DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.046

生物素标记 P^{53} 探针在骨肉瘤石蜡切片上进行原位分子杂交

In situ hybridization using biotin-labelled P^{53} probe in paraffin section of osteosarcoma

李增鹏 高奉浮 (第三军医大学附属大坪医院病理科)重庆,630042

原位分子杂交技术能在组织切片的亚细胞水平上检测其特异基因 DNA 或 mRNA,因而具有其独特的准确性和特异性。最近我们用生物素标记的 P^{53} 探针对30例骨肉瘤进行原位分子杂交技术检测,获得了较满意的结果。现报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料

切片为1987~1993年送检骨肉瘤标本30例,10%中性福尔马林固定,石蜡切片5 μm。

1.2 试剂

P^{53} 探针为 Oncon 公司产品,探针长度为1.2 kb cDNA 片段,人体染色体定位:17 p。

杂交药盒为 Sigma 公司产品。蛋白酶 K 为 Merk 公司产品。ABC 复合物为美国 Vector 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 石蜡切片5 μm,60℃烤片12 h。

1.3.2 常规脱蜡至 PBS 洗10 min。

1.3.3 0.2 N 盐酸处理切片10 min 后2×SSC 洗10 min。

1.3.4 蛋白酶 K(25 μg/ml)37℃消化20 min。

1.3.5 0.2%甘氨酸处理切片10 min 后 PBS 洗10 min。

1.3.6 4%多聚甲醛后固定切片20 min 后 PBS 洗10 min。

1.3.7 0.1%三乙醇胺 pH8.0洗10 min。

1.3.8 逐级酒精脱水,37℃干燥 1h。

1.3.9 将切片在预杂交液中45℃湿盒内60 min(Sigma 杂交盒1:1稀释)。

1.3.10 将 P^{53} 探针液(200 ng/ml)和切片加热96℃变性6~8 min 后迅速放入冰水中冷却5 min 做杂交液备用。

1.3.11 将 P^{53} 探针液滴在组织片上,加盖片45℃湿盒内(50%甲酰胺)过夜。阴性对照滴加预杂交液。

1.3.12 2×SSC 洗10 min 后 PBS 洗10 min。

1.3.13 5%BSA 封闭切片20 min。

1.3.14 ABC 复合物37℃,40 min。后 PBS 洗10 min。

1.3.15 DAB 显色5~8 min 后 PBS 洗10 min。

1.3.16 常规脱水,衬染(0.1%甲基绿30 s),封片。

2 结果与体会

阳性杂交结果显示胞核呈棕褐色颗粒状,其余为甲基绿衬染,阴性对照则不出现颗粒,但可有淡绿色背景,为本底。阳性对照用已确定为阳性或阴性组织进行原位杂交组织化学对照。阴性对照用未加探针的杂交液和已知阳性切片进行同步杂交试验。

蛋白酶 K 的处理:本组采用的材料全部为1987~1993年临床送检经10%福尔马林固定的陈旧蜡块。蛋白酶 K 的消化能使经固定后被遮蔽的靶核酸暴露,以增加探针结合及可及性。消化的浓度、温度及时间应根据不同的实验条件来确定。浓度及温度过高或过低都不易达到消化的最佳效果。我们使用的浓度为25 μg/ml,时间20 min,温度37℃。浓度过高会引起细胞形态结构的破坏及核酸靶分子的减少,亦会导致组织在切片上脱落,浓度过低将起不到消化目的。

探针浓度是直接影响杂交效果的关键。探针浓度低,杂交速率达不到要求。探针浓度过高容易形成堆积和浪费探针。文献[1,2,3]报道探针的浓度一般在50~100 ng/ml。我们通过反复试验认为,最适宜的探针浓度要通过实验来确定。我们使用的探针浓度为200 ng/ml,因为:①放射性同位素标记的探针同非放射性探针在敏感性和组织穿透能力方面相比,前者均强于后者。②不同的组织和在不同方法制备的标本上以及新鲜组织和陈旧组织中也有差异。所以探针浓度是本实验中的重要环节,选择好探针的最佳浓度才能使实验得到最好的结果和准确的科学依据。

