

兼顾免疫组化和电镜样品的戊二醛–多聚甲醛混合固定液的应用

陶亚群 李贵苹 易 静 杨 洁*

(上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025)

摘要 探寻兼顾同一实验动物用于免疫组化和电镜标本取材的灌注固定液中戊二醛–多聚甲醛的合适配比。小鼠分别用不同配比的固定液进行心脏灌注固定, 对心肌、肾脏、肝脏进行电镜观察, 并选择心肌组织进行免疫组化反应和免疫胶体金标记。结果发现, 采用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠各脏器既能很好地保存其超微结构, 又能保存某些抗原活性。

关键词 固定液; 戊二醛; 多聚甲醛; 透射电子显微镜; 激光共聚焦显微镜

The Application of Glutaraldehyde and Paraform Mixed Fixative for Specimens Used for Immunohistochemistry and Transmission Electron Microscope Observation

Tao Yaqun, Li Guiping, Yi Jing, Yang Jie*

(Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract The present study introduces a technical experience to figure out a suitable ratio of glutaraldehyde and paraform in the perfusing fixative for specimens used for both immunohistochemistry and transmission electron microscope (TEM) observation in the same experimental animal. The heart of mouse was perfused with different ratios of fixative respectively. The myocardium, kidney and liver were then observed by TEM for ultrastructural changes. In addition, the myocardial tissue was selected for immunohistochemical reaction and immune colloidal gold labeling. The results showed that 0.10% glutaraldehyde+4% paraform mixture is suitable for preservation of the ultrastructure and the antigen activities.

Keywords fixative; glutaraldehyde; paraform; transmission electron microscope; laser scanning confocal microscope

在分子形态学实验中, 免疫组化组织标本的固定标本用4%多聚甲醛(paraform, PFA)固定, 电镜标本则用2.50%戊二醛(glutaraldehyde, GA)固定^[1], 而免疫电镜的标本则用0.05%~0.50% GA和4% PFA混合固定液固定。取材使用非同一只动物, 容易产生个体差异, 对实验结果有一定的影响。

为了去除这种差异, 本研究首先使用0.05%戊

二醛+4%多聚甲醛混合液和0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液分别进行灌注固定, 让固定液在脉管系统内迅速达到动物体内各器官进行固定, 缩短了将实验动物处死、剖开胸腔、取出组织修剪并投入固定液固定的时间, 从而减少了组织离体时间对免疫组化结果的影响, 也能达到电镜标本快速固定并同时取得多种脏器的要求。然后再将组织投入相应的

收稿日期: 2016-09-19 接受日期: 2016-10-25

*通讯作者: Tel: 021-63846590-776480, E-mail: pollyyj@gmail.com

Received: September 19, 2016 Accepted: October 25, 2016

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776480, E-mail: pollyyj@gmail.com

网络出版时间: 2016-12-19 16:16:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161219.1616.016.html>

固定液(电镜的2.50%戊二醛和免疫反应的4%多聚甲醛)中保存以完成后续实验。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物及分组

经动物伦理委员会批准的实验动物C57BL/6J小鼠4只, 8周左右, 雌雄随机, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司; 将实验小鼠随机分为两组: 实验组2只, 正常对照组2只。

1.2 实验试剂及仪器

实验试剂有: 多聚甲醛(MERCK公司)、戊二醛(TED PELLA公司)、山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)、小鼠源抗骨架结合蛋白特异性一抗(Abcam公司)、Alexa Fluor® 488标记的山羊抗小鼠IgG(Invitrogen公司)、免疫胶体金抗小鼠IgG(Sigma公司)和DAPI(碧云天生物技术研究所在所)。仪器有: 石蜡切片机(Leica公司)、V7超薄切片机(Leica公司)、LSM710激光共聚焦显微镜(ZEISS公司)、透射电镜PHILIP CM-120(PHILIP公司)、透射电镜HITACHI H-7650(HITACHI公司)。

