

免疫电镜法

孙纪申

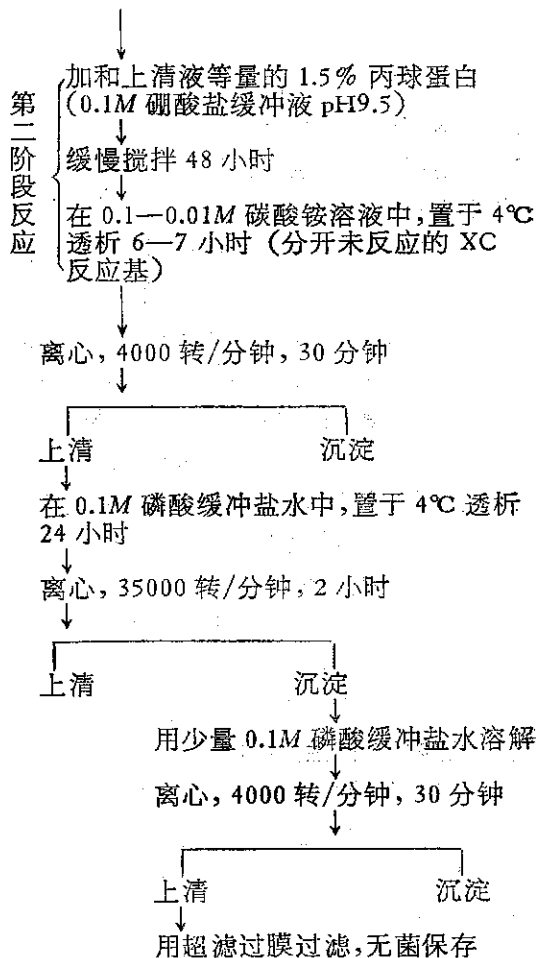
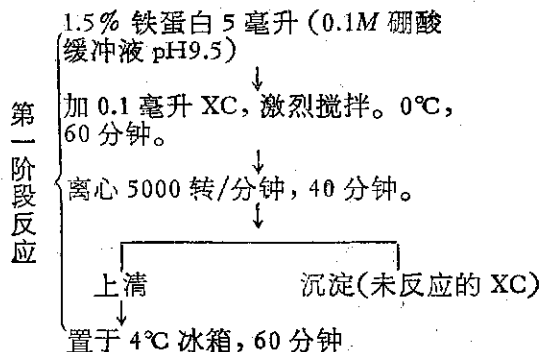
(中国医学科学院分院)

免疫电镜法是把免疫化学技术与电镜技术有机地结合起来,研究抗原抗体相互作用的一种技术方法。随着电镜分辨率的提高和电镜对组织细胞及微生物超微结构研究的发展,为从超微结构水平或分子水平上研究免疫作用,提供了良好条件。现将最广泛应用的铁蛋白抗体法和酶抗体法简介如下。

(一) 铁蛋白抗体法 铁蛋白性质随动物种类不同而有所不同,最常用的是马脾铁蛋白,在电镜下可见直径约 100 \AA 的蛋白壳,壳内有直径为 55 \AA 的铁核心。使用市售铁蛋白前要经过提纯¹⁾。

结合铁蛋白和抗体球蛋白的交联剂有几种,其中以 XC (苯二甲基二异氰酸盐)、TC (甲苯 2,4 二异氰酸盐)、FNPS (二氟二硝基二酚)、戊二醛等应用最广²⁾。

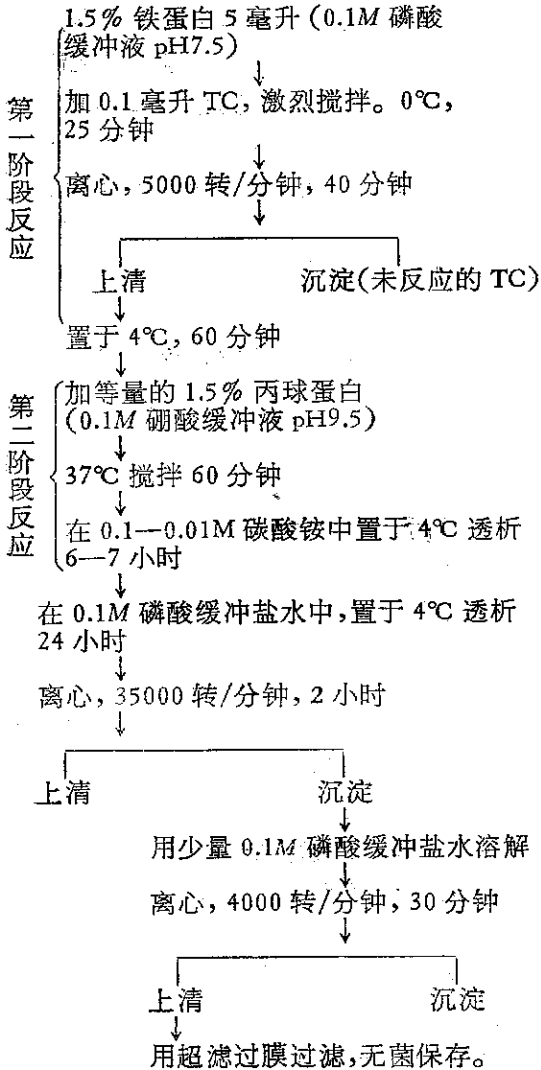
1. XC 结合法



1) 孙纪申 1979 微生物学通报 6(3): 42.

