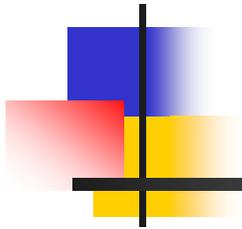


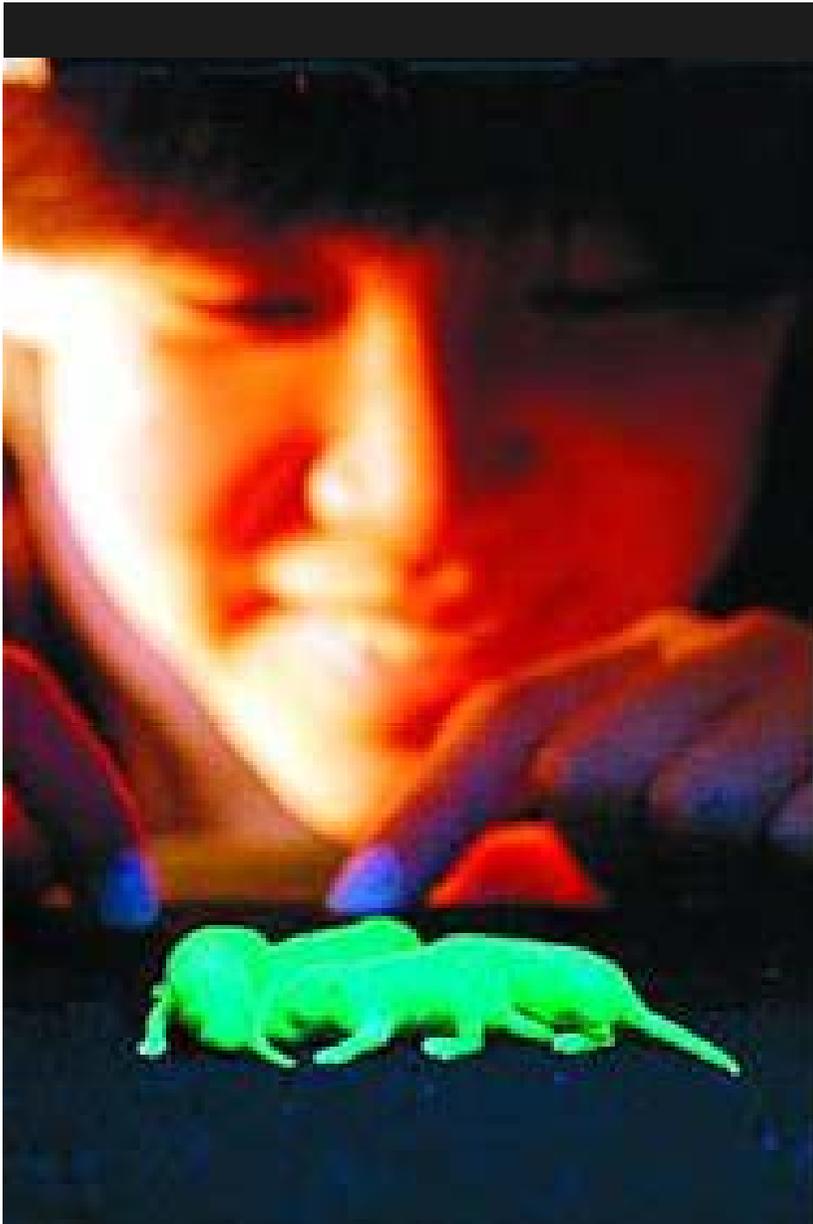
# Immuno- Histo- Chemistry IHC

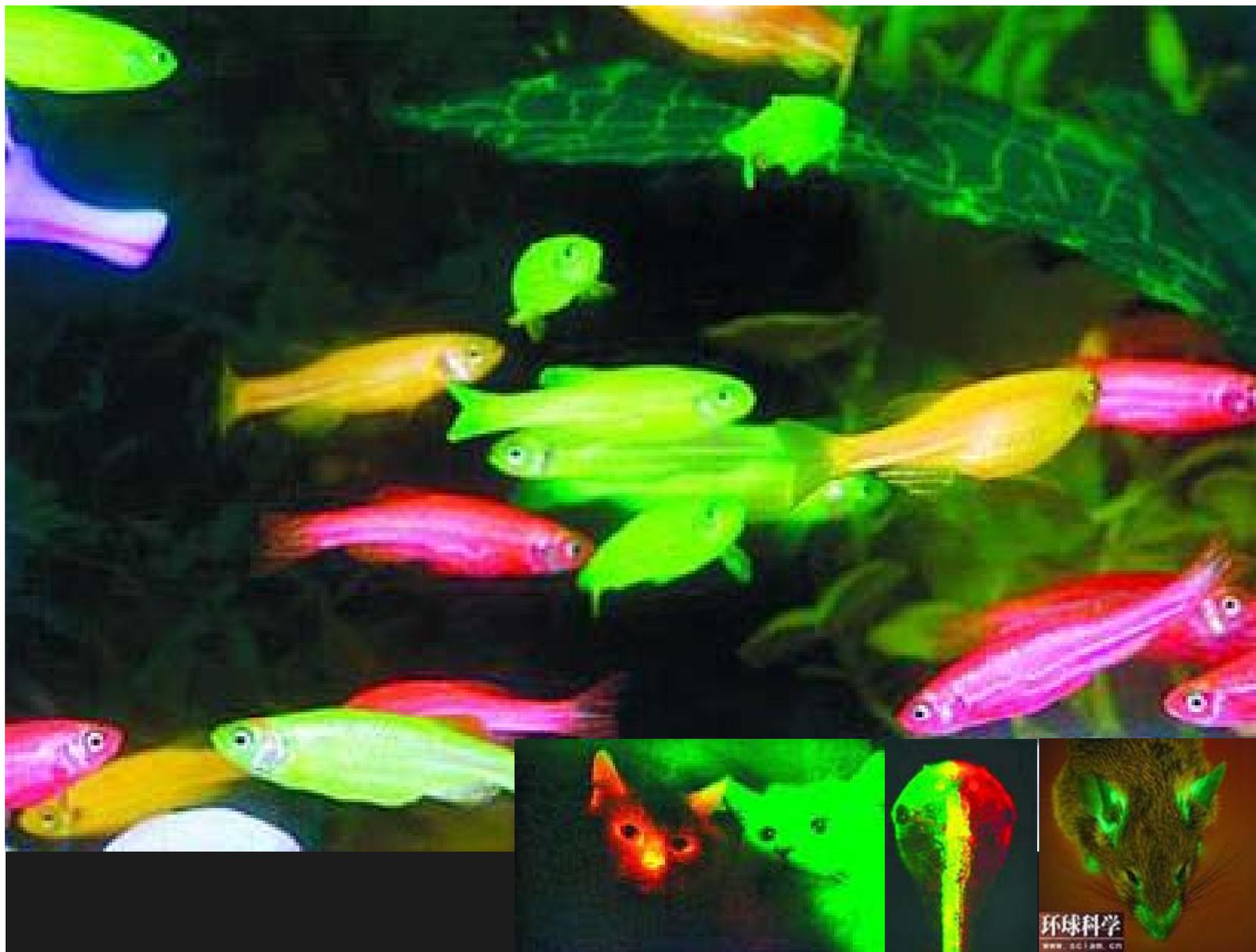


**Dept of Histology & Embryology**

Deshan Zhou

zhouds08@ccmu.edu.cn





水母 (Aequorea victoria) ? Green fluorescent protein; GFP

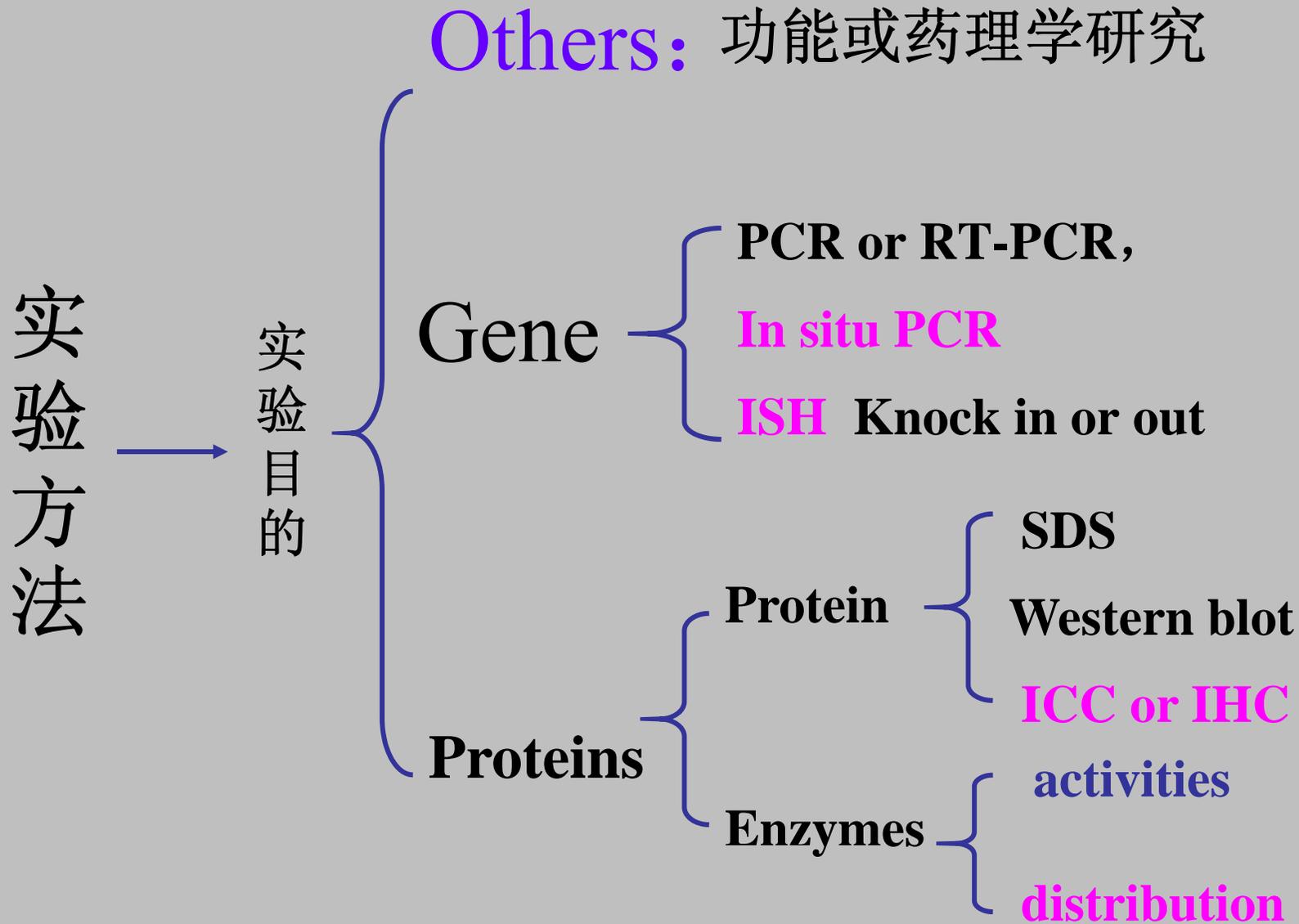


马丁·查尔菲

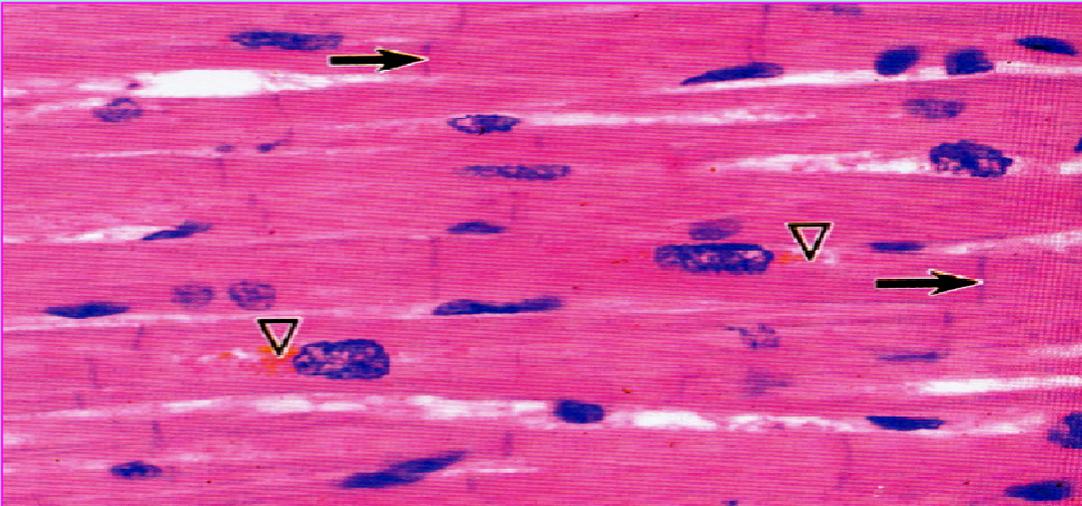
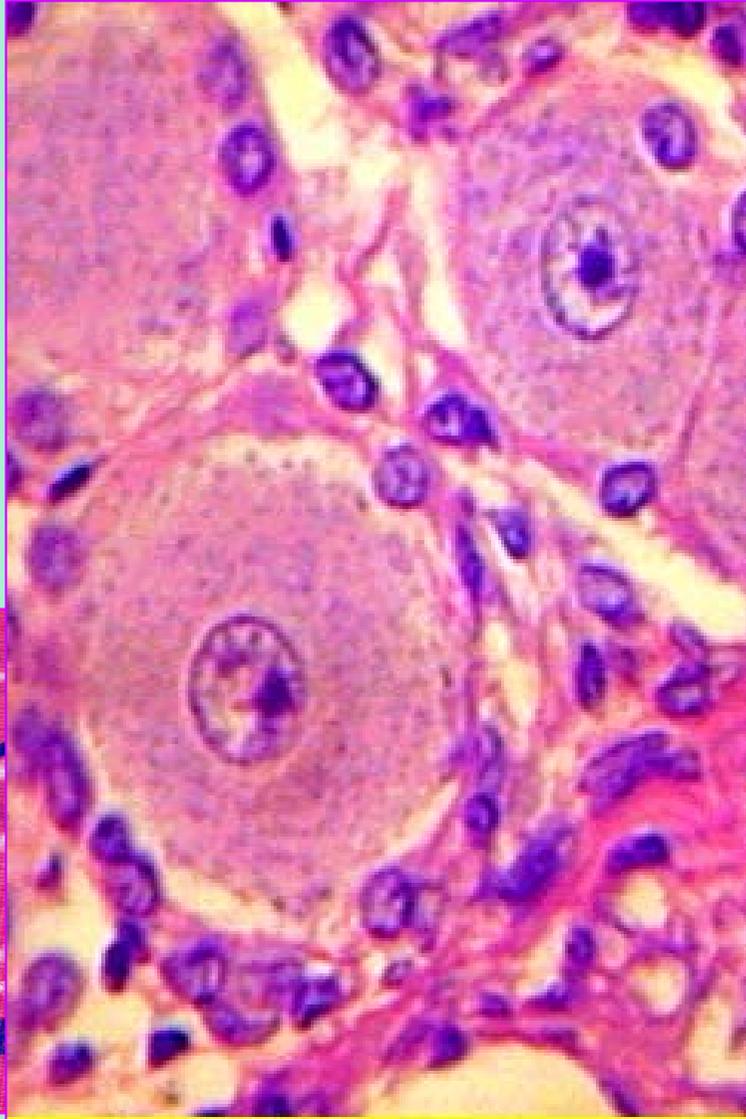
下村脩

钱永健

# 研究工作中掌握各种实验技术方法至关重要



# Histology



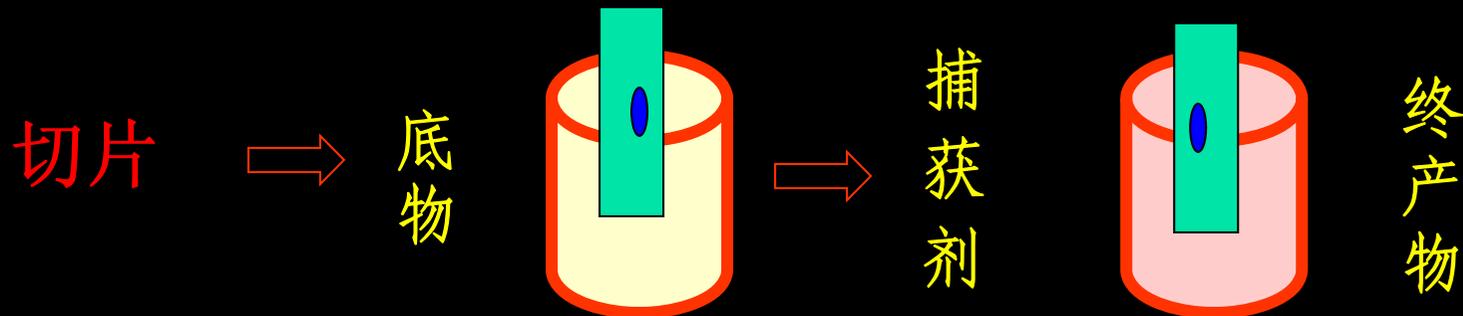
# Enzyme Histochemistry and Cytochemistry

\* Principle: To reveal the chemical composition of tissue and cell with chemical or biochemical methods

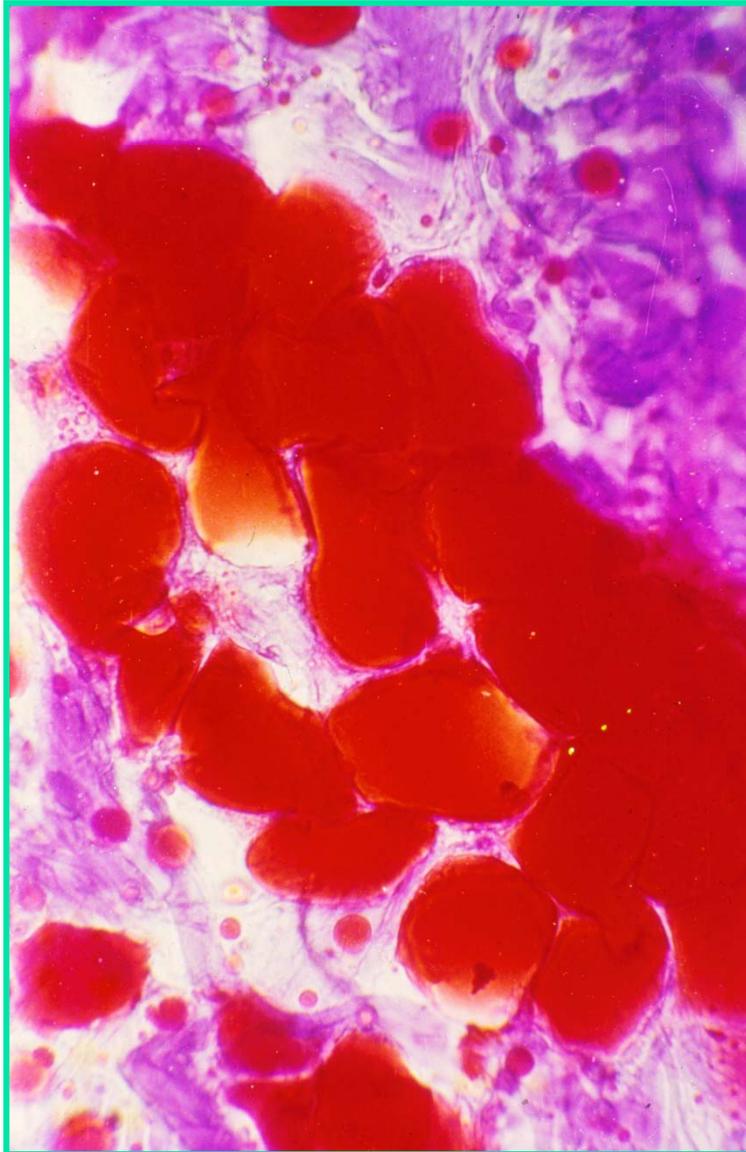
➤ Structure and its activity

➤  $\text{HRP} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{HRP} \cdot \text{H}_2\text{O}_2 + \text{供氢体 (电子供体)}$