1.3 取材固定方法

采用3.5%水合氯醛麻醉小鼠后, 剪开胸腔, 暴露心脏, 将输液针刺入左心室, 打开输液阀, 在右心房上剪一小口, 使血液和灌洗液可以排出。灌入约50 mL于4 °C预冷的生理盐水, 以冲洗血液。换4 °C预冷灌注液继续输液, 待小鼠抽搐停止后再持续输5 min灌注液, 即可将小鼠体内各脏器充分固定^[2]。其中, 实验组小鼠A用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注, 小鼠B用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注, 正常对照组小鼠C用4%多聚甲醛灌注, 小鼠D用2.50%戊二醛灌注。待小鼠尾巴翘起灌注结束后, 取其心、肝及肾等器官, 并用原灌注液保存。另外取小鼠A的心肌投入2.50%戊二醛中保存; 取小鼠B的心肌分别投入4%多聚甲醛和0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液中保存, 再取小鼠A、B的肾和肝两种组织投入2.50%戊二醛中保存; 取小鼠C的心肌投入4%多聚甲醛保存用作对照; 取小鼠D心肌、肾、肝投入2.50%戊二醛保存用作对照。

1.4 荧光标记免疫组化及冷冻超薄切片免疫胶体金标记检测骨架结合蛋白表达

1.4.1 荧光标记免疫组化 将保存在4%多聚甲醛里的心肌置于梯度浓度酒精中脱水、二甲苯透明、

浸蜡、石蜡包埋、切片。切片经梯度浓度酒精脱蜡至水, 热抗原修复, 10%山羊血清封闭, 滴加小鼠源抗骨架结合蛋白特异性一抗4 °C孵育过夜, PBS代替一抗作为阴性对照。加入Alexa Fluor® 488标记的山羊抗小鼠IgG二抗孵育。甘油封片, LSM710激光共聚焦显微镜观察成像。

1.4.2 冷冻超薄切片及免疫胶体金标记 将保存在0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液中的心肌进行PBS漂洗, 用2%、5%、10%的明胶于37 °C下梯度渗透^[3], 低温固化明胶并切成小块, 2.3 mol/L蔗糖浸泡, 4 °C浸泡过夜, 并置于旋转台上持续旋转。EM FC7冷冻切片机进行半薄切片, 染色后观察并进行定位, 选取细胞较多的区域进行修块, 然后超薄切片。进行免疫标记, 滴加小鼠源抗骨架结合蛋白特异性一抗, PBS代替一抗作为阴性对照。免疫胶体金IgG标记后, 用1%戊二醛固定并用2%醋酸双氧铀染色, MC-UA孵育、甲基纤维素包埋后, 透射电镜(HITACHI H-7650)观察。

1.5 电子显微镜观察心肝肾肌肉超微结构

将保存在2.50%戊二醛中的各组组织进行PBS漂洗, 1%锇酸固定2 h, 蒸馏水漂洗, 酒精梯度脱水, 环氧丙烷置换, 812包埋剂浸透, 60 °C烘箱聚合48 h, V7超薄切片机(Leica公司)切片, 枸橼酸铅染色后, 透射电镜(PHILIP CM-120)观察。

