DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.057
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0359-02

技术方法

不同显色方法对免疫细胞化学显色结果的影响

A comparative study of different chromogens applied in immunocytochemistry

张吉强[1],姚 青[2],刘建军[1],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,[2]附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨不同显色方法对免疫细胞化学实验结果的影响。方法 免疫细胞化学S-P法,显色剂分别为3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC)、二氨基联苯氨(Diaminobenzidin, DAB)和硫酸镍铵-DAB(Nickel ammonium sulfate-DAB, Ni-DAB)。结果 在抗体浓度、孵育时间等条件完全相同的情况下,Ni-DAB显色法灵敏度最高、反差强,AEC显色效果也较好,DAB效果最差。结论 Ni-DAB显色敏感性较DAB高8~12倍,特别适合于难以显示的抗原。其操作简单,仅需在显色时加入少量硫酸镍铵即可,所需抗体浓度大大降低,并可结合DAB或AEC进行双重标记,是一种值得推荐的免疫细胞化学显色方法。

免疫细胞化学是组织细胞化学中常用的方法之一,显色时选用不同的显色剂可以使终产物形成不同的颜色,如3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC)为红色,二氨基联苯氨(Diaminobenzidin, DAB)为棕黄色等,目前使用较多的是AEC和DAB,尤其是DAB。DAB首先被Graham和Karnovsky[1]用作过氧化物酶组织化学的显色剂,其显色的终产物稳定性强,切片可脱水透明、长期保存;而且终产物还具有嗜锇性,经锇酸处理后,电子密度增加,可用于电镜观察,因而被广泛应用于免疫细胞化学的显色反应[2]。但是,DAB显色的敏感性不是很高,如何提高免疫细胞化学检测的灵敏性问题一直备受广大学者的关注,据文献报道镍与DAB联合应用可以显著增强DAB显色的敏感性,但应用该法的文献并不多。为此我们比较了常用的AEC法、单一的DAB法(DAB)和硫酸镍铵增强的DAB显色法(Ni-DAB)对免疫细胞化学显色结果的差异,以期找出一种高敏感性、低成本、简便易行的显色方法。

1 材料与方法

成年雌性昆明小鼠购自本校实验动物中心,经常规灌注固定后取脑进行冰冻切片(30 μm)备用。

免疫细胞化学采用S-P法。一抗分别为:兔抗雌激素β受体抗体(ERβ)购自Santa Cruz公司(Sc-8974),兔抗胆碱乙酰转移酶抗体(ChAT)购自Chemicon公司(AB143)。二抗(羊抗兔)购自博士德生物工程有限公司、S-P复合物(辣根酶标记链亲和素)购自中山生物技术有限公司;硫酸镍铵为上海试剂二厂产品(分析纯;购自重庆化学试剂仓库)。实验操作参照Hancock[3,4]加以修改如下:①0.1 mol/L PBS漂洗,3×5 min;②3% H_2O_2(PBS配)处理30 min以封闭内源性过氧化物酶活性;③0.1 mol/L PBS漂洗,3×5 min;④0.4% Triton X-100/0.1%牛血清白蛋白(PBS配)37 ℃孵育1 h;⑤一抗37 ℃孵育1 h后立即用PBS漂洗(但ERβ再于4 ℃过夜)。然后用0.1 mol/L PBS漂洗,4×5 min;⑥二抗孵育,室温1 h;0.1 mol/L PBS漂洗,4×5 min;⑦S-P复合物孵育,室温1 h;0.1 mol/L PBS漂洗,4×5 min;⑧显色。AEC显色按试剂盒(博士德)的使用说明进行,DAB按常规进行。

Ni-DAB显色液的配制:2.5%硫酸镍铵-0.035%DAB(0.1 mol/L醋酸钠溶液配制),过滤后加入0.03% H_2O_2。光镜下观察显色至合适,然后终止显色,进行常规脱水、透明、封片(AEC组在终止显色后直接用水溶性封片剂或甘油封片)。