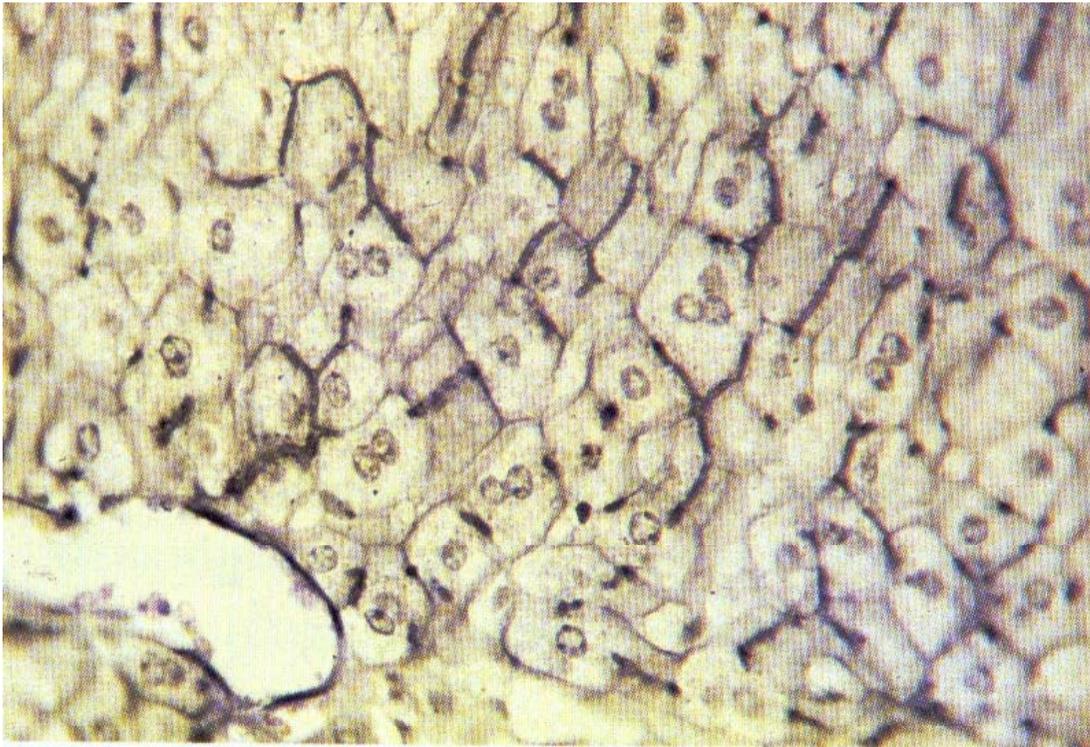
$\text{HRP} + \text{H}_2\text{O} + \text{供氢体 (氧化型)}$



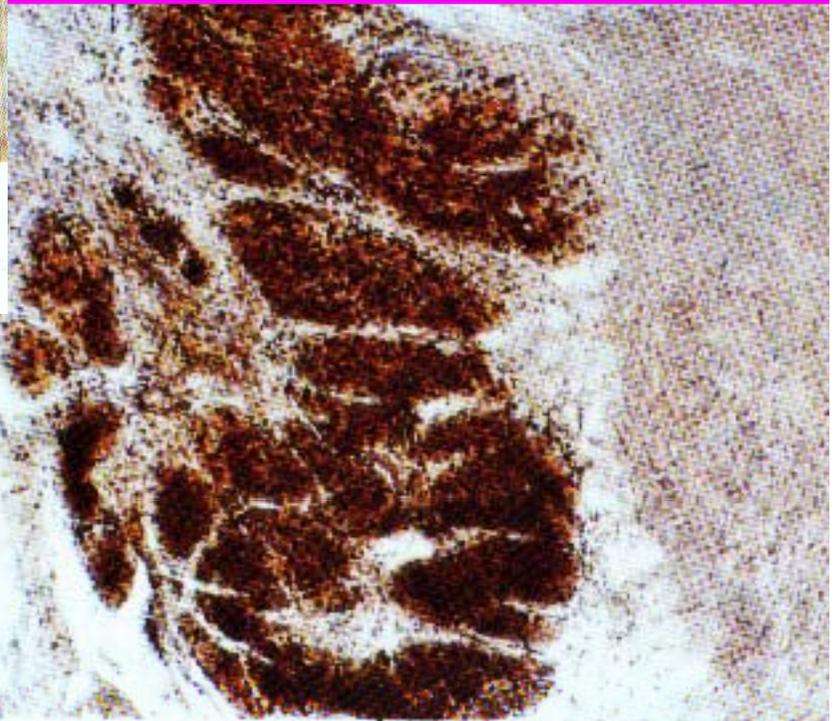
# Histochemistry



# Histochemistry Cytochemistry



b. 肝臓のアルカリフォスファターゼ反応（暗褐色の部分）。ウサギ毛細胆管の壁が陽性を示している。

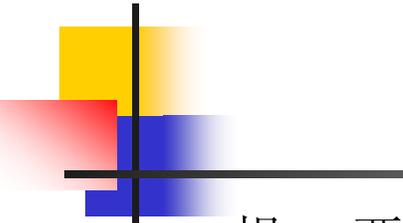


c. 心臓組織の酸性フォスファターゼ反応（茶褐色の部分）

优点和缺点？

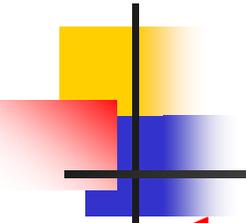
## Abstract

Diabetic cardiomyopathy is responsible for substantial morbidity and mortality in the diabetic population. Increased oxidative stress has been associated with the pathogenesis of chronic diabetic complications including cardiomyopathy. Multiple biochemical mechanisms have been proposed to increase oxidative stress in diabetes. The present study investigated the effect of tin protoporphyrin IX (SnPPIX, 50 µmol/kg/d), and were compared with untreated diabetic and non-diabetic animals. All treatments began at the onset of diabetes, 48 h after injection of streptozotocin along with the confirmation of hyperglycemia. Animals were euthanized after 1 week and 1 month of treatment, and heart tissues were harvested. Frozen tissues were subjected to HO-1 and HO-2 mRNA expression by real-time RT-PCR and HO activity determination. **Paraffin-embedded tissue sections** were used for **immunohistochemical analysis** of HO-1 and HO-2. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) stain, a sensitive and specific marker of DNA damage, was performed to assess damage induced by oxidative stress. In addition, **tissue sections were subjected to histochemical analysis** for iron. We further examined non-diabetic animal treated with direct HO agonist, hemin (50 mg/kg/d). A possible relationship between the HO and the nitric oxide (NO) pathway was also considered by studying the mRNA levels of endothelial nitric oxide synthase (NOS) and inducible NOS, and by measuring the amount of NOS products. Our results demonstrate no significant alterations of the HO system following 1 week of diabetes. However, 1 month of diabetes caused increased oxidative stress as demonstrated by higher levels of 8-OHdG-positive cardiomyocytes (80% positive as compared to 11.25% in controls), in association with increased HO isozyme mRNA (2.7-fold increase as compared to controls) and protein expression, and augmented HO activity (759.3 as compared to 312.3 pmol BR/h/mg protein in controls). Diabetic rats further demonstrated increased number of cardiomyocytes with stainable iron. SnPPIX treatment resulted in reduced number of 8-OHdG-positive cardiomyocytes (19.5% as compared to 80% in diabetics) in parallel with reduced HO activity (569.7 as compared to 759.3 pmol BR/h/mg protein in diabetics). Non-diabetic rats treated with HO-agonist hemin exhibited abnormalities similar to diabetic rats. Our results provide the first direct demonstration that diabetes-induced oxidative stress in the heart is, in part, due to upregulated HO expression and activity. These results provide evidence of pro-oxidant activity of HO in the heart in diabetes, which could be mediated by increased redox-active iron.



## Please don't read

**提 要:**目的 制备结直肠癌特异性单克隆抗体,为深入研究相关肿瘤的发病机制提供新的实验工具。方法 用人结直肠癌患者的手术标本制备细胞悬液免疫小鼠,按常规方法进行细胞融合,经**免疫组织化学染色**筛选阳性克隆,并对其抗(体的特性和生物学性状等进行分析。结果 共获得32个阳性克隆,其中针对结直肠癌较特异性的阳性克隆有2个(克隆)株223,1528。**免疫组化染色**显示,克隆株223培养上清和腹水与结直肠癌组织的冰冻切片反应的阳性率可达100%。癌旁正常组织的阳性率较低,且染色强度远弱于癌组织,当抗体稀释度超过1:6000时反应阴性,而肿瘤组织仍呈强阳性。从结肠癌的分化程度来看,分化较差的肿瘤组织,包括中、低分化的癌组织染色较强。另外,免疫染色阳性产物主要位于肿瘤的腺腔和正常黏膜表面,提示该抗体所识别的抗原可能为结直肠癌细胞和黏膜上皮分泌的黏蛋白等抗原。结论 本研究成功地制备了两株针对结直肠癌的较特异的单克隆抗体,可作为实验研究相关蛋白在结直肠癌及其他肿瘤发病中的作用机制的方法。



# 一、Introduction

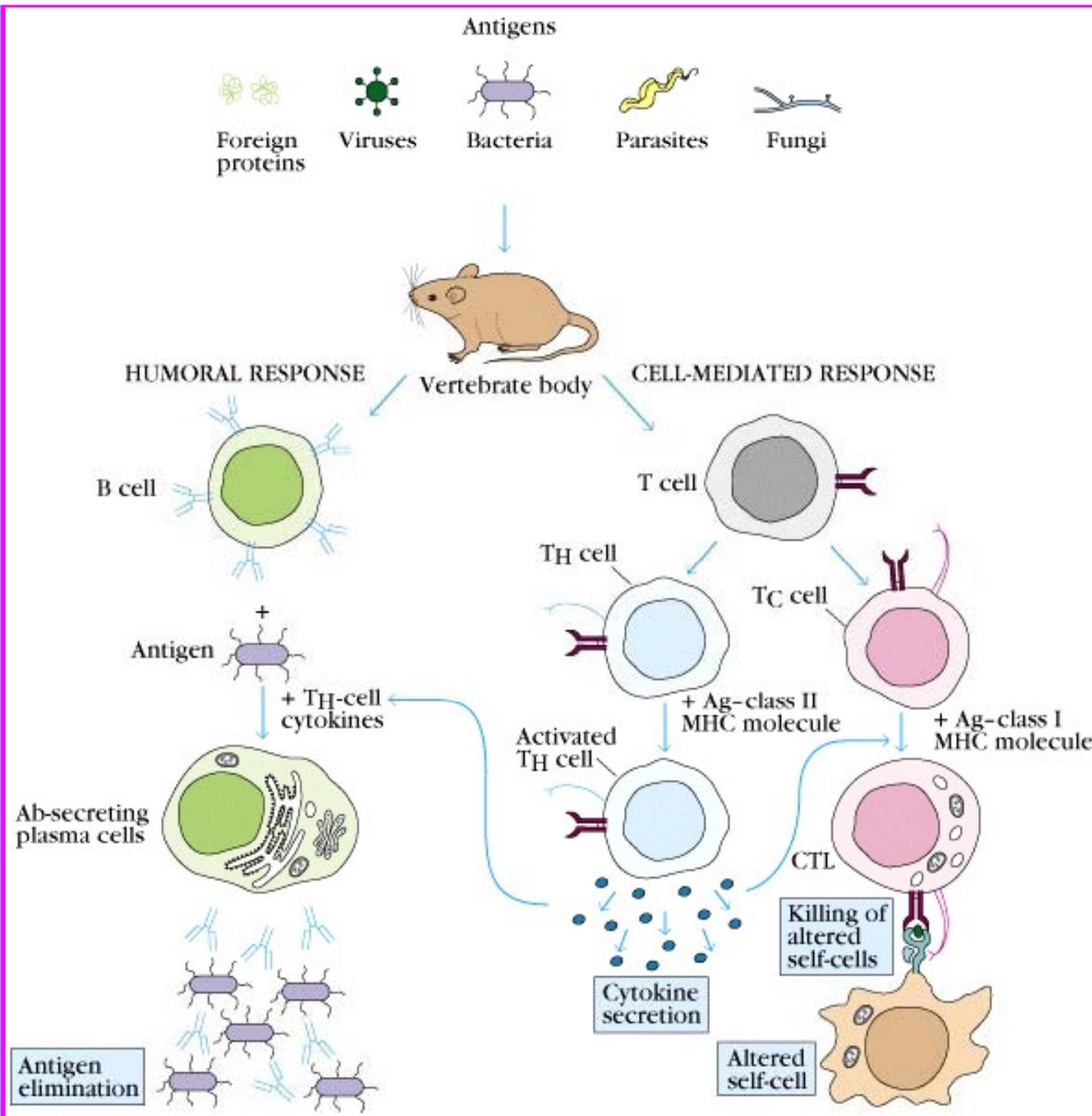
---

## 1. Definition

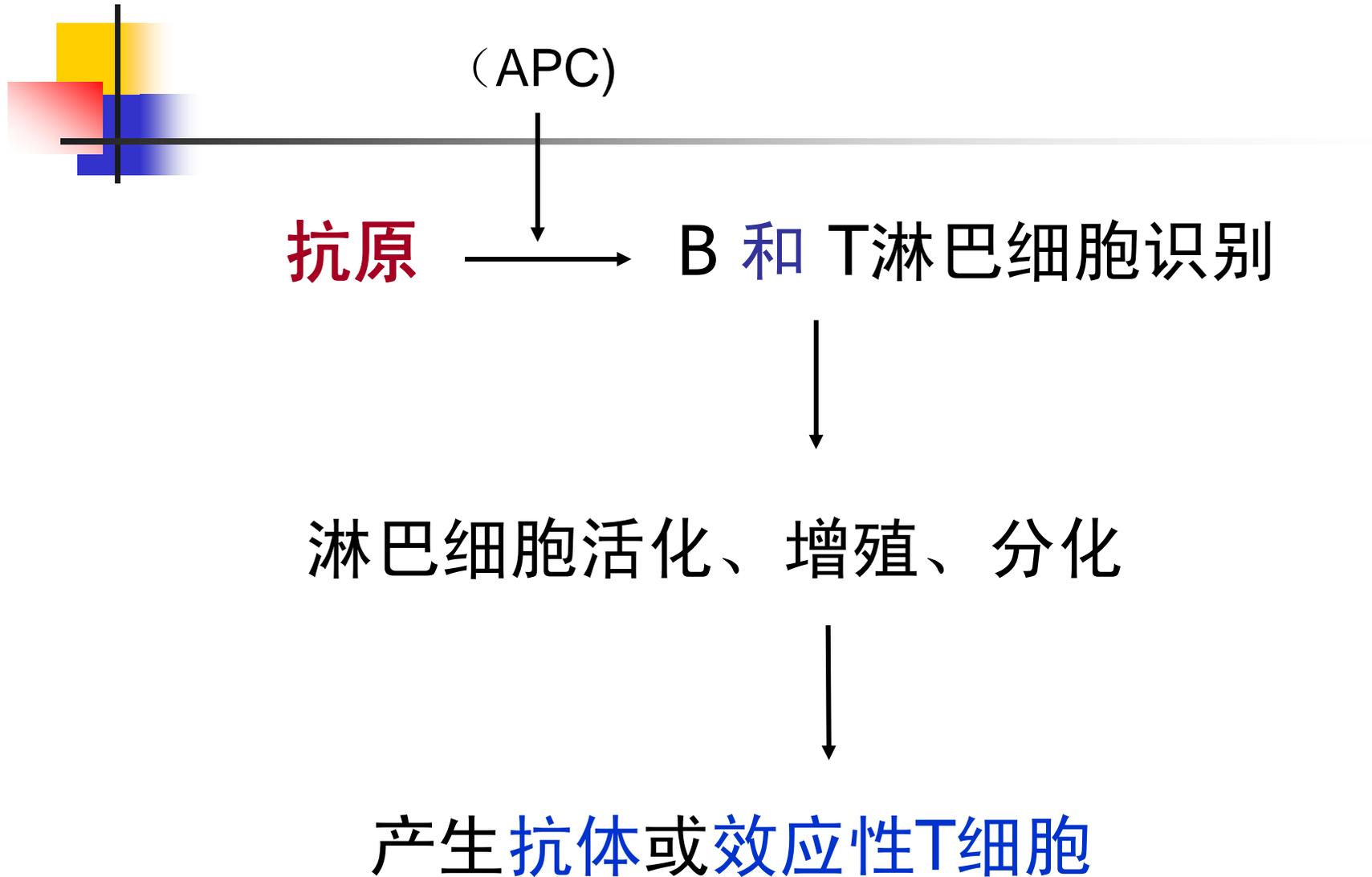
免疫组织化学（immunohistochemistry）又称免疫细胞化学（immunocytochemistry; ICC）是组织化学与免疫技术的结合。即利用抗原与抗体特异性结合的原理，通过组织细胞化学手段，对组织切片或细胞中的某些多肽和蛋白等大分子物质进行组织细胞原位定位、定性或半定量检测的形态学研究技术。

