

葡萄糖氧化酶-二氨基联苯胺-硫酸镍铵法 在免疫酶双重染色技术中应用

张远强 苏慧慈
(第四军医大学组织胚胎学教研室)

摘要 作者在豚鼠胰腺组织石蜡切片的 PAP 免疫酶双重标记染色中,分别使用葡萄糖氧化酶-二氨基联苯胺-硫酸镍铵 (Glucose oxidase-DAB-Nickel, GDN) 和单纯 DAB 显示生长抑素 (Somatostatin, SOM) 及 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamin, 5-HT) 免疫反应细胞,获得良好的染色结果。该方法步骤简单,结果明确,背景清楚,是取得理想的免疫酶双重染色结果的新途径。

在免疫酶组织化学的双重或多种标记染色时,通常使用一些不同的供氧体,使最终产物呈现不同的颜色反应,分别显示两种或多种抗原成分,以便观察或比较两种或多种抗原在形态学上的相互关系。如使用 DAB 显示褐色,4-氯-1-萘酚 (CN) 显示蓝色; 3-氨基-9-乙基咪唑 (AEC) 显示红色;邻联茴香胺显示绿色等。但上述供氧体,除 DAB 外,其它供氧体均溶于有机溶剂,需用特殊的水溶性封固剂封片,且易褪色。本文在豚鼠胰腺组织 PAP 双标染色中,使用 GDN 和 DAB 分别显示 SOM 和 5-HT 获得良好的双重免疫酶染色结果,现报告如下

(一) 材料和方法 材料 兔抗 5-HT 血清由我室生产,兔抗 SOM 血清 (INC, USA); 羊抗兔 IgG 和兔 PAP 复合物由我校病理教研室生产;葡萄糖氧化酶 VII (Glucose oxidase VII),二氨基联苯胺 (DAB) (Sigma, USA);硫酸镍铵(上海试剂二厂)。

标本制备 250 克左右雄性豚鼠 5 只,断头处死,取胰腺组织块,经 Bouin 氏液浸泡固定 24 小时,石蜡包埋,切片厚度 $4\mu\text{m}$,用 10% 乳胶贴片, 37°C 烘干备用。

染色步骤 1. 常规脱蜡至水,置切片于 0.3%

H_2O_2 甲醇中 30 分钟; 2. PBS (0.02 mol/L, pH7.2, 下同); 3. 正常羊血清 (1:50), 封闭 30 分钟; 4. 加兔抗 SOM 血清 (1:4000) 4°C , 24 小时; 5. PBS 冲洗 15 分钟,加羊抗兔 IgG (1:64), 室温 1 小时; 6. PBS 冲洗 15 分钟,加兔 PAP 复合物(1:300),室温 1 小时; 7. 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH6.0) 冲洗 15 分钟; 8. 入 GDN 溶液孵育 15—20 分钟, GDN 溶液配制参见文献^[4]; 9. 显微镜下阳性结果明确后, 0.2mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH2.2) 冲洗 2 小时; 10. PBS 振洗 10 分钟后加兔抗 5-HT 血清 (1:8000) 4°C , 24 小时,重复步骤 5—6; 11. Tris-HCl 缓冲液 (0.05mol/L, pH7.6) 冲洗 15 分钟, DAB 显色 5 分钟 (DAB 20mg, Tris-HCl 50ml 新鲜配制,加 H_2O_2 $5\mu\text{m}$); 12. 流水冲洗 20 分钟,苏木精复染,透明,封固。

对照实验: 1. 阴性对照 空白及正常兔血清替代对照。2. 阳性对照 用已知抗原阳性的组织切片作阳性对照,以判定染色结果。2. 抗体洗脱对照: 已知某抗原成分阳性的切片,在 DAB 显色前先于 0.2mol/L (pH2.2) 甘氨酸-盐酸缓冲液中分别振洗 1 小时、1.5 小时、2 小时和 3 小时,再依次加羊抗兔 IgG 和 PAP 复合物。

(二) 结果 经 Bouin 氏液固定的豚鼠胰腺石蜡切片, 在 PAP 免疫酶双重标记色中, 使用 GDN 和 DAB 分别显示 SOM 和 5-HT 免疫反应细胞。结果表明该方法切片背景清晰, 阳性细胞与阴性背景对比反差强烈。在豚鼠胰腺, SOM 免疫细胞主要分布在胰岛周边部, 中央部有零星分布, 在胰外分泌部亦可看到单个或数个聚集的 SOM 细胞。细胞呈深蓝色, 着色均匀, 细胞大小不等, 形态各异, 有的伸出触角状突起(见图 1—2)。胰岛中 5-HT 免

疫反应细胞呈褐色, 细胞形态以三角形或锥形为主。两种细胞为单着色细胞, 说明这些细胞仅含一种检测抗原见图 1—2。

空白及血清替代对照试验结果为阴性。洗脱对照试验发现洗脱时间以 2 小时为宜, 洗脱效果良好。

(三) 讨论 免疫酶双重染色时, 通常使用不同的供氧体, 使最终产物呈现不同的颜色, 以便比较两种抗原在组织切片中的关系, 但由于多数供氧体, 如 CN, AEC 等易褪色, 易溶于