2) 松本 明, 东 昇 1974 临床免疫 1031--1038.

2. TC 结合法



3. FNPS 结合法 配制如下反应混合液, 置于 4°C 搅拌 24 小时, 使 FNPS 结合。

丙球蛋白	200 毫克
生理盐水	2 毫升
4% 碳酸钠溶液	2 毫升
铁蛋白 (340 毫克)	4 毫升
FNPS (5 毫克) 溶解在 1 毫升冷丙酮	

反应后, 置于 0.1M 磷酸缓冲盐水中透析, 以离心法去除沉淀。以超离心法去除未反应的球蛋白(沉淀用盐水洗三次, 最后用少量盐水溶解), 无菌保存。

4. 戊二醛法 取 15 毫克铁蛋白和 3 毫克球蛋白 (IgG) 溶液于 0.9 毫升 0.1M 磷酸缓冲

液 (pH7.0) 中, 加入 0.1 毫升新鲜稀释的戊二醛, 使戊二醛最终浓度为 0.005—0.05%, 此混合液置 37°C 24 小时, 无需搅拌。加入 0.02% NaN₃ 防腐, 结合完结时加 0.01M 赖氨酸中止反应。

铁蛋白分子较大, 用于定位细胞内抗原, 困难较多, 但用于细胞表面抗原或细菌、病毒抗原的定位则是相当理想的。

细胞内抗原定位可用超薄切片法进行。

(1) 细胞用 1% 戊二醛或 5% 福尔马林予固定 5 分钟, 组织用 5% 福尔马林固定 40—60 分钟。

(2) 以冰冻切片(滑动)法切削, 破坏部分细胞膜。

(3) 加铁蛋白抗体进行反应, 室温或 37°C, 30 分钟。

(4) 洗净。

(5) 用锇酸作后固定。水洗、脱水、包埋、超薄切片、染色、电镜观察(按常规进行)。

(二) 酶抗体法 酶抗体法是在荧光抗体、铁蛋白抗体等技术和组织化学的基础上发展起来的一种新技术, 建立于 1966 年。此法建立以来, 在医学、生物学的理论与实际工作中, 特别是在免疫学、变态反应学、寄生虫、肿瘤和内分泌学中应用日趋广泛¹⁾。

取抗体球蛋白 2 毫升(每毫升 0.1M 磷酸缓冲液中含有 20 毫克)加辣根过氧化物酶 40 毫克, 溶解后, 边搅拌边加入 1% 戊二醛水溶液 0.1 毫升, 置于室温 2 小时, 以半饱和硫酸铵盐析法去除其中未反应的酶(在上清中), 然后用葡聚糖 G-200 或 Bio-Gel P-300 等凝胶过滤法提纯(酶呈黄褐色), 在 4°C 条件下, 用超过滤法过滤后, 在 -20° 至 -70°C 冰冻保存。酶抗体向细胞内的渗透性比铁蛋白抗体明显好。样品置于 4°C 反应 4—8 小时, 用蔗糖、磷酸缓冲液长时间洗净, 除去未反应的酶抗体, 然后对酶(即参与抗原抗体反应的, 同抗体相结合的酶)进行显色反应。反应液为卡诺夫斯基 (Karnowsky)

1) 龚伊红等 1980 中华物理医学杂志 2(1): 31。

液 (20—30 毫克 3,3-二氨基联苯胺, 溶解于 100 毫升 0.05M Tris-HCl 缓冲液中, pH7.6, 然后加入 0.001% H_2O_2) 置于室温下反应 10—30 分钟, 用蒸馏水洗涤, 以钼酸做后固定, 以后的操作和一般超薄切片法同。由于有电子密度高的无构造物质存在, 就可以把抗原抗体结合的部位识别出来。

陈良标等对副流感病毒(仙台株)的抗原定位作了电镜观察¹⁾。将辣根过氧化酶标记的兔抗豚鼠抗体 (1:10), 37°C 下作用 2—4 小时,

缓冲液浸洗 2—3 小时, 洗去未结合的抗体, 用 2.5% 戊二醛固定 30 分钟, 用缓冲液浸洗半小时, 然后对酶进行显色反应(反应液的配制: 取 3,3-二氨基联苯胺 4 毫克溶于 0.05M pH6.8 的 5 毫升 Tris-HCl 缓冲液中, 临用时加 1% H_2O_2 0.03 毫升), 用上述反应液处理 30 分钟, 用缓冲液洗 30 分钟, 1% 钼酸固定 1—2 小时, 以后的操作和一般超薄切片同。

1) 陈良标等 1979 微生物学报 19(1): 91。