包括组织学、酶化学、免疫学三门技术相结合

免疫反应

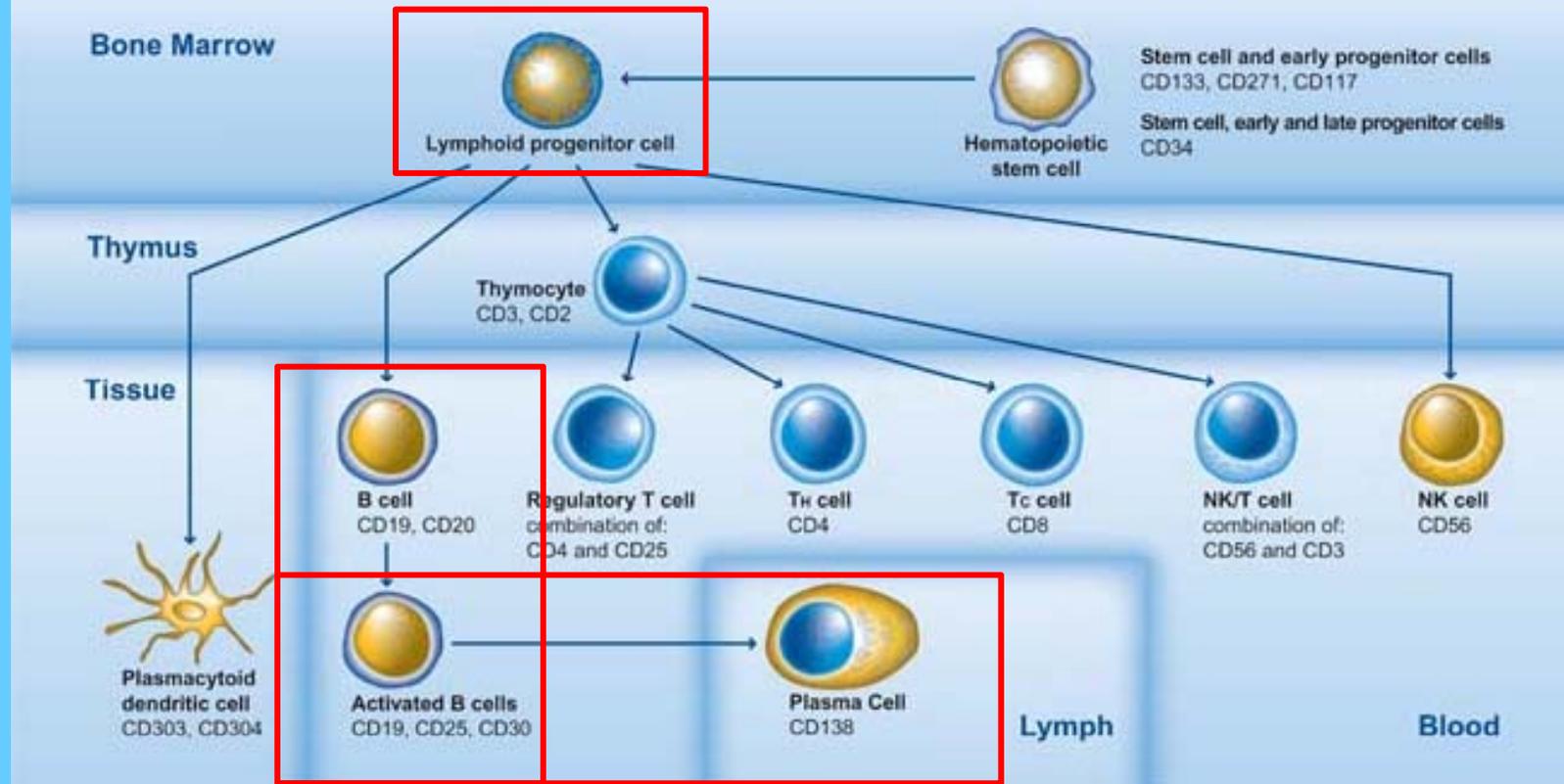


# 特异性免疫的基本过程



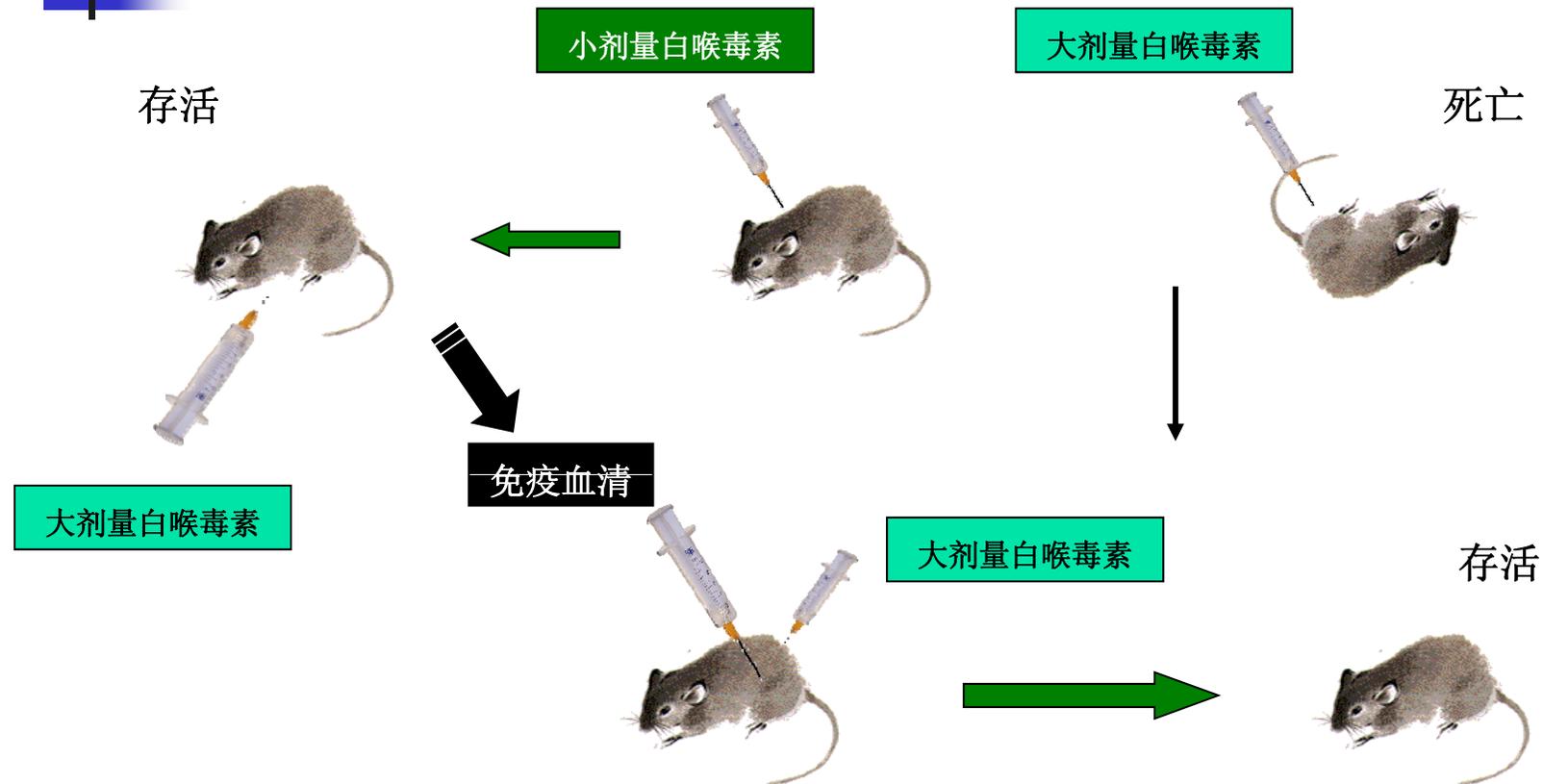
# Immunophenotyping: Lymphoid cell maturation

www.abcam.com

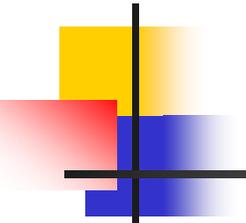


产生抗体或效应性T细胞

- 免疫血清：含有一种称为**抗毒素**的物质，可以凝集细菌，故称凝集素、抗毒素，**called Antibody, Ab**



**The finding of Immunoglobulin, Ig**



Behring因这一伟大发现获**首届**诺贝尔奖，哪年？

---

- **Antibody:** 利用**多肽**或**蛋白**作为抗原，免疫动物，机体受抗原刺激后，**B细胞**分化为**浆细胞**，产生一类免疫球蛋白（**immunoglobulin Ig**）—抗体（**Ab**），存在于**血清**等体液中，能与**相应抗原**特异性地**结合**。
- 在**免疫组化染色**中，通常利用上述特性，用**已知抗体**检测组织切片或细胞中是否存在相应的**抗原**，即**ICC**。
- **Is it possible to detect antibody by ICC?**

## 2. Immunoglobulin Structure

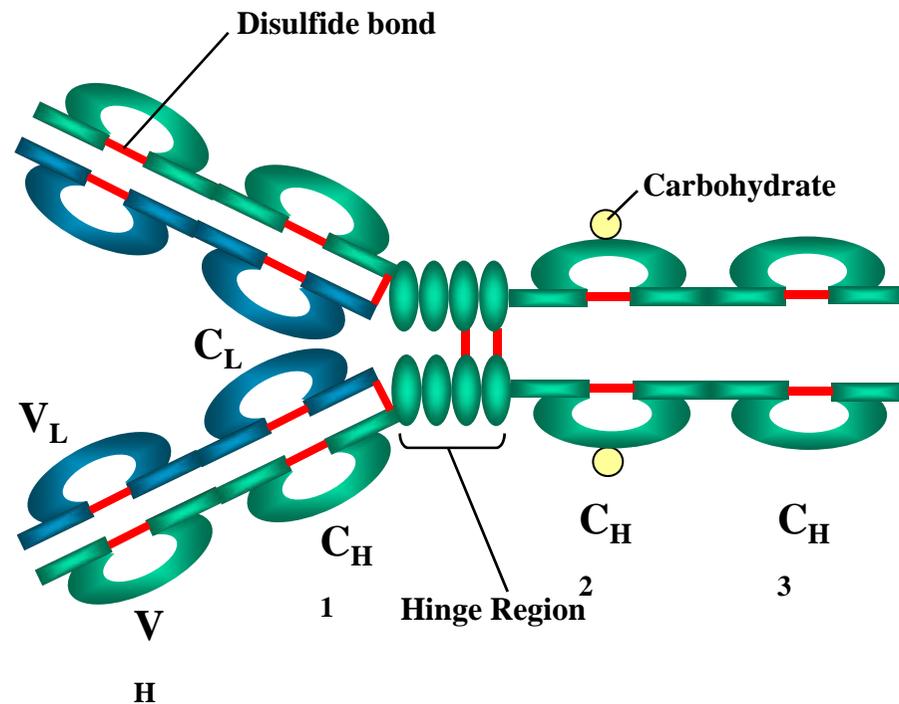
- Variable & Constant Regions

(可变区和恒定区)

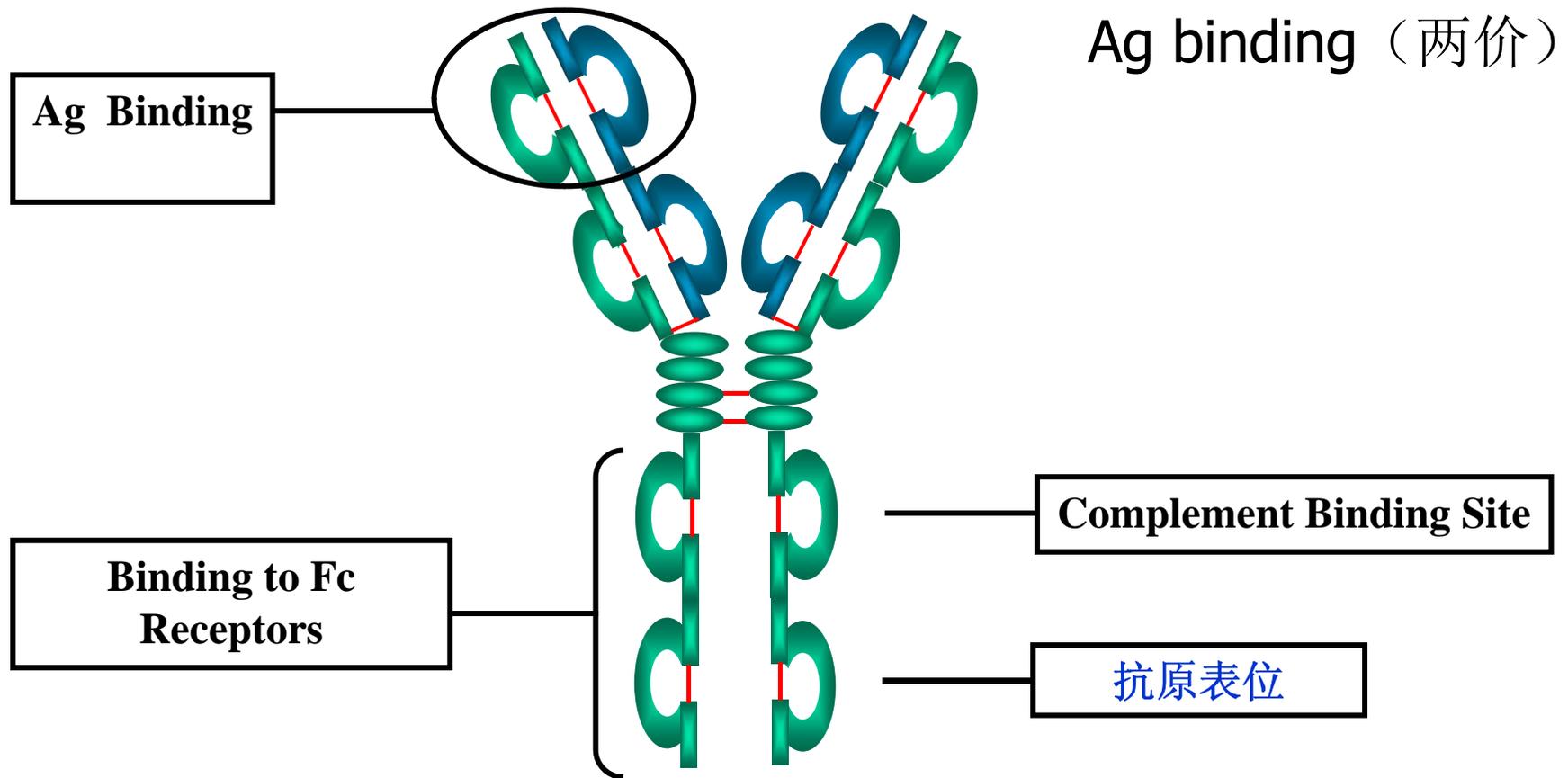
- $V_L$  &  $C_L$

- $V_H$  &  $C_H$

- Hinge Region



# Immunoglobulin Structure



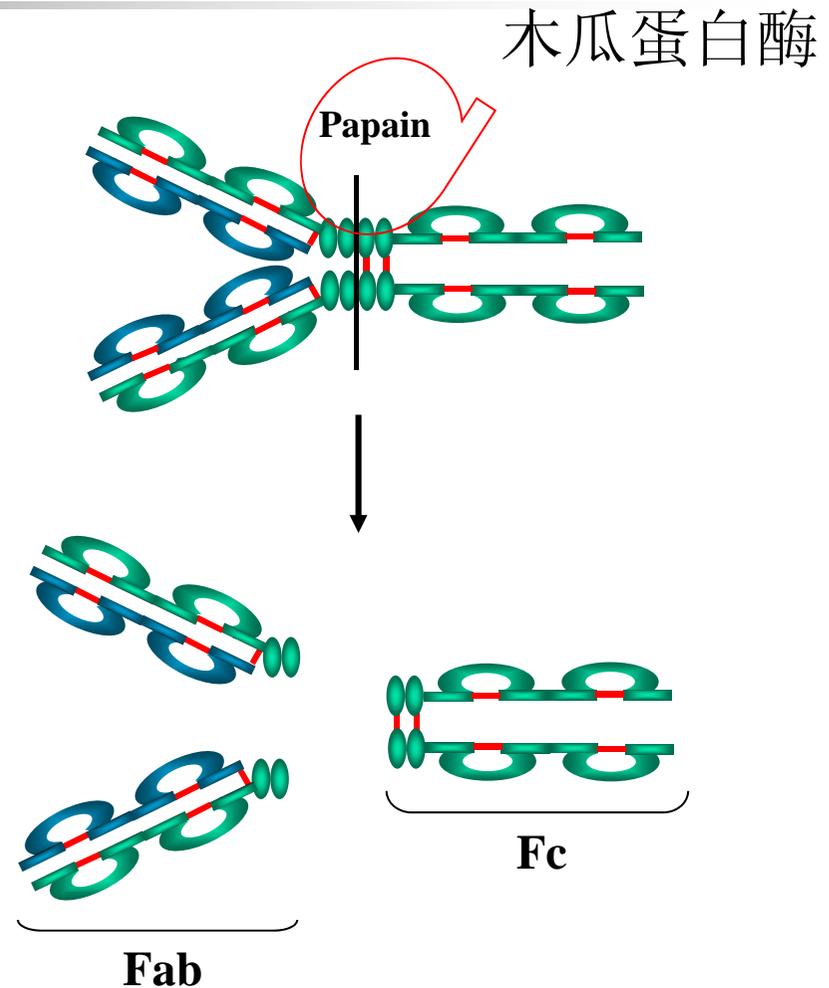
# Immunoglobulin Fragments

## ➤ Fab (抗原结合片段)

- Ag binding
- Valence = 1

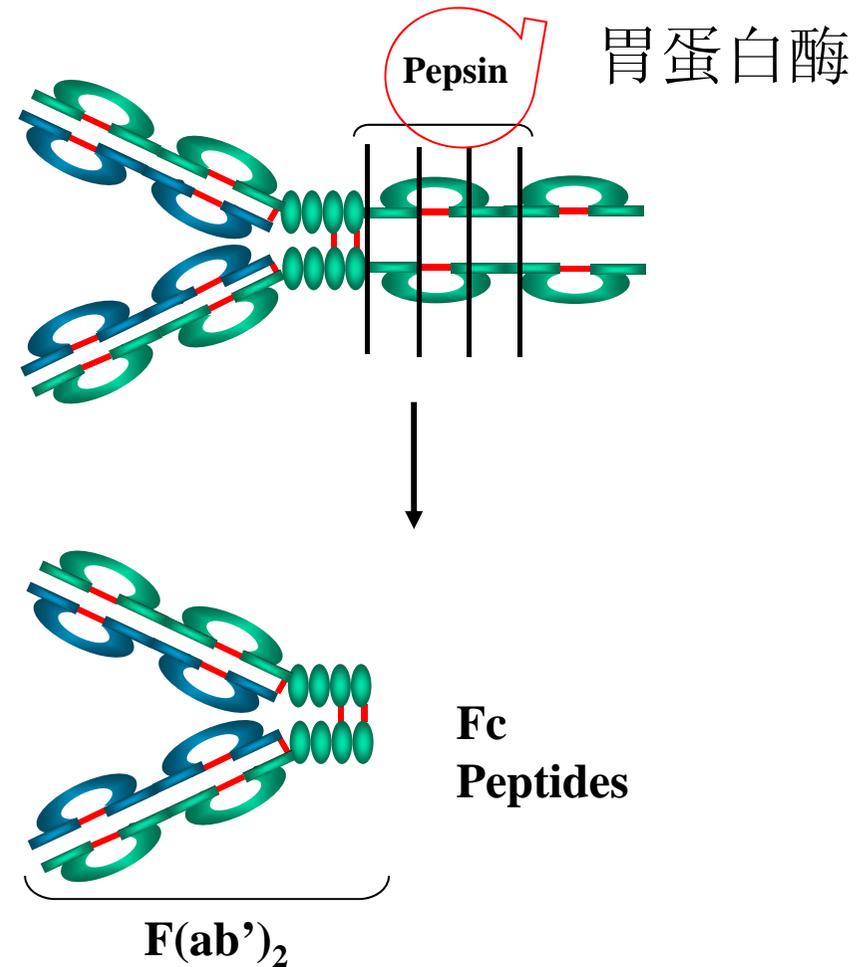
## ➤ Fc (可结晶片段)

