

免疫酶定位技术 II. 固定剂的选择和反应的专一性

—人体肝组织内甲种胎儿蛋白的定位

郑璧如 吴高德

(中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组)

摘 要

本文着重讨论免疫酶定位工作中组织固定剂的选择和酶标反应专一性等问题。以苦味酸-甲醛固定液应用于肝组织内甲种胎儿蛋白(简称甲胎蛋白)的定位获得满意结果。以事先筛选待免疫的动物排除非特异反应,通过一系列对照实验证明反应的专一性。

在过去几年中我们曾建立了免疫酶定位技术,并应用于系统观察大鼠肝组织内甲胎蛋白的分布情况及其与细胞分裂、分化和癌变的关系^[1,2,3],其后又应用这一技术于人体肝组织的甲胎蛋白的定位。本文报道在前阶段工作基础上,进一步比较了几种固定剂应用于人肝脏甲胎蛋白定位的效果,同时为了排除未经免疫的兔血清(正常兔血清)与人肝组织产生非特异阳性反应。采用事先筛选兔子的方法以排除非特异反应的干扰,最后再经过比较系统的对照实验以证明反应的专一性。

材 料 和 方 法

一、人体甲胎蛋白的纯化

纯人胎儿甲胎蛋白(由本室朱畴蓉同志提供)^[4]。

二、兔抗人甲胎蛋白抗血清的制备

1. 筛选兔子 健康白兔,体重 1.5—2.0 公斤,

取免疫前血清(不稀释)与人肝组织切片按酶标流程操作。取其血清与人肝组织没有交叉反应(阴性反应)的兔子进行免疫,并用这种兔子免疫前的血清作为正常兔血清对照。

2. 抗血清制备 用上述纯化甲胎蛋白 300 微克加完全佐剂注入兔一侧后腿腓窝淋巴结内,间隔一月再同样注射另一侧腓窝淋巴结。以后间隔两周至一月测效价。待效价升而复降至滴度近乎零时,再以甲胎蛋白加完全佐剂多点注入背部皮下,待效价满意时,颈动脉放血得抗血清。抗血清对正常人血清和纯化的 HBsAg 均无沉淀反应。

三、酶标记物的制备

羊抗兔 γ 球蛋白抗体的制备及与辣根过氧化物酶的交联条件同前文^[1]。辣根过氧化物酶系东风生化试剂厂 1977 年产品, Rz2.80, 酶标记物的纯化与鉴定亦同前文^[1]。

四、组织制备

肝癌手术标本或尸检肝脏标本,取 $1 \times 0.6 \times 0.15$ 厘米组织块,立即投入冷固定剂,冰箱固定过夜,冷乙醇脱水,二甲苯透明,58—60℃石蜡包埋,3 微米连续切片。

1. 固定剂 采用五种不同的溶液固定同一标本,以比较观察其结果。(1) 95%乙醇-冰乙酸(99:1V/V); (2) 无水乙醇-福尔马林(96:4V/V); (3) Bouin 液; (4) 病理常规 10%福尔马林液; (5) 苦味酸-甲醛固定液,参照 Stefauini 等报道的方法^[5],称取 45.14 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 稍加热溶解于 500 毫升蒸

1967, *J. Exp. Med.* 126: 715-725.

[4] 苏燎原、林兴成、吕国刚、陶明山、周有宁: 1979. “核技术” 3: 88—90.

[5] Metcalf D., Johnson G. R. and Mandel T. E.: 1979. *J. Cell Physiol.* 98: 401—420.

[6] Radke H. W., Erbes P. M., Fassbinder W. and Kosh K. M.: 1978. *Exp. Haematol.* 6: 468—472.

[7] Lowenberg B., de Zeeuw H. M. C., Dick K. A. and van Bekkum D. W.: 1977. *J. Natl. cancer Inst.* 58: 959—966.

