维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2008年第17卷第2期
J Regional Anat & Operative Surg,2008,Vol.17,No.2

免疫电镜技术运用过程中电子染色方法的选用

赵承军[1],张东梅[1],邓其跃[1],陈鹏慧[1],蔡文琴[1],陶忠芬[2],张吉强[1] (第三军医大学基础医学部:1.神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所;2.中心实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探究免疫电镜不同染色方法对免疫组化阳性实验结果影响的关系。**方法** 组织切片经常规免疫组化(雌激素受体GPR30)并行DAB-硫酸镍铵显色后进行电镜切片,然后分为双氧铀-柠檬酸铅双染、双氧铀单染与未染色3组,以便对不同电子染色结果进行比较。**结果** GPR30免疫阳性产物位于细胞核外的膜性结构上,在铀-铅双染组显示很高的电子密度,但是背景染色也很深,在铀单染组的反差比较好,而未染色组的反差更好。**结论** 免疫电镜技术中针对不同的免疫阳性反应选用不同的电子染色方法,有利于阳性结果的判断与鉴别。

[关键词] 免疫电镜技术;雌激素受体;海马;电子染色
[中图分类号] R329.33;Q-336 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2008)02-0088-03

The effect of different immunoelectronic staining on the ultralocalization of the immunohistochemstry

ZHAO Cheng-jun, ZHANG Dong-mei, DENG Qi-yue, CHEN Peng-hui, CAI Wen-qin, TAO Zhong-fen, ZHANG Ji-qiang (Department of Neurobiology, Chongqing Neuroscience Institute, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore different immunoelectronic staining methods on the ultralocalization of immunohistochemistry. **Methods** The novel membrane receptor GPR30 immunohistochemistry with DAB-nickel intensification was applied, then ultrathin sections were prepared and different eletronic staining (citric lead plus dioxydate uranium, dioxydate uranium-only or no electrostaining) was carried out. **Results** Under light microscope, GPR30 showed very strong immunoreactivity in the hippocampal pyramidal neurons. Under electronic microscope, the blank staining (no electrostaining) sections showed the highest contrast, while the double staining sections showed the lowest contrast. **Conclusion** For different immunoreactive intensity, different electronic staining was suggested.

Keywords: immunoelectronic microscope; estrogen receptor; hippocampus; electronic staining

免疫电镜标记技术已广泛应用于生物学的各个方面[1-2],它能在超微结构水平上精确、细致地定位,特异性高,方法简便,优越性十分显著。而如何能成功确定免疫反应阳性区域并选取合适的区域是免疫电镜成败的关键。为此我们应用免疫电镜技术但选用不同的电子染色方式,以比较几种电子染色的优缺点,从而为免疫电镜技术的开展提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年雌性SD大鼠共12只,体重(210±10)g,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为实验组(加抗体组)和空白对照组(不加抗体的阴性对照),实验组又分双氧铀-柠檬酸铅双染色、双氧铀单染与未染色三组进行对比观察。

1.2 主要试剂和药品

羊抗兔GPR30(ab12563)多克隆抗体购自英国Abcam公司,抗体稀释液(antibody diluent with background-reducing, S302281)与羊抗兔EnVision™试剂盒(GK400305)购自Dakocytomation公司,封闭血清、DAB显色试剂盒等购自北京中杉公司,其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器设备

TECNAI-10型透射电子显微镜(PHILIPS公司),超薄切片机(LKB公司)。

1.4 免疫组织化学染色

1.4.1 动物固定、取材 动物用5%水合氯醛麻醉,开胸,经左心室插管到主动脉,剪开右心耳,先后灌注生理盐水200 mL和4%多聚甲醛溶液300 mL。灌注后取出大脑组织,分离海马放入2.5%戊二醛溶液。然后用振荡切片机制备海马切片(片厚100 μm),切片入2.5%戊二醛溶液后固定2 h,用0.01 mol/L PBS pH为7.2~7.4洗涤3次,每次1 h,最后保存于4 ℃备用。

1.4.2 包埋前免疫电镜步骤 按文献[3-4]进行。简述如下:3% H_2O_2 封闭15 min,0.01 mol/L PBS漂洗后,用正常山羊

[基金项目] 第三军医大学回国人员启动基金资助项目(TMMU,2007XG41),重庆市回国人员启动基金资助项目(CSTC,2007BB5030)

[作者简介] 赵承军(1965-),男,山西省吕梁市人,副教授,主要从事发育神经生物学方面的研究,现工作单位:宁夏医学院组织胚胎学教研室。

[通迅作者] 张吉强,第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,电话:(023)68752232

