DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.059
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1378 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

# 技术方法

文章编号:1000-5404(2002)11-1378-02

## 树脂摊片法在坐骨神经免疫电镜观察中的应用

## Application of resin spreading method in the observation of sciatic nerve by immuno-electron microscopy

周 萍[1],张杰敏[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]分子生物学中心;[2]第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 通过树脂摊片包埋在坐骨神经免疫电镜观察中的应用,以提高检测的阳性率及定位的准确性。方法 40只3月龄Wistar大鼠分别用CJ-Pen19灭活菌株经初次免疫和加强免疫后,第5周取坐骨神经1 cm,Zamboni液固定6~18 h,石蜡包埋,制成20 μm厚的切片,免疫组化检测坐骨神经局部IgG,光镜下选取有意义的区域定标。采用树脂摊片包埋制片。结果 轴索变性组IgG染色呈点状,中等电子密度沉积于神经轴膜和轴浆内,髓鞘脱失组IgG主要位于髓鞘表面,神经轴膜和轴浆均未见IgG沉积。结论 树脂摊片包埋在免疫电镜标本制作过程中,能明显提高检测的阳性率及定位准确性,值得推广。

免疫电镜检测包括包埋前染色和包埋后染色,由于电镜包埋处理过程中,多个步骤均有可能降低被测标本的抗原性,从而容易影响检测的阳性率。周围神经标本小而且容易纵向分离,在染色后传统的载玻片摊片法包埋过程中更不易从载玻片上剥离。坐骨神经虽然是最大的周围神经,但在制片过程中可剥离仍较困难。本研究采用一种新的方法-树脂摊片法,提高了染色后包埋制样的成功率,同时又简单、易行、经济、实用[1]。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及其标本来源[2]

1.1.1 实验动物 40只3月龄的Wistar大鼠分别用CJ-Pen19灭活菌株经初次免疫和加强免疫后,第5周取坐骨神经作病理学观察,共有15条神经发生病变,按病理类型分为2组:轴索变性11条、髓鞘脱失4条;另取无病变对照组。设健康成年Wistar大鼠正常坐骨神经为组化检测阴性对照。

1.1.2 标本收集 CJ-Pen19全身免疫动物病理学观察取材的同时各留取一段长约1 cm的坐骨神经,Zamboni液(含饱和苦味酸的多聚甲醛缓冲液)固定6~18 h后,石蜡包埋,制成20 μm厚的切片,用于免疫电镜包埋前组化染色。

### 1.2 主要试剂

小鼠抗大鼠IgG单抗效价1∶100(武汉博士德公司),SABC检测盒(武汉博士德公司)和DAB显色剂(武汉博士德公司)。

### 1.3 坐骨神经局部IgG、IgM表达的免疫组化染色[3]

20 μm切片脱蜡至水,免疫组化检测坐骨神经局部IgG、IgM的表达,DAB染色后(按武汉博士德公司相应试剂说明操作),光镜下选取有意义的区域定标。

### 1.4 树脂摊片法包埋制片[4]

采用树脂摊片法包埋制片。①坐骨神经切片20 μm用3%的戊二醛,如为包埋前染色则在染色后用冷二钾坤酸钠缓漂洗,后转入3%的戊二醛固定。②冷二钾坤酸钠缓冲液漂洗4次,每次10~15 min。③1% $OSO_4$ 后固定2 h。④50%~70%丙酮脱水8~10 min。⑤饱和醋酸铀过夜。⑥90%丙酮脱水8~10 min。⑦100%丙酮脱水4次,每次8~10 min。⑧环氧丙烷置换10~15 min。⑨环氧丙烷:618=1∶1 1 h 35~40 ℃。⑩纯包埋剂(不加DMP—30)2 h 35~40 ℃。⑪包埋剂(加DMP-30)3 h 35~40 ℃。⑫包埋:用已配好的618包埋剂倒在塑料包埋框的背面,尽量让其平、薄,然后放入60~70℃烤箱中硬化。制成大小不等的618包埋剂平板备用,将已制好的618载玻片平板放平,把已在包埋剂(加DMP—30)中浸透好的坐骨神经阳性厚片用小镊子夹起放在平板上,用牙签把厚片碾平,使其不卷曲,不皱折,然后用已废弃的包埋头后端轻轻地放在碾平的厚片上,放入烤箱过夜,升温至60~70 ℃硬化48 h。⑬JME-100SX电镜观察。

## 2 结果

轴索变性组IgG染色电镜观察,可见点状、中等电子密度的染色物质大量沉积其部位以神经轴膜为主,少部分轴浆内也可见;髓鞘脱失组仅有少部分神经可见少量IgG染色物质沉积,见图1,但沉积量少且主要位于髓鞘表面,神经轴膜及轴浆内均未见IgG沉积。

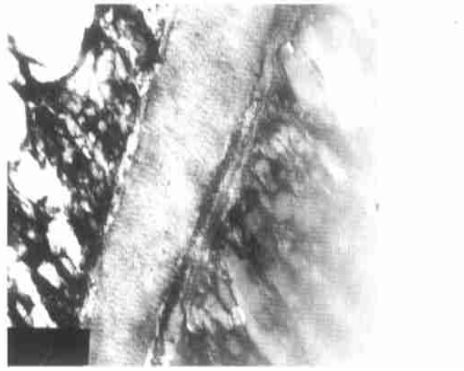


图1 脱髓鞘神经髓鞘表面见较高电子密度物质沉积(纵切面,透射电镜×25 000)