馏水,加入20克多聚甲醛,呈白色悬液状。于水浴上加热至60℃,即解聚,溶液转清。从水浴中取出,加 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.74克溶解后,再加150毫升经过两次过滤的饱和苦味酸溶液,然后加水至1000毫升,过滤备用。

2. 固定时间 分别冷固定4、6、8、10、12—20小时。

五、酶标流程

大致同前文报道^[1]。1. 切片常规脱蜡后,移至磷酸缓冲生理盐水(PBS)(0.1M pH7.4)搅拌洗涤3次,每次10分钟。2. 兔抗人甲胎蛋白抗血清稀释30倍,37℃温育1小时,然后PBS洗涤,同上。3. 正常羊血清稀释8倍,37℃保温半小时,不洗。4. 酶标记物稀释15倍,37℃保温1小时,经PBS洗2次,再以Tris-HCl缓冲液(0.05M pH7.6)搅拌洗涤10分钟。5. 切片先浸入3',3-二氨基联苯胺(DAB)溶液(20毫克DAB溶于40毫升上述Tris-HCl缓冲液)中,室温(20—25℃)温育10分钟,再浸入同样DAB溶液加0.4毫升1% H_2O_2 的混合液中,室温显色20分钟。蒸馏水搅拌洗涤。6. 苏木精染色液衬染细胞核。常规脱水,透明,封片。

六、对照实验

1. 正常兔血清对照 经过筛选,其血清与肝组织没有非特异交叉反应的兔子,取其免疫前的血清作为正常对照。

2. 无关抗血清对照 以与甲胎蛋白无关的兔抗血清代替兔抗人甲胎蛋白抗血清。(1)兔抗人绒毛膜促性腺激素抗血清(中国科学院生理研究所二室鲍璋同志提供)效价为1:10240。(2)兔抗水稻普通矮缩病毒抗血清及兔抗小麦丛矮病毒抗血清(均由本所六室熊立民同志提供)效价分别为1:8000及1:400(毛细管环状试验)。(3)兔抗HBsAg抗血清(上海医学化验所顾彬昌同志提供)效价1:32(对流免疫电泳)。

3. 排除非特异交叉反应 (1)以羊抗人甲胎蛋白抗血清代替兔抗人甲胎蛋白抗血清。(2)以PBS代替兔抗人甲胎蛋白抗血清。(3)以羊抗兔 γ 球蛋白抗体加辣根过氧化物酶混合液代替酶标记物。(4)以辣根过氧化物酶标记的兔抗马 γ 球蛋白抗体代替酶标羊抗兔 γ 球蛋白抗体。

4. 吸收、阻断试验 (1)兔抗人甲胎蛋白抗血清经纯甲胎蛋白免疫吸附柱吸附,除去抗甲胎蛋白的专一抗体后,代替兔抗人甲胎蛋白抗血清。(2)切片经过专一抗血清温育后,先以羊抗兔 γ 球蛋白抗体温

育30分钟。然后再与酶标记物温育。

5. 内源过氧化物酶或过氧化氢酶活力检测 切片脱蜡水化进入PBS后,仅以酶底物溶液显色以观察肝组织内源酶活力。

结果与讨论

从人胎儿心脏血液中提取的甲胎蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现很浓的一条蛋白区带。以此免疫已经筛选的兔子得到单相抗血清,酶标记物对正常兔血清作免疫电泳,在 γ 区呈单一沉淀线。以酶底物溶液显色,沉淀线显棕色。酶标阳性细胞在胞浆内呈现棕色颗粒,核阴性。

下面着重讨论两个问题。

一、固定剂的选择

免疫标记定位工作要求组织固定剂既能保持形态结构的完好,又尽可能少损伤抗原(或抗体)的活性。在大鼠肝组织甲胎蛋白定位的工作中,曾采用乙醇-冰乙酸和Bouin液两种固定剂。两者各有利弊,都不够满意。本工作试用五种固定剂平行处理同一标本,同时观察形态(苏木精-伊红染色)和酶标结果,发现以苦味酸-甲醛液固定的标本,细胞结构保存比较满意,酶标阳性率高。乙醇-冰乙酸固定的标本,酶标阳性率与前者相仿,但细胞浆较空,结构保存稍差。Bouin液固定的形态最好,但对抗原损伤较大。乙醇-福尔马林固定液及病理常规福尔马林液固定的无论从形态或酶标角度看均较差。苦味酸-甲醛固定液具有高效、快速、渗透力强等特点,且可适用于电镜标本的固定^[6],对免疫定位工作可能是一个比较理想的固定剂。

