

下丘脑IFN- α R和ER免疫组化双标技术探索

何书海, 李洵, 赵慧英 (1. 信阳农业高等专科学校动物科学系, 河南信阳464000; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌712100)

摘要 [目的] 选出一种提高下丘脑中雌激素受体(ER)和-干扰素受体(IFN- α R)免疫组化双标阳性检出率和染色强度的方法。[方法] 用MaxVision法对大鼠下丘脑冰冻切片和石蜡切片分别进行IFN- α R和ER免疫组化双标染色, 其中石蜡切片进行抗原微波修复。[结果] 下丘脑石蜡切片抗原微波修复后IFN- α R和ER阳性检出率较冰冻切片有明显提高, 且双标着色对比鲜明, 易于镜下观察。[结论] 下丘脑IFN- α R和ER免疫组化双标染色宜选用石蜡切片并进行微波修复, 能提高双标阳性率, 且显色强, 值得推广。

关键词 微波修复; -干扰素受体; 雌激素受体; 下丘脑; 免疫组织化学法; 双标

中图分类号 S852.16+7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05451-02

Exploration on the Double Labeling Method of Immunohistochemistry of IFN- α R and ER in the Hypothalamus

HE SHU-hai et al (Department of Animal Science, Xinyang Agriculture College, Xinyang, Henan 464000)

Abstract A better method of increasing the positive rate and staining intensity of immunohistochemical double labeled staining of IFN- α R and ER in the hypothalamus was screened out. The frost slice or paraffin slice of rat hypothalamus were used to do IFN- α R and ER the immunohistochemical double labeled staining by MaxVision method, in which the antigens in paraffin slice were repaired by microwave. After antigens were repaired by microwave, the positive rate of IFN- α R and ER in hypothalamus by paraffin slice was increased greatly than that by frost slice and the double labeled staining was more obvious in contrast and easy to be observed under microscope. Selecting the paraffin slice and microwave reparation in the immunohistochemical double labeled staining of IFN- α R and ER in the hypothalamus could increase the positive rate of double label with strong staining effect, which was valued to be popularized.

Key words Microwave reparation; Interferon- α receptor; Estrogen receptor; Hypothalamus; Immunohistochemistry; Double label

下丘脑的中心机能是维持机体内环境的稳定以维持个体生存;参与机体的生殖、发育、应激及免疫反应等生理过程^[1]。研究2种或2种以上物质是否共同参与了下丘脑的神经免疫内分泌高级调节机制,免疫组化双标法是研究中常采用的可靠方法之一。由于脑组织质地比其他器官松软且含水量大,所以在脑组织免疫组化染色实验研究中,很多实验室常采用冰冻切片进行免疫组化染色。但是冰冻切片不容易制作较薄的切片且脑组织块在冻结过程中容易产生水的结晶从而影响细胞的形态结构及抗原物质的定位^[2],并且由于切片厚度不同,组织结构也不如石蜡切片清晰,从而影响到染色切片中双标记免疫阳性物质的对比与分辨;但做免疫组化双标染色照片对清晰度有着很高的要求,以确保试验结果的准确性。在大量的科学研究中发现ER免疫组化染色的阳性检出率不稳定且低^[3],综合以上技术性的因素,要成功完成下丘脑中IFN- α R和ER免疫组化双标染色是一件具有挑战性的工作,笔者总结出一套能提高IFN- α R和ER双标阳性率,重复性好,显色强的研究方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 含有IFN- α R和ER的SD大鼠下丘脑冰冻切片30片,片厚25 μ m;石蜡切片90片,片厚5 μ m。试剂包括快捷免疫组化试MaxVision检测试剂盒(福州迈新生物技术开发公司);兔抗鼠、人ER多克隆抗体(武汉博士德公司,工作浓度为1:50);兔抗鼠、人IFN- α R多克隆抗体(武汉博士德公司,工作浓度为1:50)等。枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol/L) pH值为6.0。仪器采用医用微波炉,立式塑料抗原修复盒。

1.2 方 法

1.2.1 冰冻切片和石蜡切片免疫组化双标染色。冰冻切片(30片)用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗6 min后进行同一切