2 结果

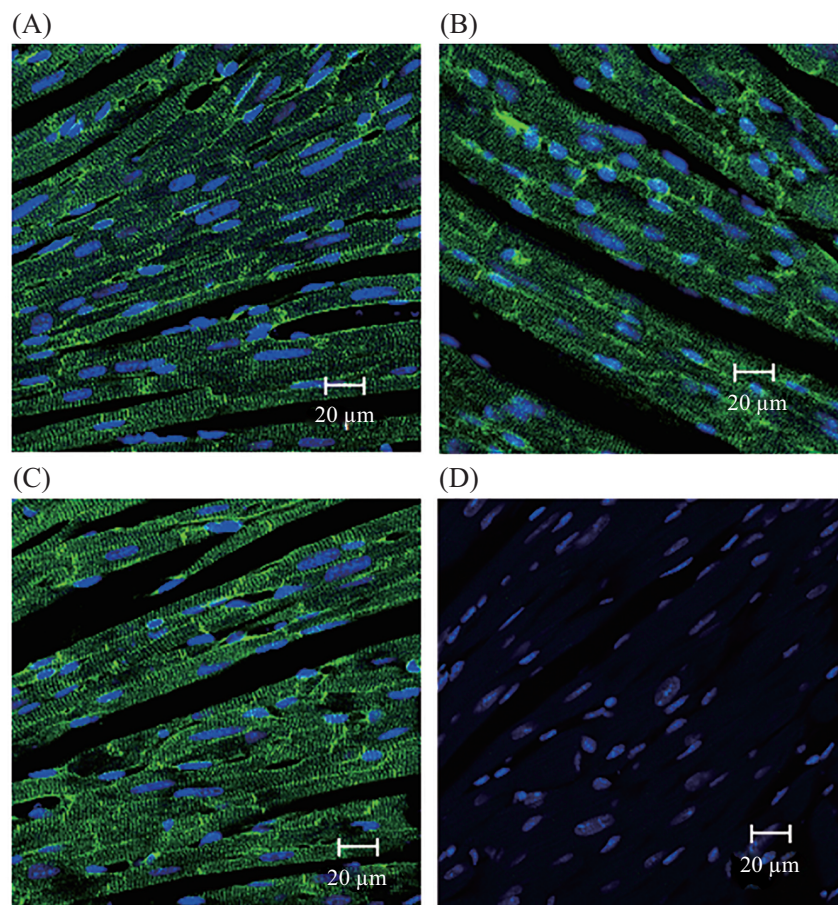
2.1 不同固定液处理后骨架结合蛋白表达

2.1.1 荧光标记免疫组织化学 用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠和用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠骨架结合蛋白表达量无明显差异(图1)。

2.1.2 冷冻超薄切片及免疫胶体金标记 电镜观察到在闰盘处有较多胶体金颗粒的标记(图2), 表明心肌闰盘处有该骨架结合蛋白的表达, 也说明这一固定液配比能较好保存抗原活性。

2.2 不同固定液处理后超微结构观察

用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠超微结构保存较差, 肌丝(图3A)、溶酶体(图4A)、内质网(图3A和图5A)和线粒体(图4A和图5A)等细胞结构不清晰。而用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠组织超微结构保存较好, 能清晰显示细胞核、细胞膜、内质网(图5C)、线粒体(图4C

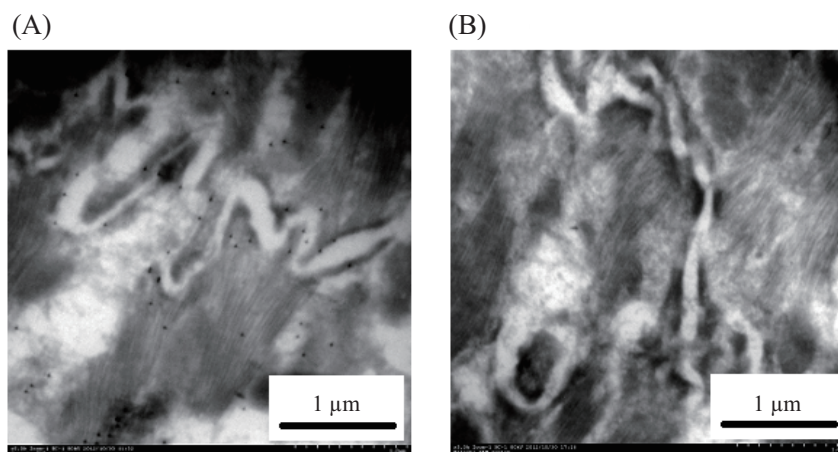


A: 用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; B: 用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; C: 用4%多聚甲醛固定液灌注的小鼠; D: 阴性对照。

A: the mouse was perfused with 0.05% glutaraldehyde+4% paraform; B: the mouse was perfused with 0.10% glutaraldehyde+4% paraform; C: the mouse was perfused with 4% paraform; D: negative control.