[收稿日期] 2008-02-01 [修回日期] 2008-03-01

维普资讯 http://www.cqvip.com

血清封闭30 min,然后加入一抗(GPR30,1∶200)于4 ℃孵育过夜。PBS漂洗后加入羊抗兔EnVision™试剂,室温1 h,0.01 mol/L PBS漂洗后用硫酸镍铵-DAB显色5 min。在解剖显微镜下选取免疫阳性反应区域,修成0.1 mm×0.1 mm×1 mm大小,放入0.01 mol/L的PBS,经1%锇酸后固定、丙酮梯度常规脱水、环氧树脂618包埋、半薄切片定位后,70 nm超薄切片捞于有支持膜的200目镍网上,按实验分组进行电子染色,透射电子显微镜观察拍照。空白对照用PBS取代一抗,其它步骤相同。有DAB颗粒沉积者为阳性。

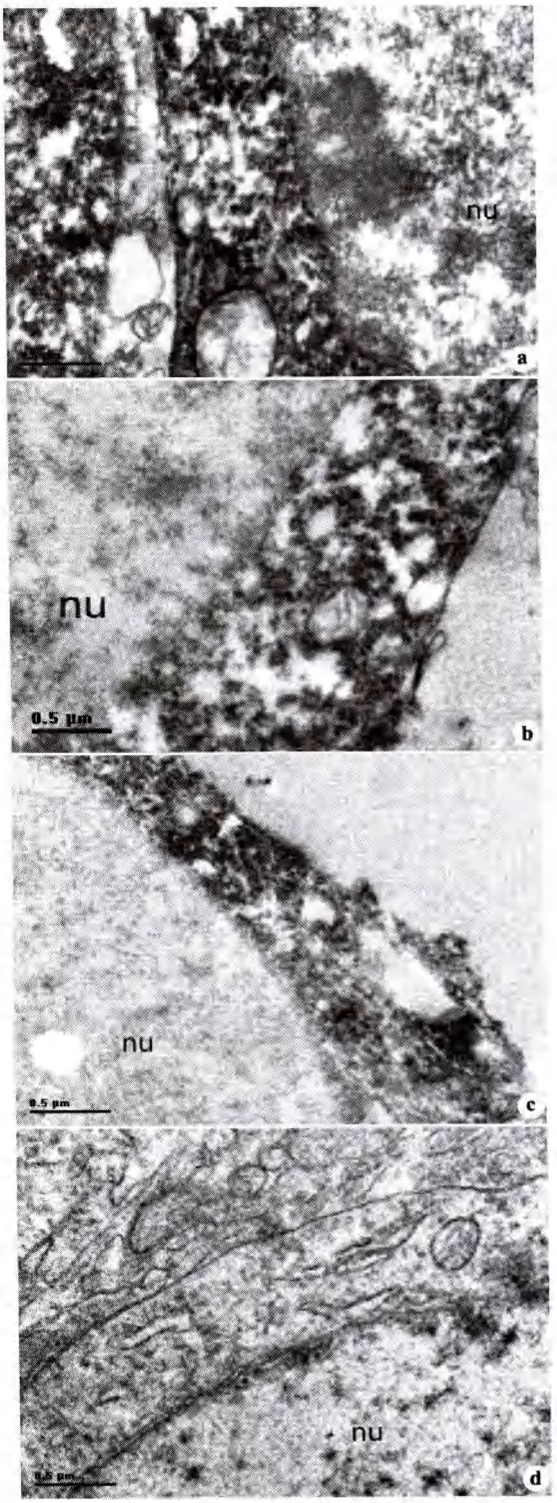
2 结果

在光镜下,GPR30免疫阳性产物清楚地位于海马椎体神经元的核外区域,但是由于神经元的细胞核体积较大,免疫阳性产物究竟在细胞膜或胞浆内难以明确。在透射电镜下观察,大鼠海马神经元细胞超微结构清晰,形态保存基本良好。实验组海马神经元中均出现电子密度高的颗粒,呈小团状或点状分布于细胞内,主要位于粗面内质网,也可定位于线粒体及胞浆中的膜性结构上。在铀-铅双染组可见很深的免疫阳性产物,颗粒成团密集、着色很深,但是其背景染色也较深(图1a),铀单染组也有较好的染色背景,其免疫阳性颗粒更清楚(图1b)。未经电子染色组免疫阳性反应颗粒着色适中,特异性强,显示更好的反差(图1c)。空白对照组即免疫组化过程中PBS组,海马神经元内未见明显免疫反应阳性的电子密度高的颗粒(图1d)。

3 讨论

免疫电镜在形态学研究中具有很广泛的应用,然而其染色程度却很难控制,一般不容易得到理想的染色结果。免疫电镜的标记方法比较多,常用的标记方法有胶体金标记以及酶标法。胶体金标记的方法由于其颗粒大小一致,在电镜下显示清楚,所以有广泛的应用。但是,由于胶体金在光镜下看不见而无法准确定位,免疫组化是否成功、组织的阳性区域在什么位置无法明确,因而胶体金标记的方法在一定程度上带有一定的"盲目性",最终使得免疫电镜的工作量非常大而很难得到理想的结果。