2 实验结果

我们首先比较了在完全相同的实验条件下三种显色方法对免疫细胞化学实验结果的影响,所用一抗浓度分别为:ERβ:1∶200;ChAT:1∶500。由于Ni-DAB显色组ChAT在此浓度下免疫阳性物质覆盖了整个细胞,因此又将一抗进行了倍比稀释,但二抗和S-P复合物的浓度保持不变,整个实验操作在6 h以内即可完成,但ERβ需在一抗内孵育过夜才能得到明显的阳性结果。

Ni-DAB显色组:显色敏感性最强,效果最好,免疫阳性物质为蓝黑色,反差很好。ERβ免疫阳性物质清楚地位于细胞核(深浅表示阳性的强弱),一抗1∶200稀释时可得到很好的显色结果,见图1,其最低稀释度可为1∶800;ChAT在1∶250~1∶500稀释时,整个细胞都被蓝黑色覆盖,包括细胞核和突起;而1∶2 000时细胞轮廓最清楚,免疫阳性物质位于胞浆和短突起内,阳性信号强而且明显,见图2;1∶4 000稀释时仍可得到较好的结果。

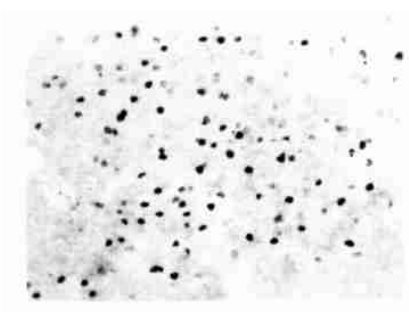


图1 小鼠脑内的ERβ免疫反应,免疫阳性物质位于细胞核,可见阳性细胞数目较多。硫酸镍铵增强的DAB显色法 (S-P×200)

作者简介:张吉强(1968-),男,重庆市潼南县人,博士,讲师,从事雌激素对神经系统作用的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752229

收稿日期:2001-10-15;修回日期:2001-12-29

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

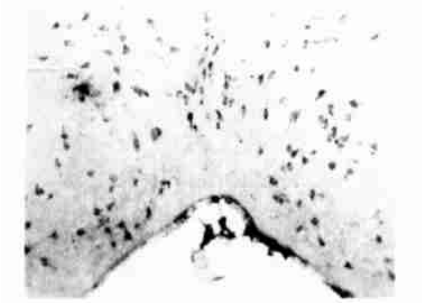


图 2 小鼠脑内的 **ChAT** 免疫反应，免疫阳性物质位于胞浆。硫酸镍铵增强的 **DAB** 显色法 (S-P× 100)

AEC 显色组：两种抗体的显色效果都较好，免疫阳性物质为鲜艳的红色。要得到清晰的结果，ChAT 的稀释浓度可以为 1∶500～1∶1 000，ERβ 为 1∶200。

DAB 显色组：ERβ 在 1∶50～1∶800 范围内在透明、封片前基本上看不出明显的阳性信号，二甲苯透明后可见有微弱的阳性反应，见图 3。要得到较好的显色效果，ChAT 所需浓度1∶250～1∶500，而且突起内的免疫反应微弱。如果将一抗、二抗和 SP 复合物的浓度均增加并在一抗内孵育过夜，可以改善显色效果，但反差仍然不如 N-DAB 组和 AEC 组鲜明。

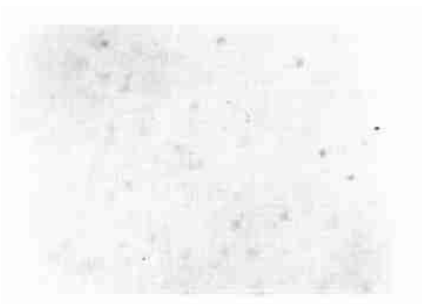


图 3 小鼠脑内的 **ERβ** 免疫反应，**DAB** 显色法。免疫阳性物质位于细胞核，但阳性细胞数目明显少于 **N-DAB** 显色组。实验条件同图 **1** (S-P×200)