图1 不同固定液处理后蛋白质表达

Fig.1 The expression of protein after processed by different fixative

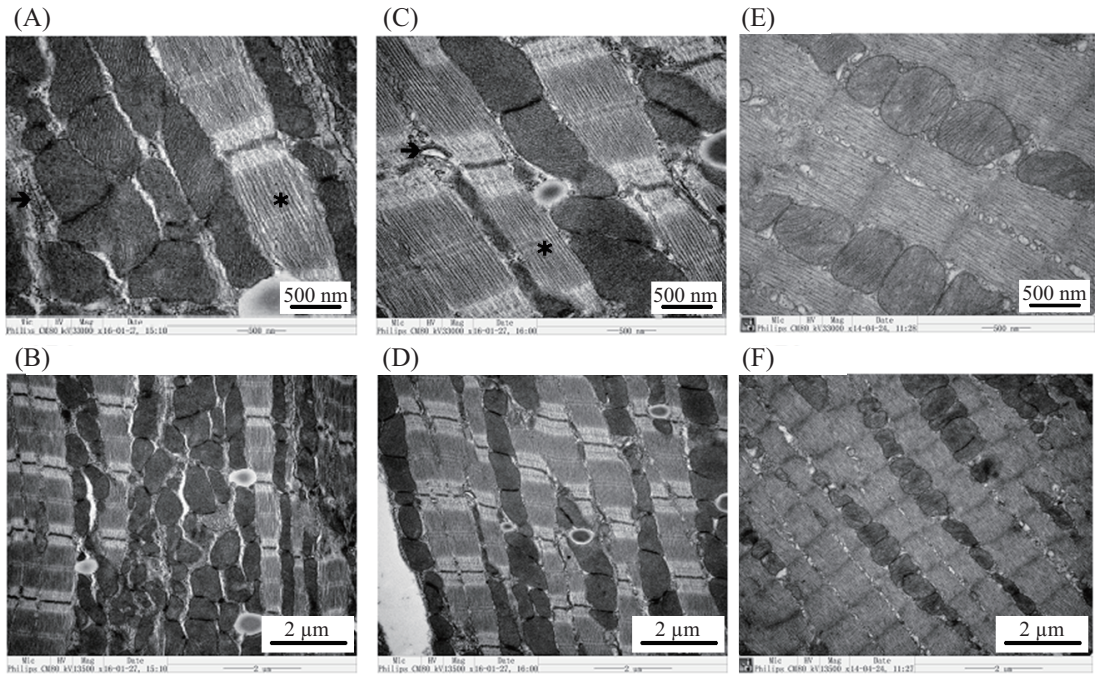


A: 胶体金标记; B: 阴性对照。

A: immune colloidal gold labeling; B: negative control.

图2 用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠心肌的免疫胶体金标记

Fig.2 Immune colloidal gold labeling on myocardial tissue fixed by 0.10% glutaraldehyde+4% paraform mixture