相比之下,酶标电镜免疫组化就直观很多,大大简化了免疫电镜的工作量。在酶标电镜免疫组化技术中,由于抗体与抗原结合后形成的免疫复合物是无色的,因此,还必须借助于组织化学方法将抗原抗体反应部位显示出来,最常用的显色剂为DAB(其显示结果为棕黄色)。DAB是广泛应用的电子供体之一,较敏感且终产物具有嗜锇性,经锇酸处理,电子密度增加,适于在电镜下确定抗原的存在部位[5]。尽管DAB标记法存在阳性颗粒大小不均一,导致在电镜下显示效果不如胶体金的不足,但是通过DAB呈色反应,在光镜下可以清楚地确定组织切片中阳性细胞的位置,从



a:铀-铅双染;b:双氧铀单染;c:未经铀铅染色;d:免疫组化未加一抗,其余处理同b; nu:细胞核

图1 不同电镜染色方法对免疫电镜结果的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

而为成功进行电镜下观察奠定了很好的基础。这是胶体金标记方法无法比拟的。

为了增强电子密度,一般都会在锇酸处理后用铀-铅染色。在实际工作中我们发现不同的电子染色对实验结果会产生一定程度的影响,为了选择合适的电子染色方法我们设计了本研究。本文实验结果表明,如果免疫反应阳性产物较多或较强,则在制作电镜标本时不需要进行后期的双氧铀-柠檬酸铅双染色,这样可以在镜下较好地发现阳性反应,电子反差适中,避免着色过深影响结果的现象(即未经电子染色组)。如果免疫反应阳性产物较弱,可以选用双氧铀单染色,这样的反差对发现阳性反应产物很有帮助(如单纯铀染色组)。只有当免疫反应阳性产物非常弱的情况下,才考虑使用双氧铀-柠檬酸铅双染色,因为应用此电子染色后,整个超微结构下背景的颜色都将加重,可能会影响免疫阳性反应的正确判断(铀-铅双染组)。另外标本经醛类固定剂固定后一般都残留有自由醛基,这种自由醛基较为活泼,可与各种抗体的ε-氨基结合,招致难以清除的非特异性染色。因此,标本固定后必须彻底清洗干净。我们选用常用的0.01 mol/L的PBS pH为7.2~7.4,固定后洗涤3次,每次1 h,最后4 ℃过夜,效果较为理想。

总之,免疫电镜实验过程中,即要考虑到保存较好的超微结构,又要能很好地体现免疫阳性反应。包埋前染色后的样本制作有一定的难度,但易于获得良好的免疫反应。包埋后染色方法简便,超微结构保存较好[6],但样本制作对抗原带来的遮盖和诸多损伤,使得标记成功率低。因此,对于不同免疫反应性的标本应该根据具体情况,选用不同的电子染色方法,这样才有可能得到最佳的结果。

[参考文献]

[1] 郭国庆,山爱景,沈伟哉,等.大鼠纹状体神经元型一氧化氮合酶神经元的分布和超微结构特征[J].南方医科大学学报,2007,27(1):1-4.
[2] 胡莲美,李秀梅,黄黎珍,等.复制型乙型肝炎病毒转基因小鼠血清中病毒颗粒的免疫电镜检测[J].中华肝脏病杂志,2007,15(2):145-146.
[3] 张吉强,姚 青,刘建军,等.不同显色方法对免疫组化显色结果的影响[J].第三军医大学学报,2002,24(3):359-360.
[4] 陆珍凤,周晓军,石群立.免疫电镜染色技术中存在的问题及对策[J].诊断病理学杂志,2004,11(4):278-279.
[5] 蔡文琴.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M].成都:四川科学技术出版社,1994.80.
[6] 洪 涛.生物医学超微结构与电子显微镜技术[M].北京:科学出版社,1980.125-127.

(编辑:余汇洋)

2008国际腹部创伤暨第九届全国脾脏外科学术研讨会征文通知

由中华医学会外科学分会脾脏功能与脾脏外科学组和《中华创伤杂志》编辑部联合主办,哈尔滨医科大学附属第一医院承办的2008国际腹部创伤暨第九届全国脾脏外科学术研讨会,定于2008年8月29日至9月1日在哈尔滨召开。会上将有来自美国、德国、日本、俄罗斯等国的知名教授及包括香港特别行政区在内的国内著名专家作相关报告。研讨内容:①交通肇事伤;②腹部创伤;③腹部医源性损伤;④脾脏的功能;⑤脾损伤;⑥脾保留性手术;⑦脾大及门静脉高压症的外科治疗;⑧脾脏移植等。征文要求:投稿为未经正式发表的论文;全文4000字以下,附400-600字摘要;寄送打印稿,附送软盘;注明作者姓名、单位、邮编、联系电话;更欢迎通过E-mail投稿。请自留底稿,恕不退稿。欢迎投稿。投稿请寄:哈尔滨医科大学办公室 朱研 收。邮编:150081。E-mail:zy9862023@163.com或jianghc@vip.163.com,电话:0451-86669482,传真:0451-86669482。截稿日期:2008年6月底前。

中华医学外科学分会、脾脏功能与脾脏外科学组、《中华创伤杂志》编辑部

2008年3月13日