



动物检验检疫技术

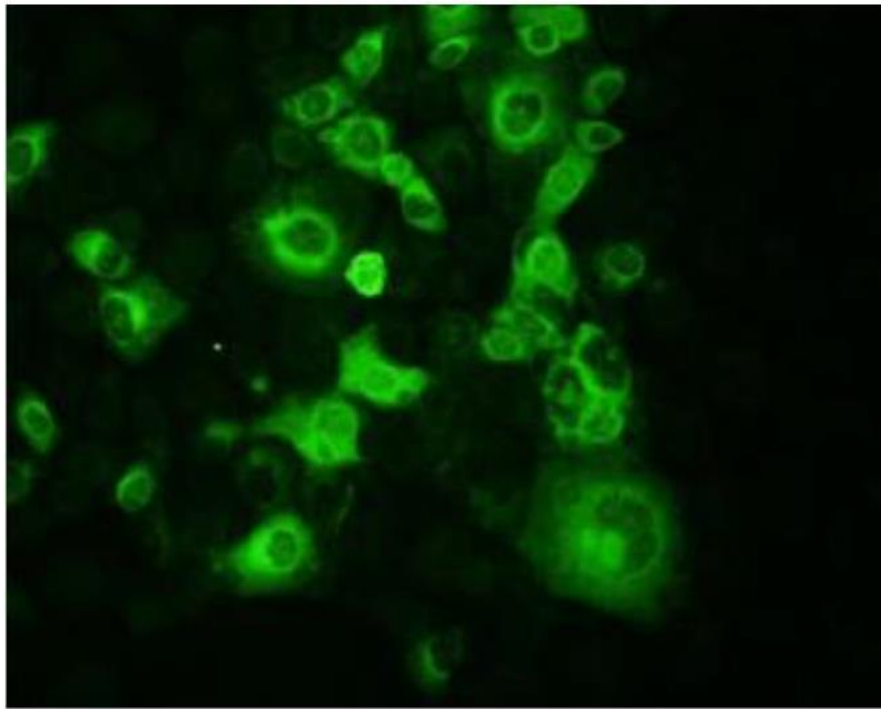
专业教学资源库

免疫荧光技术 (IFA)



免疫荧光检测法

(Immunofluorence assay, IFA)



阳性



阴性



荧光物质与荧光

- 荧光物质

- 是一类能吸收激发光的光能而发射荧光的物质。

- 荧光 (*fluorescence*)

- 荧光物质吸收激发光的能量后，电子从基态跃迁到激发态，当其回复至基态时，以发射光形式释放出能量，此发射光称为荧光。



荧光淬灭

- **定义:**荧光物质在某些理化因素作用下，发射荧光减弱甚至消退称为荧光淬灭。

(如紫外线照射、高温 ($\geq 20^{\circ}\text{C}$)、苯胺、酚、硝基苯、I-等)

- 荧光淬灭是由于激发态电子不能回复到基态，所吸收的能量无法以荧光的形式发射。
- 可在封片液中加入抗荧光淬灭剂。



常用的荧光物质

荧光物质	最大吸收光谱	最大发射光谱	应用
异硫氰酸荧光素 (FITC) (应用最广泛)	490~495nm	520~530nm (黄绿色)	FAT、荧光偏振免疫测定
四乙基罗丹明 (RB200)	570~575nm	595~600nm (橙红色)	FITC的衬比染色或双标记FAT
四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC)	550nm	620nm (橙红色)	FITC的衬比染色或双标记FAT(淬灭速度慢)
藻红蛋白 (PE)	565nm	578nm (红色)	双标记FAT、流式细胞术, 可与FITC共用488nm激发光



荧光抗体技术的基本原理

荧光素标记抗体与切片中组织/细胞抗原反应，洗涤分离后荧光显微镜观察呈现特异荧光的抗原抗体复合物及其部位，对组织细胞抗原进行定性和定位检测，或对自身抗体进行定性和滴度测定。



荧光抗体技术的内容

- ◆ 荧光抗体制备（略）
- ◆ 标本制作
- ◆ 荧光抗体染色
- ◆ 荧光显微镜检查



荧光抗体的保存

❖ -20°C : 保存1~2年

❖ 真空干燥: 长期保存



标本的制作—玻片的处理

- ❖ 免疫组织化学染色组织掉片或脱片现象普遍
- ❖ 玻片的处理目的是使组织切片牢固贴于载玻片
- ❖ 多聚赖氨酸 (*poly-L-lysine*) 溶液是广泛应用的组织切片与玻片黏合剂，该多聚阳离子分子与组织切片上的阴离子相互作用会产生较强的黏合力。



标本的制作--标本的类型

组织切片：冷冻切片、石蜡切片

印片：肝、脾、淋巴结等器官或组织

涂片：各种体液、穿刺液、细菌培养物和细胞悬液

培养细胞：单层培养细胞



组织切片的类型

- ▶ **冷冻切片：**操作简单，抗原损失少，组织细胞结构欠清晰。
- ▶ **石蜡切片：**组织细胞结构显现清楚，抗原损失多（抗原修复）。



标本的制作--标本的固定和保存

- 固定剂：乙醇、甲醇、丙酮、甲醛等
- 保存：4°C、-20°C



免疫荧光技术操作方法检测组织中猪瘟抗原

◆ 原理：间接荧光抗体染色。在组织或细胞制成标本片，加猪瘟免疫血清或单抗反应，充分洗涤后加荧光标记的羊抗猪荧光抗体，孵育洗涤后，观察。



【仪器及材料】

- ◆ PBS (0.01mol/L, pH7.4)
- ◆ 免疫血清或单克隆抗体
- ◆ 荧光标记的抗体溶液
- ◆ 甘油缓冲液
- ◆ 有盖搪瓷盒一只 (内铺一层浸湿的纱布垫)
- ◆ 荧光显微镜
- ◆ 温箱
- ◆ 玻片架、滤纸等

【操作方法】



1. 组织制片：冰冻切片或触片。
2. 固定：甲醇/丙酮室温固定标本片15-30分钟。
3. 洗涤：用PBS洗涤3次，每次3-5分钟。
4. 封闭：用1%BSA室温封闭30分钟。
5. 加一抗：加一抗溶液30-50 μ l，将标本片置于湿盒，37 $^{\circ}$ C作用
6. 洗涤：用PBS洗涤，操作同步步骤3。
7. 加二抗：加二抗溶液30-50 μ l，置于湿盒，37 $^{\circ}$ C作用40分钟。
(因荧光抗体具有光敏性，从此步骤开始避光操作和反应)
8. 洗涤：用PBS洗涤，操作同步步骤3。
9. 封固与观察：将标本片用缓冲甘油封固，置于荧光显微镜下观察。



免疫荧光技术操作方法检测细胞培养的PRRSV

- ◆ 原理：间接荧光抗体染色。在组织或细胞制成标本片，加PRRSV单抗反应，充分洗涤后加荧光标记的羊抗小鼠荧光抗体，孵育洗涤后，观察。
- ◆ 方法：同组织中猪瘟抗原检测



动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!