

免疫荧光组织化学技术

- 一、免疫荧光组织化学技术的发展史概述.....
- 二、免疫荧光组织化学的原理.....
 - (一) 直接方法.....
 - 1. 检查抗原方法.....
 - 2. 检查抗体方法.....
 - (二) 间接方法.....
 - 1. 检查抗体(夹心法)方法.....
 - 2. 检查抗体方法
 - 3. 检查抗原法
 - (三) 补体法.....
 - 1. 直接检查组织内免疫复合物方法.....
 - 2. 间接检查组织内抗原方法.....
 - (四) 双重免疫荧光组织化学标记方法.....
 - (五) 对照试验.....
 - 1. 直接方法
 - 2. 间接方法
 - 3. 补体方法
- 三、荧光抗体的制备.....
 - (一) 荧光素
 - 1. 异硫氰酸荧光素
 - 2. 四甲基异硫氰酸罗达明
 - 3. 得克萨斯红(Texas red).....
 - 4. 其它荧光素..... - (二) 荧光素标记抗体的方法
 - 1. FITC 标记抗体的方法.....
 - 2. 四甲基异硫氰酸罗达明标记抗体方法.....
 - 3. 藻红蛋白标记抗体方法.....
 - 4. 蓝色荧光素标记抗体方法.....

- (三) 荧光抗体的质量控制
- 1. 染色特异性和敏感性的测定方法
- 2. F/P 比值的测定方法
- 3. 荧光抗体的保存
- 四、免疫荧光组织化学染色方法
- (一) 荧光抗体染色方法
- 1. 直接方法
- 2. 间接方法(双层法)
- 3. 间接方法 (夹心法)
- 4. 补体方法
- 5. 膜抗原荧光抗体染色方法
- 6. 双重染色方法
- 7. 荧光抗体再染色方法
- (二) 荧光抗原染色方法
- 五、荧光显微镜检查方法
- (一) 荧光和荧光显微镜
- (二) 荧光显微镜标本制作要求
- 1. 载玻片
- 2. 盖玻片
- 3. 标本
- 4. 封裱剂
- 5. 镜油
- (三) 使用荧光显微镜注意事项
- (四) 荧光图像的记录方法
- 六、非特异性染色的消除方法
- (一) 非特异性染色的主要因素
- (二) 消除非特异性染色的方法
- 1. 葡聚糖凝胶 G-50 柱层析法
- 2. DEAE 纤维素柱层析法
- 3. 荧光抗体稀释法
- 4. 纯化抗原方法
- 5. 纯化抗体方法——免疫吸收方法

6. 伊文氏蓝(Evans blue)衬染色方法.....
- 七、现状与展望.....

免疫荧光组织化学技术

一、免疫荧光组织化学技术的发展史概述

免疫荧光组织化学是现代生物学和医学中广泛应用的技术之一，是由 Coons 和他的同事(1941)建立，免疫荧光技术与形态学技术相结合发展成免疫荧光细胞(或组织)化学。它与葡萄球菌 A 蛋白(SPA)、生物素与卵白素、植物血凝素(ConA 等)相结合拓宽了领域；与激光技术、电子计算机，扫描电视和双光子显微镜等技术结合发展为定量免疫荧光组织化学技术；荧光激活细胞分类器 Fluorescein activated cell sorter (FACS)的应用，激光共聚焦显微镜的问世，使免疫荧光细胞技术发展到了更高的阶段，开创了免疫荧光技术的新领域。细胞显微分光光度计与图像分析仪的结合使免疫荧光组织化学的定量检测更加准确。80 年代到 90 年代相继又有新的荧光素出现如 R-藻红肌，B-藻红肌，C-藻青蛋白，cy2, cy3, cy5, cy7 均在流式细胞仪和激光共聚焦显微镜中广泛应用。

由于免疫荧光组织化学的特异性，快速性和在细胞水平定位的准确性，已在免疫学、微生物学、病理学、肿瘤学以及临床检验等许多方面得到广泛应用，日益发挥重要的作用。

二、免疫荧光组织化学的原理

免疫荧光组织化学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，再用这种荧光抗体(或抗原)作为探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有标记的荧光素，荧光素受激发光的照射，由低能态进入高能态，而高能态的电子是不稳定的，以辐射光量子的形式释放能量后，再回到原来的低能态，这时发出明亮的荧光(黄绿色或桔红色)，利用荧光显微镜可以看见荧光所在的细胞或组织，从而确定抗原或抗体的性质和定位，以及利用定量技术测定含量(图 3-2-1)。

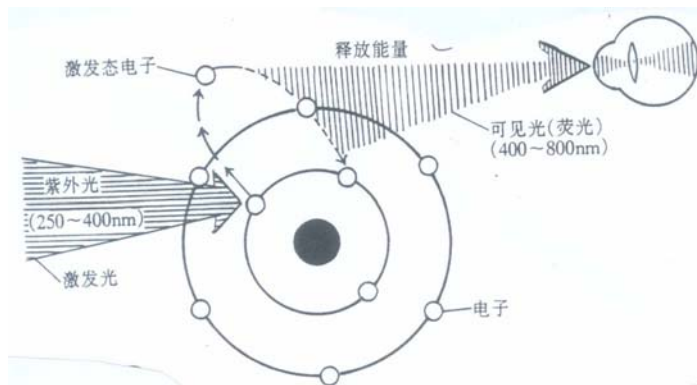


图 3-2-1 紫外光激发荧光物质放射荧光示意图

用荧光抗体示踪或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示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法。免疫荧光组织化学分直接法、间接法和补体法。

(一) 直接方法

1. 检查抗原方法

这是最简便、快速的方法，用已知特异性抗体与荧光素结合，制成特异性荧光抗体，直接用于细胞或组织抗原的检查。此法特异性强，常用于肾穿刺，皮肤活检和病原体检查，其缺点是一种荧光抗体只能检查一种抗原，敏感性较差。(图 3-2-2)