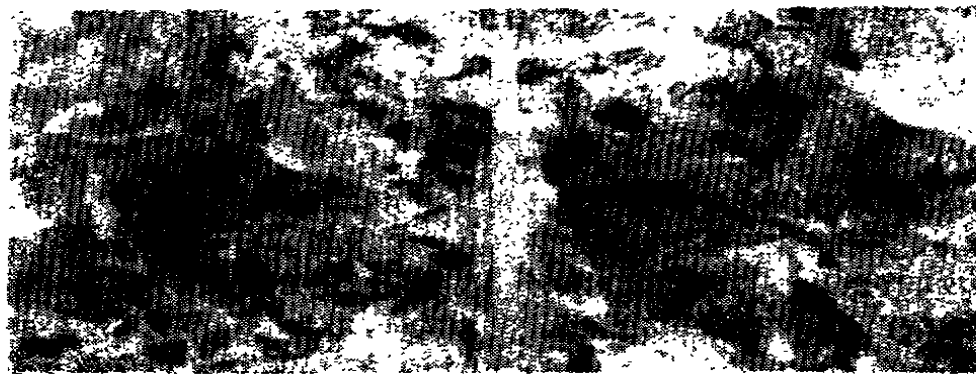


图 1 胰岛中 SOM 和 5-HT 免疫反应细胞的分布 ×100;

图 2. 胰岛中 SOM 和 5-HT 免疫反应细胞形态 ×400.
 → SOM 细胞 ⇨ 5-HT 细胞

有机溶剂, 通常不宜作为第一抗原的显色剂。本文在两次反应中均使用 DAB 作为供氧体, 但在第一次反应时, 添加硫酸镍加强, 形成金属盐沉淀, 使阳性反应物呈深蓝色反应, 第二次单独使用 DAB, 使其呈褐色反应, 以分别代表不同的抗原成分。由于 DAB 反应产物稳定, 电子密度高, 且不溶于有机溶剂, 因此结果易于保存。

在 PAP-GDN 法, 由于葡萄糖氧化酶催化底物葡萄糖的过程中, 缓慢释放 H_2O_2 , 使 HRP 催化 H_2O_2 中的 O^{2-} 与成色剂中 H^+ 结合并氧化 DAB 沉淀的过程变慢, 因而显色时间延长, 背景极浅, 适宜第一抗原定位的显色反应^[2]。我们体会先以 GDN 的深色反应显示第一抗原, 后以 DAB 的浅色反应显示第二抗原

为佳。

由于第一抗体均为兔所产生, 容易出现第二组抗体与第一组抗体的交叉反应, 从而导致假双染现象, 因此有效地洗脱已结合的抗体成分是关键。又参照 Nakane^[3] 的甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱法用于免疫酶双重标记, 操作简便, 作用温和, 效果较好。但洗脱时间不宜超过 2 小时, 否则影响第二种定位物质的抗原性。

双重染色之前, 应充分了解定位物质的抗原性强弱, 及抗血清的染色效价, 有必要先通过普通 PAP 法确定两种第一抗体的稀释度^[3]。另外, 由于双重染色冲洗及浸泡时间较长, 因此要求高质量的切片及充分烘烤, 以防染色过程中脱片。

参 考 文 献

[1] Nakane P. K. 1968 Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labelled antibody: a study on pituitary gland of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 16(2): 557—562
 [2] Shu S. Y. et al. 1988 The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.* 85(2): 169—171

[3] Vandesande F. 1983 Immunohistochemical double staining Techniques. In Cuello AC ed. *Immunohistochemistry.* 257—272. New York: Wiley.
 [4] Zhang Y. Q. et al. 1989 The distribution of the 5-HT immunoreactive cells in the pancreas of guinea-pig. *J. Med. Coll. PLA.* 4(3): 239—242

鱼 类 的 受 精

张 天 荫

(山东大学生物学系)

关于动物的受精，特别是海胆和哺乳类已有大量文献和专著问世，但对鱼类却知之甚少。自1979年以来从亚显微结构方面对几种鱼类受精过程作了报道，在此作一综合介绍。

(一) 精子

硬骨鱼类的精子没有顶体，但圆口纲的七鳃鳗，板鳃纲的鲨鱼 (*Squalus suckleyi*) 和鲟

形目的鲟鱼的精子则有顶体。

现以鲫鱼 (*Carassius auratus*) 精子为例说明精子的构造。精子的头部呈椭圆形，直径为 $2\mu\text{m}$ ，核为椭圆形，长轴为 $2\mu\text{m}$ ，短轴为 $1.5\mu\text{m}$ ，核前无顶体，核的后端有一深窝，称为核隐窝。核为一致密的染色质，内有几个小孔。

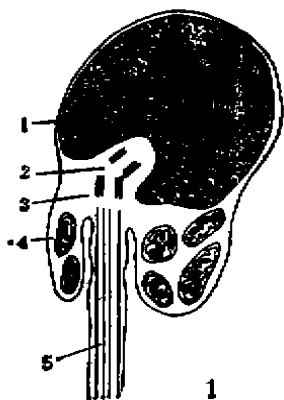


图1 鲫鱼精子矢状切面
 1.核; 2.近侧中心粒; 3.远侧中心粒;
 4.线粒体; 5.轴丝 (引自 Barcetti 等
 1984)

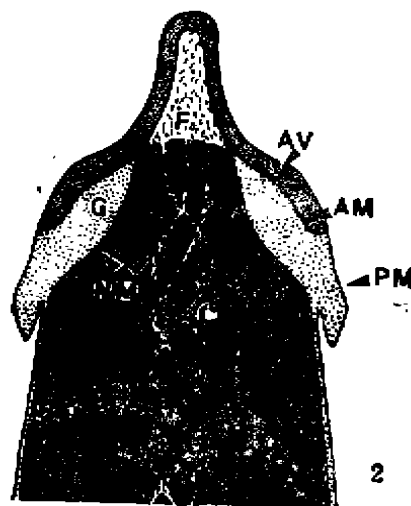


图2 白鲟鱼精子顶体的图解。AV. 顶体囊;
 AM. 顶体膜; PM. 质膜; F. 顶体下腔和小管
 中的丝状物质; G. 顶体下腔侧壁的颗粒物质;
 NM. 核膜; C.小管 (引自 Cherr 和 Clark,
 1984)