DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.012

参考文献

1. 陈宏础。肾小球选择性滤过的临床意义。魏明竟等主编《肾功能检验进展》，科技文献出版社重庆分社，1986
2. 丁振若，等。溶菌酶测定用于脑脊液、尿液感染的鉴别诊断。临床检验杂志 1983；1:70
3. 屋形稔·他。尿中γ-グルタミルトランスペペチダーゼ。日本临床 1985秋季增刊 240页
4. Shaw AB, et al. Protein creatinine index and Albustix in assessment of proteinuria. Br Med J 1983: 287:929

（收稿日期：1987年8月19日，修回日期：1988年5月5日）

生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片上作原位杂交技术操作和经验体会

张士敏* 李奇芬** 朱纯吾* 王慧芬**

在肝组织切片上作HBV DNA的原位杂交实验，是继Soathern blot分子杂交方法（吸印法）之后发展起来的又一种新方法。原位杂交法与吸印法相比有其优点：首先，它是在肝组织切片上进行，不仅可观察HBV DNA的分布和数量等，还可观察HBV DNA与细胞病变的关系，这是吸印法所不及的；其次，原位杂交法所需肝组织少，而吸印法一般需10mg肝组织才能进行[1]；再则，有人认为原位杂交法比吸印法敏感[2]。HBV DNA探针有用同位素如^{32}P或^{3}H标记，也有用生物素标记的。而生物素标记的探针具有可在普通光学显微镜下观察，组织切片可长期保存，操作安全，无放射性沾染等优点。虽然，最初人们认为其敏感性不如同位素标记的探针，但随着标记技术的改进，其敏感性已可与同位素标记探针媲美[3]。

我们应用Enzo Biochem生产的生物素标记的HBV DNA探针（HBV Patho-Geno Kit），在福尔马林固定、石蜡包埋的肝穿刺组织和尸检肝组织上进行原位杂交实验，取得了成功。现将我们的方法以及初步的经验和体会介绍如下：

* 解放军302医院
** 第三军医大学第一附属医院

原位杂交技术操作流程

原位杂交技术操作步骤多，所用试剂繁杂，文献报告所用方法不甚一致。在实验中最大的困扰是易于发生脱片和出现假阳性。我们经过反复摸索，采用以下操作流程，基本上控制了脱片，并初步解决了假阳性现象。

1. 载玻片预处理：先经洗液浸泡→清洗→95%酒精浸泡→擦干→均匀涂布玻片粘附剂（Slide adhensive, Pacific Trade d Service Co）→空气干燥。

2. 切片敷贴后，温箱60℃烤片48h左右。

3. 常规脱蜡至80%酒精。

4. 去内源性过氧化物酶（80%甲醇-0.6% H_2O_2液，室温，15'）→PBS冲洗。

5. 0.2N HCl处理，室温，20'→PBS冲洗。

6. 链霉蛋白酶（Pronase E, E. Merck公司产品）消化（0.1mg/ml, pH7.4, 37℃, 10'）。链霉蛋白酶应于配制后，室温放置至少30min再用。

7. 0.2%甘氨酸-PBS液，pH 7～8，冲洗5'。

8. 4%多聚甲醛-PBS液，pH 7～8，5'～

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

10'。

9. 重复步骤7。

10. Denhardt氏液1h→空气干燥（Denhardt氏液：1%Ficoll400，1%聚乙烯吡咯烷酮，1%牛血清白蛋白）。

11. 明胶-铬明矾液（GCA液：0.25g明胶于60℃时溶于50ml去离子水，冷却后加铬明矾至0.5%，防止产生气泡）。10s→气干。

12. 100%酒精脱水。

13. 切片放置于用50%甲酰胺液湿润之湿盒内，滴加含有生物素标记HBV DNA探针杂交混合液，加盖片，在恒温蒸气流中，85℃，10'后，迅速降温，然后移入37℃，温箱2h。

杂交混合液内含：50%甲酰胺，生物素标记HBV DNA探针（5μg/ml）、10%葡聚糖硫酸酯、2×SSC（0.3M NaCl0.03M醋酸钠）和Carrier DNA（2mg/ml）。

14. 小心地揭去盖玻片。

15. 50%去离子甲酰胺液（用2×SSC配）10'、室温。

16. 0.1%Triton-PBS液充分冲洗→PBS冲洗。

17. 链霉亲和素-生物素化辣根过氧化物酶复合物。37℃、30'。

18. 0.1%Triton-PBS冲洗5'→PBS冲洗。

19. DAB（0.05%DAB-0.01%H_2O_2液）呈色，10'～15'，室温→自来水冲洗。

20. 苏木素复染。

21. 常规脱水，透明，封片。

对照实验

（一）阳性对照：以8例经吸印法证实肝组织HBV DNA为阳性的病例，其肝组织切片作原位杂交试验，呈阳性反应，这三例即确定为HBV DNA阳性，每次实验，均以之作为阳性对照标本。

（二）阴性对照：

1. 空白对照：每份标本检测时，同时设一空白对照片，用不含HBV DNA探针的50%甲酰胺，2×SSC和10%葡聚糖硫酸酯溶液代替杂交液。空白对照必须是阴性，实验结果方判为有效。

2. 非HBV感染的肝组织对照：包括正常肝1例（意外死亡的健康成人），非肝病患者的肝2例，以及1例病理诊断为亚急性重型肝炎，但血清学和免疫组化均无任何HBV标志物阳性者的肝组织，结果均为阴性。

（三）阳性标本经DNA酶消化后，再进行杂交，杂交信号显著减弱；经RNA酶消化后，杂交信号也有减弱。

结果与体会

1. 结果判断：切片由两位观察者分别观察。每例标本只有当空白对照实验为阴性时方为有效。同一检测标本，在一次以上的实验观察到一致的阳性结果方定为HBV DNA阳性标本。生物素标记探针，经DAB呈色后，HBV DNA呈棕黄色粗大颗粒（参照文献6，图1～4）。

2. 呈棕黄色粗颗粒的HBV DNA，主要见于胞浆，胞核阳性少见，而且，染色较浅。我们企图以延长杂交时间（从2h延至48h）来提高核阳性细胞数，但未获成功。延长杂交时间未见核阳性细胞增多。

3. 原位杂交实验，组织切片必须经蛋白酶消化，而且，操作步骤繁复，并要求反复冲洗，保持洁净。因而，在操作过程中很容易发生组织片脱落现象，成为原位杂交技术中的重要困扰之一，因此，防止脱片是进行原位杂交实验的首要保证。我们曾试用明胶、乳胶等数种粘贴方法，最后选用了玻片粘附剂，可达到防止脱片的目的。但要注意：玻片一定要清洗干净，粘附剂涂布厚度要适中，过厚将影响染色，过薄则易产生脱片。

4. 有人报告在杂交前用Denhardt氏液和GCA液处理切片，可减少同位素标记探针非特异性结合和减低背景[4]。我们采用此法，发现对生物素标记探针的背景亦有改善。

5. 我们通过反复试验后发现，甲酰胺是产生假阳性的重要因素。这与Lawrence和Singer的结果相符，他们认为甲酰胺主要影响背景[5]。

6. 在85℃蒸气浴中进行杂交时，切片

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

上易于凝集水珠，这可使杂交液的浓度和pH值发生改变。我们除了在滴加杂交液后加盖盖玻片外，并将切片放入铝盒中，密封后，再将铝盒放入蒸气浴中，防止了水汽凝集，取得了良好效果。

7．原位杂交实验出现假阳性，这是实验中遇到的最大困扰。我们经反复摸索，体会到试剂纯、缓冲液及各种配制液体pH的准确和所用主要试剂必须新鲜配制，这三点是保证防止假阳性出现的重要条件。

参 考 文 献

1. Burrell CJ, et el. Hepatology 1984; 4:20
2. Haase AT. J Histochem Cytochem 1986: 34:27
3. Leary JJ, et al. Pro Natl Acad Sci USA 1983; 80:4045
4. Lee GM, et al. Histochem J 1985; 17: 1221
5. Lawrence JB, Singer RH. Nucleic Acid Res 1985; 13:1777
6. 李奇芬，等。第三军医大学学报1988；1:14

（收稿：1987.7.21，修回：1988.5.1）

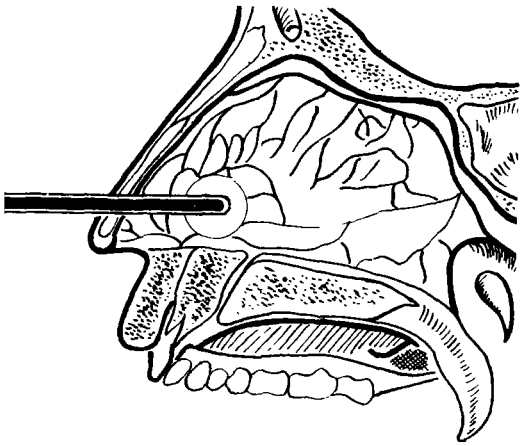
冷冻治疗鼻衄的技术改进

李伯贞 贺晓宁 裴 文 （第一附属医院 耳鼻喉科）

自1982年以来，我科在门诊应用液氮冷冻治疗鼻衄79例，由于在冷冻技术上加以改进，收到较满意的治疗效果。现报道如下：

冷冻治疗鼻中隔易出血区反复鼻衄的病例优于手术治疗。冷冻治疗简便易行，病人不仅可随到随做治疗，而且痛苦少，疗效好。但由于液氮冷冻探头多为圆杆状，与鼻中隔易出血区粘膜接触面很小，而鼻中隔易出血区粘膜下即是软骨和骨，当冷冻探头接触粘膜后难于固定，若稍一滑动即可造成粘膜损伤出血。为此，作者在冷冻区先放一块圆形直径约1 cm，厚约1 mm的小棉片，这样可使冷冻探头易于固定（见图）。这一方法上的改进提高了冷冻效果。一般冷冻40至90s为宜。在79例中，冷冻一次鼻衄痊愈者71例（89.9%），二次痊愈者6例（7.6%），三次痊愈者2例（2.5%）。经一至一年半随访结果，治愈率达96%。个别复发者可随时再冷冻治疗，疗效亦佳。

（收稿：1987.6.16，修回：1988.5.14）



图注：白色圆形区为小棉片，覆盖在易出血区表面，棉片之上为冷冻探头。

大白鼠肝线粒体细胞色素定量

董 燕 王松宝 陈宗荣 （卫防系 防原医学教研室）

JN Williams Jr于1964年报道了用差分光谱法测定鼠肝线粒体细胞色素含量[1]，并用回收实验证实了方法的可靠性。由于此法不需特殊仪器和试剂，且能同时定量四种细胞色素成份（a、b、c、C_1），所以直至近年，国外仍不断有人沿用此法，但国内尚少见报道。

我们在应用原法的基础上，对于测定的

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