

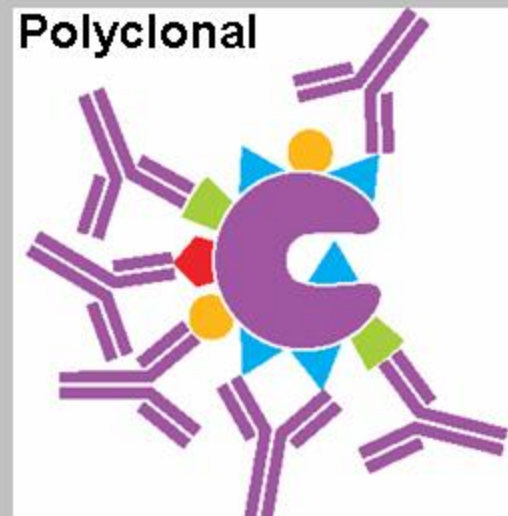
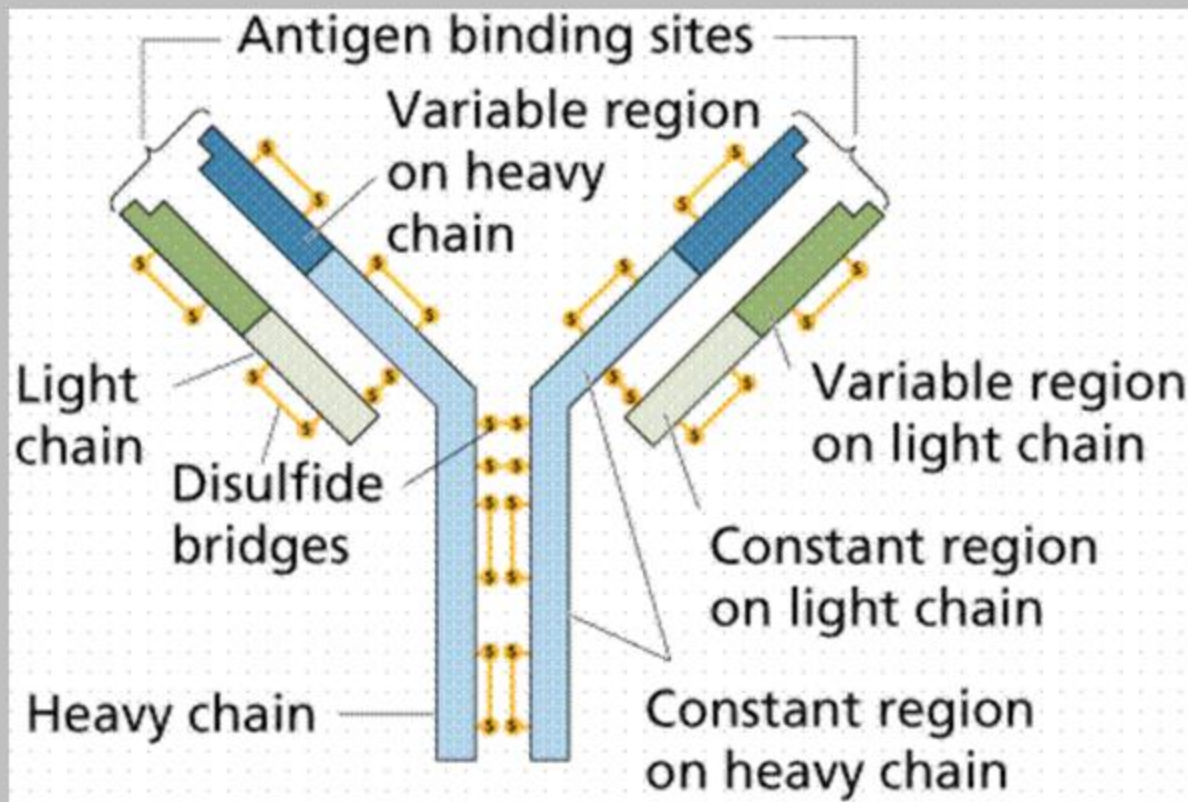
# 免疫组织化学ABC染色法