固定时间,一般病理标本要求固定充分,形态观察才满意。习惯采用长时间室温固定。但在免疫定位工作,为了减少抗原(或抗体)活性的丧失,只要细胞结构的保存能基本符合要求,应尽可能采用低温及短时间固定。在本实验条件下,10小时以上即可获得比较满意的固定效果,8小时以下则固定不够充分。

二、酶标反应的专一性

在本工作过程中,曾遇到兔血清与人肝组织有非特异的交叉反应。这是免疫组织化学定位工作中带普遍性的问题。我们曾试图用化学的和免疫学的方法处理血清或切片,以期去除此非特异反应,但结果不够满意,最后采用筛选兔子的方法。此种非特异反应与兔子的品系关系不大,而个体差异明显。即使用纯种兔时,不同个体的血清与人肝组织的反应也可以显示阳性、弱阳性(+)或强阳性(+++)的差别。另一方面,不同个体的人肝组织与同一兔血清反应也有强弱之别。经过筛选,可用作免疫的兔子一般占10—20%

由于免疫酶技术的高度灵敏性及同时存在上述非特异反应的可能性,因此在工作过程

中,注意对酶标反应的专一性加以严格的检验就更为必要。例如在人肝癌组织甲胎蛋白定位的工作过程中,我们曾反复观察到癌周肝细胞中有酶标阳性的细胞^[7]。从所进行的各对照组实验结果来看,除兔抗人绒毛膜促性腺激素和兔抗人HBsAg抗血清两组外,其余对照组均呈阴性(图1,表1)。在加兔抗人绒毛膜促性腺激素抗血清的切片中,可观察到少数肝细胞内有较弱的反应(图2)。据文献报道,特别在肝癌组织中,人绒毛膜促性腺激素的免疫组织化学反应很可能是呈阳性的^[8]。此外,由于肝癌病人血清中HBsAg阳性率可高达80%以上。本工作特别注意排除癌周肝细胞内的阳性反应是HBsAg的可能。但是(1)在纯化的甲胎蛋白制剂中未检测到 α_2 - β 区有杂蛋白。(2)兔抗

表1 对照实验及结果一览表

实验组别	第一血清	中间层血清	第二血清	酶标结果*
实验片	兔抗人AFP抗血清	正常羊血清	HRP-SAR Ab	阳性
正常兔血清对照	正常未免疫兔血清	"	"	阴性
无 关 抗 血 清 对 照	兔抗 HCG 抗血清	"	"	弱阳性
	兔抗人 HBsAg 抗血清	"	"	阳性
	兔抗 RDV 抗血清	"	"	阴性
	兔抗 WRSV 抗血清	"	"	阴性
排除非特异 交叉反应	羊抗人 AFP 抗血清	"	"	阴性
	PBS	"	"	阴性
	兔抗人 AFP 抗血清	"	HRP + SAR Ab	阴性
	兔抗人 AFP 抗血清	"	HRP - RAH Ab	阴性
吸收试验	兔抗人 AFP 抗血清经纯 AFP 免疫吸附柱吸收	"	HRP - SAR Ab	阴性
阻断试验	兔抗人 AFP 抗血清	SAR Ab	"	阴性
内源酶对照	PBS	PBS	PBS	阴性

* 指肝细胞酶标结果,红细胞内源阳性均不计。

缩写符号: AFP——甲种胎儿蛋白。HCG——人绒毛膜促性腺激素。HBsAg——乙型肝炎病毒表面抗原。RDV——水稻普通矮缩病病毒。WRSV——小麦丛矮病病毒。HRP——辣根过氧化物酶。HRP——戊二醛交联的辣根过氧化物酶标记物。SAR Ab——绵羊抗兔 γ 球蛋白抗体。RAH Ab——兔抗马 γ 球蛋白抗体。

人甲胎蛋白抗血清对纯 HBsAg 对流免疫电泳不产生沉淀线。(3) 以免抗 HBsAg 抗血清代替兔抗人甲胎蛋白抗血清作免疫酶定位时, 虽然在癌周肝细胞中也观察到阳性反应, 但两者的分布回异(图 3A、B) 根据上述结果, 可以认为本工作中所观察到的阳性定位结果是甲胎蛋白专一的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等: 1975, 生物化学与生物物理学报, 2(2) 149—155.
[2] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等:

1976, 生物化学与生物物理学报, 8(1) 49—59.

