DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.06.019

免疫过氧化物酶染色法在常规HE染色切片中的应用

姚云泉 张战根 高广正（新桥医院 病理科）

自从酶标记抗体法（Avrames 1969）[1]、PAP法（Stern-berger 1970）[2]和ABC法（Hsu）[3]问世以来，已被广泛地应用于科研和病理诊断工作中。这些方法一般用于检测组织中各种抗原的表达常需用未经染色的切片。可是，有时由于具有病理诊断意义的组织块已用毕而不能重新取材切片或因会诊邮来仅是1张HE染色的切片。在此种情况下，为了进一步明确诊断而又需作免疫组化染色来确定其组织中的某种抗原，其唯一的办法只能利用现有HE切片如何进行处理再行免疫染色。

Walder（1984）[4]和Milios J（1987）[5]相继采用PAP法和ABC法在常规HE染色切片上成功地进行了免疫染色。但Walder采用的PAP法未能在HE切片上表达S-100蛋白。作者分别采用Milios的酸酒精液和本科的高锰酸钾草酸液两种方法处理HE切片，应用双PAP法进行免疫染色成功地显示了组织中的相关抗原。其效果与未经染色的切片基本一致，具有实用价值。在国内尚未见有报道，故将方法介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源及制备

人体恶性肿瘤组织（结肠癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤、食道癌、淋巴结转移性癌、恶性神经鞘瘤、多形性胶质瘤、组织细胞增生症X、节细胞神经瘤等）均为我科档案材料。组织为20%福马林液固定，常规石蜡包埋。切片4μm，常规HE染色。

1.2 主要试剂（表1）

表1 主要试剂

抗体	来源	方法
Keratin(P)	上海医科大学免疫室	双PAP法
GFAP(M)	重庆医科大学病生教研室	双PAP法
CEA(M)	无锡制药二厂	双PAP法
Mc3(M)	西安四军医大一院消化系	双PAP法
S-100(P)	DaKo公司	双PAP法
ConA	Vect or Lab	ABC法

注：（P）多克隆抗体；（M）单克隆抗体；（MC3）结肠癌单克隆抗体。

1.3 免疫组化染色步骤

1.3.1 脱色前处理：（1）将HE染色切片放入二甲苯中，除去盖玻片。（2）无水酒精、95%酒精、自来水、蒸馏水分别洗涤。

1.3.2 脱色处理方法（2种）：（1）切片放入0.5%盐酸酒精（70%）液处理1min～2min，水洗。(2)切片用0.25%高锰酸钾液处理2min～4min，水洗，入2%草酸液处理30s至切片呈无色，水洗。

1.3.3 染色步骤：按我们改良的Vacca[6]的双PAP法进行。简述如下：（1）将已脱色处理的切片用PBS洗涤。（2）胰酶液消化37℃30min。（3）PBS洗2min×3。（4）3%H_2O_2液处理10min，室温。（5）PBS洗2min×3。（6）滴加3%正常羊血清37℃30min。（7）滴加第一抗体4℃过夜。（8）同（5）。（9）滴加第二抗体37℃30min。（10）同（5）。（11）滴加第三抗体37℃30min。（12）同

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

（5）。（13）重复（9）～（13）。（14）DAB显色，镜下控制。（15）水洗，滴加Mayer's苏木素液5min，水洗至蓝色。（16）常规脱水透明封固。

用相同的肿瘤组织未经HE染色的切片作比较，其条件与上述相一致。以PBS替代一抗作阴性对照。

2 结果

2.1 HE脱色处理的切片与未经染色的切片其免疫染色结果基本一致。只是前者背景染色略深些。

2.2 酸酒精脱色与高锰酸钾草酸液脱色比较，其结果基本一致。只是前者背景染色略大于后者。

3 讨论

免疫过氧化物酶技术在HE切片上的应用，国外有些学者曾作过尝试。如Milios等采用敏感的ABC法，将HE切片用酸酒精先脱色处理再行免疫染色，30多种抗血清均获成功。而Walder等采用单PAP法，直接在HE切片上作免疫染色，但效果不如未经HE染色者，且背景深，其中S-100蛋白免疫组化染色未获成功。我们就现有条件，在Walder方法基础上进行改进。受试验的6种抗血清，以完全相同的条件在HE脱色的切片上作免疫标记，并与未经EH染色切片作对照，均获成功。结果基本一致。我们主要作了以下几点改进：（1）采用较敏感的双PAP法；（2）免疫染色前先进行脱色和蛋白酶消化，使抗原重新暴露和减轻背景染色，提高了免疫反应效果；（3）将一抗孵育时间由室温30min改为4℃冰箱过夜，既提高了一抗的稀释度又节省了昂贵的一抗，减轻了背景非特异性结合。

我们将酸酒精与高锰酸钾草酸液作了比较，结果两种方法均较理想，染色基本一致。只是前者背景略深，可能与前者脱色不彻底有关。而后者脱色时应控制其浓度，我们认为0.25%高锰酸钾和2%草酸液为合适浓度。

免疫过氧化物酶技术中，目前以ABC法最敏感，其次为双PAP法与单PAP法[7]，但前者尚需进口，应用受到限制。而PAP试剂国内已商品化，应用方便经济。我们也用存档10多年的HE切片，本方法同样能显示相关抗原。该技术值得推广，尤其在无法重新获得未染色切片的情况下更有价值。

参考文献

1. Avrameas S. Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunohistochemistry 1969;6:43～52
2. Steroberger LA, et al. The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry preparation and properties of soluble antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 1970: 18:315～333
3. Hsu S, et al. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies Am J Clin Pathol 1981: 75:734～742
4. Walder, et al. Immunoperoxidase staining of previously stained tissue J Cutaneous Pathol 1984;11:95～98
5. Milios, et al. The application of the avidin-biotin technique to previously stained histological section. Stain Technology 1987;62:411—416
6. Vacca JL, et al. A modified peroxidase-antiperoxidase tissue antigen:Localization of substance P in rat spinal cord J Histochem Cytochem 1980;28:297
7. 刘开凤，等。PAP、双PAP和ABC法敏感性及操作方法的比较。华西医大学报 1987；18(1)：48～51

（收稿：1989.06.12；修回：1989.11.21）

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