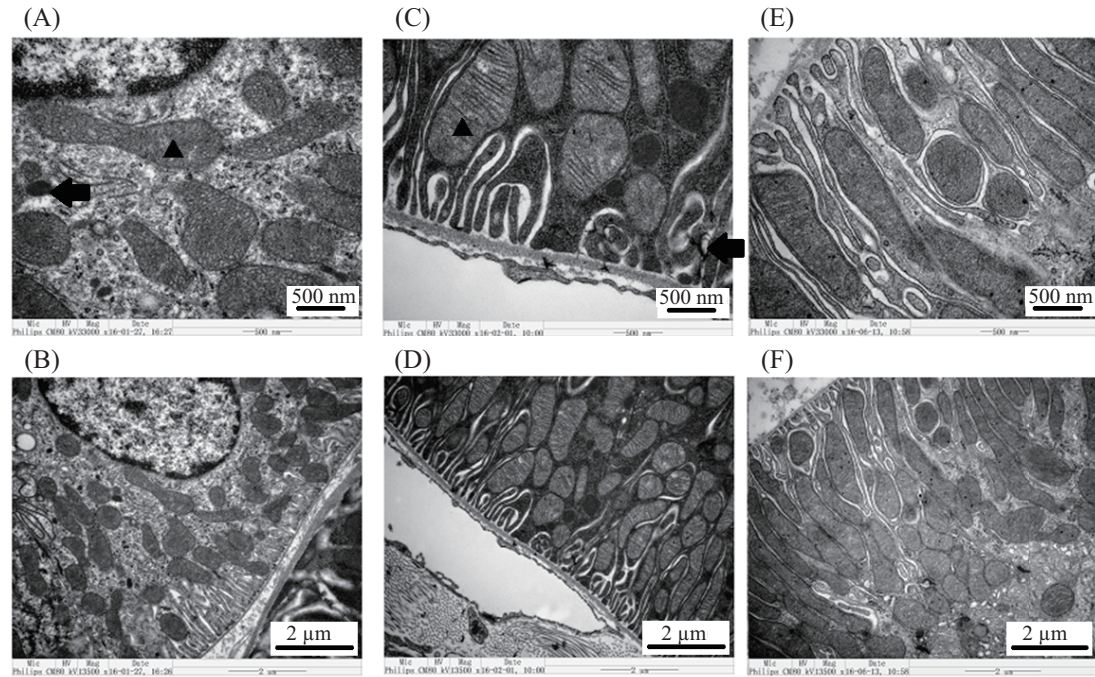


A、B: 用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; C、D: 用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; E、F: 用2.50%戊二醛灌注的小鼠。*: 肌丝; →: 内质网。

A,B: the mouse was perfused with 0.05% glutaraldehyde+4% paraform; C,D: the mouse was perfused with 0.10% glutaraldehyde+4% paraform; E,F: the mouse was perfused with 2.50% glutaraldehyde. *: myofilament; →: endoplasmic reticulum.

图3 透射电镜下各种灌注液灌注的小鼠心肌的超微结构

Fig.3 TEM image of the myocardial tissue fixed by different perfusing fixative

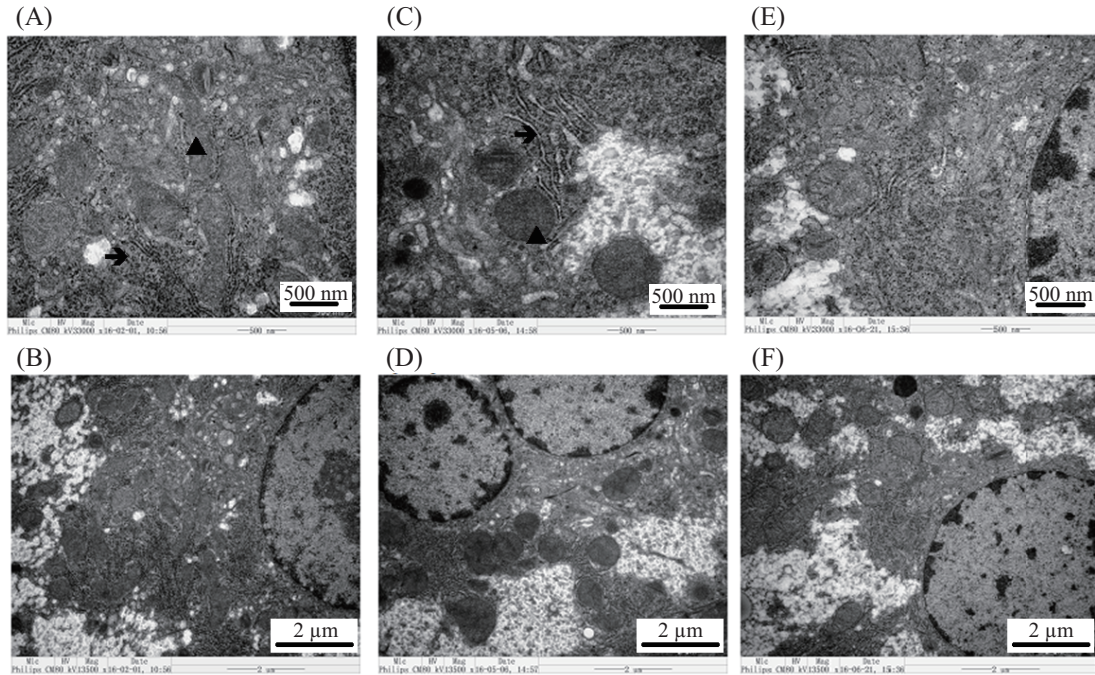


A、B: 用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; C、D: 用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; E、F: 用2.50%戊二醛灌注的小鼠。←: 溶酶体; ▲: 线粒体。

A,B: the mouse was perfused with 0.05% glutaraldehyde+4% paraform; C,D: the mouse was perfused with 0.10% glutaraldehyde+4% paraform; E,F: the mouse was perfused with 2.50% glutaraldehyde. ←: lysosome; ▲: mitochondria.