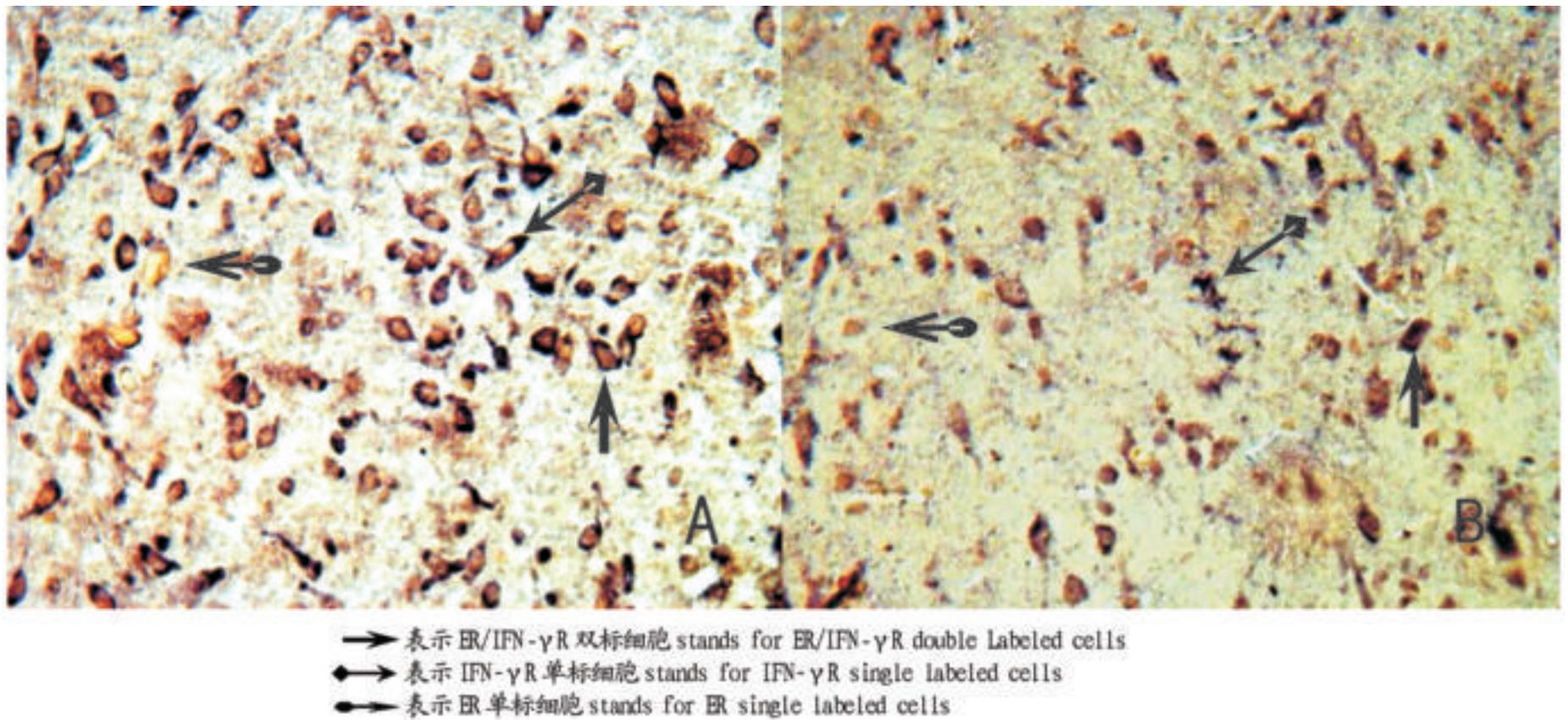
片免疫组织化学双重标记染色。石蜡切片(30片)脱蜡下行至水,置0.01 mol/L(pH值为6.0)柠檬酸缓冲液中微波抗原修复,继而用0.01 mol/L PBS(pH值为7.4)漂洗6 min后进行同一切片免疫组织化学双重标记染色。免疫组化双标染色步骤如下:兔抗鼠、人ER多克隆抗体室温下孵育60 min;0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次5 min。Max Vision试剂室温下孵育10~15 min;0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次3 min。最后DAB棕色呈色液呈色。2.5%高锰酸钾5%硫酸洗脱液灭活ER剩余抗体活性。换用兔抗鼠、人IFN- α R多克隆抗体,重复以上试验步骤,DAB蓝色呈色液呈色。最后常规脱水、透明、封片。双标对照试验分别省去IFN- α R或ER抗体,用PBS代替,结果只出现另一种免疫反应产物,表明试验具有免疫染色特异性。

1.2.2 防脱片石蜡切片抗原微波修复时不同放置方法。切片垂直放置:石蜡切片30片,脱蜡下行至水,切片垂直放入微波修复专用塑料盒,微波炉火力调至高档,作用10 min,修复结束将装有切片的塑料盒放置冷水盆中冷却至室温。切片倾斜放置:石蜡切片30片,脱蜡下行至水,放入微波修复专用塑料盒,修复前先将载玻片上有组织片的一面朝上放置,并倾斜约75°,减少沸腾的水对组织片的冲刷力度,火力调至高档,作用10 min,修复结束将装有切片的塑料盒放置冷水盆中冷却至室温。

2 结果与分析

2.1 石蜡切片、冰冻切片及不同抗原修复比较 在对试验技术进行改进后,微波抗原修复的5 μ m脑组织石蜡切片中阳性产物表达镜下观察清晰,ER/IFN- α R 2种阳性产物对比明显(图1)。且石蜡切片中IFN- α R和ER双标阳性检出率高,重复性好,显色强。

2.2 不同放置方法对防石蜡切片抗原微波修复时脱片的影响 微波修复时切片倾斜放置比垂直放置效果更好并且能减少组织片的脱落。由表1可知,经防脱片技术改进可明显降低脱片量。



注:A 为石蜡切片抗原微波修复;B 为冰冻切片。

Note: A, Paraffin slice, antigen microwave retrieval; B, frost slice.