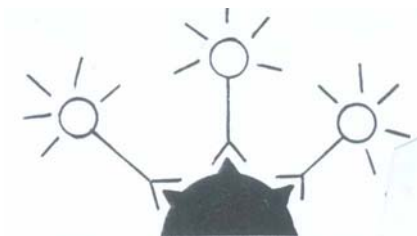


图 3-2-2 直接法

2. 检查抗体方法

将抗原标记上荧光素，用此荧光抗原与细胞或组织内相应抗体反应，而将抗体在原位检测出来。

(二) 间接方法

1. 检查抗体(夹心法)方法

此法是先由特异性抗原与细胞或组织内抗体反应，再用此抗原的特异性荧光抗体与结合在细胞内抗体上的抗原相结合，抗原夹在细胞抗体与荧光抗体之间，故称夹心法。

2. 检查抗体方法

用已知抗原细胞或组织切片，加上待检血清，如果血清含有切片中某种抗原的抗体，抗体结合在抗原上，再用间接荧光抗体(抗种属特异性 IgG 荧光抗体)与结合在抗原上的抗体反应，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。此法是检验血清中自身抗体和多种病原体抗体的重要手段。

3. 检查抗原法

此法是直接法的重要改进，先用特异性抗体与细胞标本反应，随后用缓冲盐水洗去未与抗原结合的抗体，再用间接荧光抗体与结合在抗原上的抗体结合，形成抗原-抗体-荧光抗体的复合物。

同直接法相比荧光亮度可增强 3 或 4 倍。此法除灵敏性高外，它只需要制备一种种属间接荧光抗体，可以适用于同一种属产生的多种第一抗体的标记显示，这是现在最广泛应用的技术。

（三）补体法

1. 直接检查组织内免疫复合物方法

用抗补体C₃荧光抗体直接作用组织切片，与其中结合在抗原抗体复合物上的补体反应，而形成抗原-抗体-补体-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上补体存在处，此法常用于肾穿刺组织活检诊断等。

2. 间接检查组织内抗原方法

常将新鲜补体与第一抗体混合同时加在抗原标本切片上，经 37℃ 孵育后，如发生抗原抗体反应，补体就结合在此复合物上，再用抗补体荧光抗体与结合的补体反应，形成抗原-抗体-补体-荧光抗体的复合物，此法优点是只需一种荧光抗体可适用于各种不同种属来源的第一抗体的检查。

（四）双重免疫荧光组织化学标记方法

在同一组织标本上需要同时检查两种抗原时要进行双重荧光染色，一般均采用直接法，将两种荧光抗体(如抗 A 和抗 B)以适当比例混合，加在标本上孵育后，按直接法洗去未结合的荧光抗体，抗 A 抗体用异硫氰酸荧光素标记，发黄绿色荧光；抗 B 抗体用 TMRITC 或 RB200 标记，发红色荧光，可以明确显示两种抗原的定位。

（五）对照试验

为了保证免疫荧光组织化学染色的准确性，排除某些非特异性染色，必须在初次试验时进行以下对照试验：

1. 直接方法

(1) 标本自发荧光对照：标本只加 PBS 或缓冲甘油封片，荧光显微镜观察组织内如果有荧光，称为自发荧光。

(2) 抑制试验：可分为二步方法和一步方法。

1) 一步抑制方法：先将荧光抗体与过量未标记特异性抗体作等量混合，再加在标本上染色，结果应为阴性。

2) 二步抑制方法：标本先加未标记的特异性抗体，水洗后再加标记荧光抗体，结果应呈阴性或明显减弱的荧光。

(3) 阳性对照：用已知阳性标本做直接法免疫荧光组织化学染色，结果应呈阳性荧光。

结果：如对照 1 和 2 无荧光或弱荧光，3 待检查标本呈强荧光即为特异性阳性荧光。

2. 间接方法

(1) 自发荧光对照：同直接法。

(2) 荧光抗体对照：标本只加间接荧光抗体染色，结果阴性。

(3) 抑制试验：同直接法。

(4) 阳性对照：同直接法。

结果：如对照 (1)、(2)、(3) 均呈阴性，阳性对照和待检标本呈阳性荧光则为特异性荧光。

3. 补体方法

(1) 自发荧光对照

(2) 荧光抗体对照

(3) 抑制试验

(4) 补体对照：取新鲜豚鼠血清 1:10 稀释先作用标本，洗后再用抗补体荧光抗体染色，结果阴性。

(5) 抑制试验：标本加灭活的第一抗体，再加 1:10 稀释的新鲜豚鼠血清孵育后，再加未标记的抗补体血清与抗补体荧光抗体等量混合稀释液，结果应为阴性。

(6) 阳性对照。

(1) ~ (5) 结果阴性，6 和待检标本阳性时，则为特异性荧光。

三、荧光抗体的制备

制备荧光抗体是免疫荧光组织化学的重要技术之一，制备特异性强和高效价的荧光抗体必须选用高质量的荧光素和高效价的抗体。

(一) 荧光素

荧光是指一个分子或原子吸收了给予的能量后即刻引起发光，停止能量供给，发光也瞬时停止。可以产生明亮荧光的染料物质，称荧光色素。目前主要常用于标记抗体的荧光色素如下：

1. 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)

FITC 是一种呈黄色粉末状，性质稳定，在室温下能保存 2 年以上，在低温中可保存多年。易溶于水和酒精。最大吸收光谱为 490~495nm，最大发射光谱为 520~530nm，呈现黄绿色荧光，分子量为 389.4。(图 3-2-3)