作者简介:周 萍(1964—),女,四川省德阳市人,实验师,主要从事创伤与分子生物学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757465

收稿日期:2001-11-28;修回日期:2002-04-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 3　讨论

格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)是一种常见的周围神经病。根据病理改变的不同,分为急性髓鞘脱失(Acute inflammatory demyelination paralysis, AIDP)和急性轴索变性(Acute motor axon degeneration, AMAN)两种类型。近年认为,大部分GBS的发生与空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni, CJ)某些菌株(如Pen-19等)前驱期感染有关[5]。因此,本研究通过免疫电镜技术方法的改进,拟更准确地检测不同类型病变神经局部IgG、IgM等免疫物质的表达情况及沉积部位,找到体液免疫因素介导CJ-Pen19诱发周围神经病变的直接证据。

文献[6]报道,在常规免疫电镜技术方法中,普遍采用的方法是环氧树脂包埋法,它将小片组织或半薄切片贴在载玻片上,再将充满环氧树脂的胶囊倒置于切片上聚合、硬化,进行原位包埋。这种方法存在一个缺点,就是组织硬化以后,很难将树脂与玻片进行分离以致于影响到切片工作。另外,由于周围神经标本不仅细小,而且易碎,采用常规的载玻片摊片法包埋过程中不易从载玻片上剥离,从而影响阳性染色部位的观察及定位。本研究经过改良,采用简单、易行的树脂摊片法,明显提高了染色后包埋制样的成功率,同时染色部位定位清晰、准确,成功地找到了体液免疫因素介导CJ-Pen19诱发周围神经病变的直接证据,为探讨CJ诱发周围神经病的免疫机制提供了必要的和有效的方法。实验证明,树脂摊片法包埋在免疫电镜标本制作过程中,尤其对于细小易碎的标本,不失为一种提高检测阳性率及定位准确性较成功的方法,值得推广。

关键词:树脂摊片;免疫电镜
中图法分类号:R446　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 周　萍. 618环氧树脂平板在免疫电镜包埋中的应用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(11): 791.
[2] 张杰敏, 蔡方成. 不同菌型空肠弯曲菌免疫诱发大鼠变态反应性周围神经病的比较性研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(1), 21—24.
[3] 张杰敏, 蔡方成. 空肠弯曲菌诱发周围神经病的免疫学证据[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(2), 98—101.
[4] 张亦农, 李　和. 纳金在包埋前免疫电镜中的应用[J]. 解剖科学进展, 1999, 5(2): 166—170.
[5] Blaser M J. Epidemiologic and clinical features of Campylobacter jejuni infection[J]. J Infect Dis, 1997, 176 (Suppl 2): S103—105.
[6] 蔡文琴, 王伯汀云. 实用免疫细胞化学与分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 135—140.

(编辑　谢义霞)


# 征订启事

## 欢迎订阅2003年《中国临床康复》杂志

《中国临床康复》(原《现代康复》)杂志是由卫生部主管、中国康复医学会主办的国家级医学期刊。ISSN1671-5926, CN21-1470/R, 系中国科技论文统计源期刊,中国医学核心期刊,并被国内多家检索系统收录。本刊为临床康复医学工作者,临床各科医务人员和医疗、教学、科研服务。及时报道国内外临床康复医疗、专科康复、康复功能评定、康复工程等方面的新理论、新技术、新经验和新进展。设有特色专栏:每期专题论坛(10万字专家继教园地)、康复医学在线、循证医学导引;论著、基础研究、综述、经验交流、英文专栏等。本刊为半月刊,A4开本,160页,国内邮发代号:8—94, 12元/册,全年288元。欲分科订阅者(上半月刊(内科系统)、下半月刊(外科系统)各144元/12册),请直接汇款至《中国临床康复》杂志社发行部。

联系地址:辽宁省沈阳市和平区十纬路16号《中国临床康复》杂志社发行部　　邮政编码:110003
联 系 人:吕明超　　电　　话:(024)22714352、22714373

## 欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》

《中国肿瘤生物治疗杂志》由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办,现为"中国科技论文统计源期刊"、《中国科学引文数据库》来源期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国医学文摘·肿瘤学》医学核心期刊,2002年被《中国学术期刊文摘》收录为首批源期刊。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要刊登与肿瘤生物治疗有关的基础理论与临床应用的研究论文,新实验技术及研究成果等。主要栏目有述评、论著、综述、短篇报道、研究简报和科技信息等。欢迎广大从事肿瘤生物治疗的科研工作者及相关临床医师踊跃投稿,本刊将公平公正、择优录取。

本刊为季刊,每期定价8.00元,全年定价32.00元,邮发代号:4—476。欢迎广大读者到当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将40.00元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码。

联系地址:上海市翔殷路800号第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部
邮政编码:200433　　联 系 人:厉永建　　电　　话:(021)55620605×22、25070316×22


?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net