维普资讯 http://www.cqvip.com

319—320
17

多组织蜡块的制作及其在免疫组化实验中的应用

R 392—33
R361.2

病理生理教研室 李培然 范维珂

多组织蜡块 免疫组织化学 单克隆抗体
免疫组化染色

中图分类号 R392—33

近年来，由于单克隆抗体的不断研制成功，大大地推动了细胞、组织及体液中相对特异的微量抗原的鉴定，其中利用免疫组织化学方法检出正常组织与肿瘤组织中特定抗原（肿瘤标记物），对鉴定的诊断肿瘤具有重要意义。由此国外已研制出多种具有识别某些特定抗原的单克隆抗体：如抗角蛋白的单抗等。国内亦正在迎头赶上。但是，在制备这些单抗时，要在几百个杂交瘤细胞孔中筛选到有临床应用价值，即其所产生的单抗具有灵敏度高，特异性强的少数几个杂交瘤细胞株，常需要经过大量组织切片的筛选。以往一张切片只有一种组织，每张切片要耗去相当量的抗体、试剂和一定的时间。因而既费钱又费时，而且各种切片间可能条件不完全一致，可比性差。为了解决这一矛盾，参考文献经验[1][2]，将十余种以上的组织包埋在同一正常大小的蜡块内，用于杂交瘤细胞孔内所含抗体的免疫组化筛选，这样可较快地得到所要求的细胞株，每个孔都可节约时间与材料十余倍。此外，在获得某种单抗时，不论是自制或是买来的，只要用此种多组织切片进行一次试验即可得出其灵敏度及特异性的概念。并由此确定应用何种稀释度最为合适，即达到了阳性染色深而背景染色浅的结果。在工作中，我们用于研制抗角蛋白、抗胶质纤维酸性蛋白、抗神经微丝、抗波形蛋白、抗上皮膜抗原、抗Ⅳ型胶原蛋白及抗结蛋白等单克隆抗体的筛选及其特异性鉴定，效果良好，现将结果报告如下：

材料与方法

1. 多组织蜡块的制备

取病理解剖的正常人体组织及引产的6月令胎儿的正常胚胎组织，包括心、肝、脾、肺、肾、肠、胃、大脑、小脑、皮肤、肌肉、胸腺、胰腺等组织，经4%中性甲醛固定，切成细条（约10×2×2mm）脱水，浸蜡，以直立形式包埋成多组织蜡块备用。该多组织蜡块中的组织可按检测要求任意挑选，一般一个蜡块可切几百张至上千张切片。

2. 筛选或鉴定的单抗种类

包括本室研制的(1)抗角蛋白；(2)抗胶质纤维酸性蛋白；(3)抗神经微丝；(4)抗波形蛋白；(5)抗上皮膜抗原；(6)抗Ⅳ型胶原；(7)抗结蛋白等的筛选时，用杂交瘤细胞株培养上清，不经稀释，对多组织切片进行免疫组化检测。鉴定时用杂交瘤细胞株培

维普资讯 http://www.cqvip.com

养上清或腹水，作1∶1，1∶50，1∶100，1∶1000或更高的稀释后进行多组织切片的免疫组化检测。

3. **免疫组化方法**（ABC—AEC法） 按本室常规进行，主要采用多组织蜡块切片及上海生物制品所免疫室生产的ABC试剂和本室产品AEC显色剂，用Mayer氏苏木素复染胞核，用甘油明胶盖片镜检，以显示棕红色沉淀的深浅程度判断为阳性强弱及阴性结果，卅卅卅十－。

结　果

1. **杂交瘤细胞上清液的筛选**

杂交瘤细胞培养上清液经ELISA检测的阳性孔，再用多组织蜡块切片经免疫组化法筛选出其中体能产生具有抗体具有应用价值的，特异性强，灵敏度高的细胞株。如抗角蛋白抗体要选择其对上皮细胞呈阳性反应而与非上皮细胞呈阴性反应者、抗胶质纤维酸性蛋白要选择其只对星形胶质细胞呈阳性反应者；抗神经微丝蛋白要选择其对神经细胞及神经微丝呈阳性反应者；抗波形蛋白要选择其只对除肌肉以外的间质组织呈阳性反应者；抗上皮膜抗原要选择其只对腺上皮的腔缘膜呈阳性反应者；抗Ⅳ型胶原蛋白要选择其只对各种基底膜呈阳性反应者；抗结蛋白要选择其只对肌肉细胞阳性而非肌肉细胞阴性者。本实验结果符合上述规律，阳性染色处呈棕红色，阴性处只有细胞核呈兰色。可以鉴别各种组织，背景清晰。

2. **单克隆抗体的鉴定**

对多种抗角蛋白（HK_2，K27）、抗胶质纤维酸性蛋白（GFAP）、抗神经微丝（NF）、抗上皮膜抗原（EMA）、抗Ⅳ型胶原（ColⅣ）、抗结蛋白（Desmin）单克隆抗体的免疫组化鉴定，得出特性强而灵敏度高的结果（如表）

讨　论

在进行高特异性的单抗制备时，所用抗原常不是高度纯化的，所以产生的抗体可能有许多种，大多数不是研究者所需要的，因而必须迅速检出产生的所需抗体的杂交瘤细胞而丢弃产生不需要抗体的杂 （下转第322页）

附表　多组织切片对单克隆抗体的鉴定

多组织	心	肝	脾	肺	肾	肠	胃	皮肤	肌肉	大脑	小脑	胸腺	胰腺
单抗 HK_2 1∶50		胎肝 卅		上皮 卅	曲管 卅	上皮 卅	上皮 卅	卅	—	—	—	小体 卅	上皮 卅
K_{27} 1∶50	—	—	—	—	—	—	—	角化上皮 卅	—	—	—	—	—
GFAP 1∶200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	星形胶质细胞 卅	—	—	—
NF 1∶200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	神经微丝 卅	—	—
EMA 1∶50	—	—、	—	上皮 卅	曲管 卅	—	—	—	—	—	—	—	上皮 卅
Desmin 1∶50	卅	—	—	—	—	肌肉 卅	肌肉 卅	—	卅	—	—	—	—
ColⅣ 1∶50	上皮、血管、腺体、肌肉基底膜均为阳性。												