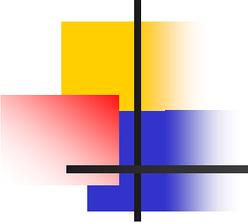
- 具有抗原性



# Immunoglobulin Fragments

- $F(ab')_2$ 
  - Ag binding
- $pFc'$ 
  - 将被继续降解





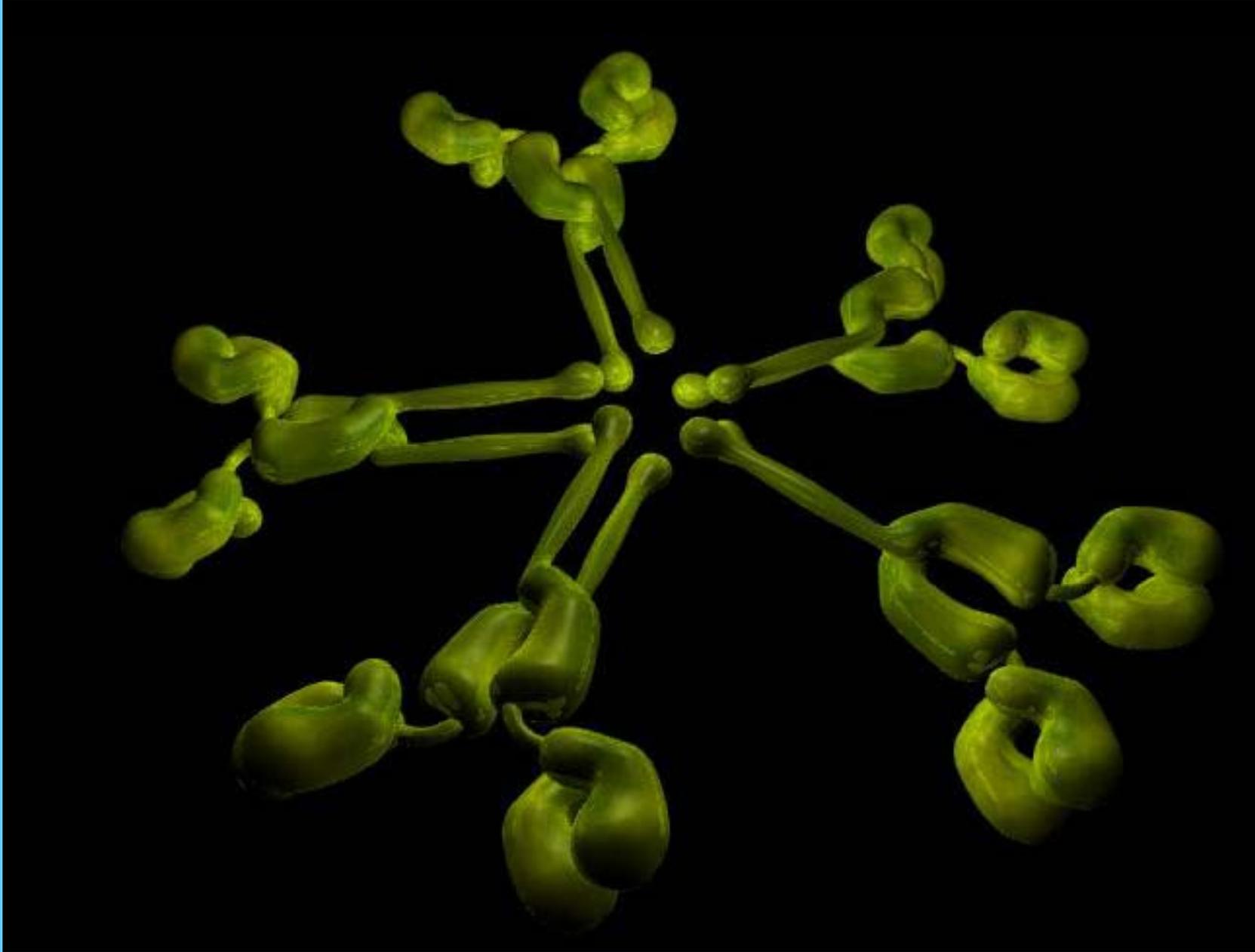
# Immunoglobulin Classification

---

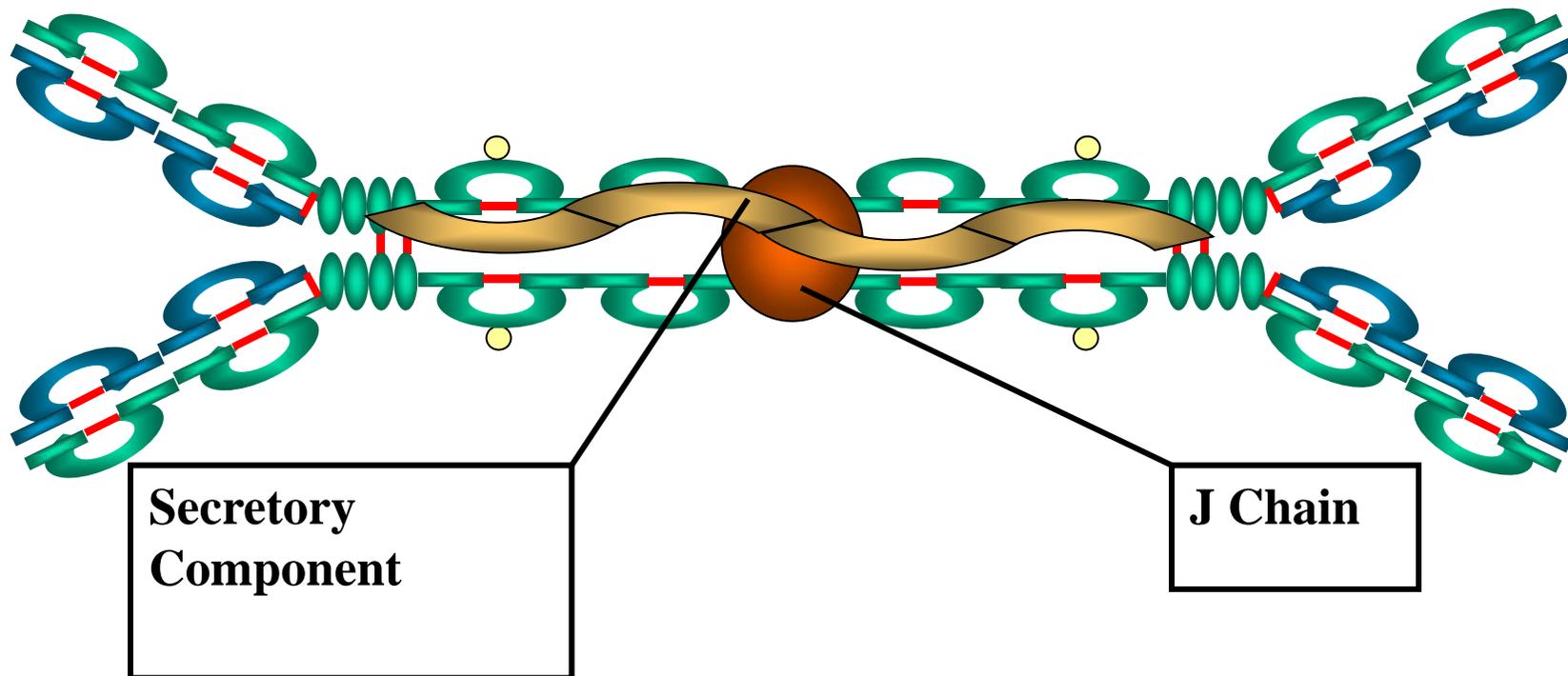
Ig 重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同  
其抗原性也不同，将Ig分为5类

- IgG - Gamma heavy chains ( $\gamma$ 链)
- IgM - Mu heavy chains ( $\mu$ 链)
- IgA - Alpha heavy chains ( $\alpha$ 链)
- IgD - Delta heavy chains ( $\delta$ 链)
- IgE - Epsilon heavy chains ( $\epsilon$ 链)

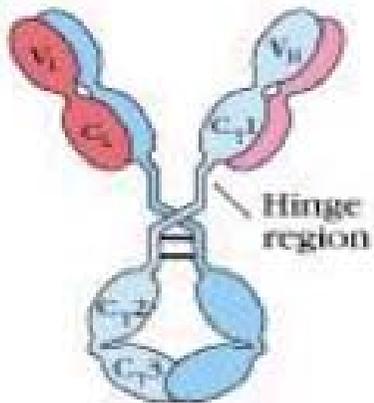
**IgM 含有5个单体。**



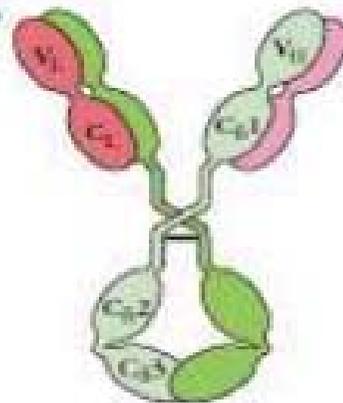
分泌型 IgA含2个单体



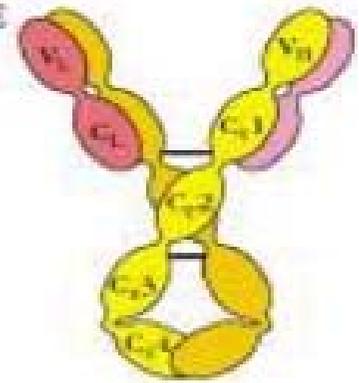
(a) IgG



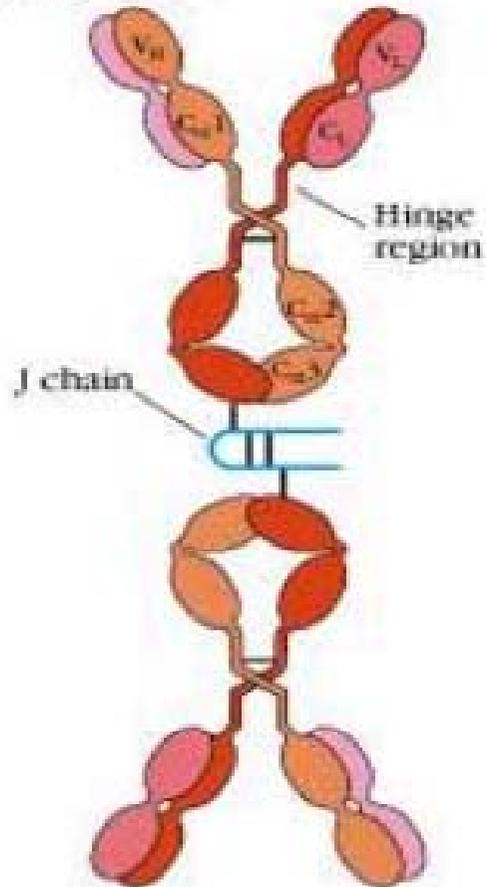
(b) IgD



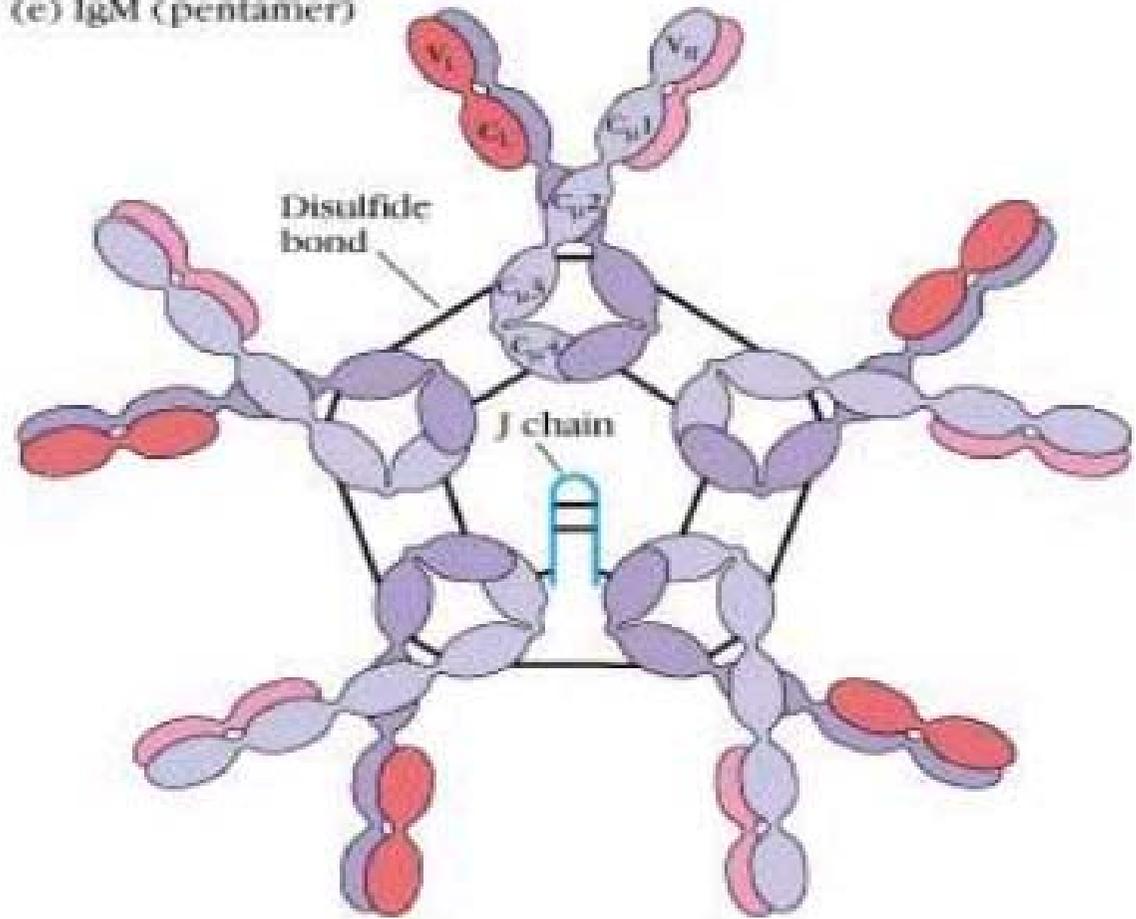
(c) IgE



(d) IgA (dimer)

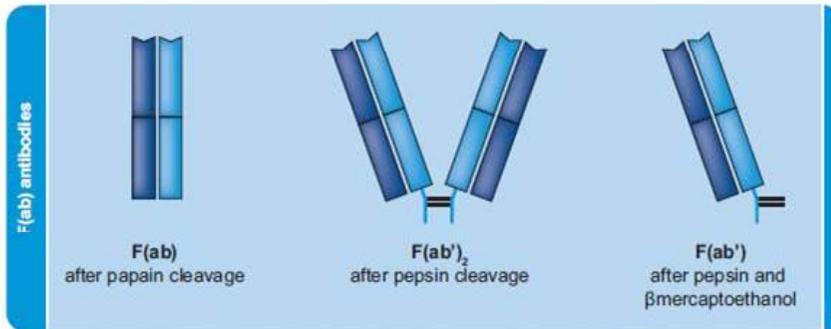
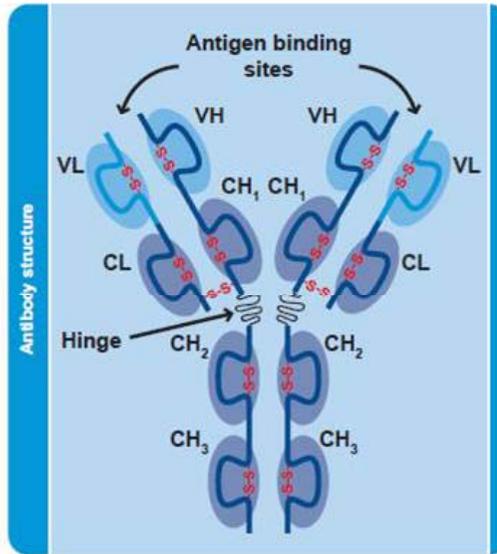


(e) IgM (pentamer)



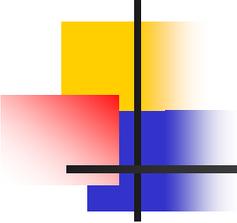
# Antibody structure and F(ab) antibodies

The light chain (LH) folds into a variable domain (VL) and a constant domain (CL) whereas the heavy chain is composed of one variable domain (VH) and three (IgG and IgA) or four (IgE) constant domains (CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>).



The **F(ab) fragment** is an antibody structure that still binds to antigens but is monovalent with no Fc portion. An antibody digested by the enzyme papain yields two F(ab) fragments of about 50 kDa each and an Fc fragment. In contrast, **F(ab')<sub>2</sub> fragment** antibodies are generated by pepsin digestion of whole IgG antibodies to remove most of the Fc region while leaving intact some of the hinge region. F(ab')<sub>2</sub> fragments have two antigen-binding F(ab) portions linked together by disulfide bonds, and therefore are divalent with a molecular weight of about 110 kDa.

Ig	形式	价数
IgG	单体	2
IgA	双体	4
IgM	五聚体	10
IgD	单体	2
IgE	单体	2



# Immunoglobulin Subclasses

---

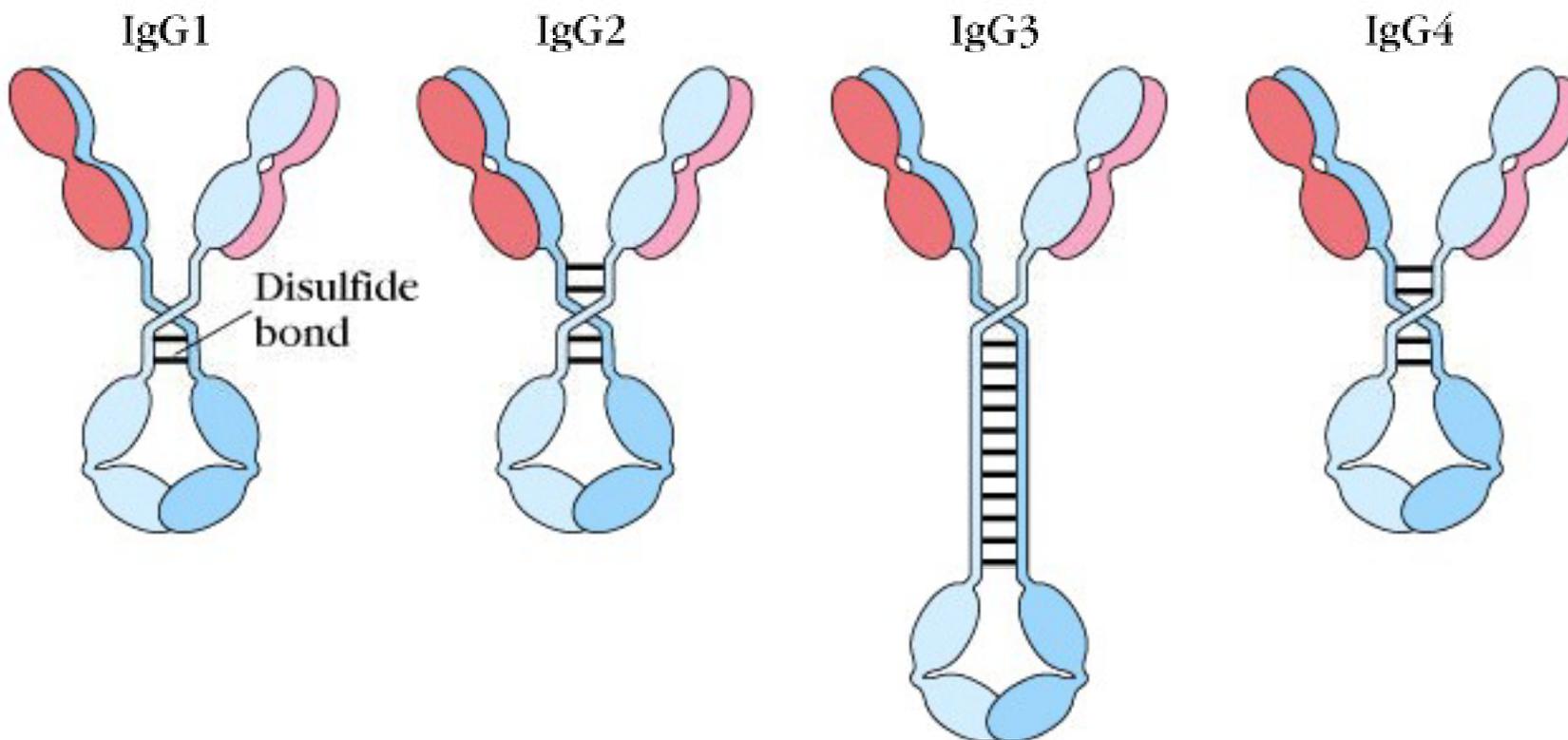
## ➤ IgG Subclasses

- IgG1 - Gamma 1 heavy chains
- IgG2 - Gamma 2 heavy chains
- IgG3 - Gamma 3 heavy chains
- IgG4 - Gamma 4 heavy chains

