DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.02.024

APAAP桥联酶标技术

李增鹏（大坪医院 病理科）

当前免疫组化技术由于方法上的不断改进和革新，正以惊人的速度向前发展。多年来在实际应用中大多数人都采用辣根过氧化物酶作用于底物呈现颜色，但用碱性磷酸酶、抗碱性磷酸酶（简称APAAP）者少有报道。我室在使用该试剂后，经反复试验和对比取得了满意的染色效果。现介绍如下：

1 试 剂

第一抗体CEA（北京生物制品所）MC_5（结肠癌单克隆抗体）

第二抗体（羊抗鼠抗血清）（军科三所）

第三抗体APAAP和底物液。（军科三所）。

2 标记过程

（1）石蜡切片（5μm）常规脱蜡，水化；（2）0.1%胰蛋白酶和0.1%氯化钙消化20min；（3）3%正常羊血清浸浴10min；（4）第一抗体（1:50）4℃过夜；（5）第二抗体温育30min；(6)APAAP复合物温育30min；（7）1%坚固红底物液（配方见后）显色；（8）需要时进行对比染色，甘油明胶封固。上述1、4、5、6各步骤后，均用PBS液洗。

底物工作液：

坚固红TR盐	2mg
α-萘酚AS-BI磷酸盐	1 mg
Tris缓冲液	2ml
二甲基甲酰胺	40μl

注：配制时先将α-萘酚AS-BI磷酸盐溶于40μl二甲基甲酰胺，再加Tris缓冲液。临用前10min加坚固红TR盐（底物液中，坚固红含量每1 ml底物液中含坚固红1 mg）。

3 染色结果

APAAP染色终产物颜色为玫瑰红色，胞膜一圈着色。显示胞浆抗原的细胞浆着色。核为复染之颜色。

4 讨 论

4.1 *基本原理* 本试剂系1种碱性磷酸酶、抗碱性磷酸酶复合物。其基本原理与PAP法类似，是一抗与组织中的抗原结合。第二抗体起桥抗作用，1个Fab段联接第一抗体，另1个Fab段联接碱性磷酸酶抗体（第三抗体）与碱性磷酸酶的复合物（APAAP），通过APAAP复合物中的碱性磷酸酶催化底物显色以鉴定抗原物质。

4.2 *坚固红反应原理* 坚固红为重氮盐的1种，其反应原理可分为两步，即初级反应和次级反应。初级反应是以萘酚AS-BI磷酸盐物质的衍生物作底物；而次级反应是以重氮盐坚固红为捕捉剂，与初产物发生偶联反应，形成不溶或微溶于水的偶氮染料，沉淀于反应部位，达到显色定位的目的。

我们取1977年～1988年的蜡块用PAP、ABC、APAAP 3种方法染色同一腊块比较，结果APAAP法敏感性和阳性率高于其它2种方法，具颜色鲜艳，对比明显等优点。曾有人认为要比酶标抗体间接法高4倍～5倍，而且非特异染色淡，内源酶干扰少，染色后阳性和

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

阴性细胞均保持良好的形态结构。对一些甲醛固定石蜡包埋组织中的微量抗原也能得到很好的效果。若用恒冷切片效果更佳。因用坚固红作用底物液，使其反应的最终产物颜色为玫瑰红色，容易与组织或组织中的色素颗粒鉴别，避免了DAB产物（棕褐色)难与色素区别的缺点。当前国内多数单位用DAB作底物显色剂，但DAB是1种致癌性较强的晒试剂，常致操作者恐惧，且不易处理，尤其对显微摄影及幻灯片的制作，效果往往不好，反之，APAAP法则无此隐患，其优越性就显得更为突出。另外该法还可用于双标和多标。目前应用较多的是PAP-APAAP和ABC-APAAP双标记，也有已应用到免疫金银染色上。

4.3 注意事项

4.3.1 底物液临用前30min配制。染色时间在显微镜下控制，显色时间一般在15min～30min都能获得较满意的效果。

4.3.2 第一抗体可根据自己的需要进行搭配。最好是分装保存，以免冻融次数多减少试剂的效价。

4.3.3 在PBS中尽量充分洗涤，有微量振荡器效果更好。

4.3.4 对抗原较弱的组织可将二抗和APAAP复合物重复1次，可增强染色深度。

4.3.5 显色后不脱水，用甘油明胶封片。切片放在4℃下保存半年效果仍然很好。在复染中可根据自己的习惯进行对比染色，如：Mayer氏苏木素、甲基绿或伊文斯蓝均可。

4.3.6 灭活内源性过氧化物酶可省略，因APAAP染色除小肠组织内都不受内源性过氧化酶的干扰。

（本文承蒙高奉浔教授修改，特此致谢）

参 考 文 献

1. 王 棣。抗碱性磷酸酶MCAB的制备和应用。中华微生物学和免疫学杂志。1986；6（3）：152

（收稿：1989：11.06，修回：1990.12.25）

临床常用孕激素制剂生物活性比较

陶晓靖 何世荣（西南医院 妇产科）

在妇产科疾病的临床诊治中，孕激素制剂的应用非常广泛，尤为孕酮（黄体酮）、甲孕酮（安宫黄体酮）、甲地孕酮（妇宁片）、氯地孕酮、炔诺酮（妇康片）及18-甲基炔诺酮等。孕激素必须与特异性受体结合后才能发挥其生物活性。我们测定并比较了临床常用几种孕激素制剂与人子宫内膜及大鼠子宫雌激素胞浆受体（ERc）和孕激素胞浆受体（PRc）的结合能力，为指导恰当的临床用药提供了理论依据。

1 材 料 和 方 法

1.1 研究对象 （1）人子宫内膜：20例正常妇女增生期子宫内膜，用小号刮匙刮取50mg～300mg。（2）

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