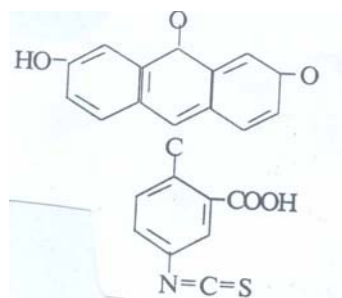


图 3-2-3 FITC 的分子结构式

在碱性条件下，FITC 的异硫氰酸基在水溶液中与免疫球蛋白的自由氨基经碳酰胺化而形成

硫碳氨基键结合,成为标记荧光免疫球蛋白,即荧光抗体。一个 IgG 分子上最多能标记 15~20 个 FITC 分子。

2. 四甲基异硫氰酸罗达明(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TMRITC)

TMRITC 是一种紫红色粉末,较稳定。其最大吸收光谱为 550nm,最大发射光谱 620nm 呈橙红色荧光,与 FITC 的黄绿色荧光对比清晰,与蛋白质结合方式同 FITC。它可用于双标记示踪研究(图 3-2-4)。

3. 得克萨斯红(texas red)

得克萨斯红是一种褐色粉末状,易溶于有机溶剂,性质稳定,在 4℃ 下能保存 2 年以上,最大吸收光谱为 590-595nm,最大发射光谱为 620-630nm,共有四种结构,常用的分子量为 625.15(图 3-2-5)。

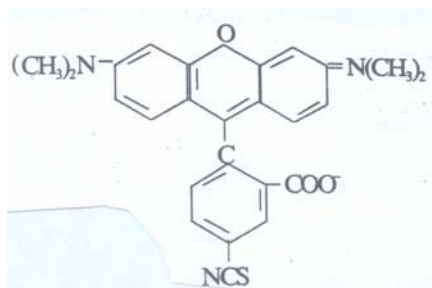


图 3-2-4 TMRITC 的分子结构式

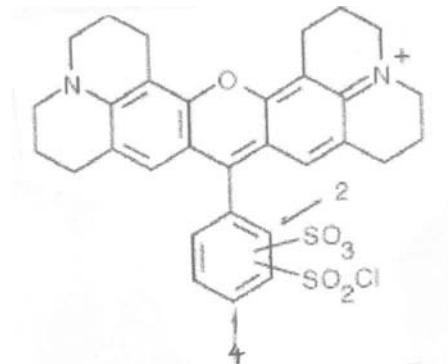


图 3-2-5 Texas red 的分子结构式

4. 其它荧光素

如 4-乙酰胺-4'-异硫氰酸-2-硫酸苜(SITS) 7-氨基甲基香豆素 AMC 呈兰色荧光;藻红素 R(phycoerythrin-R);花青(Cyanine,Cy₂,Cy₃,Cy₅,Cy₇)等。

(二) 荧光素标记抗体的方法

1. FITC 标记抗体的方法

(1) Marshall 氏法

1) 材料: 抗体溶液、0.5mol/L pH9.0 碳酸盐缓冲液、无菌生理盐水、异硫氰酸荧光素、1% 硫柳汞水溶液、三角烧瓶(25-50ml)、冰及冰槽(或 1000ml 烧杯)、电磁搅拌器、灭菌吸管、透析袋、玻棒、棉线及烧杯(500ml)、pH7.2 的 0.01mol/L PBS 葡聚糖凝胶 G-25 层析柱等。

2) 方法及步骤:

①抗体的准备: 取适量已知抗体浓度之溶液,加入三角烧瓶中,再加入生理盐水及碳酸盐缓冲液,使最后抗体浓度为 20mg/ml,碳酸盐缓冲液容量为总量的 1/10,混匀,将三角烧瓶置冰槽中,电磁搅拌(速度适当以不起泡沫为宜)5~10min。

②荧光素的准备: 根据标记的抗体总量,按每毫克蛋白加 0.01mg 荧光素,用分析天平准确称取所需的异硫氰酸荧光素粉末。

③结合: 边搅拌边将称取的荧光素渐渐加入抗体溶液中,避免将荧光素粘于三角烧瓶壁或搅

拌玻棒上(大约在 5~10min 内加完)，加完后，在 4℃ 左右继续搅拌 12~18h，通常将装置安放 4℃ 冰箱或冰库中进行。

④透析：结合完毕后，将标记的抗体溶液离心(2000r/min)10min，除去其中少量的沉淀物，装入透析袋中再置于烧杯中用 0.01M pH7.2 缓冲盐水透析(0~4℃)过夜。

⑤过柱：取透析过夜的标记物，通过葡聚糖凝胶 G-25 或 G-50 柱，分离游离荧光素，收集标记的荧光抗体进行鉴定。(图 3-2-6，图 3-2-7)

