

一级抗体检测

直接和间接检测方法

一个IHC-P试验的结果主要取决于用于可视化目标抗原的检测系统。直接检测方法，即用酶或荧光染料标记一级抗体，此方法非常迅速，并且不需要二级抗体就能直接检测目标抗原。然而，因为只有一个标记抗体与每个抗原结合，如果抗原浓度低，在显微镜下信号可能会太微弱而检测不到。因此，间接方法会更好。

在间接方法中，一级抗体不会被标记。反而一种针对一级抗体宿主物种的标记二级抗体被用来放大信号，通常会结合附加的放大步骤。常见的标记物有荧光轭合物或酶，它们可以将可溶性底物转化为显色沉淀物(见 Fluorescent-and-chromogenic-IHC-P)。

SYSY的参考实验方案主要使用亲和素-生物素复合(ABC)法来放大信号，显色底物法来检测抗原抗体复合物。在ABC方法中，生物素可与二级抗体共轭来连接一级组织结合抗体和亲和素-生物素酶复合物。LSAB方法与ABC方法非常类似，但使用抗生物素蛋白链菌素-过氧化物酶而不是亲和素。某些组织(例如肾脏、肝脏)含有大量内源生物素。尤其是当使用Tris-EDTA或者主要成分为EDTA的抗原修复缓冲液时，ABC方法会导致高背景或者假阳性染色。因此，SYSY推荐使用亲和素-生物素阻断步骤。如果仍然存在背景问题，可以考虑试用主要成分为聚合物的检测系统来取代ABC方法。

在主要成分为聚合物的检测系统中，酶和二级抗体通过聚合物主链共轭结合。与ABC方法相比，大量共轭抗体和酶会增强敏感性。

酪胺信号放大 (TSA) 技术是一种酶介导检测方法。它通过辣根过氧化物酶 (HRP) 来催化标记的酪胺 (例如生物素、DNP) 沉淀、结合到组织切片上。此标记物随后可用显色或者荧光检测方法进行检测。与ABC方法相比，TSA的灵敏度提高了100倍，从而使得低丰度蛋白也可被检测到。

免疫组织质谱分析法是一种非常新的方法。它利用已知分子质量的金属同位素标记抗体，然后进行MS成像。

使用二级抗体的缺陷

许多间接检测方法都建立在二级抗体的使用上。然而，二级抗体可能会与组织中的内源免疫球蛋白发生交叉反应。但此现象可以通过使用交叉吸附的二级抗体和相应的阻断液来最小化。当使用正常免疫血清来阻断时，请选择二级抗体宿主的正常血清。

SYSY推荐在你的IHC-P染色实验中应包括“无初级抗体对照”。染色实验方案中省略初级抗体可保证染色是由初级抗体与其抗原结合产生，而不是由检测系统或者组织样本产生的。