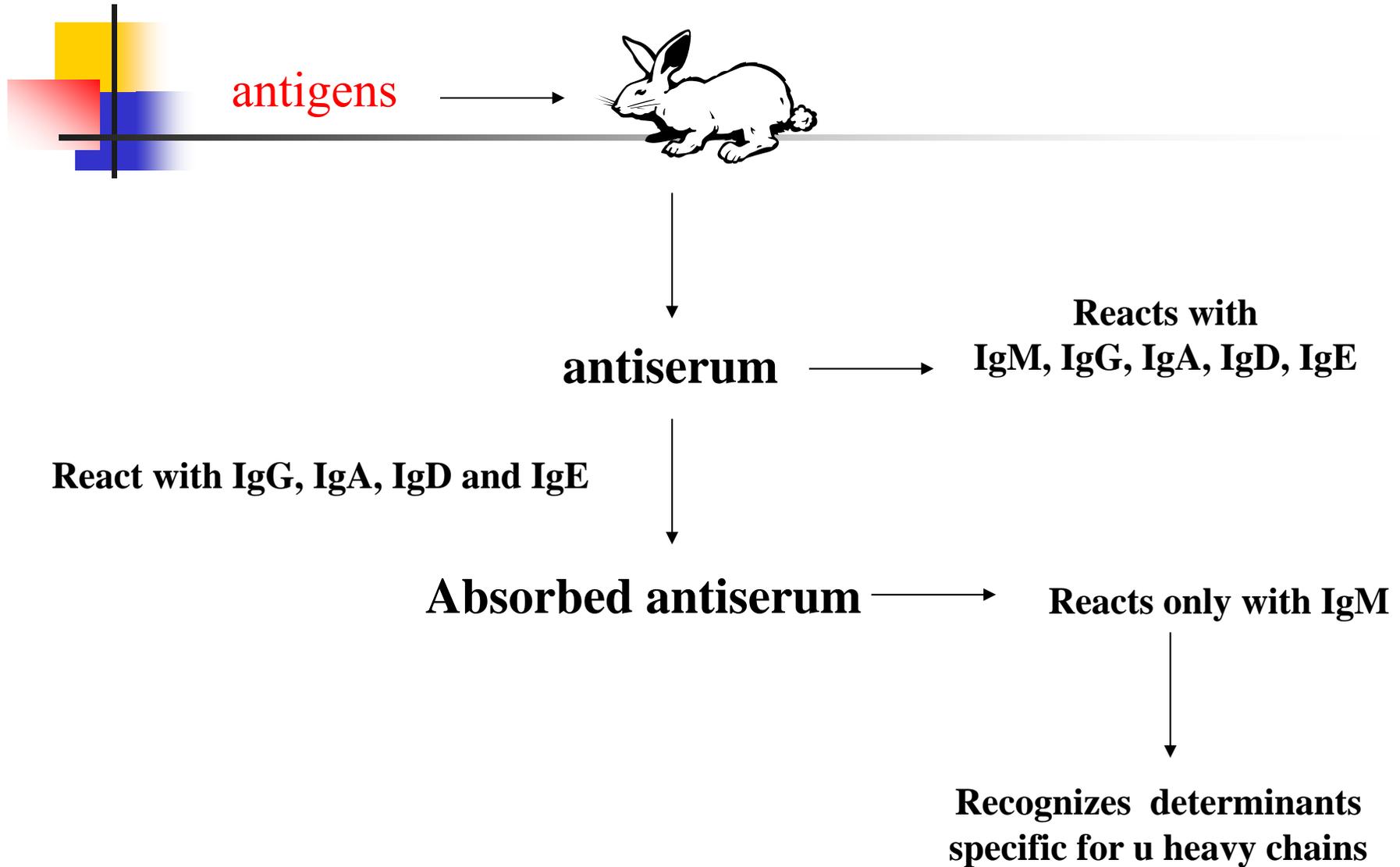
## ➤ IgA subclasses

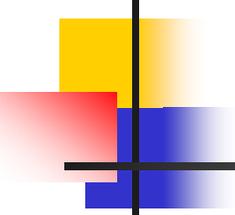
- IgA1 - Alpha 1 heavy chains
- IgA2 - Alpha 2 heavy chains

根据**铰链区氨基酸组成**和**重链二硫键的数目**  
和**位置**的差别,同一类**Ig**分为不同的亚类:



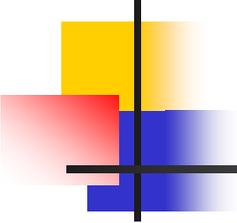
# Prepare Immunoglobulin Isotypes





## **Classification:** 多克隆抗体和单克隆抗体

➤ 多克隆抗体(**Polyclonal antibody**) 用抗原免疫动物, 刺激多个**B**细胞产生针对**不同抗原表位**的抗体, 即多克隆抗体, 即含有**针对不同表位产生的抗体**, 并含有**IgM, IgG, IgA, IgD, IgE**多种抗体。存在于血清中, **Thus, serum** 属于多克隆抗体, 也称**抗血清**。

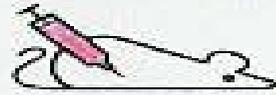


## Monoclonal Antibody

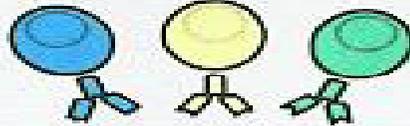
---

- **1975年 Milstein与Kohler**首创了小鼠**B**淋巴细胞杂交瘤制备单克隆抗体  
(**Monoclonal Antibody mAb**) 技术

用抗原免疫小鼠



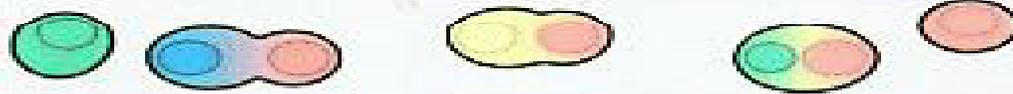
免疫脾细胞



骨髓瘤细胞



在PEG作用下融合成杂交瘤细胞



HAT培养基筛选



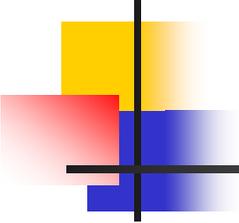
杂交瘤细胞增殖，未融合细胞死亡

筛选产生特异性抗体的杂交瘤细胞



克隆化，制备单克隆抗体





## 基本原理

---

- 杂交瘤 (hybridoma) 细胞：由两种类型的体细胞融合形成。
  - 小鼠骨髓瘤细胞在体内、外可无限增殖，但不能分泌抗体。
  - 经抗原免疫的小鼠脾细胞能产生抗体，但在体外不能无限增殖。

## 补救合成途径

次黄嘌呤  
鸟嘌呤



胸腺嘧啶  
核苷



**HGPRT:** 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (脾细胞含有)

**TK:** 胸苷激酶

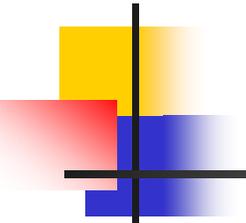
**HAT:** 含次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷的培养基

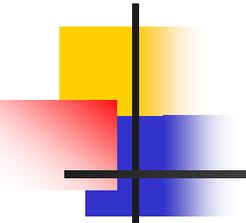
## 从头合成途径

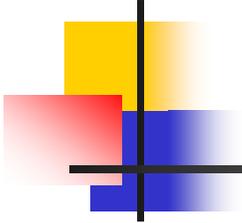
氨基喋呤  
HAT

核苷酸

核酸

- 
- 
- **未融合的脾细胞**因不能在体外存活而死亡；
  - **未融合的骨髓瘤细胞**合成DNA的主要途径被氨基喋呤阻断，又因缺乏HGPRT, 不能利用次黄嘌呤完成DNA的合成过程而死亡；
  - 融合细胞由于从脾细胞获得HGPRT ，故能在HAT培养基中存活和增殖。

- 
- 融合后的杂交细胞系称为杂交瘤细胞；
  - 骨髓瘤细胞**无限增殖**的特性和**B细胞合成和分泌**抗体的能力；
  - 由一个**B细胞**融合而产生的克隆，仅识别**一种抗原表位**，该杂交瘤细胞产生的抗体，称为单克隆抗体（**monoclonal antibody, mAb**）
  - **1975年 Milstein与Kohler**
  - **与Jerne 共同分享了1984年诺贝尔奖。**



杂交瘤细胞

培养上清

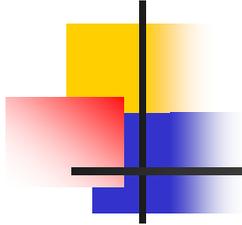
腹水

## mAb特点和应用

**特点：**性质纯、效价高、特异性强

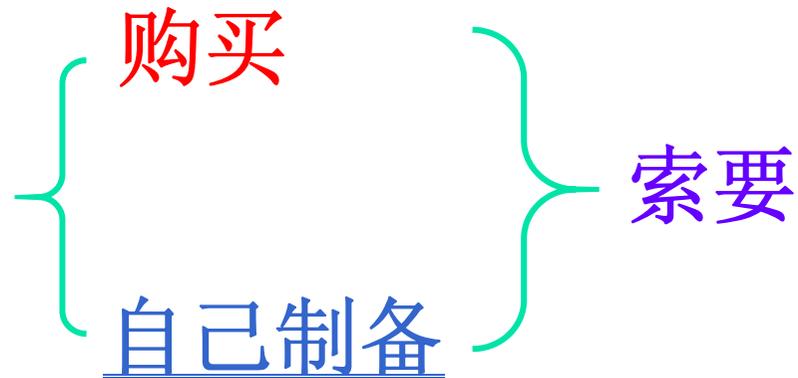
**应用：**

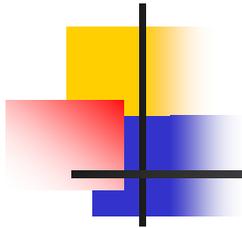
**检测抗原；**与抗癌药物、毒素或放射性物质偶联可制成**生物导弹**；用抗T细胞、抗IL-2R的mAb可防治器官**移植排斥**反应。



If you prepare to deal out the ICC in your work, you should make choose antibody first!

**Where could you get an antibody?**





单抗：不需要纯化抗原，但耗时、费力

多抗：必须纯化抗原，否则**cross-reaction**

方法诸多，参照蛋白的分离纯化

自制抗体

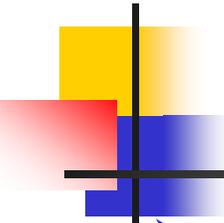
已知抗原免疫

抗原丰富、纯度高

抗原少则需纯化

半抗原还需偶联剂连接在载体上

基因工程制备抗体



## 3. Definition of Antigen

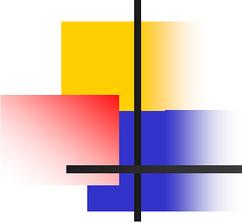
---

➤ **Antigen** : a substance that react with TCR/BCR and have the potential to induce a specific immune response, 并能与其产生的效应分子 (antibody) 或效应细胞 (Tc, CTL) 在体内外发生特异性反应的物质, 又称**免疫原 (immunogen)**

**Immunogenicity** (免疫原性) :

刺激机体产生免疫应答的特性;

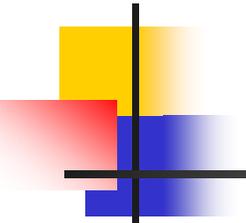
**抗原性 (antigenicity)** : 与抗体或效应 T 细胞发生特异性结合的能力, 又称**免疫反应性 (immunoreactivity)**



# 决定抗原免疫原性的因素

---

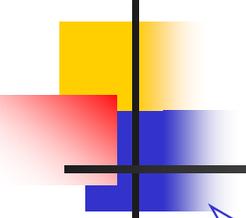
- 异物性 (Foreignness)
  - 免疫系统具有区分“自我”与“非我” Self and non-self 的能力。一种物质要能成为抗原，首先必须要能够被免疫系统所识别。
  - 异物性 是指抗原与所刺激机体的自身正常物质在组成及结构上的差异性，是决定免疫原性的最根本的条件。
  - 异种物质 > 同种异型物质 > 自身成分



➤ 完全抗原: **immunogen**和**antigenicity**

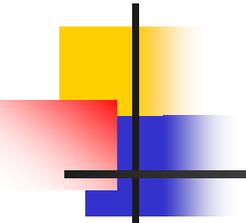
---

- **Hapten**（半抗原）有**抗原性**而无免疫原性的物质；**单独不引起抗体产生**，与蛋白质胶体颗粒（载体）结合后，可诱使抗体形成。**Note: 蛋白质**使其具有免疫原性，而**半抗原**则决定抗原特异性。
- **Carrier**（载体）与半抗原结合而赋予其免疫原性



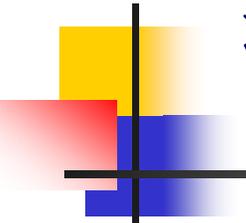
## 抗原特异性的分子基础

- 抗原与抗体的结合具有高度特异性
- 特异性是由抗原分子中一些特殊的化学基团（抗原决定簇(antigen determinant) ,也称抗原表位 (epitope) 所决定，而非整个抗原分子决定
- Conformation 很重要
- 抗原结构的旋光度也与抗原特异性有关



- **抗原决定簇**(antigen determinant)

- 是抗原分子中一些特殊的化学基团，与 **TCR/BCR** 及抗体特异性结合的基本结构单位，其**性质**、**数目**和**空间构型**决定了抗原的特异性。
- 抗原决定簇又称 **表位** (epitope)
- **Size 4-8 residues**
- 多抗与单抗的敏感性存在差异



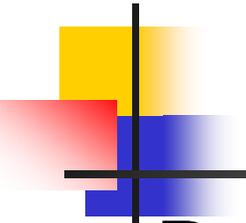
## 动物的选择：成年、健康、雄性

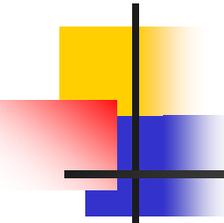
---

- Genetics
- Species
- Individual
- 宿主的状态：健康、营养、年龄等因素

### 抗原的剂量和进入途径

非经口途径一般是有效的免疫途径。

- 
- **Dose** 应在一定时间内连续免疫2~3次，用动物制造抗血清或抗体时，追加免疫注射，注射剂量、途径、间隔均需严加注意，以免动物发生死亡。
  - **Route** 与抗原在体内滞留的时间有关
    - **Subcutaneous > muscle > Intravenous > Intra gastric**
  - **Adjuvant(佐剂)**
    - **Substances that enhance an immune response to an Ag**

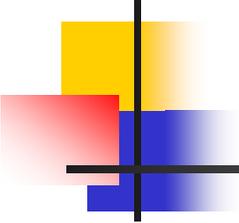


**Adjuvant**：非特异性的免疫增强剂。与抗原一起注射或预先注入机体时，可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型的微生物及其产物。

不完全(或完全)弗氏佐剂(**Freund adjuvent**)

### ➤ 作用机制

- 增加抗原滞留时间；
- 增加**APC**的抗原呈递能力；
- 刺激淋巴细胞的增殖分化

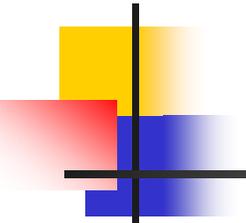


## ■ 种类

---

- 生物性：BCG、LPS
- 无机化合物：明矾
- 人工合成：poly
- 矿物油
- CFA等

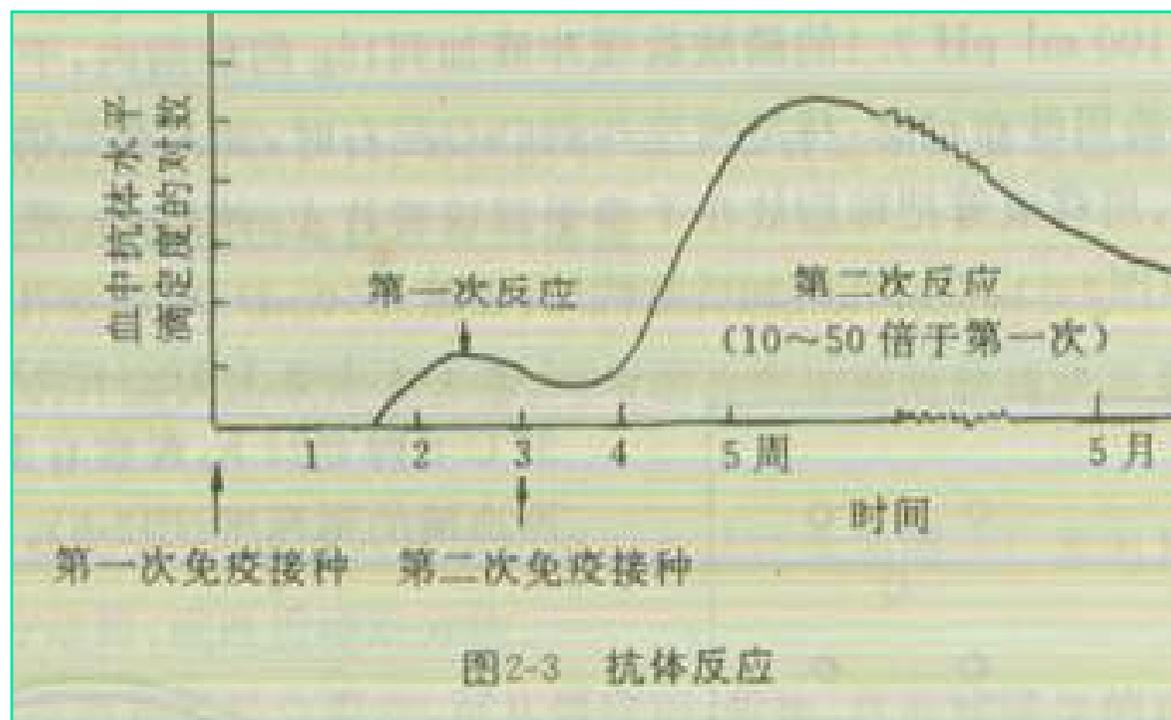
**Frendud Adjuvant: 200mg BCG、15m  
羊毛脂、85ml优质石蜡与等体积混合后使用**

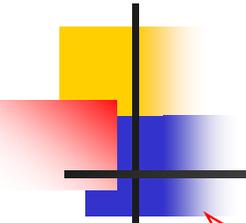


## 免疫反应过程:

- **致敏阶段**: 将加工处理抗原传递给免疫活性细胞, 启动免疫反应。
- **反应阶段**: 抗原信息刺激淋巴细胞后, 母细胞化, 大量增殖。
- 刺激 **Thymus-dependent lymphocytes** 分化成致敏淋巴细胞, 而 **Thymus independent lymphocytes** 或 **Bone marrow derived lymphocytes** 分化成浆细胞

➤ 效应阶段：当致敏淋巴细胞再次遇到相应抗原刺激后，释放多种生物活性物质，参与细胞免疫反应；浆细胞可形成各种类型的免疫球蛋白，参与体液免疫反应。

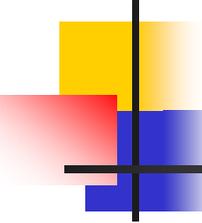




## 抗体的鉴定

---

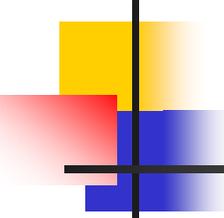
- 抗血清的效价检测：放免和双向扩散，**ELISA**
- 特异性测定：针对相应抗原和近似抗原的识别能力。特异性强、而交叉反应低为佳。  
**亲和力**：即与抗原结合的牢固度（高和低）
- 抗体是否具有免疫原性和反应性？
- 将小鼠的Ig免疫兔，能否获抗小鼠Ig的Ab？



## 4. Immunofluorescence staining

---

- Coons等于1941年首次报道了用荧光素标记抗体检测肺炎双球菌，开创了免疫荧光染色的新篇章。
- 随着科学技术的发展，荧光色素种类和质量增加，标记抗体检测组织细胞内抗原，即免疫荧光细胞（组织）化学。
- 近年，激光技术、电子计算机等技术的迅猛发展，免疫荧光细胞化学发展为激光共聚焦荧光显微镜定量技术；



# Immunofluorescence staining

---

- 与图像分析结合使免疫荧光染色的定量检测更加准确。
- 荧光激活细胞分类（FACS）的应用使该技术发展至更高阶段，开创了该技术的新领域，细胞分选技术。
- **Tissue FAXS: The equivalent to flow cytometry in tissue, Microscope-based cell analysis system for cells in tissue sections and smears** —— 半定量免疫组化类流式细胞分析技术。