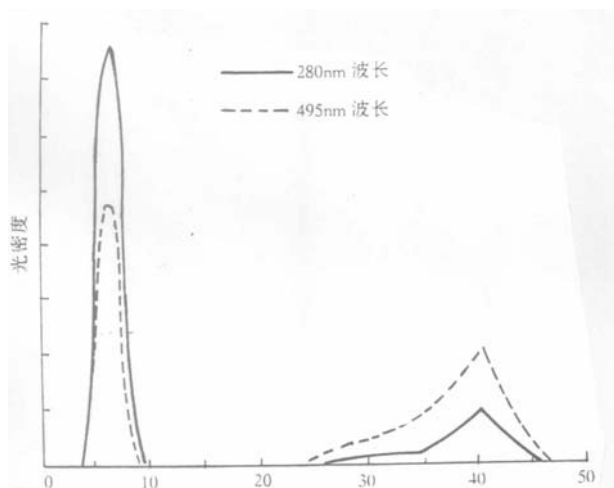


图 3-2-6 Sephadex G-25 对 FITC 标记抗体(羊抗兔)柱层析洗脱模型

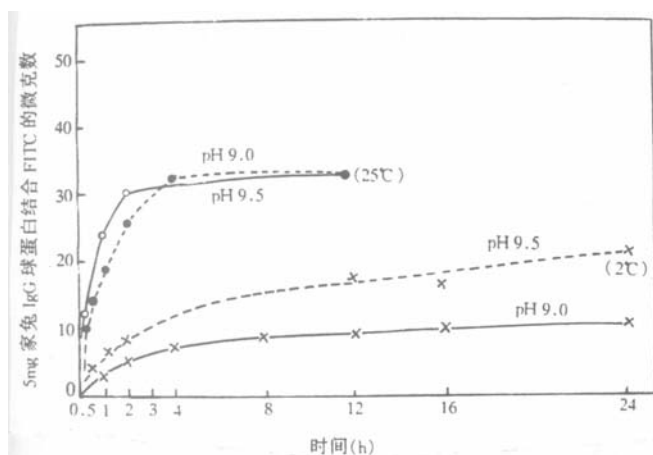


图 3-2-7 FITC 与家兔 IgG 球蛋白在 25℃ 和 2℃ 时结合的动力学 (Kawamura 1964)

(2) Chadwick 氏法

1) 试剂和材料：抗体球蛋白溶液、异硫氰酸荧光素、3% 重碳酸钠水溶液、0.01mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲盐水、1% 硫柳汞、离心机及离心管、三角烧瓶(25ml)、冰槽、无菌吸管及毛细滴管、烧杯(500ml)透析袋、棉线、玻棒等。

2) 方法及步骤：

①抗体准备：用 0~4℃ 的 pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水将抗体蛋白溶液稀释至浓度为 30~40mg/ml，置入三角烧瓶内，放于冰槽中。

②荧光素准备：按每毫克蛋白加入荧光素 0.01mg 计算，称取所需之荧光素量，用 3% 重碳酸

钠水溶液溶解。

③将准备的抗体与荧光素溶液等量混合，充分搅匀，在 0~4℃冰箱中结合 18~24h。

④透析和柱层析：方法同 Marshall 氏法。

(3) 改良法

试剂：

1) 0.01mol/L pH7.2PBS配法：NaCl 18g、Na₂HPO₄ 1.15g、KH₂PO₄ 0.2g，溶于 2000ml蒸馏水中，校定pH至 7.2。

2) 0.5mol/L pH9.0 碳酸盐缓冲液配法：取 0.5mol/L Na₂CO₃(5.3%)10ml加入 0.5mol/L NaHCO₃(4.2%)90ml，混匀后，校定pH至 9.0。

3) 3%重碳酸钠水溶液配法：称 1.5g 无水碳酸钠充分溶解于 50ml 灭菌蒸馏水中即成。

方法及步骤：取高效价的抗人球蛋白兔免疫血清，分离球蛋白，用盐水(0.15mol/L NaCl)及缓冲液(0.5mol/L NaHCO₃-Na₂CO₃ pH 9.0)稀释使每ml内含抗体 10mg，缓冲液为总量的 10%，降温至 4℃，加入异硫氰酸荧光素，(蛋白：荧光素=80mg:1mg)，在 0~4℃下电磁搅拌 12~14h。然后用半饱和的硫酸铵将标记球蛋白沉淀分离，除去未结合的荧光素，再用缓冲盐水透析，除去硫酸铵(用Nessler氏试剂测验至隔夜透析的盐水无氨离子及荧光色素为止)。将制备好的荧光抗体加叠氮钠 0.01%，分装在 1ml安瓿中，或冻干，保存于冰箱中(4℃)可以用半年以上，-20 保存可达 2 年以上。

2. 四甲基异硫氰酸罗达明标记抗体方法

(1) 取 IgG10ml(6mg/ml)在 0.1mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液中透析过夜。

(2) 将四甲基异硫氰酸罗达明(每毫克 IgG 加入 5~20μg)溶于二甲亚砜(1mg/ml)，取此溶液 300μl，一滴一滴加入抗体溶液中，同时电磁搅拌。

(3) 在室温中搅拌 2h，避光。

(4) 把结合物移入直径 3cm，高 30cm 大小的 Bio-Gel P-6 层析柱，用 0.01mol/L pH 8.0 的 PBS 平衡过柱，流速为 1.5ml/min。

(5) 收集先流出的红色结合物，即为标记抗体，分装，4℃保存备用。

3. 藻红蛋白标记抗体方法

(1) 巯基化藻红蛋白(phycoerthrin,PE)的制备 600 μl 的 15.5mg/ml 盐酸巯醇亚胺(iminothiolane hydrochloride)加到 1.2ml 的 3.6mg/ml 的 PE 中，和 1.2ml PB(pH 6.8)混合，装入透析袋置入 50mmol/L pH 6.8 PB 中透析，4℃过夜，再换用 pH7.5 PB 透析 6h。每个 PE 分子中可结合 8 个巯基。

(2) 巯基PE-IgG制备 异双功能试剂SPDP[N-Succinimdy1 3-(2-pyridyldithio) propionate] 30μg (1.1mg/ml)的乙醇溶液，加入 700 μl 的 4.2mg/ml IgG PB溶液(50mmol/L pH 7.5)，在室温中反应 2.5h。再加入巯基化PE400 μl(1.7mg/ml)加到 500 μl 反应混合液中，室温反应 12h，加入 100 μ

1的 50mmol/L碘乙酸钠封闭残余巯基, 在 4℃用PB透析过夜。加入 0.01%NaN₃分装, 4℃保存半年。

(3) PE-标记蛋白 A 方法

1) 取 4.08mg PE 溶于 0.1mol/L pH 7.4 PB(含 0.1mol/L NaCl)1ml 中, 溶解后, 取出 0.5ml, 再加入 10 μl SPDP 无水甲醇液(2.6mg/ml), SPDP/蛋白摩尔比为 10, 22℃反应 5min, 过 Sephadex G-50(1×17cm), 用 100mmol/L pH 7.4PBS(含 0.1mol/L NaCl)平衡和洗脱。