- **组织学**：是研究机体微细结构及其相关功能的科学，它是以显微镜观察组织切片为基本方法的，故又称显微解剖学（**microanatomy**）。
- **组织化学**：在细胞和组织中，以化学或物理试验法，对某些特殊物质、反应基团和酶促活性进行识别、定位和定量。

# 免疫组织化学

- 免疫组织化学(Immunocytochemistry)技术是在免疫学、生物学和显微镜技术进展的基础上发展起来的一项技术。它将血清学—抗原抗体特异性结合和显微镜示踪法相结合。
- 该种技术方法可以特异、敏感和快速地检出和定位某些未知抗原或抗体成分，包括各种病原微生物、各种蛋白质、多肽、部分类脂质和多糖，以及细胞表面的膜抗原和受体等。它也是神经形态学的常用方法。
- 免疫细胞化学（Immunocytochemistry）与免疫组织化学相似，应用于细胞涂片或细胞爬片

# 抗体



Monoclonal



# 免疫组织化学的分类

- 直接法、间接法、补体法
- 免疫荧光技术（1941）
- 免疫酶标技术（1960）
- 过氧化物酶—抗过氧化物酶复合物（PAP）法
- 标记亲和素—生物素（LAB）法
- 桥连亲和素—生物素（BAB）法
- 亲和素—生物素—过氧化物酶（ABC）法

# Biotin（生物素）

- 1936年，蛋黄中分离得到，在动植物组织中广泛分布，即维生素H或辅酶R。  
分子量为**24431 Da**。
- 其羧基加以化学修饰后可制成各种活性基团的衍生物，称为活化生物素，以羧基丁二亚酰胺酯最常用。

# Avidin（亲和素）

- 卵白素或亲和素，一种碱性糖蛋白，分子量68 kDa，IP 10.5，与生物素的亲和常数为 $10^{-15} \text{ M}^{-1}$ 。由四个亚基组成多聚体，可结合四个生物素。
- 生物素和亲和素间的亲和力是抗原抗体间亲和力的100万倍。它们之间的结合是牢固的，不可逆的。