# Antibody with antigen binding, 镜下如何识别?

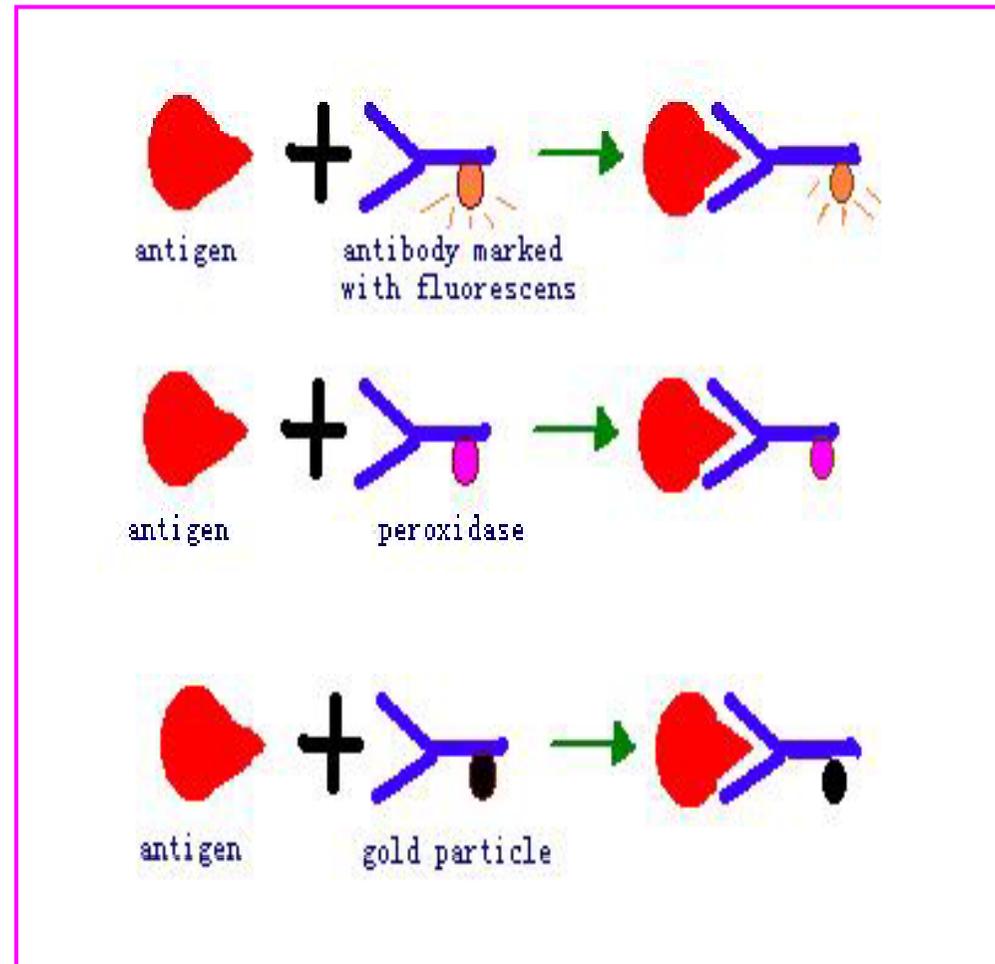
## Labeling markers

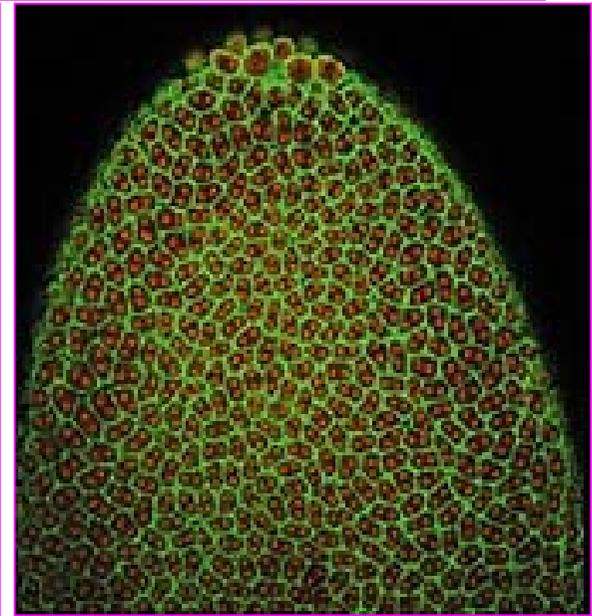
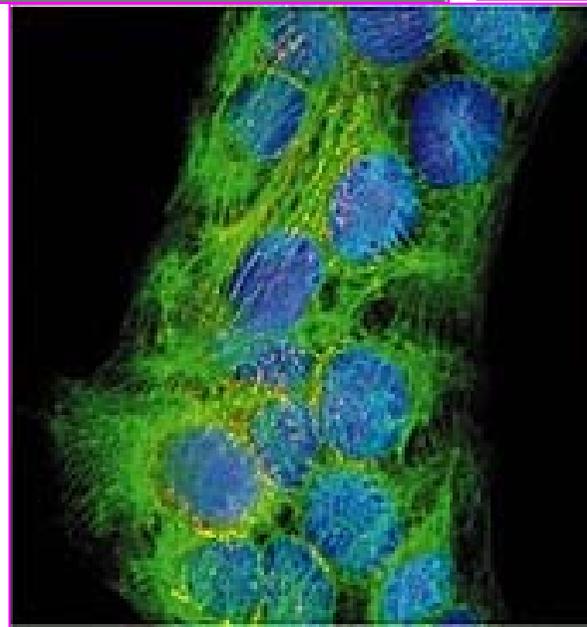
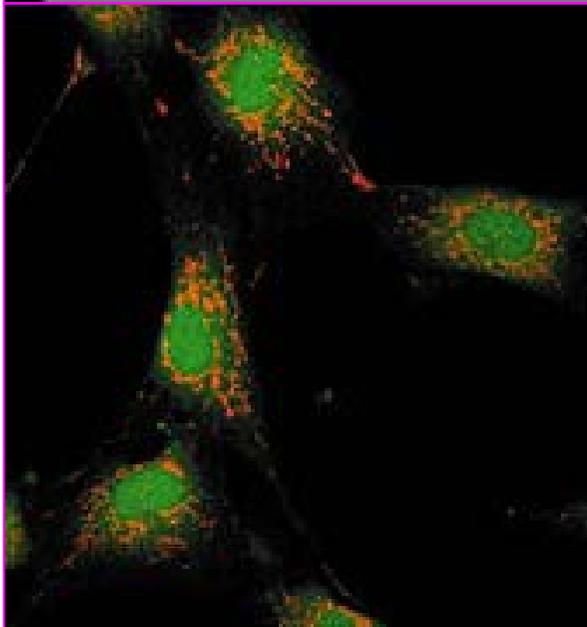
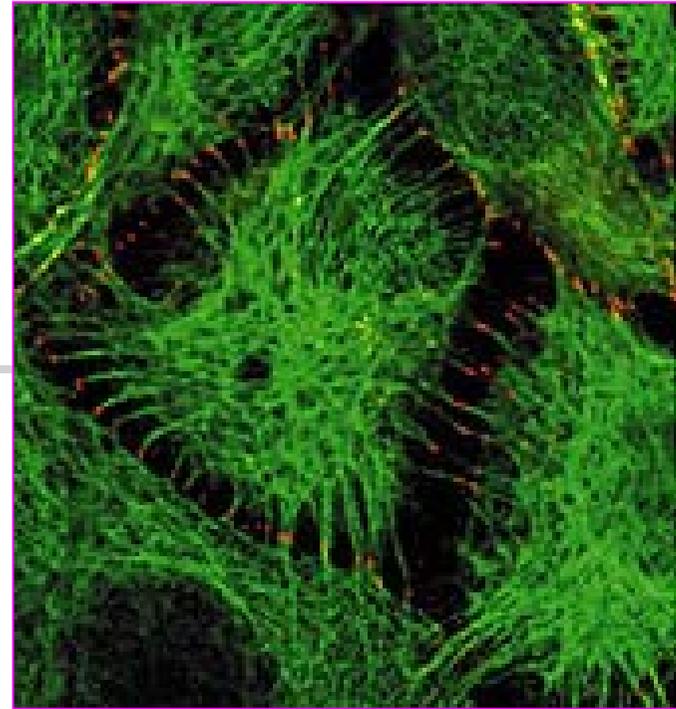
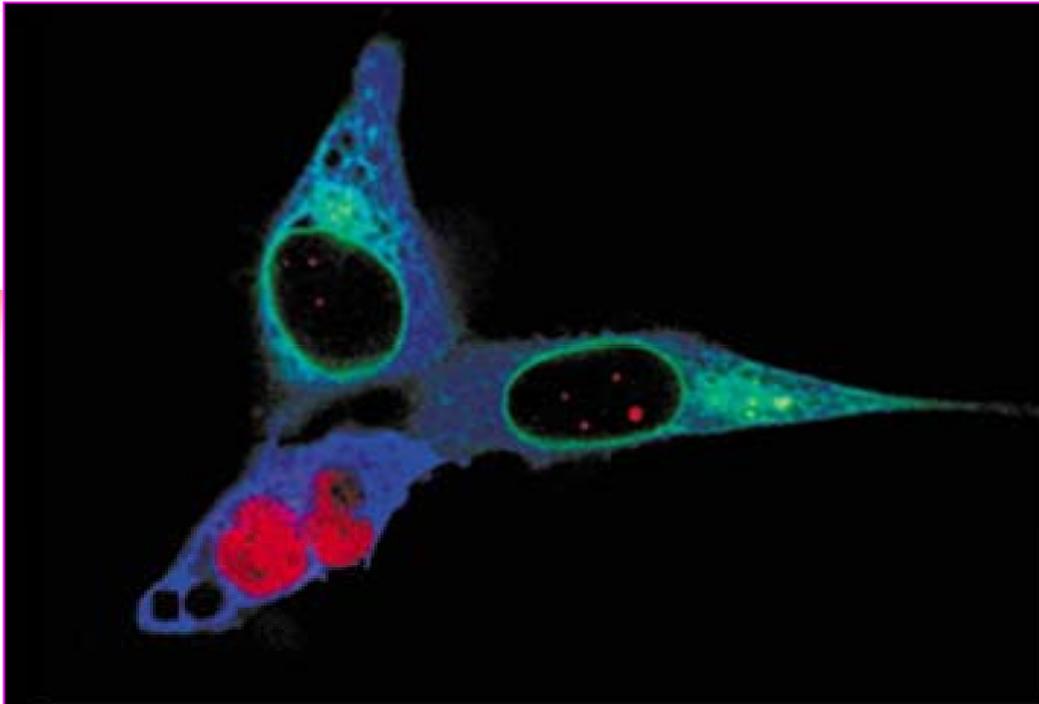
**Principle:** Using a labeled antibody to reveal an antigen in the tissue/cells

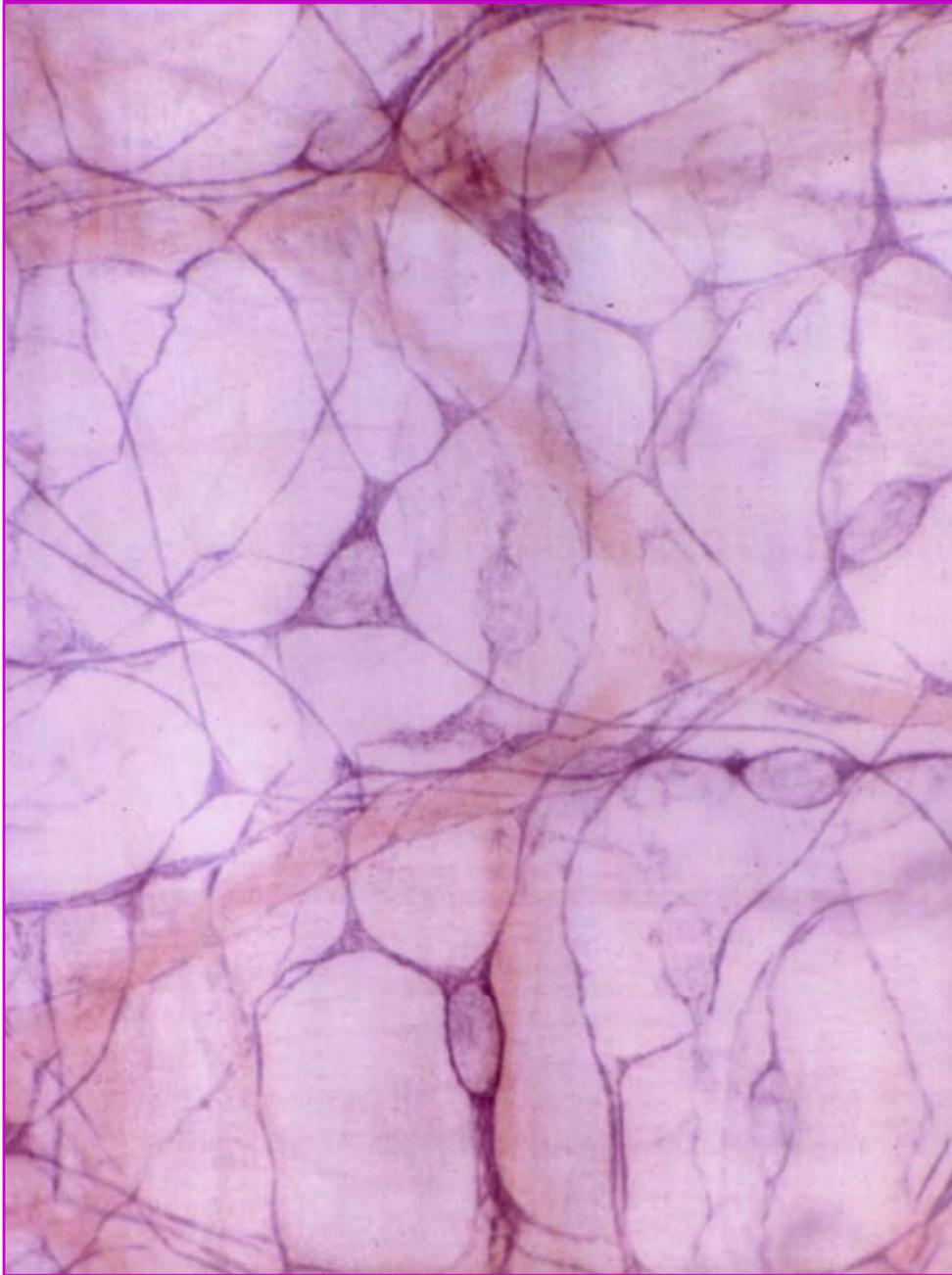
fluorescence

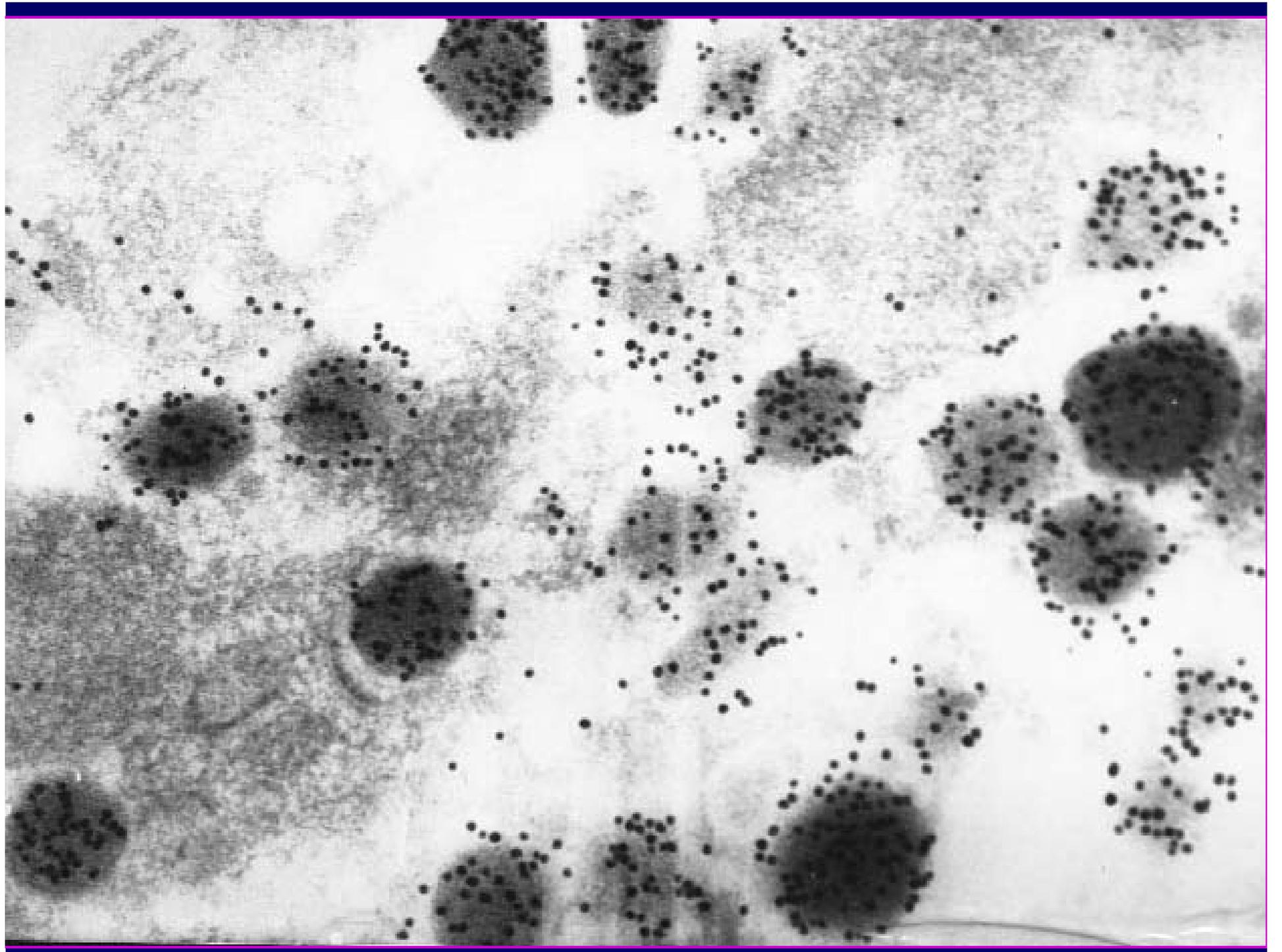
peroxidase

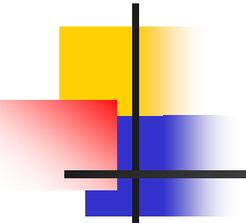
gold particle











# Fluorescence markers

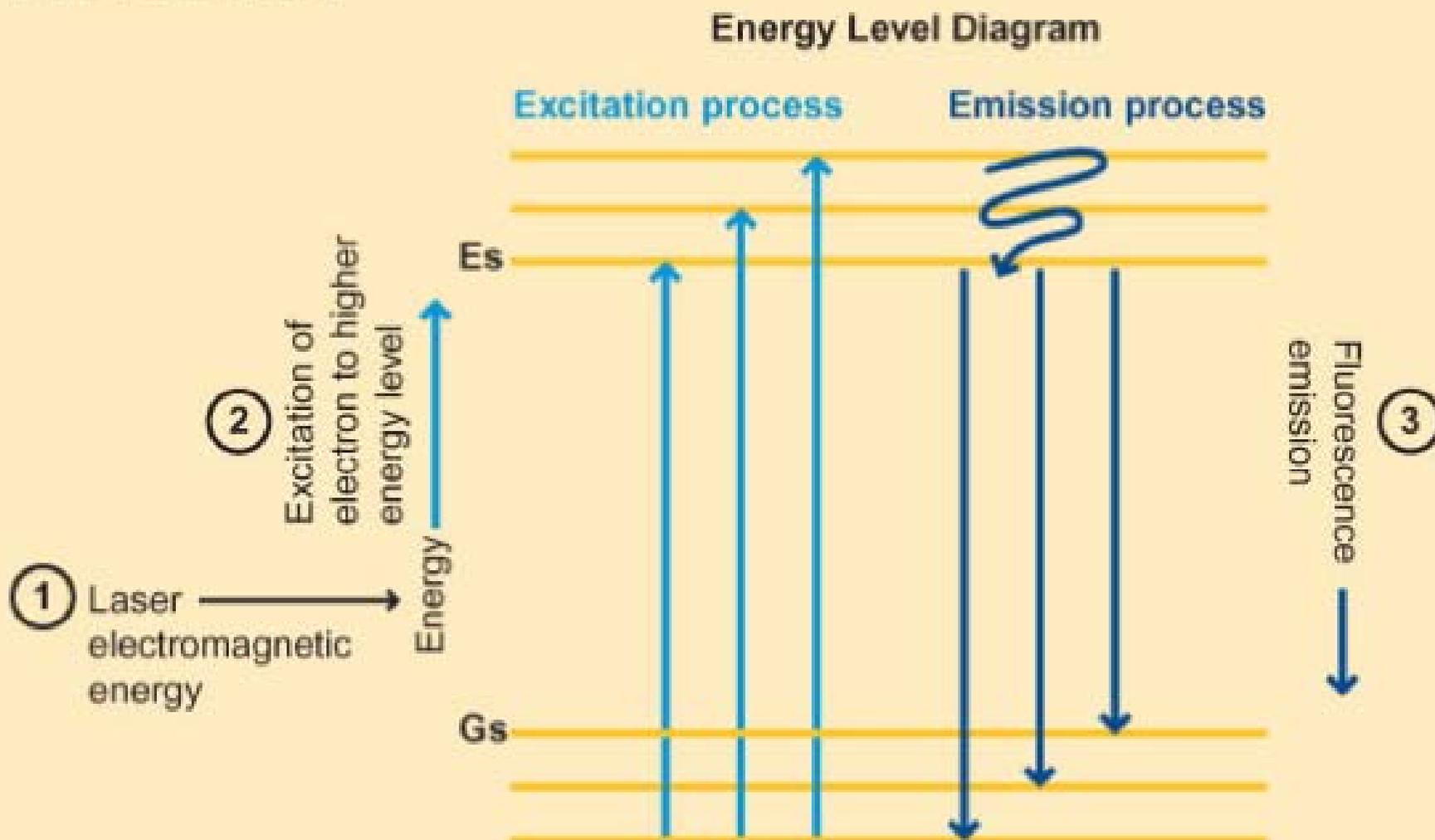
---

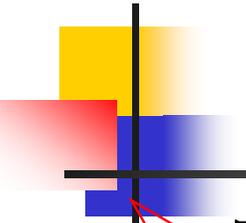
★ **荧光素**：可以产生**明亮荧光**的染料物质，称**荧光色素**，是指一个分子或原子吸收了给予的能量后即刻引起发光，一旦停止能量供给，发光也**瞬时停止**（一般持续 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 秒）；**荧光素**由具有吸收一定频率光能的生色团和产生一定光量子的荧光团组成。