2) 0.5ml 蛋白(2mg/ml)100mmol/L PBS(含有 100mmol/L NaCl pH 7.4), 加入 2.6 μl 上述 SPDP 甲醇液, SPDP: 蛋白 A=9: 5, 22℃, 40min, 加入 25 μl 二硫苏糖醇(DTT) pH 7.4 缓冲液, 22℃, 25min, 同上过 sephadex G-25, 收集蛋白 A 峰。

3) 取 0.77mg/ml的PE 和 0.27mg/ml蛋白A 等量混合, 22℃反应 6h, 混合物 4℃保存备用, 以上两种PE标记制品, 可最后溶于 0.01mol/L pH 7.4 PB(含有 0.1mol/L EDTA、1mol/L 碘乙酰胺、1% BAS和 0.1% NaN₃), 0~4℃保存。

4. 蓝色荧光素标记抗体方法

Kbaffan 等(1986)首先创立了蓝色荧光素标记和染色技术, 可进行双标记或多标记。

(1) 取 7-氨基-甲基香豆素(7-amino-4-methyl coumarin,AMC)260 μg 溶于二甲亚砜 25 μl 中。

(2) 将上液加入 10ml IgG- 巴比妥缓冲液(0.5mol/L, pH 8.5,内含 50~100mg IgG)中, 室温反应 2h, 过 Sephadex G-50 除去游离荧光素, 最大荧光波长 430nm, 最大吸收波长 354nm。

(三) 荧光抗体的质量控制

1. 染色特异性和敏感性的测定方法

(1) 特异性染色和效价测定 直接染色效价以倍比稀释荧光抗体溶液如 1: 2, 1: 4, 1: 8……, 与相应抗原标本作一系列染色, 荧光强度在“+++”的最大稀释度, 为其染色滴度(效价)或单位。实际染色应用时, 可取低一个或两个稀释度(即 2~4 个单位), 如染色效价为 1: 64, 实际应用时可取 1: 32 或 1: 16。间接染色效价可按抗核抗体荧光染色法步骤, 先用不同稀释度的荧光抗体染色, 结果以抗核抗体荧光强度“++”为标准, 染色用效价和直接法相同。

(2) 非特异性染色测定 根据荧光抗体的用途不同, 可用相类似的抗原切片或涂片, 倍比稀释荧光抗体, 按常规染色, 结果在标本上出现的非特异染色应显著低于特异染色, 否则应采取消除非特异性染色的方法处理荧光抗体。

(3) 吸收试验 在荧光抗体中加入过量相应抗原, 于室温中搅拌 2h 后, 移入 4℃中过夜, 3000r/min,离心 30min, 收集上清液, 再用于相应抗原阳性标本染色, 结果应不出现明显阳性荧光。

2. F/P 比值的测定方法

F(荧光素)和 P(抗体蛋白)的克分子比值反映荧光抗体的特异性染色质量, 一般要求 F/P 的克分子比值为 1~2。过高时, 非特异性染色增强; 过低时, 荧光很弱, 降低敏感性。

(1) 蛋白质定量 测定荧光抗体的蛋白质 mg/ml 量。

(2) 结合荧光素定量 先制作荧光素定量标准曲线, 即准确称取 FITC 1mg, 溶于 10ml 0.5mol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液中, 再用 0.01mol/L pH 7.2 PBS 稀释到 100ml, 此时荧光素含量为 $10 \mu\text{g/ml}$, 以此为原液, 再倍比稀释 9 个不同浓度的溶液, 用分光光度计在 490nm 波长测定光密度值 (OD), 以光密度为纵坐标, 荧光素含量为横坐标, 作标准函数图。荧光素与蛋白质结合后, 其吸收光谱峰值向长波方向位移约 5nm, FITC 和蛋白质结合后由 490nm 变为 493-495nm, RB200 和蛋白质结合后变为 595nm。

F/P 比值的计算: 可按以下公式计算。

$$\text{F/P 克分子比值} = \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{蛋白质 mg/ml}} \times \frac{160000 \times 10^3}{390 \times 10^6} = 0.41 \times \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{蛋白质 mg/ml}}$$

式中 160000 为抗体蛋白质的分子量, 390 为 FITC 的分子量。蛋白质从克换算为毫克需再乘以 10^3 , 而荧光素从克换算为微克需要再乘以 10^6 。

测定 RB200 荧光抗体的克分子比值公式如下:

$$\text{RB200 荧光抗体的克分子比值} = \frac{(\text{RB200 } \mu\text{g/ml} \times 10^{-3}) \div 580}{\text{蛋白质 mg/ml} \div 160000(\text{IgG})}$$

$$\text{TMRITC 荧光抗体克分子量比值} = \frac{A_{515\text{nm}}\text{OD}}{A_{280\text{nm}}\text{OD}} \text{ 或} = \text{重量比(g/g)} \times \frac{160000}{580}$$

3. 荧光抗体的保存

以 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 或 -20°C 低温保存, 防止抗体活性降低和蛋白变性。最好加入浓度为 1: 5000 的硫柳汞或者 1: 10000, 叠氮钠防腐, 小量分装如 0.1~1ml, 真空干燥后更易长期保存。

四、免疫荧光组织化学染色方法

(一) 标本制作

(二) 荧光抗体染色方法

1. 直接方法

(1) 染色 切片经固定后, 滴加经稀释至染色效价如 1: 8 或 1: 16 的荧光抗体, 在室温或 37°C 染色 30min, 切片置入能保持潮湿的染色盒内, 防止干燥。