# 显色系统

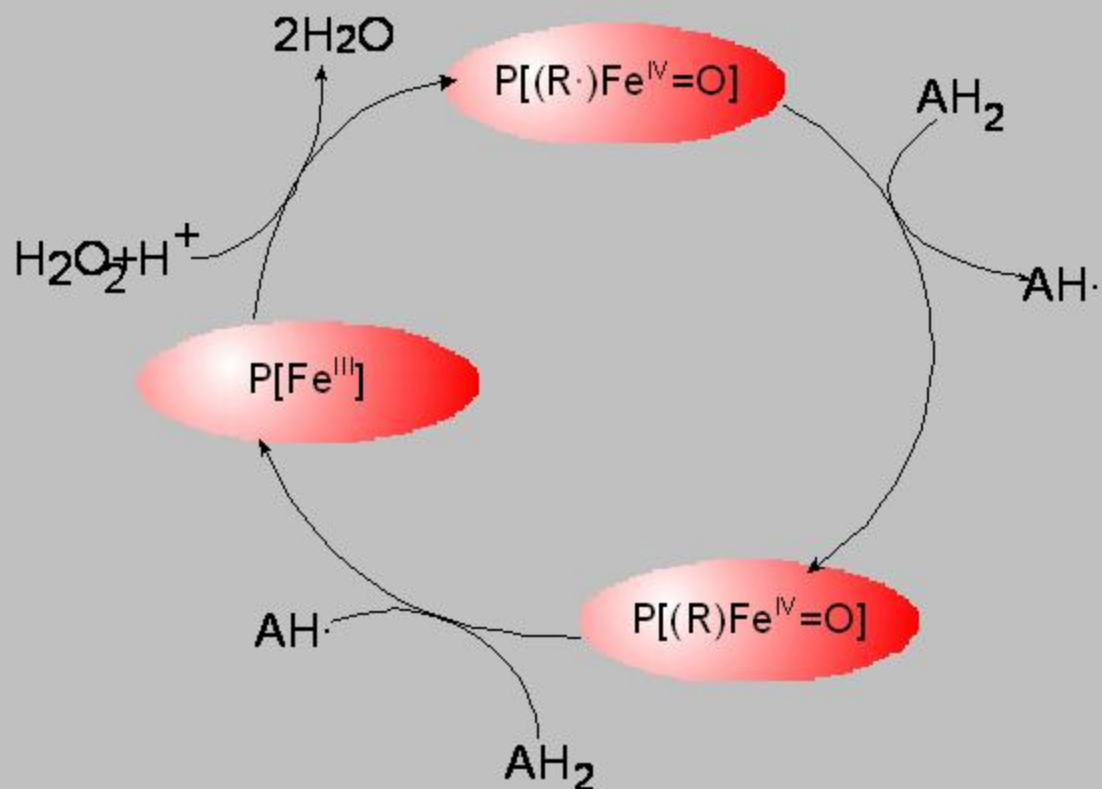
酶	底物	颜色
辣根过氧化物酶	DAB	棕黄色
小牛肠碱性磷酸酶	重氮盐	蓝色



# HRP



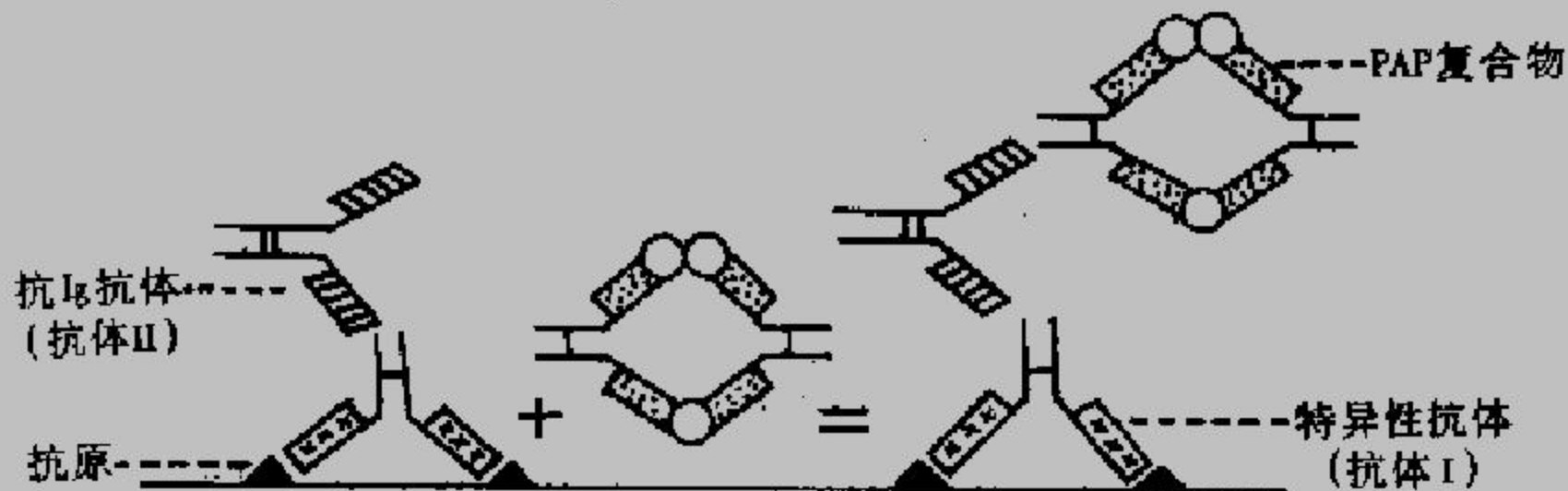
辣根：一种十字花科的粗糙植物，产于欧亚大陆，其根很厚实，略带白色，有刺鼻气味，叶子底部大，白色花呈圆锥形花序