图4 透射电镜下各种灌注液灌注的小鼠肾脏的超微结构

Fig.4 TEM image of the kidney fixed by different perfusing fixative



A、B: 用0.05%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; C、D: 用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠; E、F: 用2.50%戊二醛灌注的小鼠。▲: 线粒体; →: 内质网。

A,B: the mouse was perfused with 0.05% glutaraldehyde+4% paraform; C,D: the mouse was perfused with 0.10% glutaraldehyde+4% paraform; E,F: the mouse was perfused with 2.5% glutaraldehyde. ▲: mitochondria; →: endoplasmic reticulum.

图5 透射电镜下各种灌注液灌注的小鼠肝脏的超微结构

Fig.5 TEM image of the liver fixed by different perfusing fixative

和图5C)、溶酶体(图4C)和肌丝(图3C)等细胞结构。

3 讨论

固定剂戊二醛和多聚甲醛分子中的醛基均能与蛋白质结合形成分子间的交联,影响蛋白质构象而使之固定,而戊二醛与蛋白质分子中的氨基、肽链N-端氨基等伯胺基、杂环上的亚胺基、巯基、羟基以及酰胺基反应形成更加稳定的产物^[4]。醛基浓度越高则越多的蛋白质被结合,固定结构就保存得越好。但分子间过度的交联形成的网格结构可能部分或完全掩盖某些抗原决定簇,使之不能充分暴露,可能造成假阴性的错误结论^[5]。

故本文设计了戊二醛0.10%和0.05%的两种低浓度比例的混合液。结果表明,采用0.10%戊二醛+4%多聚甲醛混合液灌注的小鼠组织既能够较好地保存抗原的免疫原性而得到较满意的免疫组织化学结果,又能够较好地固定细胞超微结构,从而达到较好的电镜标本的固定效果。

以往的形态学实验都是采用光镜和电镜不同的固定液分别用于不同的动物灌注取材,往往会因为动物的个体差异造成实验结果的差异。通过本文

设计的混合固定液的灌注实验动物,可以大大减少实验动物个体差异所带来的实验结果偏差,减少了实验动物的需求量并简化了实验的过程。

参考文献 (References)

- 1 陈小婉,江英,仇志强,张小兵.不同固定液对大鼠耳蜗-氧化氮合酶表达及透射电镜观察的影响.听力学及言语疾病杂志(Chen Xiaowan, Jiang Ying, Qiu Zhiqiang, Zhang Xiaobin. The effects of different fixative on transmission electron microscopy examination and induced nitric oxide synthase expression in rat. Journal of Audiology and Speech Pathology) 2016; 24(1): 58-61.
- 2 扬天祝.经心脏灌注固定动物组织的技术研究.河北医学院学报(Yang Tianzhu. Technical experience in perfusion through the heart for fixation of animal tissues. ACTA Academiae Medicinae Hebei) 1992; 13(2): 83-4.
- 3 Peters PJ, Pierson J. Immunogold labeling of thawed cryosections. Methods Cell Biol 2008; 88: 131-49.
- 4 李临生,张淑娟.戊二醛与蛋白质反应的影响因素和反应机理.中国皮革(Li Linsheng, Zhang Shujuan. Influence factors on reactions of glutaraldehyde with protein and the reaction mechanism. China Leather) 1997; 26(12): 8-12.
- 5 古德全.固定对免疫组织化学反应的影响.中国组织化学与细胞化学杂志(Gu Dequan. The influence of fixatives on immunohistochemistry. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry) 1997; 6(1): 79-81.