(2) 洗片 倾去荧光抗体, 将切片浸入 pH 7.2PBS 中洗两次, 电磁振动, 每次 5min, 再用蒸馏水洗 1min, 除去盐结晶。

(3) 50% 缓冲液 (0.5mol/L 碳酸盐缓冲液 pH 9.0~9.5) 甘油封固、镜检。

直接法比较简单, 适合做细菌、螺旋体、原虫、真菌及浓度较高的蛋白质抗原如肾、皮肤的

检查和研究。此法每种荧光抗体只能检查一种相应的抗原，特异性高而敏感性较低。

2. 间接方法(双层法)

(1) 切片固定后用毛细滴管吸取经适当稀释的免疫血清滴加在其上，置于染色盒中保持一定的湿度，37℃作用 30min。然后用 0.01mol/L pH 7.2PBS 洗两次，10min，用吸水纸吸去多余的液体。

(2) 再滴加间接荧光抗体(如兔抗人 γ -球蛋白荧光抗体等)，同上步骤，染色 30min，37℃，缓冲盐水洗两次 10min，振动，缓冲甘油封固，镜检。

3. 间接方法(夹心法)

(1) 切片或涂片固定后，置于染色湿盒内。

(2) 滴加未标记的特异性抗原作用切片于 37℃，30min。

(3) 缓冲盐水洗 2 次，每次 5min，吹干。

(4) 滴加特异性荧光抗体在切片上 37℃，30min。

(5) 如(3)水洗。

(6) 缓冲甘油封固，镜检。

4. 补体方法

(1) 材料和试剂

1) 免疫血清 60℃灭活 20min，用 Kolmers 盐水作 2 倍稀释成 1: 2，1: 4，1: 8.....。补体用 1: 10 稀释的新鲜豚鼠血清，抗补体荧光抗体等，按下述的补体法染色。免疫血清补体结合的效价如为 1: 32 则免疫血清应用 1: 8 稀释。

2) 补体用新鲜豚鼠血清一般作 1: 10 稀释或按补体结合反应试管法所测定的结果，按 2 单位的比例，用 Kolmers 盐水稀释备用。Kolmers 盐水配方：即在 pH7.4 的 0.1mol/LPBS 中溶解 $MgSO_4$ 的含量为 0.01% 浓度。

3) 抗补体荧光抗体：在免疫血清效价为 1: 4，补体为 2 单位的条件下，用补体染色法测定免疫豚鼠球蛋白荧光抗体的染色效价，然后按染色效价 1: 4 的浓度用 Kolmers 盐水稀释备用。

(2) 方法步骤

1) 涂片或冰冻切片用冷丙酮 10min 固定和 PBS 洗一次，3min，吹至组织表面无水份。

2) 吸取经适当稀释的免疫血清及补体的等量混合液(此时免疫血清及补体又都各稀释一倍)滴于切片上，37℃作用 30min，置于保持一定湿度的染色盒内。

3) 用缓冲盐水洗 2 次，搅拌或振动，每次 5min，吸干标本周围水份。

4) 滴加经过适当稀释的抗补体荧光抗体 30min，37℃，水洗同(3)。

5) 蒸馏水洗 1min，缓冲甘油封固。

5. 膜抗原荧光抗体染色方法

本法应用直接法或间接法的原理和步骤，可对活细胞在试管内进行染色，常用于 T 和 B 细

胞、细胞培养物、瘤细胞抗原和受体等的研究，阳性荧光主要在细胞膜上。FACS 即采用此原理和方法。

6. 双重染色方法

在同一标本上有两种抗原需要同时显示(如 A 抗原和 B 抗原)，A 抗原的抗体用 FITC 标记，B 抗原的抗体用罗达明标记，可采用以下染色方法：

(1) 一步法双染色方法 先将两种标记抗体按适当比例混合(A+B)，按直接方法进行染色。

(2) 二步法双染色方法 先用 RB200 标记的 B 抗体染色，不必洗去，再用 FITC 标记的 A 抗体染色，按间接法进行。

结果：A 抗原阳性荧光呈现绿色，B 抗原阳性呈现桔红色荧光。

(三) 荧光抗原染色方法

某些抗原可以用荧光素标记，制成荧光抗原，标记荧光素的方法与制备荧光抗体方法相同。用荧光抗原可以直接检查细胞或组织内的相应抗体，特异性较好，敏感性较差。染色方法同荧光抗体染色的直接方法。由于多数抗原难以提纯或量少昂贵，一般很少采用此法。

五、荧光显微镜检查方法

(一) 荧光显微镜

荧光显微镜是免疫荧光组织化学的基本工具，分透射和落射二种类型，落射光无需镜内操作方便，效果更好。它是由超高压光源、滤板系统(包括激发和压制滤板)和光学系统等主要部件组成。是利用一定波长的光激发标本发射荧光，通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像。

(二) 荧光显微镜标本制作要求

1. 载玻片

载玻片厚度应在 0.8-1.2mm 之间，太厚的玻片，一方面光吸收多，另一方面不能使激发光在标本上聚焦。载玻片必须光洁，厚度均匀，无明显自发荧光。有时需用石英玻璃载玻片。

2. 盖玻片

盖玻片厚度在 0.17mm 左右，光洁。为了加强激发光，也可用干涉盖玻片，这是一种特制的表面镀有若干层对不同波长的光起不同干涉作用的物质(如氟化镁)的盖玻片，它可以使荧光顺利通过，而反射激发光，这种反射的激发光又可激发标本。

3. 标本

组织切片或其他标本不能太厚，如太厚激发光大部消耗在标本下部，而物镜直接观察到的上部不能充分激发。另外，细胞重叠或杂质掩盖，背景非特异染色引起的荧光影响判断。

4. 封裱剂

封裱剂常用甘油，必须无自发荧光，无色透明，荧光的亮度在 pH8.5~9.5 时较亮，不易很

快褪去。所以，常用甘油和 0.5mol / L, pH9.0~9.5 的碳酸盐缓冲液的等量混合液作封裱剂。如果用抗褪色剂封裱荧光染色标本更有利于显微摄影。配方是将 P-一次苯基二胺二氢氯 100mg 加入 PBS 10ml 中，调 pH 至 9.0~9.5，再加入甘油 90ml，混匀，在室温放置过夜，待其中小气泡完全消失即可使用。