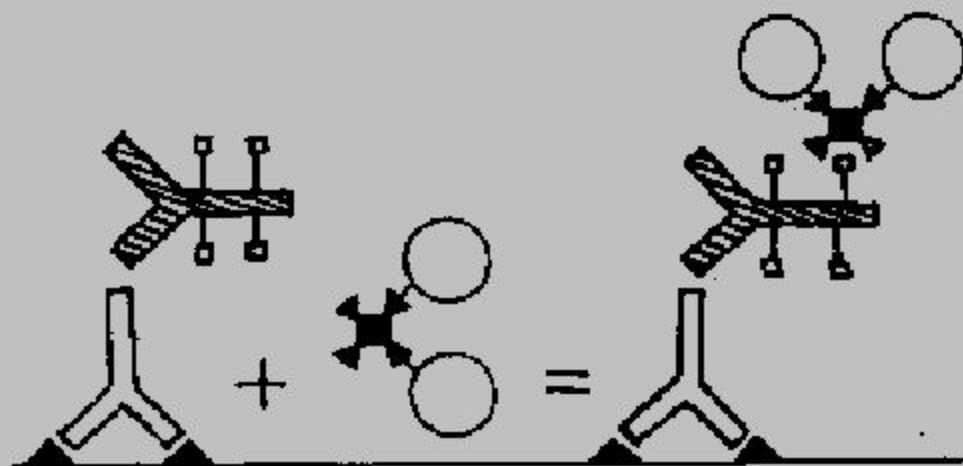
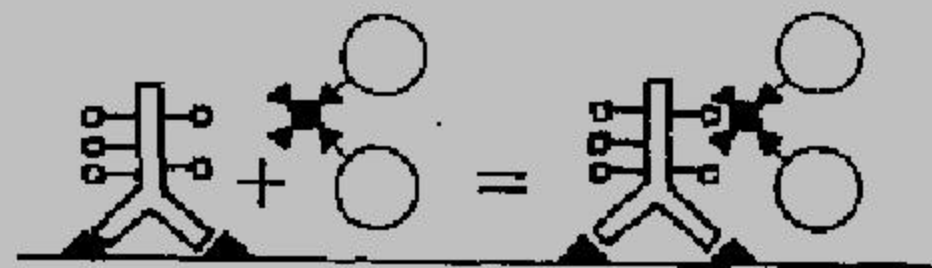
HRP最适pH: 5.0