- **要求**：荧光素与抗体结合后，不影响抗原、抗体的免疫活性
- **优点**：制备的荧光标记抗体与组织内的抗原结合形成不同颜色的激发荧光。
- **不足**：荧光存在的时间短，易猝灭。

# Fluorescence – how it works

## Fluorescence:





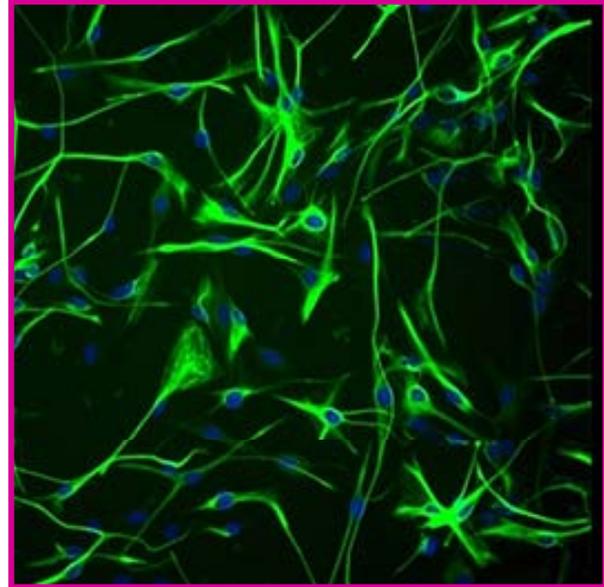
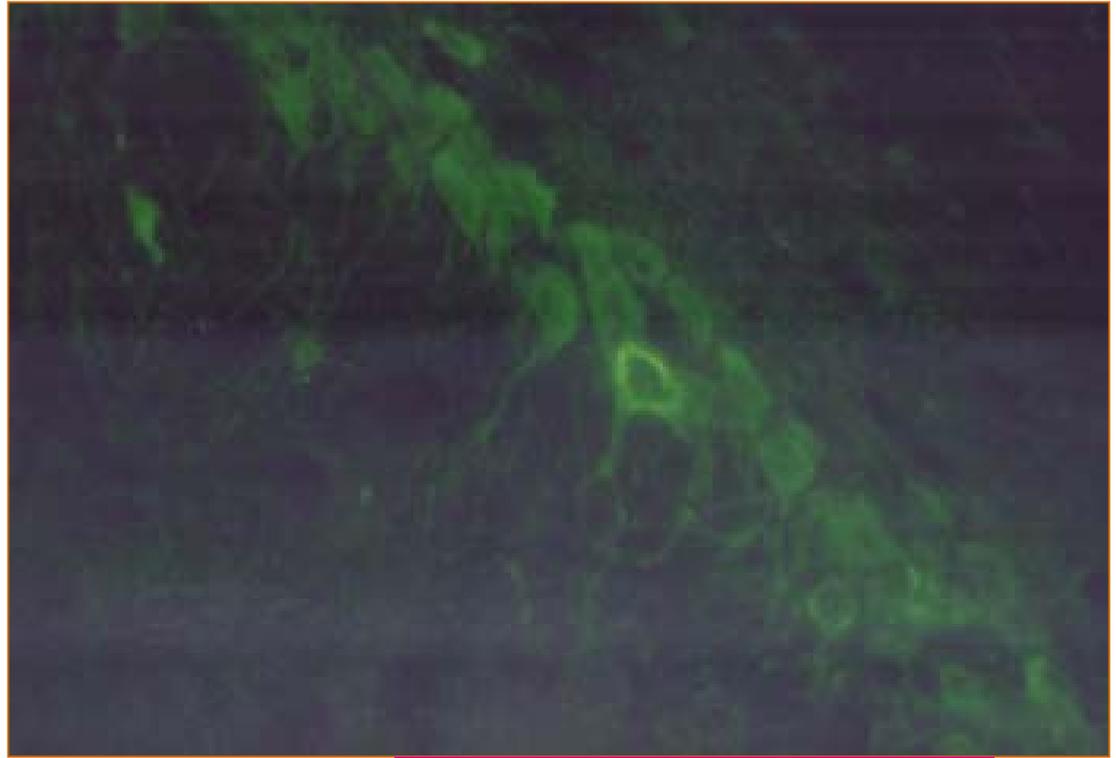
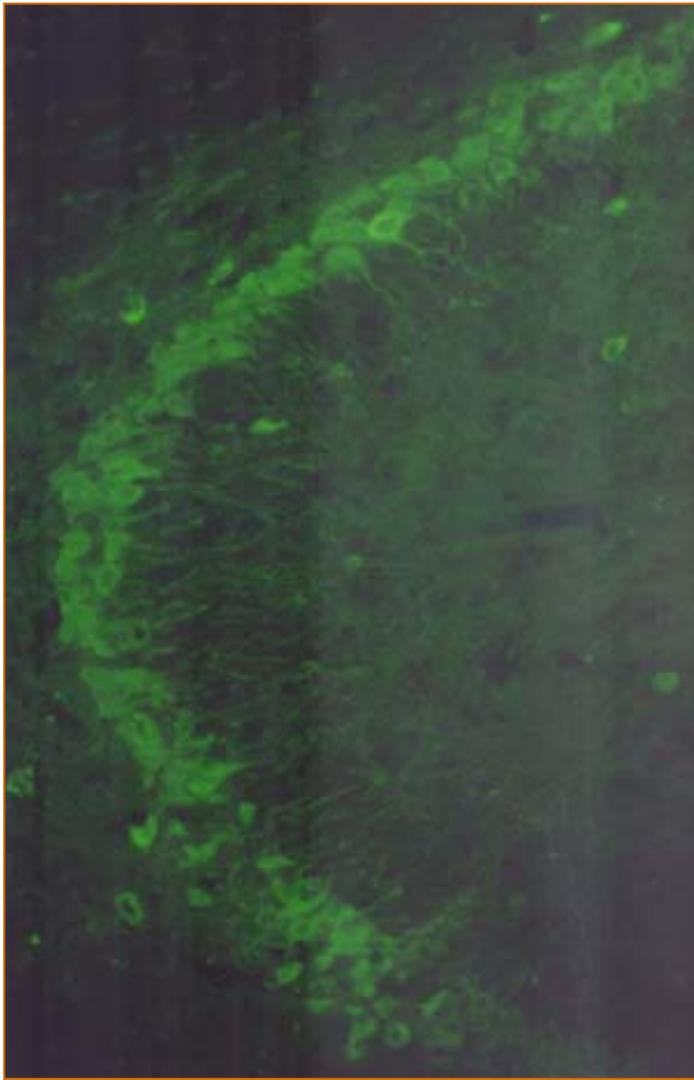
## 荧光素

➤ 异硫氰酸荧光素 (**Fluorescein isothiocyanate, FITC**)

➤ **性质**: 分子量为**389.4**, 呈黄色、橙黄或褐黄色粉末, 稳定, 室温保存两年以上; 低温可保存多年。易溶于水和酒精。最大吸收光谱 (**490~495nm**), 最大发射光谱 (**520~530nm**), 呈**黄绿色荧光**。

➤ **原理**: 在碱性水溶液中, **FITC**的**异硫氰酸基**与**Ig**的**氨基**经**碳酰胺化**, 形成**硫碳氨基键**, **FITC**标记在**Ig**上, 所谓的**荧光素标记抗体** (多用于标记**二抗**)。

➤ **特点**: 一个**IgG**分子最多能标记**15~20**个**FITC**分子。



分子量：389.4/15~20个FITC分子

➤ **四甲基异硫氰酸罗达明 (tetramethylrodamine isothiocyanate, 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；常与FITC配伍用于双标

➤ **四乙基罗达明 (tetraethylrodamine B200, RB200)** 分子量为**580**，褐红色粉末，不溶于水，易溶酒精和丙酮；性质稳定，可长期保存。最大**吸收光谱**为**570 nm**，最大**发射光谱**为**595~600 nm**，呈明亮**橙色**荧光。此两物质与**Ig**结合方式**同FITC**

- 花青类染料 **cyanine dyes**: 以Cy2, Cy3,Cy5最为常用  
Cy3绿色或红色荧光; 而Cy5红色荧光。
- 该类荧光物质与传统的荧光素类似, 但水溶性好, 对光  
相对稳定, 标本可以较长期保存
- Cy2 最大吸收/发射光为492 nm/510 nm为绿色荧光, 与  
FITC相比, 荧光强、稳定、抗淬灭强等。
- Cy3 最大吸收/发射光为550 nm/570 nm为绿色荧光, 但  
在绿色光波长512 nm激发下, 亦可发红色615 nm荧光。
- Cy5最大吸收/发射光为649 nm/680 nm, 呈红色荧光,  
不能裸眼观察, 普通荧光显微镜并非理想的激发光源, 主  
要用于激光共聚焦显微镜。

➤ **Alexa Fluor** 系列：美国分子探针实验室开发的系列荧光染料，高亮度，稳定性好，水溶性好等颇受欢迎。

➤ 该类荧光染色后面的数字代表的激发波长

➤ 如**Alexa Fluor350**，最大吸收/发射光波长为**346 nm/442 nm**为**兰色荧光**；**Alexa Fluor500**，最大吸收/发射光波长为**502nm/525 nm**，为**绿色荧光**；**Alexa Fluor660**，最大吸收/发射光波长为**563 nm/590 nm**，为**红色荧光**。

➤ **DyLight Fluor**，由**dyomics**与**赛默飞**等合作开发的系列荧光染料，具有**荧光强度高、稳定、分子量小、渗透好**等优点，最大吸收/发射光谱均在合理范围，常用。

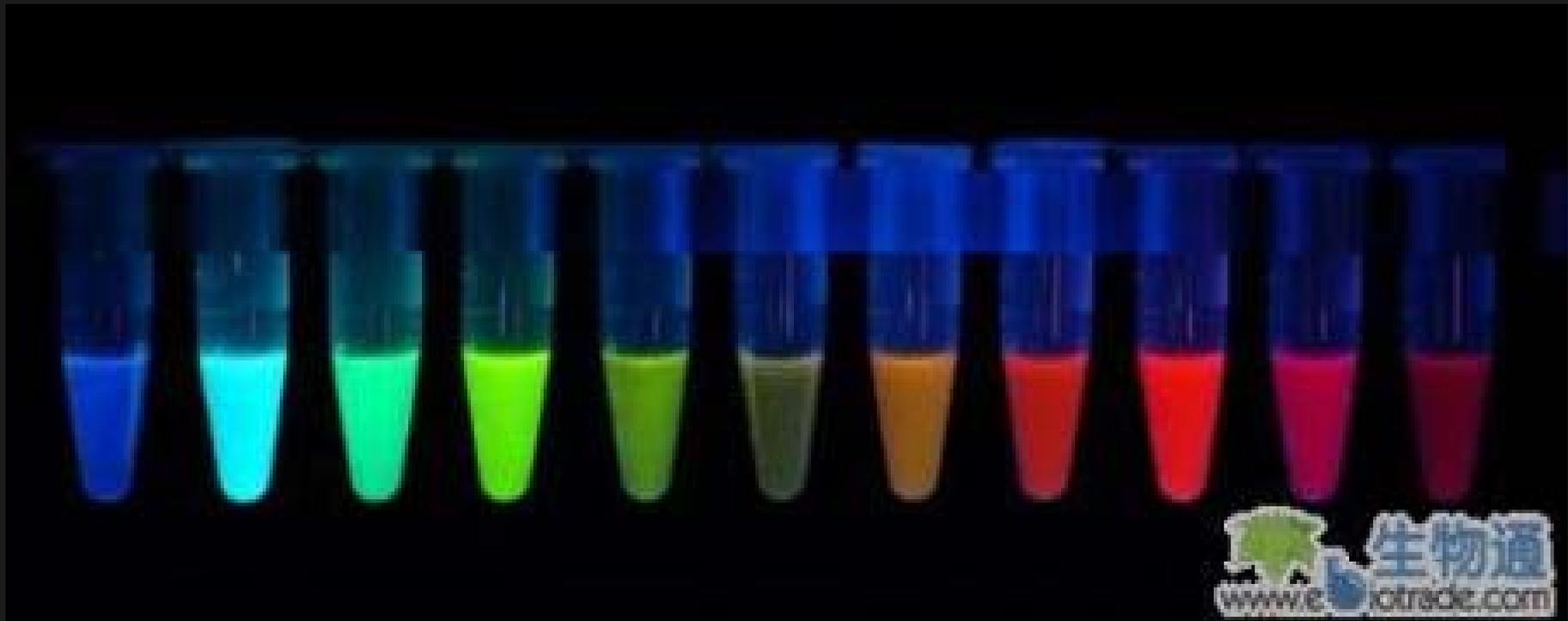
## Spectral properties of DyLight fluorochromes

DyLight® 488 激发/发射波长: 493/518

DyLight® 549 激发/发射波长: 562/576

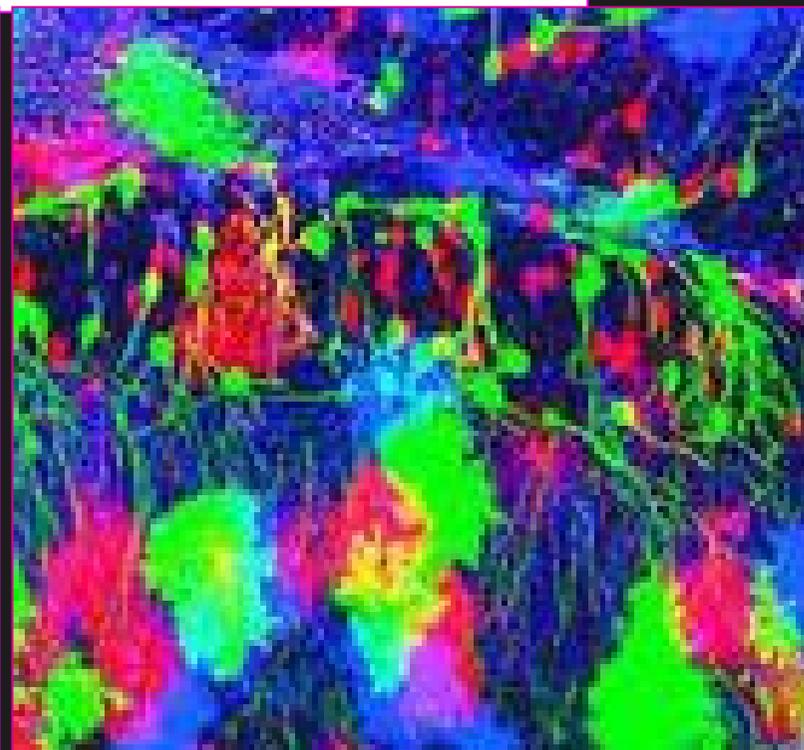
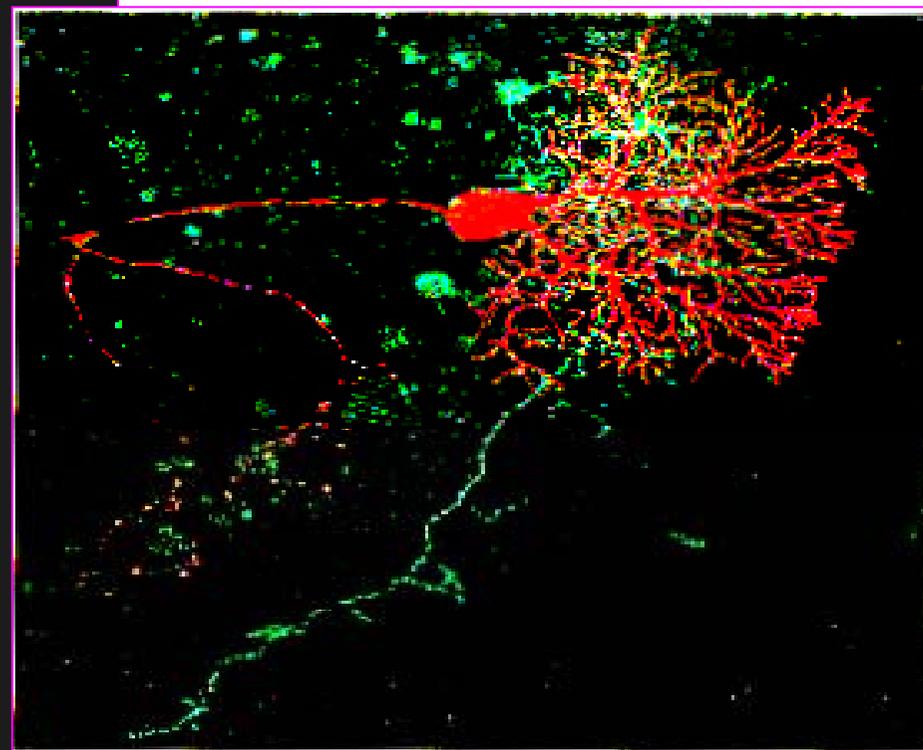
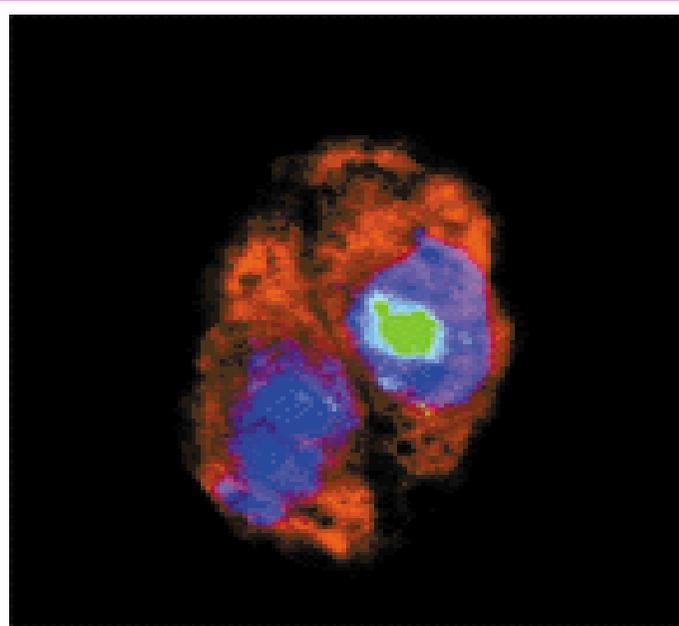
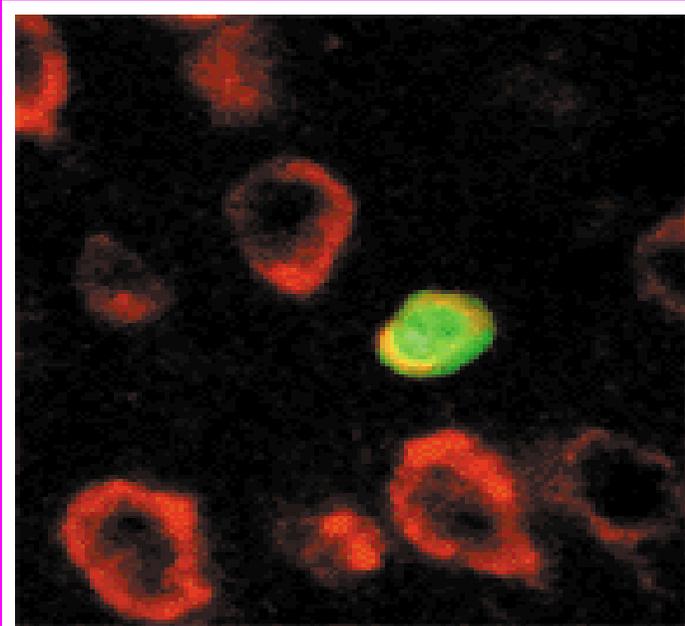
DyLight® 594 激发/发射波长: 593/618