变性和杂交是本实验中必不可少的一项重要手段。我们采用的变性温度为96~98℃,时间为8 min。变性温度过低,双链结构解不开,温度过高、时间太长易使组织片脱落。为了使探针的变性更彻底,我们采用两次变性的方法,即探针单独变性和滴加在组织片后一同再复性,这样能使探针和靶核酸的结合更完全,可及性更大些。我们采用的杂交温度为45℃,时间:过夜(12~16 h)。温度在40℃时杂交效果明显不如前者好,信/杂比也不如前者。

关键词 骨肉瘤;原位杂交;P^{53}

中图法分类号 R365

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

参考文献

1 孙士勇译. DNA 探针技术. 北京：科学出版社，1992：10

2 蔡文琴，王伯沄 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科学技术出版社，1994：422

3 苏慧慈. 原位杂交. 北京：中国科学技术出版社，1994：74

（收稿：1995-06-17；修回：1995-12-20）

（编辑 冷怀明、汪勤俭）

肝癌病人手术前后 NK 细胞、mIL-2R、sIL-2R、TNF 水平的检测

Detetion of NK cell, mIL-2R, sIL-2R and TNF in patients with liver carcinoma before and after operation

黄兴玉 张援平 蔡学敏 刘倩予 （第三军医大学附属西南医院检验科）重庆，630038

本文对肝癌病人手术前后外周血 NK 细胞活性，膜白细胞介素-2受体（mIL-2R）表达，可溶性白细胞介素-2受体（sIL-2R）和 TNF 水平进行了检测，初步探讨了肝癌手术前后细胞免疫功能的变化，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

原发性肝癌30例，均经病理切片证实。男24例，女6例。年龄30～68岁。全部在手术前采血，其中10例在手术后3周采血复查。正常对照组为我院健康献血员30例。男18例，女12例，年龄20～39岁。

1.2 试剂及方法

1.2.1 NK 细胞活性 肝素抗凝全血用淋巴细胞分层液分离出淋巴细胞作为效应细胞，K_{562} 细胞株（重庆医科大学病生教研室提供）作为靶细胞。采用LDH释放法[1]测定NK细胞活性。

1.2.2 mIL-2R 表达 肝素抗凝全血经适量 PHA 诱导激活淋巴细胞，按常规分离淋巴细胞收集单个核细胞，洗涤后手工涂片，采用免疫酶标（ABC）组化法（美国 VECTOR 产品），IL-2R 单抗（Tac）（卫生部武汉生物制品所）光镜下计数200个以上细胞，算出阳性细胞百分率。

1.2.3 血清 sIL-2R 测定 采用夹心 ELISA 法[2]，（第四军医大学试剂盒），酶标仪490 nm 测吸光度，根据计算机拟合方程采用双对数直线回归求出血清 sIL-2R 含量。

1.2.4 血清 TNF 测定 采用双抗体夹心法（军事医学科学院试剂盒），490 nm 测吸光度，根据计算机拟合方程采用指数回归求出待测血清 TNF 含量。

1.2.5 统计学处理 用第三军医大学数学教研室医用数理统计程序包，所得数据经微机处理。

2 结果

肝癌病人的 NK 细胞活性、mIL-2R 表达明显低于正常对照组。sIL-2R、TNF 水平明显高于正常对照组。

10例肝癌病人手术后3周 NK 细胞活性和 mIL-2R 有不同程度升高，高于术前，低于正常对照组。sIL-2R 和 TNF 有不同程度下降，但未恢复至正常水平（见附表）。

附表 肝癌病人与正常人 NK 细胞活性、mIL-2R、sIL-2R、TNF 水平变化比较（$\bar{x}\pm s$）

项目	正常对照组	肝癌病人组	
		手术前（$n=30$）	手术后（$n=10$）
NK 细胞活性（%）	35.57±11.14	19.85±9.22△△	28.22±13.45△*
mIL-2R（%）	45.99±9.87	22.76±6.75△	32.02±10.34△*
sIL-2R（μ）	36.85±17.24	90.08±31.51△△	50.11±22.17△
TNF（μg/L）	0.91±0.23	4.586±1.824△△	2.82±0.85△

△：与正常对照比较 $P<0.05$；△△：与正常对照比较 $P<0.01$；*：手术后与手术前对照比较 $P<0.05$

3 讨论

NK 细胞在机体免疫监控中占有重要地位，其活性高低与肿瘤的发生发展密切相关[3]。它是机体抗肿瘤生长，扩散和转移的自然防御系统。许多研究发现，恶性肿瘤病人外周 NK 细胞数量减少，活性降低[4]。本

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