P: peroxidase (HRP)  
AH<sub>2</sub>: substrate

# PAP法

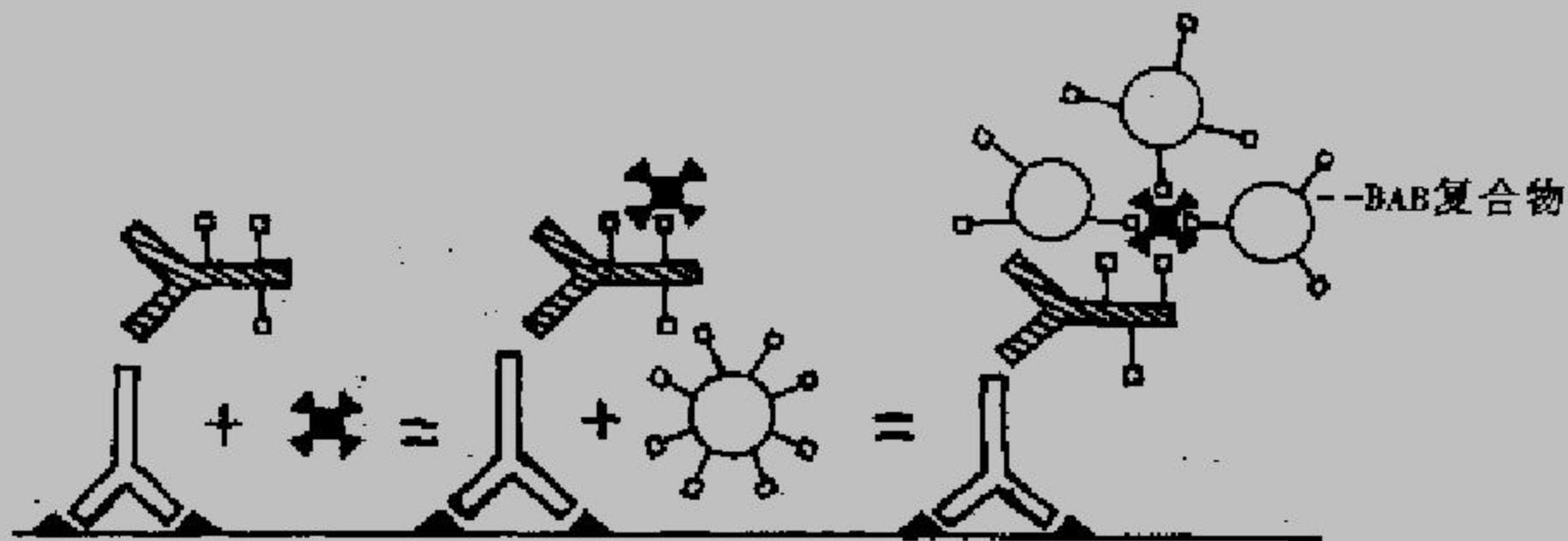


# LAB法



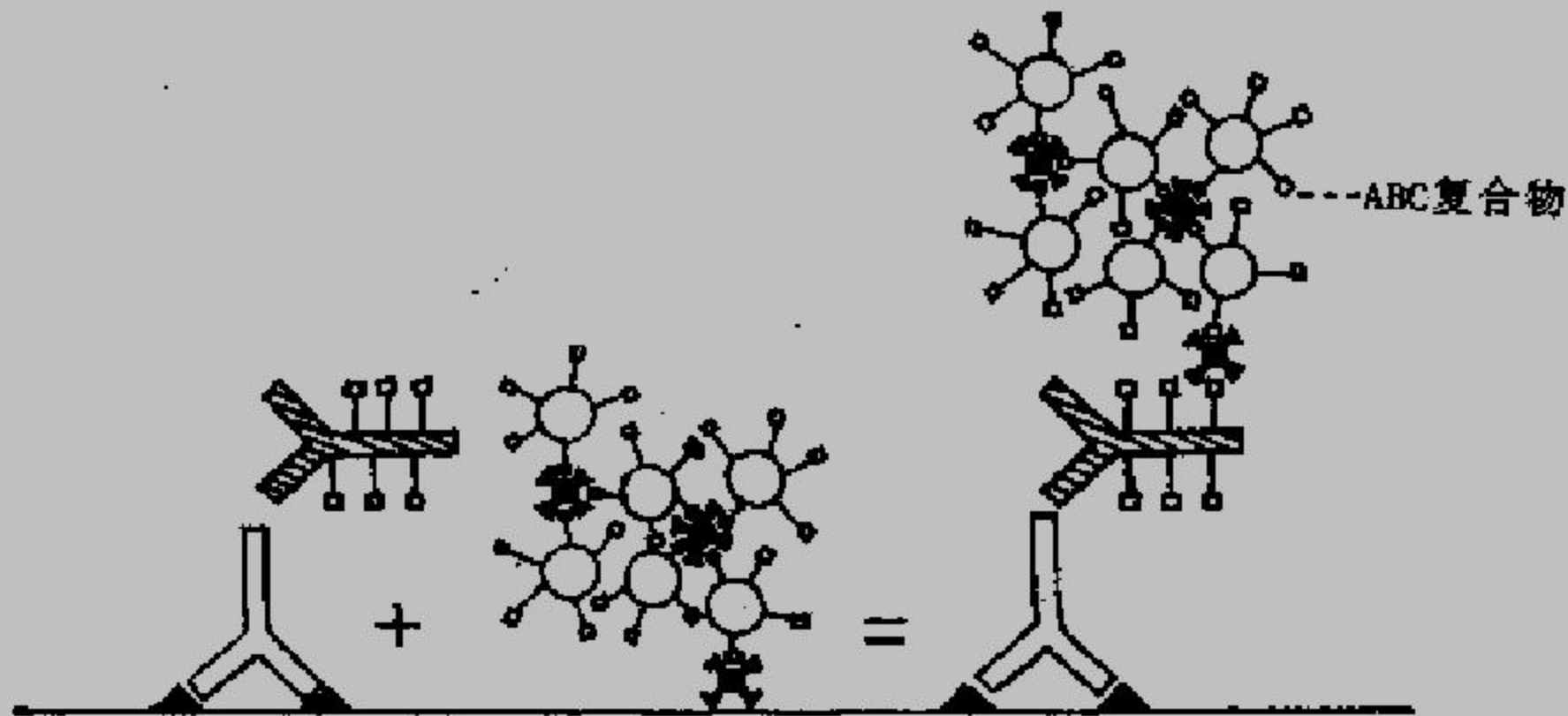
-  --- 抗原
-  --- 特异性抗体 (抗体 I)
-  --- 抗体抗 (抗体 II)
-  --- 生物素
-  --- 酶
-  --- 亲合素