- [3] 上海市肿瘤医院病理科等: 1976, 生物化学与生物物理学报, 8(3) 271—280.
[4] 张先扬等: 1974, 生物化学与生物物理进展(2) 36—39.
[5] Stefanini, M., C. De Martino and L. Zamboni, 1967. *Nature* 216: 173—174.
[6] Accinni, L., K. C. Hsu, H. Spiele, and Cesare De Martino 1974 *Histochemie* 42: 257—264.
[7] 中国人民解放军第二军医大学病理教研室等: 中华医学检验杂志, 付印中。
[8] Cochrane, M. and R. Williams 1976. "Hepatocellular Carcinoma" (Okuda, K. and R. L. Petersed) pp. 333—349. John Wiley & sons.

(上接第 26 页)

用组蛋白吸附于去氧核糖核酸的子链上方法区别为正常和变形的两种结构。这种情况, 认为如果识别基因最先存在结合蛋白质的话, HMG 进一步结合形成变形的核小体, 如果不那样仅仅结合组蛋白就形成正常核小体。或许还有别的机理, 不管怎么说, 首先一定要弄清楚复制正常核小体的分子机制。

第三, 阐明细胞分化的分子机理。受精卵经反复细胞分裂的生长发育过程中(染色质复制)细胞分化了。也就是说, 由各种各样细胞所发现的特定基因, 没有发现别的分子机理就成立。如上述说明那样, 决定各基因的正常还是变形的核小体结构。这种决定因子能识别基因的蛋白质在染色质复制过程中是否结合到该基因上, 这样的因子在受精卵中作为蛋白质或信息核糖核酸(mRNA)来自亲本。随着生长发育的进程中必

须自己合成。因此, 它的调节必须先行。也许有别的结构。总而言之, 该细胞中一次转录的基因(红血球的珠蛋白基因), 虽然成为不转录基因也保持其变形的结构, 这种结构大概是不可逆的机理吧!

以上三点是 1980 年代染色质研究的重要课题。真核细胞的分子生物学姑且不论, 在其他方面也是重要课题。特别是真核细胞的去氧核糖核酸的一级结构及其转录产物的加工之间相互关系, 对真核细胞来说作为特有大概也是重要的。另外, 用分子水平来阐明染色质的高级结构及其细胞周期变化也是重要的。

[林斯骏摘译(日本)生物物理 Vol. 20, No 3, 1—2, 1980. 姚 鑫、开建伟校]

(上接第 42 页)

应用本文介绍的薄板电泳方法, 可以进行微量 DNA 样品的分子量链长测定。将已知链长的限制性内切酶酶切的标准 DNA 片段与被测样品在同一薄板上电泳, 根据各标准 DNA 片段与溴酚蓝标记染料相对电泳迁移的距离, 可求得相对迁移率与核苷酸碱基对对数的直线斜率关系, 由直线斜率而测知未知样品的碱基对数目。此法缺点在于板小、量程小、误差大。如在样品量微的条件下, 不得不使用此法时, 必须反复测定, 求得重复性一致的数据,

方可定量。

聚丙烯酰胺凝胶薄板电泳已初步应用于微量 DNA 的分析研究, 此法的应用或许有助于生物分子的微量分析。

参 考 文 献

- [1] Felgenhance, K.: 1967 *Biochem. Biophys. Acta*, 133: 165—167.
[2] Maniatis, T. et al.: 1975 *Biochem.*, 14: 3787—3794.
[3] 卫林祥等, 1979 细胞生物学杂志, 2: 24—26.