 常用供氢体
 - 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-diamino-benzidine, DAB)
 - 反应产物棕色
 - 不溶于水, 切片可脱水透明, 不易褪色
 - 3-氨基-9-乙基卡巴唑 (3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC)
 - 反应产物桔红色
 - 呈色后不能进行脱水处理, 应用水溶性封固剂, 易褪色

常用标记酶及其底物的呈色反应

- 辣根过氧化物酶 (HRP)
 - 常用供氢体
 - 4-氯-1-萘酚 (4-Chloro-1-Naphthol, CN)
 - 灰蓝色反应产物
 - 用水溶性封固剂

辣根过氧化物酶常用供氢体

供氢体	反应产物	颜色	水溶解度
联苯胺	蓝色	蓝色	不溶解
3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)	棕色	棕色	不溶解
3-氨基-9-乙基卡巴唑联苯胺	红色	红色	不溶解
甲萘酚	红色	红色	不溶解
甲萘酚派洛宁	桃红	桃红	不溶解
4-氯-1-萘酚	灰蓝色	灰蓝色	不溶解
四甲基联苯胺	蓝色	蓝色	不溶解

辣根过氧化物酶常用供氢体

供氢体	反应产物	颜色	水溶解度
邻联二茴香胺	深棕	深棕	部分溶解
邻联二茴香胺	桃红	桃红	奶状物
邻联甲苯胺	蓝色	蓝色	小不稳定
邻苯二胺	深桔黄	深桔黄	大
5-氨基水杨酸	紫褐	紫褐	小
5-氨基-2-羟基苯甲酸	棕色	棕色	小

常用标记酶及其底物的呈色反应

- 碱性磷酸酶 (AP)-显色反应
 - 偶氮偶联反应
 - 底物
 - a-萘酚磷酸盐, 经水解得a-萘酚, 与重氮化合物 (如坚牢蓝、坚牢红) 形成不溶性沉淀 (蓝色或红色)
 - AP标记抗体

- 主要用于内源性过氧化物酶含量较高的血细胞，淋巴细胞免疫组化染色

- 显色液中加入左旋咪唑 (levamisole)可抑制内源性ALP活性

常用标记酶及其底物的呈色反应

■ 碱性磷酸酶 (AP)一显色反应

■ 靛兰一四唑反应

● 底物

- 5-溴-4-氯-3-羟吲哚磷酸盐 (BCIP), 经酶水解, 并形成靛兰, 而氮兰四唑 (NBT) 在氧化过程中被还原成不溶性紫色沉淀

常用标记酶及其底物的呈色反应

■ 其他

■ 葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase,GO)

● 底物

- 葡萄糖+NBT (+PMS) → 蓝黑色终反应产物

● 吩嗪甲硫酸酯

(Phemazine methosulfate,PMS) 0.1~0.2mg/ml 加入作用液, 防止弥散

常用标记酶及其底物的呈色反应

常用标记酶及其底物的呈色反应

常用标记酶及其底物的呈色反应

常用免疫酶染色法

■ 免疫酶标法 (酶标抗体法)

■ 用偶联剂将酶与抗体结合, 形成酶标抗体

● 直接法和间接法

■ 非标记免疫酶法

■ 不用偶联剂制备抗体, 而用免疫方法制备抗酶抗体, 而通过中间抗体连接

● 酶桥法

● 酶免疫复合物法 (PAP法, APAAP法)

免疫酶标法

■ 直接法

■ 原理

- 将酶 (HRP、AP、GO) 标记在特异性抗体上形成酶标抗体
- 酶标抗体直接与相应抗原结合形成抗原-抗体-HRP复合物
- 用酶底物显色: 如HRP底物, DAB-H₂O₂过氧化物酶催化H₂O₂分解, 使联苯胺氧化, 形成联苯胺 (棕褐色)