# BAB法



# ABC法

- 1981年许世明设计成功了ABC法。



## 許世明教授

- 學術獎勵、榮譽事項：
- 青年獎章Young man of the year, 1976, Taiwan
- 獲得美國專利Awarded by US Patent 4684609
- 美國American Men & Women of Science, 1989
- 美國國家衛生總署研究計畫評審委員及顧問Consultant, National Institutes of Health, USA
- 多項雜誌論文評寫委員、多項學術編輯Reviewer in more than 20 Journals
- Citation Record: > **15,000** times (Among the **top 100** most cited Scientist, 1985- )
- 財團法人傑出人才發展基金會- 傑出人才獎座86 至90 年度連續五年獎勵
- 行政院表揚傑出科學與技術人才獎1999
- 國際ISI identify Highly Cited Researchers -2003: The Clinical Medicine Category – 215 Researchers Listed; two with Chinese last name, one from Taiwan is Hsu, Su-Ming

# 药品与试剂



- ABC试剂盒内含：  
正常羊血清，生物素化二抗(Biotin-IgG)，抗生素Avidin(A液)和活化生物素过氧化物酶Biotin-peroxidase(B液)。
- 0.01 M PBS(pH 7.4)
- 抗体稀释液为含有10%正常羊血清和0.2%Triton X-100的PBS
- 0.1 mol Tris-HCl (pH 7.5)
- 0.05%DAB的0.1 M Tris-HCl缓冲液，3% $H_2O_2$ 。

# 实验设计

- 阳性对照
- 阴性对照
- 空白对照
- 替代对照
- 吸收实验
- 抑制实验
- 自身对照



# 非特异性的排除

- 抗体蛋白非特异性吸附
- 特异性抗血清不纯：  
免疫沉淀线分离、组织吸附、使用单克隆抗体
- IgG的交叉反应：人与猿或猴、兔与豚鼠  
稀释一抗，改用包含不起交叉反应的血清
- 共同抗原决定簇：  
使用McAb
- 单一决定家族抗体的特异性
- 天然抗体
- 特异性抗原弥散
- IgG受体的干扰

# 操作步骤 (一)

1. 0.01 M PBS, 5 min, 三次。
2. 切片入含有10%正常羊血清和0.2% Triton X-100的PBS液中, 37°C孵育1 h。
3. 切片入第一抗体中(如是贴片法, 需置于湿盒内), 37°C 孵育1-2h, 移入4°C冰箱孵育48-72 h。
4. 0.01 M PBS, 5 min, 三次
5. 切片入生物素标记的第二级抗体(Biotin羊抗兔IgG)1: 200 孵育37°C孵育 1 h。
6. 0.01 M PBS, 5 min, 三次
7. AB peroxidase complex液制备。于 0.2% Triton X-100的PBS液中, 以1: 200稀释倍数加入ABC试剂盒中A液(Avidin液)与B液(Biotin-peroxidase液), 两者的体积比为1: 1, 在37°C孵育30分钟。挑入切片, 孵育1 h。

## 操作步骤（二）

8. 0.01 M PBS, 5 min, 三次
9. 用0.1 M Tris-HCl缓冲液(pH 7.6)洗5min。
10. 切片挑入0.05% DAB (0.1 M Tris-HCl缓冲液, 加0.03%  $H_2O_2$  显色, 反应一般需要5-15min, 显微镜下观察监控呈色反应。
11. 切片入0.1 M Tris-HCl缓冲液终止反应, 并进行漂洗。
12. 贴片、晾干、复染、脱水、透明、封片, 镜下观察。注意要在不含盐的溶液中贴片, 否则组织片干后会出现盐的结晶影响观察; 另外, 为了使组织结构清晰, 封片前的脱水、透明要完全, 载玻片和盖玻片要干净, 封片中避免气泡形成。

# 增强染色的方法

- 一类是对切片进行前处理，有：  
高温高压法，甲酸处理法，微波处理法，蛋白酶处理法等，其目的是使更多的抗原表位暴露，这些方法对贴片法适用，但在漂浮法中用这些处理方法应极为小心，因为切片本来就比较脆弱，处理后易导致切片破碎。
- 另一类是加强底物的染色反应，主要是在底物反应液中加入重金属，如氯化钴，氯化镍，硫酸镍氨等。

# GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein, 星型胶质细胞标记