图1 下丘脑 ER/IFN- γ R 免疫组织化学双标记染色 ($\times 400$)

Fig.1 The picture about the ER/IFN- γ R immunoreactivity in hypothalamus by double immunohistochemistry labeled staining ($\times 400$)

表1 不同放置方法对防石蜡切片抗原微波修复时脱片变化

Table 1 The effect of different placements on decline of paraffin slices for antigen microwaves recovery

组别	样本数	脱片	未脱片
Group	Number	Declined slice	Non declined slice
垂直放置组	30	14 (46.7%)	16 (53.3%)
Uprightness placed			
倾斜放置组	30	6* (20.0%)	24 (80.0%)
Slope placed			

注:* 为 $P < 0.01$, 差异极显著。

Note: * denotes extremely significant difference ($P < 0.01$).

3 讨论

(1) 组织中抗原的妥善保存及抗原决定簇的充分暴露与免疫组化的成功关系密切。过去一直认为 ER 一旦经过甲醛固定、石蜡切片制作过程后抗原即遭破坏,故只能在冰冻切片上进行免疫组化染色。近几年,抗原修复实践对此提出了异议,过去所认为的在石蜡切片上没有 ER 阳性表达的原因并非其抗原遭到破坏,而是由于固定剂甲醛的醛基与组织细胞中蛋白质的氨基形成醛键或羧甲基;或甲醛使组织细胞蛋白质发生交联,使细胞内抗原决定簇被封闭^[4]。采用微波抗原修复法可以使被封闭的抗原决定簇充分暴露,提高免疫组化染色的敏感性及其阳性检出率^[5]。此外,微波可使抗原分子上结合的其他大分子蛋白解离而被洗脱^[6],从而降低免疫组化染色背景,增加对比度。

(2) 试验采用石蜡和冰冻切片进行免疫组织化学染色的

对比,结果下丘脑石蜡切片抗原微波修复后 IFN- γ R 和 ER 阳性检出率较冰冻切片有明显提高,且双标着色对比鲜明,易于镜下观察。再者,脑组织选用 5 μm 的石蜡切片,而未用 25 μm 的冰冻切片;特别是在试验双标染色时,过厚(25 μm) 的切片不利于 2 种阳性产物的颜色对比。选用 5 μm 的石蜡切片虽然切片制作程序相对复杂,但是保证了观察免疫组化阳性表达产物时的清晰度和对比度,还可以避免由于脑组织蔗糖处理不当、冰冻时间长短而导致的组织切片出现空洞的现象。另外,将修复的切片组织面朝上,倾斜一定角度,能有效减少由于水的沸腾而对组织冲刷所导致的组织切片掉片现象。

(3) 在整个免疫组化染色过程中需经过许多环节,每个环节都可影响到免疫组化检测结果。试验认为对下丘脑中的 IFN- γ R 和 ER 进行免疫组化双标染色时选用石蜡切片和微波炉修复,可被认为是一种提高 IFN- γ R 和 ER 阳性检出率的理想方法,值得推广使用。

参考文献

- [1] 李继硕. 神经科学基础 M. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [2] 王伯法. 病理学技术 M. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [3] ANTHONY R, BHARAT J. Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in eupe [J]. Am J Clin Pathol, 2005, 23(6): 35.
- [4] 韩恩善, 张雪. 微波技术在病理免疫组化中的应用 J. 宁夏医学院学报, 1992, 21(6): 461.
- [5] LEONG A S. Microwaves in diagnosis immunohistochemistry [J]. Eur J Morphol, 1996, 34: 381.
- [6] 熊正文, 李春光, 丁华野, 等. 增强免疫细胞化学染色敏感性的新技术研究及应用 J. 诊断病理学杂志, 2000, 7(2): 147.
- [5] 李凯伦, 崔玉苍. 猪鸡疫病免疫诊断技术 M. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 347-368.
- [6] 郎洪武, 王力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断 J. 中国兽医科技, 2001(3): 3-5.

(上接第 5445 页)

参考文献

- [4] 廖延雄. 兽医微生物实验室诊断手册 M. 北京: 中国农业出版社, 1995: 81-114.