5. 镜油

一般暗视野荧光显微镜和用油镜观察标本时，必须使用镜油，最好使用特制的无荧光镜油可用甘油代替，液体石蜡也可用，只是折光率较低，对图像质量略有影响。对于落射光荧光显微镜 BX60，Nikon E-1000 无须镜油。

（三）使用荧光显微镜注意事项

1. 严格按照荧光显微镜出厂说明书要求进行操作，不要随意改变程序。
2. 应在暗室中进行检查。进入暗室后，接上电源，点燃超高压汞灯 5~15min，待光源发出强光稳定后，眼睛完全适应暗室，再开始观察标本。
3. 防止紫外线对眼睛的伤害。在调整光源时应戴上防护眼镜。
4. 检查时间每次以 1~2h 为宜，超过 90min，超高压汞灯发光强度逐渐下降，荧光减弱；标本受紫外线照射 3~5min 后，荧光也明显减弱或褪色；所以最多不得超过 2~3h。
5. 荧光显微镜光源寿命有限，标本应集中检查，以节省时间，保护光源。天热时，应加电扇散热降温，新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再启用时，须待灯光充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源。
6. 标本染色后立即观察，因时间久了荧光会逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃ 保存，可延缓荧光减弱时间，防止封裱剂蒸发。
7. 荧光亮度的判断标准：一般为四级，即“—”——无或可见微弱自发荧光。“+”——仅能见明确可见的荧光。“++”——可见有明亮的荧光。“+++”——可见耀眼的荧光。

（四）荧光图像的记录方法

荧光显微镜所看到的荧光图像，一是具有形态学特征，二是具有荧光的颜色和亮度，在判断结果时，必须将二者结合起来综合判断。结果记录根据主观指标，即凭工作者目力观察，作为一般定性观察，基本上是可贵的。随着技术科学的发展，采用细胞分光光度计，流式细胞仪，激光共聚焦显微镜和图像分析仪等仪器。但这些仪器记录的结果，也必须结合主观的判断。

荧光显微镜摄影技术对于记录荧光图像十分必要，由于荧光很易减弱褪色，要及时摄影记录结果。方法与普通显微镜摄影技术基本相同。只是需要采用高速感光胶片如 ASA200 以上或 24° 以上。因紫外光对荧光猝灭作用大，如 FITC 的标记物，在紫外光下照射 30s，荧光亮度就有降低。有的荧光强度不够，曝光速度太慢，只能用人工掌握曝光时间，将荧光图像拍摄下来。研究型荧光显微镜都有半自动或全自动显微数码相机摄影系统装置，如 Nikon 公司 2001 年在我国推出了 Nikon E-1000 全自动荧光显微镜配备有 Cool CCD 与计算机联接将图像采集在软盘上再与彩色打

印机连接直接打印照片。

六、非特异性染色的消除方法

（一）非特异性染色的主要因素

组织的非特异性染色的机理很复杂，其产生的原因主要可分以下几点：

1. 一部分荧光素未与抗体结合，形成了聚合物和衍化物，而不能被透析除去引起非特异性染色。
2. 抗体以外的血清蛋白与荧光素结合形成荧光素蛋白，可与组织成分非特异结合。
3. 除去检查的抗原以外，组织中还可能存在类属抗原(如 Forssman 氏抗原)，可与组织中特异性抗原以外的相应抗原结合。
4. 从组织中难以提纯抗原性物质，所以制备的免疫血清中往往混杂一些抗其他组织成分的抗体，以致容易混淆。
5. 抗体分子上标记的荧光素分子太多，这种过量标记的抗体分子带过多的阴离子，可吸附于正常组织上而呈现非特异性染色。
6. 荧光素不纯，标本固定不当等。

（二）消除非特异性染色的方法

消除荧光抗体非特异性染色的方法应根据产生的原因采取适当的方法，常用的方法有以下几种：

1. 透析法

荧光素如 FITC 分子可以通过半透膜，而蛋白质大分子不能透过，可将未与蛋白结合的荧光素透析除去。

(1) 将标记完毕的荧光抗液体装入一透析袋或玻璃纸袋内，液面稍留空隙，紧扎。

(2) 浸入 0.01mol / L pH7.2 的 PBS 中(悬于大于标记物体积约 50—100 倍的 PBS 内)，在 4℃ 中透析，每日更换 3~4 次 PBS，透析液中无荧光即可(在荧光光源照射下)。

2. 葡聚糖凝胶 G-50 柱层析法

除去游离荧光素可用葡聚糖凝胶 G-25 或 G-50 柱层析方法，加入荧光抗体 15~18ml(按床体积的 5%~10%加样)，使其缓慢渗入柱内，待即将全部入柱时，加入 PBS 少许，关闭下口，停留 30—40min，使游离荧光素充分进入分子筛孔中，然后再接通洗脱瓶开始滴入洗脱液。加入洗脱液一定量后，荧光抗体即向下移行，逐渐与存留于上端的游离荧光素之间拉开明显的距离界线，随着大量洗脱液的不断加入，二者分离距离越来越大，荧光抗体最先流出，分前、中、后三部分，收集中间部分，测 F / P 比值，合格者浓缩，分装。如仅用小量荧光抗体，可用 1cm×20cm 的层析柱，取 2g Sephadex G-50 装柱，即可过滤 2~3.5ml 荧光抗体。

3. 荧光抗体稀释法

先测定荧光抗体的特异性染色与非特异性染色效价，若二者效价相差较大，则可将荧光抗体稀释至一临界浓度，使特异性染色呈阳性，而使非特异性染色保持阴性，稀释方法和染色效价测定方法相同。