3 讨论

本研究结果表明，不同的显色方法对同一实验结果的影响很大，尤其是对一些弱表达的抗原或 ERβ 一类的核抗原，用常规 DAB 等显色法很难显示出来，因此可能产生完全相反的结果。DAB 作为实验室最常用的免疫细胞化学显色试剂，在本研究所用的三种显色法中敏感性最差，几乎不能检测到 ERβ 的表达。AEC 显色效果较DAB 好，但该法显示的切片只能用水溶性封片剂或甘油等封片，这样对观察带来一定的不利影响，而且也不能长期保存。虽然采用抗原修复对 DAB 的显色有一定增强，但是抗原修复常常导致组织切片脱落、甚至破碎。延长切片在抗体内的孵育时间或提高抗体浓度也可改善显色结果，但同时可能导致显色背景过高。

在所有的实验组中，N-DAB 显色的阳性信号非常清楚。不论是核抗原 ERβ，还是容易显示的 ChAT（还有 NOS_1 和 p75 等其它抗原），都得到了理想的效果。其灵敏度远高于 AEC 法和 DAB 法。如对 ChAT，要得到同样清楚的结果，AEC 法和 DAB 法所需浓度分别为 1∶500～1∶1 000 和 1∶250～1∶500，而 N-DAB 法所需一抗仅为 1∶2 000～1∶4 000。对 ERβ，无论何种浓度下 DAB 基本上都是微弱或无阳性，而应用 N-DAB 法一抗甚至可以稀释到 1∶800。因此，N-DAB 较 DAB 敏感性增强 8～12 倍，较 AEC 法高出 4 倍左右，而 AEC 则较 DAB 至少高出 1 倍。

Hancock[3,4] 将镍引入到DAB 显色法中，建立了 N-DAB 显色法。我们在重复作者的步骤时发现，其操作很容易导致背景染色过深。经过反复摸索，我们延长了漂洗时间，省略了显色前用醋酸缓冲液和镍溶液处理等步骤，显色效果同样很好。据报道国内舒斯云等[5] 改良的葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵显色法敏感性较高，但该法首先是成本高（葡萄糖氧化酶价格昂贵），其次是步骤较我们所用的N-DAB 法繁琐，其报道的整个实验过程比我们至少多出 3 h。至于与 N-DAB 显色的敏感性有何差异，我们未曾作进一步比较，也未见文献报道。

总的来说，N-DAB 显色法具有高灵敏性、高反差、操作简便（仅在配制常规 DAB 显色液时加入 2.5%的硫酸镍铵即可）等优点，所需硫酸镍铵价格便宜，容易购得，所需抗体浓度较常规的 DAB 或 AEC 大大降低，可以节约大量的经费，并可结合 DAB 和/或 AEC 法进行免疫组化多重标记，是一种值得推荐的免疫细胞化学显色方法。

关键词：3-氨基-9-乙基咔唑（AEC）；二氨基联苯氨（DAB）；硫酸镍铵；免疫细胞化学

中图法分类号：R392.31 文献标识码：B

参考文献：

[1] Graham R C, Jr Karnowsky M J. The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique[J]. J Histochem Cytochem, 1966, 14(4): 291－302.

[2] 蔡文琴，王伯弥，云. 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. 33－45.

[3] Hancock M B. A serotonin-immunoreactive fiber system in the dorsal columns of the spinal cord[J]. Neurosci Lett, 1982, 31(3): 247－252.

[4] Hancock M B. Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining[J]. J Histochem Cytochem, 1984, 32(3): 311－314.

[5] 舒斯云，鞠 躬. 一种敏感的辣根过氧化物酶反应法：葡萄糖氧化酶-二氨基联苯氨－硫酸镍铵法[J]. 解剖学报，1989，(4)：402－404.

（编辑 陈聪连）

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