免疫酶标法

■ 直接法

免疫酶标法

■ 直接法

■ 优点

- 操作简单, 省时, 特异性高, 背景着色低

■ 缺点

- 敏感性差, 只能用于检测一种抗原

■ 应用

- 肾活检组织、结缔组织病皮肤活检标本、IgG、IgM、C3等检测

免疫酶标法

■ 间接法：将酶标记在第二抗体上

■ 主要步骤

- 一抗加在切片上（抗原）—抗原抗体复合物
- 加酶标记的二抗—与一抗结合
- 加底物—由酶作用进行显色反应

免疫酶标法

■ 间接法

免疫酶标法

■ 间接法

■ 优点

- 用一种酶标抗体可与多种一抗配合，应用广
- 灵敏性强

■ 缺点

- 特异性差，步骤多，非特异性着色可增加

■ 应用

- 自身抗体、病毒、细菌、寄生虫、癌胚抗原、癌基因等检测

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 原理

- 用酶与抗酶抗体进行免疫反应，将两者结合的方法（不通过化学交联）

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 基本流程（四步法）

- 1 抗原+第一抗体
- 2 +第二抗体（桥抗体）
- 3 +抗酶抗体
- 4 +HRP+DAB+H₂O₂—>有色沉淀物

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 注意点

- 第一步
 - 桥抗体必须对特异性抗体（一抗）、抗酶抗体，均具特异性，才能连接两者
 - 抗原特异性抗体、抗酶抗体由同一种属动物产生
- 第二步
 - 桥抗体应过量，当与特异性一抗结合后，仍有剩余的抗原结合位点，使结合抗酶抗体，最后使酶通过免疫学原理与抗酶抗体结合

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 特点

- 用抗酶抗体
- 采用免疫反应原理（避免化学交联对酶抗体活性的影响）

- 一抗与抗酶抗体为同一种动物
- 二抗作为桥抗体连接二种IgG（同种动物）

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 附 双桥法（起免疫放大作用）

- 第一次酶桥法接酶抗体后
- 再加桥抗体+抗酶抗体
- 最后加上酶分子，使结合于两次加入的抗酶抗体上，形成抗原抗体复合物的酶分子增加，酶的呈色反应强，提高了敏感性

非标记免疫酶法

■ 酶桥法（抗酶抗体法）

■ 优点

- 对酶活性及抗体效价影响小
- 非特异性染色比间接法轻
- 提高了灵敏度

■ 缺点

- 手续较多，时间长
- 抗酶抗体血清中含有低亲合力的抗酶抗体分子，与酶结合力较弱，易丢失
- 抗酶抗体全血清中含有非特异性抗体，能与二抗结合，但不能与酶结合

非标记免疫酶法

■ 过氧化物酶抗过氧化物酶免疫复合物法

■ （PAP法-Peroxidase Antiperoxidase complex）

■ 原理

- 将酶桥法的第3，4步合并为1，用PAP复合物代替
- 现将抗酶抗体和酶—>可溶性酶复合物
- 常用事先制备好的PAP进行免疫酶染色，故称PAP法（现有试剂：鼠、兔、羊PAP）

非标记免疫酶法

酶与抗体的比例

- 3个酶分子与2个抗酶抗体结合形成亚单位构成环形体

非标记免疫酶法

■ PAP法

（Peroxidase Antiperoxidase Method）

■ 基本流程（三步法）

- 抗原与特异性抗体结合
- +第二抗体
- PAP复合物—>抗原—特异性抗体—第二抗体—PAP复合物—>加酶底物，显色

非标记免疫酶法

■ PAP法

非标记免疫酶法

■ PAP法

（Peroxidase Antiperoxidase Method）

■ 优点

- 敏感性高
- 背景着色低（PAP为复合物，不存在游离免疫球蛋白）

- 步骤简化（染色）

非标记免疫酶法

■ PAP法

（Peroxidase Antiperoxidase Method）

■ 缺点

- PAP制备复杂，步骤多，时间长

非标记免疫酶法

■ APAAP法（Alkaline Phosphatase Antialkaline Phosphatase Method）

■ 基本流程

- 一抗—组织抗原—>形成复合物
- 二抗起桥联作用
- +抗碱性磷酸酶抗体与碱性磷酸酶复合物（APAAP Complex）
- APAAP复合物中的AP酶催化底物以显示抗原物质

非标记免疫酶法

■ APAAP法

非标记免疫酶法

■ APAAP法（Alkaline Phosphatase Antialkaline Phosphatase Method）

■ 注意点（同PAP法）

- 一抗与第三抗必须来源于同一种属动物
- 二抗必须过量

非标记免疫酶法

■ APAAP法（Alkaline Phosphatase Antialkaline Phosphatase Method）

■ 优点

- ALP免疫组化染色，不受内源性过氧化物酶干扰，处理内源性ALP较易
- 红色易与色素颗粒区别（用坚牢红时）

非标记免疫酶法

■ APAAP法（Alkaline Phosphatase Antialkaline Phosphatase Method）

■ 应用

- 含丰富内源性过氧化物酶的冷冻切片的首选方法（淋巴组织、肿瘤组织）
- 皮肤病理学中应用，可与黑色素相区别

免疫酶组织化学技术

■ 免疫酶组织化学技术概念

■ 与免疫荧光技术比较

■ 标记酶的要求

■ 酶标抗体的制备方法及其原理

■ 常用的标记酶及其底物呈色反应原理

■ 各种免疫酶染色方法的原理及其优缺点或注意点