4. 纯化抗原方法

用各种方法提纯单一成分的抗原是产生单价特异性抗体的最主要条件。现代免疫化学技术(免疫吸收法)和柱层析法等提供了很大的可能性。

5. 伊文蓝(Evan blue)衬染色方法

用 0.01%伊文蓝的 0.01mol/L pH7.2 PBS 溶液稀释荧光抗体，可将背景细胞和组织染色呈红色荧光，与特异性黄绿色荧光形成鲜明的对比，减少了非特异性荧光，宜作常规应用。伊文蓝一般配成 1%溶液，保存于 4℃，用前再稀释至 0.01%用以稀释荧光抗体。

此外，还可以用胰酶消化组织切片或用 10%牛血清蛋白封闭法等消除非特异性染色，提高特异性染色。

七、现状与展望

免疫荧光组织化学技术经过半个多世纪的不断改进和创新，已成为现代研究生物和医学的重要手段之一。由于免疫荧光技术与形态、机能相结合不断完善和发展，尤其是合成了多种新荧光素与抗体容易结合，结合物稳定。可以和 FITC 结合进行免疫荧光组织化学双标记或三标记。至今，它已和亲合化学技术如 SPA, Biotin 及 avidin, ConA 相结合，应用领域也日益扩大，又与现代的电子计算机和扫描电视技术，共聚焦显微镜，荧光激活细胞分类器(FACS)以及数码相机摄影技术的应用，使得快速性、简便性有了更大的提高，使得定量更加准确。90 年代又开展了荧光原位末端标记和荧光原位杂交技术，使得范围更广大。

虽然免疫组织化学有了很大的发展，如免疫金银法，免疫胶体铁法，SP, Evison 和 CSA 法，但由于它有自己独特的优点，特异性强，定位准确、简便、快速、鲜明，在许多领域中仍占有不可取代的地位。如肾活检、皮肤活检中 IgG, IgM, IgA, C3 等检测，自身抗体的检查，传染病的快速诊断，单克隆抗体的筛选及鉴定等。随着科学技术的不断发展，免疫荧光组织化学技术广泛应用于生命科学的各个领域，放射出更加灿烂五彩缤纷的荧光。

参考文献

1. Akivoshi. Kawamura, JR. Fluorescent antibody techniques and their application. University of Tokyo Press. 1969
2. 王伯运 免疫荧光组织化学和荧光组织化学技术。第四军医大学科技资料增刊, 1974;2:5~30

3. Huang SN, et al. Application of immunofluorescent staining on paraffin section improved by trypsin digestion. *Lab Invest*, 1976;35:383
4. Wick G, Traill KN, Schouesten K. *Immunofluorescence Technology, Selected Theoretical and Clinical Aspects*. Elsevier Biomedical press. Amsterdam, 1982: P27~36, P181, P229~262, P317~323
5. Akiyoshi Kawamura Jr. *Fluorescent antibody. Technique and Their Applications*. Second Edition University of Tokyo Press, Tokyo, 1977. P79, P141~281
6. 蔡文琴, 王伯运主编. *实用免疫细胞化学*. 成都: 四川科技出版社 1990, P968~977
7. 李成文. *现代免疫化学技术*. 上海: 上海科技出版社 1992; P97~100
8. Mahmudi-A₃er-s; Lacy-P; Bablit₂-B; Mogbel-R Inhibition of nonspecific binding of fluorescent-labelled antibodies to human eosinophils. *J. Immunol- Methods*. 1998;227(1-2): 113-9
9. Magro-C-M; Cronison-AN The immunofluorescent profile of dermatomyositis: a comparative study with lupus erythematosus. *J-Cutan-Pathol*. 1997;24(9):543-52
10. Bausch-SB. A method for triple fluorescence labeling with vicia villosa agglutinin, an anti-parvalbumin antibody and an anti-G-Protein-coupled receptor antibody. *Brain-Res-Brain-Protoc*. 1998;2(4):286-98
11. Gregori Weber, 1916-1917. A fluorescent life time. *Jameson-DM, Biophys-J*, 1998;75 (1):419-22
12. Savige-JA, Paspaliaris-B, Silvestrini-R, et al. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J-Clin-Pathol* 1998;51(18):568-751
13. Ballou B, Fisher GW, Deng JS, et al. Cyanine fluorochrome-labeled antibodies in vivo: assessment of tumor imaging using Cy3, Cy5, Cy5.5 and Cy7. *Cancer-Detect-Prev* 1998;22 (3) 251-7
14. Gruber HJ, Hahn CD, Kada G, et al. An anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconjug Chem* 2000;11(5):696-704
15. Southwell BR, Fumess JB. Immunohistochemical demonstration of the NK1D tachykinin receptor on muscle and epithelia in guinea pig intestine. 2001;120(5):1140-51
16. Arseniev L, Pickerd N, Goudeva L, et al. Comparative evaluation of commonly used clone and fluorochrome conjugates of monoclonal antibodies for CD34 antigen detection. *J Hematother Stem Cell Res* 1999;8(5):547-59
17. O'Brjen TE, Metheny CD, Polansky JR. Immunofluorescence method for quantifying the trabecular meshwork α -inhibin response (TIGR) protein in trabecular meshwork and Schlemm's canal

cells. *Curr Eye Res* 1999;19(6):517

18. Huang MC, Kabo O, Tajika Y, et al. Detection of mammosomatotrophs in paraffin embedded specimens of various pituitary adenomas. *Chung Hua Hssueh Tsa Chih (Taipei)*. 1999; 62(12):845-51
19. 王伯运, 李玉松, 黄高昇, 张远强主编。病理学技术 北京: 人民卫生出版社出版; 2000 年 6 月 P380-396



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn

