

培养细胞免疫组化方法的改进

郑晖 肖德胜 蒋海鹰

(中南大学湘雅医学院病理学教研室 长沙 410078)

摘要 本文介绍了一种培养细胞免疫组织化学的方法,即利用琼脂糖预包埋培养细胞,制成富含细胞的琼脂块,再按一般组织块处理程序制成石蜡切片,进行免疫组织化学检测,获得了较满意的结果,并解决了培养细胞进行免疫组织化学检测的某些问题。

关键词: 培养细胞 免疫组织化学 方法学

影响培养细胞(包括贴壁生长和悬浮生长的细胞)免疫组织化学检测结果主要有两方面的原因,一方面是细胞膜的完整性在一定程度上影响抗体与抗原的结合;另一方面是培养或涂于载玻片上的细胞容易脱落。我们通过反复摸索,发现把培养细胞先作琼脂预包埋制成石蜡包埋块和石蜡切片,再进行免疫组化检测,解决了上述问题,获得了较满意的结果,现将具体操作介绍如下。

材料和方法

1. 细胞系

培养的结肠癌细胞系 SW620

2. 试剂

琼脂糖,抗 smad4 抗体购自深圳晶美公司,SP 试剂盒系北京中山生物技术公司产品

3. 方法

(1) 收集细胞 SW620 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化 1-2min,轻轻吹打细胞使细胞脱离培养瓶壁,加血清终止,并将细胞移入离心管,离心 5min(1000 转/分),去上清,用 PBS 离心清洗 2×5min(1000 转/分),加入 10% 福尔马林固定 2h,去除固定液,PBS 离心清洗 2×5min,伊红染色 2min,PBS 离心清洗 2×5min。

(2) 琼脂糖预包埋 加入少许 PBS 并用吸管吹散细胞,将离心管置于 60℃ 水浴中,加入 8% 的热琼脂糖,混匀细胞,立即离心(5000 转/分)5min,置冰箱冷却,用牙签小心挑出琼脂块。

(3) 石蜡切片的制作 切取富含细胞的琼脂块,擦镜纸包好,进行常规脱水包埋,制成连续切片,60℃ 烤片备用。

(4) 免疫组织化学检测 切片常规脱蜡至水,0.3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 20min,微波修复抗原 5min,正常血清封闭 30min,加入抗 smad4 抗体,37℃ 孵育 30min,4℃ 冰箱过夜,然后按 SP 法进行,DAB 显色。

(5) 对照 用培养于盖玻片上的 SW620 细胞作对

照;用 PBS 代替一抗或 streptavidin-peroxidase 作阴性对照。

结果

采用琼脂糖预包埋方法所获结果显示:阳性信号强,位于细胞浆和/或细胞核,定位明确,细胞形态结构清晰,背景非特异性着色极浅,甚至无着色(图 1);阴性对照组均阴性。

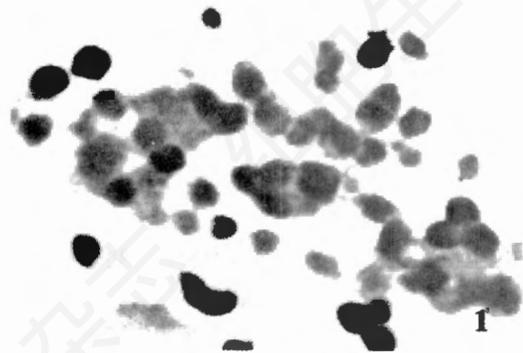


图 1 琼脂预包埋法所获的 smad4 免疫组化结果 (SP 法,×400)



图 2 细胞涂片所获的 smad4 免疫组化结果 (SP 法,×400)

用培养于盖玻片上的细胞的检测结果显示:阳性信号较弱,大部分为胞浆阳性,核阳性较少,阳性信号定位不够清楚,背景有非特异性着色。玻片上细胞比较稀疏(图2)。

讨 论

既往培养细胞作免疫组化染色多将细胞涂于载玻片或将细胞接种于盖玻片上培养待其长满后再进行免疫组化检测,其主要缺点有:①在盖玻片上培养细胞操作较烦复;②在免疫组化实验过程中,细胞容易从玻片上脱落;③细胞膜的完整性在一定程度上影响抗体与抗原的结合。针对上述问题沈明等利用弱乳化剂 Triton X-100 预处理细胞增高细胞膜的通透性,基本上解决了抗体与抗原结合的问题^[1];如何解决细胞脱落,至今尚无理想的方法,用多聚赖氨酸或黏附剂处理载玻片,虽可减少细胞脱落,但仍不能完全避免。鉴于此,笔者先用琼脂糖预包埋细胞,制成像组织块样的琼脂块,再按常规方法制成石蜡包埋块和石蜡切片,就可以如常规组织切片一样进行免疫组织化学检测,该方法的优点是:①解决了细胞膜通透性和细胞脱落的问题;②一次培养的细胞可

同时进行多项指标的检测,而且蜡块可以长久保存;③简化了在载玻片上进行细胞培养的操作;④所获结果图象清晰,阳性信号定位明确,背景非特异性着色极浅;⑤该法不但适用于培养细胞,亦适用脱落细胞和血细胞的等游离细胞的免疫组化检测;但该法亦存在某些不足:①改变了贴壁细胞的形态;②在制成石蜡切片的过程中有机溶剂可能会封闭某些抗原;③操作步骤较多。总的来说,该法作为一种改进的培养细胞免疫组织化学方法,研究者可以根据不同的研究目的予以选用。

操作过程中,应注意的事项有:①制成琼脂包埋块之前,应将细胞用伊红染色,以便在切取富含细胞的琼脂块时易于识别;②加入热琼脂时,琼脂的温度不应高于60℃,以免破坏细胞的形态结构;③加入热琼脂后,应避免琼脂过快凝固,否则离心时细胞不能成团;④所用琼脂糖浓度一般以8%比较适宜,太低易使琼脂块散开。

参 考 文 献

- [1] 沈明等,临床与实验病理学杂志,1998,14(2):197.

关于举办 2003 年全国重点高校细胞生物学骨干教师培训班的通知

细胞生物学是最近十年里发展最快的生物学基础学科,知识更新的速度非常迅速。但是目前我国各高校细胞生物学教学的教材和教学人员的水平都与国际水平有相当大的差距,急需提高。针对这一现状,中国细胞生物学学会和中国科技大学从2003年起,联合举办全国重点高校细胞生物学骨干教师培训班。我们将利用中科院生化与细胞研究所和中国科学技术大学的人才优势以及实验条件,使用国外大学教材,采取强化型集中培训,每天进行专题上课和相应的实验操作,使学员经过一个阶段的培训,能够胜任重点高校细胞生物学的教学。参加对象为重点大学中已经从事或将要从事本科生/研究生细胞生物学教学的青年教师。参加者应具备一定的细胞生物学教学经验或有较好的细胞生物学基础。开班时间为2003年7月5日-7月12日。报名方式:可通过E-mail或信件方式申报。报名截止日期:2003年3月30日。联系人:中国科学技术大学生命科学学院顾月华、刘 兢。电话:0551-3607847,3601437,E-mail:jliu@ustc.edu.cn 每位学员收培训费1500元整,食宿、交通费自理。培训班另外提供讲授内容的多媒体软件,每份500元。

相关事宜:本次培训班使用教材为美国科学院前院长 Bruce Alberts 领衔编写的 Essential Cell Biology 的中译本,这本书的特点是精而新,既反映学术研究的最新成果,又删繁就简略去细节而突出基本原理,书中各章提出的问题对于改变死记硬背式的教学和考试模式有很大的启迪作用。该书在上海科技出版社门市部有售。需要者可直接与该社濮紫兰先生联系(021-64669159)。为保证培训效果,本次培训班总名额限定为15人。报名时请附上本人在细胞生物学教学或研究工作简历,组织者将于5月30日前决定参加培训的人员名单并通知本人。有关费用请缴至下列帐号:1001221009008935652 工行徐汇支行淮海中路分理处,上海中国细胞生物学学会。

中国科学技术大学
中国细胞生物学学会
上海细胞生物学学会
安徽细胞生物学学会
二〇〇二年十二月二十四日