

亲和免疫组织化学技术

亲和细胞化学---利用二种物质间的高度亲和特性及其可标记性,将酶等标记物连接到亲和物上,以对体内待检物进行检测的方法

亲和物质---指一些具有双价或多价结合能力的物质,不但亲和物质之间有高度亲和力,而且可与各种标记物如荧光素、酶、同位素、胶体金及铁蛋白等结合,从而在细胞或亚细胞水平进行另一亲和物质的定位、定量

亲和免疫组织化学

1. 提高免疫组织化学定位的专一性
2. 加强免疫组织化学染色的灵敏度, 减少非特异性反应

常用的亲和物质

生物素(Biotin)与卵白素(Avidin)

葡萄球菌 A 蛋白(SPA)与免疫球蛋白 IgG

植物凝集素(Lectin)与糖结合物

卵白素-生物素系统

生物素、卵白素的特性及其作用原理

1. 特性

(1) 生物素(Biotin)----水溶性小分子维生素 H, 分子量 244 体内肝、肾含量较高 体内羧化酶和脱羧酶的辅酶

(2) 卵白素(Avidin)----亲和素, 抗生物素

从鸡蛋白中提炼出来的一种碱性糖蛋白, 分子量 68KD 由四个相同的亚基组成

(3) 抗生素蛋白链霉菌素(Streptoavidin)

分子量 60KD, 从链霉菌属抗生素蛋白的汤培养基中提取; 具有四个亚基

2. 作用原理

生物素和亲和素分子具有高度亲和力

生物素通过单一的生化反应结合大分子成分

亲和素可和不同的标记物结合

亲和素也可作为桥, 同时连接不同的生物素化的分子如抗体、酶等

基本方法

标记卵白素-生物素法 (Labeled avidin-biotin, LAB)

以标记的卵白素连接生物素化大分子的反应体系

桥式卵白素-生物素法 (Bridged avidin biotin, BAB 或 BRAB 法)

利用卵白素作为桥梁, 联结生物素偶联物质和生物素化的酶

ABC 法 (Avidin-Biotin-peroxidase complex method)

将卵白素和生物素偶联的过氧化物酶或碱性磷酸酶按一定比例组成卵白素-生物素酶复合物(ABC 复合物).

卵白素作为桥梁, 与生物素标记抗体和生物素酶复合物连接, 能形成一种较大类似晶格的复合体, 大大提高免疫酶染色的灵敏度

商品化的 ABC、SABC、LSAB kit

染色方法

(一)ABC 法

【基本原理】先将生物素与酶结合, 形成生物素化 HRP, 用生物素化 HRP 与卵白素按一定比例混合, 形成 ABC 复合物。这一复合物再与生物素标记抗体结

(二)LAB 法

【基本原理】先用活化生物素偶联抗体, 用酶标记卵白素, 制备成生物素化抗体和酶标卵白

素

(三)BRAB 法（桥联卵白素-生物素法）

【基本原理】用生物素分别标记抗体和酶，利用卵白素作为桥梁，将酶连接到特异性抗体卵白素-生物素系统的评价

- 敏感性高
- 特异性强
- 方法简便
- 具有多功能性
- 应用范围广

(四)S-P 法

【基本原理】抗原-特异性一抗→生物素化二抗→链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶（S-P 复合物）→DAB 显

(五) Epos 法（Enhanced polymer one-step staining, 一步法）

（六）EnVision 法（Enhanced Labelled Polymer System, 二步法）

【基本原理】

抗原→→特异性一抗→HRP-多聚螯合物-抗鼠/兔 IgG

【染色步骤】

1. 石蜡切片脱蜡，水化
2. 3%H₂O₂ 室温 20 min
3. PBS 洗 3 min X3
4. 抗原预处理
5. 滴加适当稀释的一抗，室温 60 min 或 4℃过夜
6. PBS 洗 3 min X3
7. 滴加 EnVision / HRP 试剂，室温 30 min
8. PBS 洗 3 min X3
9. DAB - H₂O₂ 显色

EnVision 法优点:

- 灵敏度高，降低背景
- 二步操作，简化步骤
- 节省时间
- 避免内源性生物素的影响
- 即用型试剂，操作容

葡萄球菌 A 蛋白(SPA)

葡萄球菌 A 蛋白（SPA）是金黄色葡萄球菌细胞壁上含有的一种蛋白质

SPA 的特性

SPA 是金黄色葡萄球菌细胞壁上的一种抗原提取物，是性质十分稳定的单链多肽

SPA 内含 4 个高度相似的 Fc 段结合区，即 A,B,C,D 区，能与多种哺乳动物血清中的 IgG Fc 段结合而产生沉淀，并能与多种标记物相结合,SPA 具有双价结合能力

其他：激活和固定补体，激活 B 淋巴细胞，促使其成熟并分泌产生各类免疫球蛋白

SPA 的应用

（一）SPA 在免疫组织化学中的应用

1. 标记 SPA 定位组织内的 IgG

用荧光素或酶标记的 SPA 可代替荧光素或酶标记的 IgG 抗血清，定位组织内的 IgG 或免疫复合物

2. SPA-HRP 法----即用 HRP 标记 SPA 蛋白间接法来定位抗原

抗原→ 特异性抗体→ SPA 蛋白-HRP 复合物

【优点】

可与多种动物的抗血清反应

高稀释度 SPA，敏感性高，降低背景染色

穿透组织或细胞的能力较强

【染色步骤】

切片脱蜡至水， 3% H₂O₂ 室温 20min

0.1%胰蛋白酶消化 10~30 min， 37℃

PBS 洗 3 min X3

适当稀释的一抗， 37℃ 60 min 或 4℃过夜

PBS 洗 3 min X3

SPA-HRP 1:50 ~ 1:100 37℃ 60 min

PBS 洗 3 min X3

DAB 显色

复染、水洗、脱水、透明、封片

3. SPA-PAP 法---SPA 作为桥抗体用于 PAP 染色

抗原→ 特异性一抗→ SPA→ PAP 复合物

【优点】

SPA 作为二抗， 不要求 PAP 一定与特异性抗体来源于同种动物反应迅速， 大大减少实验时间

【染色步骤】

切片脱蜡至水， 3% H₂O₂ 室温 20min

PBS 洗 3 min X3

特异性一抗(兔抗人)， 37℃ 60 min 或 4℃过夜

PBS 洗 3 min X3

SPA 1:50 ~ 1:100 37℃ 30 min

PBS 洗 3 min X3

鼠源性 PAP 1:100， 37℃ 60 min

PBS 洗 3 min X3

DAB 显色， 流水冲洗、衬染、常规封片

(二)其他应用

应用 SPA 菌体作为载体， 结合特异性抗体， 成为一种吸附原， 作协同凝集实验， 用于细菌、病毒等的定群和分型

吸附病毒

检测 B、T 淋巴细胞亚群

用于提取或纯化 IgG

亲和免疫组化技术要点

常用的亲和物质特性及其作用原理

几种常用的亲和免疫组化染色方法的原理及其优点

内源性生物素消除方法