DyLight® 649 激发/发射波长: 654/673



# Characteristics of fluorochromes

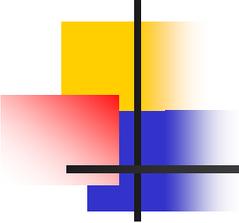
- **fluorescence efficiency**: 发射荧光的量子数/吸收激发光量子数
- **fluorescence intensity**: 发射荧光的量子数多则强与光源强度正比
- **Excitation spectrum**: 各种色素均有一定的吸收波长范围
- **Emission spectrum**: 同样各种色素亦有一定的发射波长范围
- **激发波长**: 紫外或近可见光, 而**发射波长**均位于可见光区域
- **stocks shift**: 发射波长与激发波长之间的差值, 称**斯托克位移**
- **Fluorescence quenching**: 荧光色素内部或外部因素所致荧光分子的破坏, 荧光消失(光漂白), **强光**观察过程中荧光减弱明显
- **Fluorescent anti-quencher**: 强光聚焦连续观察均可致光漂白, 可应用抗淬灭剂, 如**p-苯二胺(PPD)**, **n-没食子酸盐(NGP)**等; 中密度滤光片, 高数值孔径物镜、相对低倍率观察等





## 荧光显微镜的组成

- **照明系统**：高压汞灯、金属卤化灯，提供激发光源
- **Excitation filter**：位于光源与显微镜的光路内，将全波段光虑过仅允许荧光色素所需的波段的光透过。
- **宽带型**>30nm，光通量大，激发能量强，而**窄带型**<30nm，对荧光色素选择性激发好，常用**UV, V, B, G**
- **Emission filter**，也称阻断滤光片 **barrier filter**：位于物镜与目镜之间光路内，阻挡未被标本吸收的激发光，保护眼睛，选择让荧光色素产生的荧光通过，获取清晰的荧光图像。
- 常用数字标志，**410W, 460W, 515W, 530W**和**580W**等，允许大于该数字波长的光通过



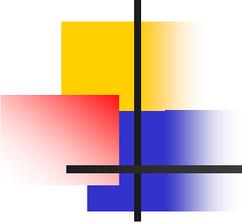
## 荧光显微镜使用注意事项

---

- 严格按说明书使用
- 高压汞灯接通电源
- 暗室观察、暗适应
- 观察照相应应在2小时以内进行
- 集中观察、避免一天内数次点燃
- 标本应封固、及时观察、记录
- 可施行半定量分析

# Immunocytochemistry

- 免疫荧光技术有灵敏、特异、操作简单等优点，但抗体用量大、标本不能长期保存、需较昂贵的荧光显微镜，不能用于电镜观察等。
- 60年代，Nakane建立了酶标抗体技术；从此开辟了酶标抗体技术及免疫酶细胞化学之路。
- 70年代，Sternberger建立了非标记抗体酶法以及PAP法。80年代，Hsu建立了ABC技术。
- 免疫细胞化学技术成为现代生命科学研究领域中不可缺少的先进形态学研究手段，同时也是临床实验室常规检查法之一，病理诊断、肿瘤性质的判定、预后评估等

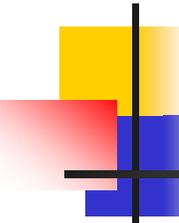


# Immuno-enzyme histochemistry

---

## 用于标记的酶须具备的条件

- 酶催化的底物应特异，容易显示，
- 终产物沉淀必须稳定
- 易获得酶分子，最好有商品出售
- 中性pH时，酶应稳定，
- 酶与抗体连结，不能影响二者的活性
- 不应存在与标记酶相同的内源性酶



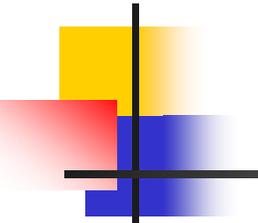
## 常用的标记酶

辣根过氧化物酶

碱性磷酸酶

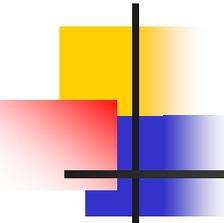
葡萄糖氧化酶

- **辣根过氧化物酶**（**Horseradish peroxidase, HRP**），最常用的酶，广泛存在于辣根而得名；是较理想的标记酶，分子量**40kD**，最适pH**5~5.5**，但**显色**时常用**中性**；
- **底物**：**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**；**特异性的**；而电子供体为**非特异**，故可用不同的电子供体，这样形成的终产物颜色不同**(用于双标)**。
- **电子供体**：**DAB**为棕黄色沉淀，不溶于有机溶剂，切片可经酒精脱水、二甲苯透明处理保存；
- **AEC**为**红色**，**CN**为兰色沉淀，溶有机溶剂，二者不能脱水处理。



## HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB反应终产物形成过程

- HRP与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>形成复合物，有供氢体，迅速生成水，酶被还原，电子供体被氧化、发生聚合，再经环化，在酶反应部位，形成不溶性棕褐色沉淀；
  - DAB是最广泛的电子供体之一，较敏感；
  - 切片可脱水、透明、半永久保存；
  - 终产物具有嗜铁性，经钨酸（OsO<sub>4</sub>）处理，形成高电子密度的铁黑，可电镜下确定抗原的存在部位。
- HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB常用于电镜组织细胞化学显示抗原。

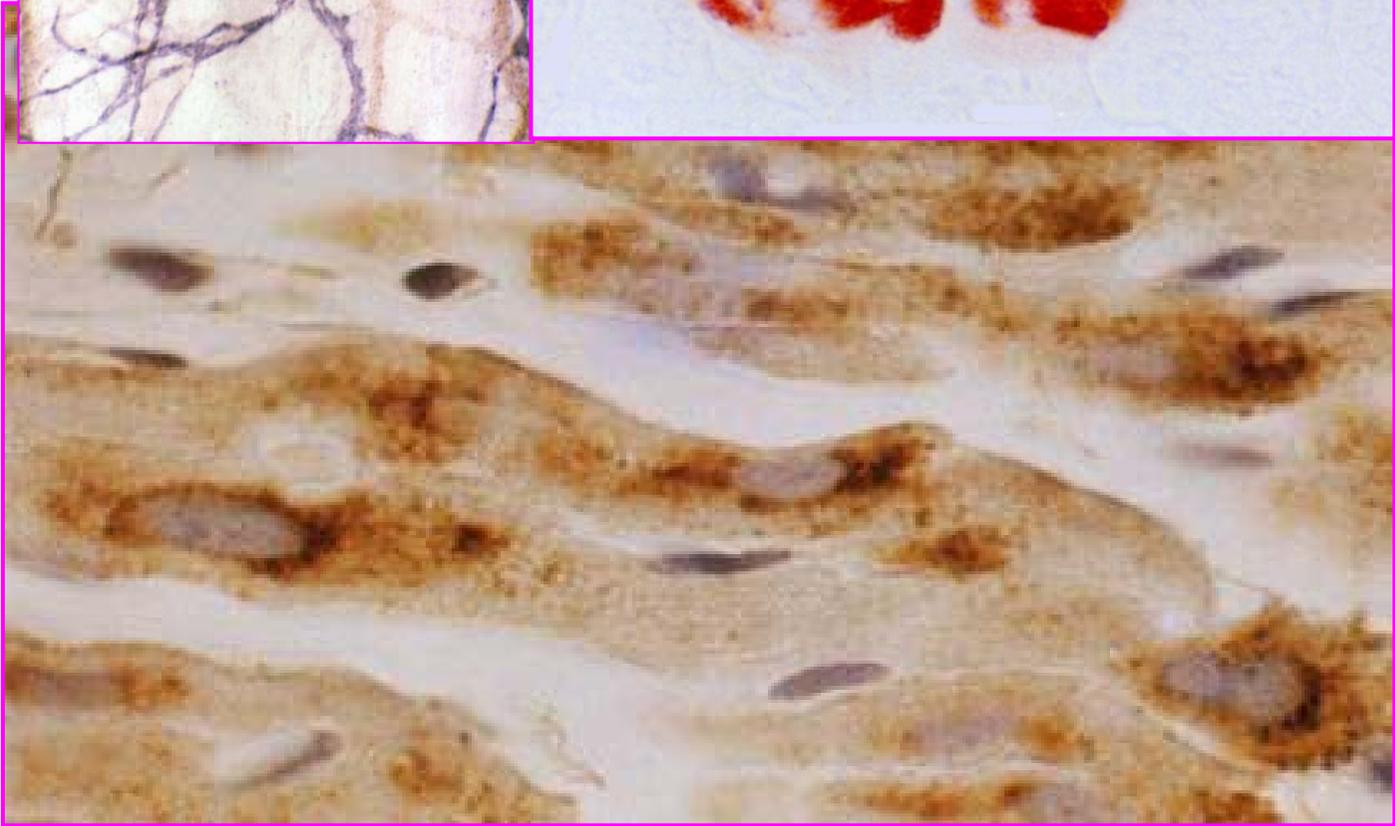
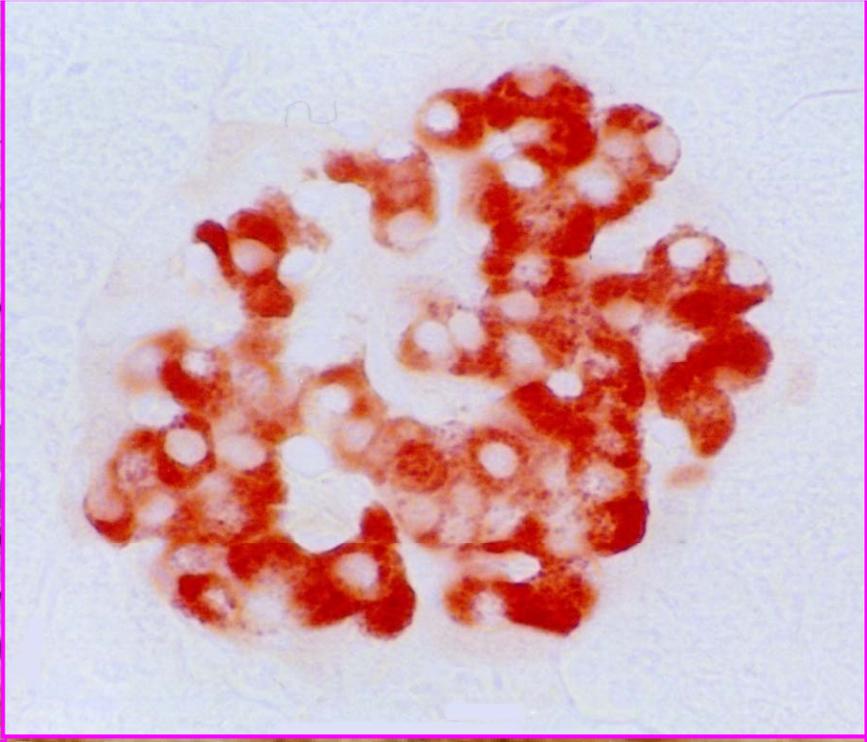
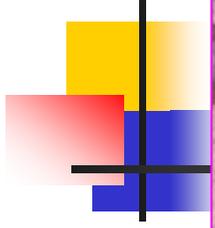


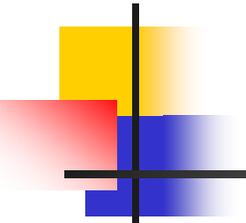
➤ **碱性磷酸酶**（**Alkaline phosphatase; AP**）

➤ **AP**：分子量约为**HRP**的2~3倍，最适pH**9.0~9.5**，最初由**Bulman**等用于标记抗体。选用不同的底物，可形成不同颜色的终产物，

➤ **AP底物**：**萘酚**和**快蓝**（**Fast Blue, FB**）为底物，生成**蓝色**沉淀。用**快红**（**Fast Red, FR**）代替**FB**，形成**红色**不溶性沉淀，但二者形成的终产物均**溶于有机溶剂**，故不能脱水透明保存。与**HRP/4-氯-1-萘酚**（**CN**）或**DAB**形成的沉淀对比鲜明。

➤ **葡萄糖氧化酶**（**Glucose oxidase, GOD**）





## gold particle labelling antibody

---

金标法的优点：**简单**；

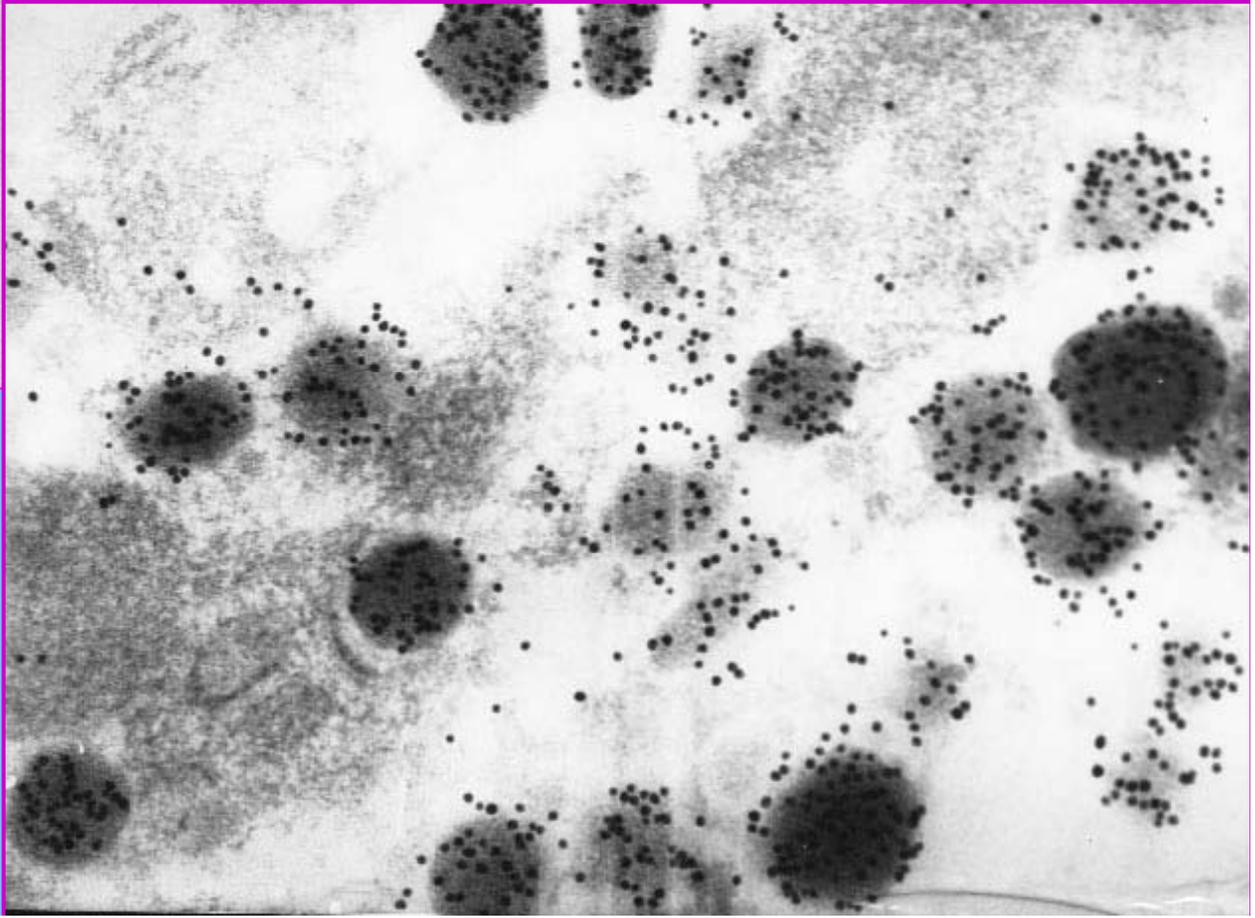
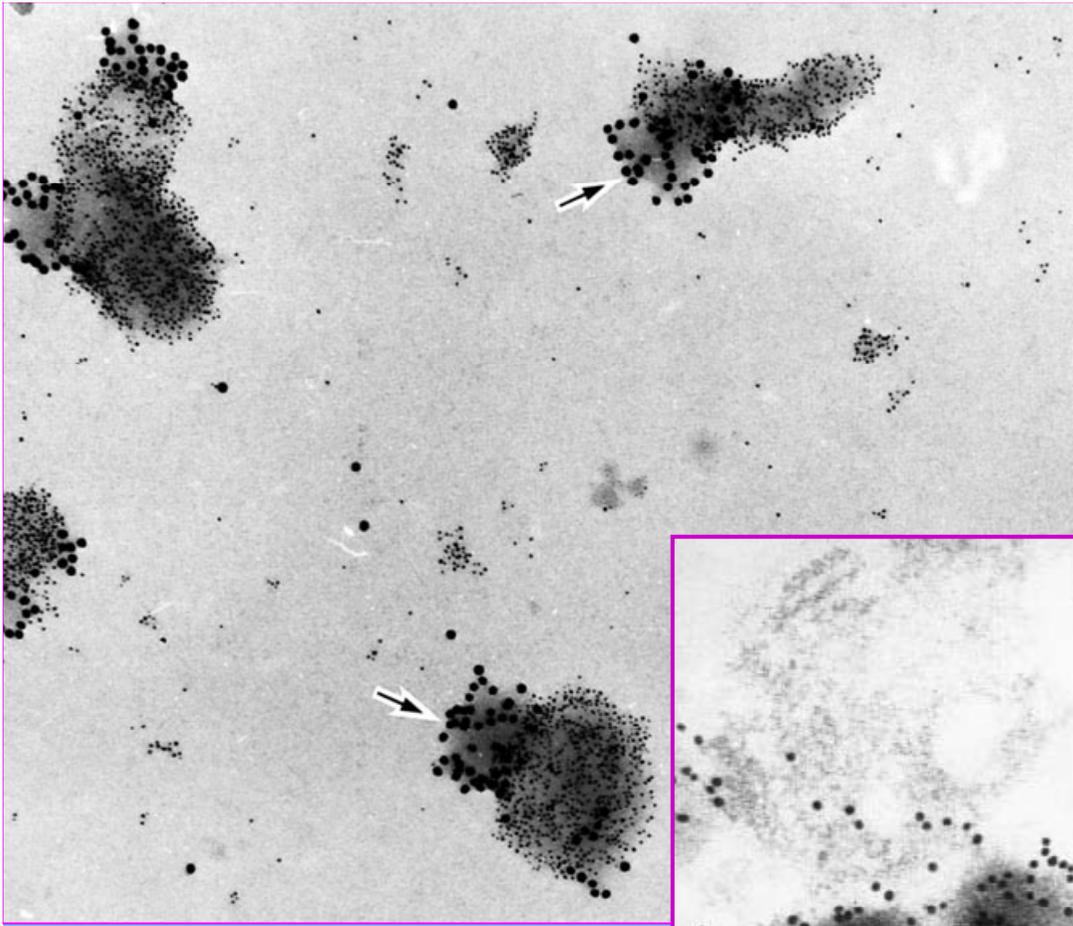
不需 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等处理，减少损伤微细结构；

金颗粒电子密度高，易于区别；

可与HRP等进行**双标**染色、用于电镜研究；

不同直径的金颗粒标记抗体，可**双标**染色；

**电镜下半定量研究**：根据抗原抗体反应部位结合金颗粒数量的多少。





Thank you