

免疫组织化学在肽能神经研究 方面的应用

艾民康 王亚威 朱长庚编



湖北省科学技术协会

1985

我会曾于1984年在湖北省武汉市举办神经解剖学新进展讲习班，其中一部分内容属肽能神经的免疫组织化学及其新近成果。鉴于讲习班结束后，不少同道来函索取这方面的资料，为了推动本门学科的发展，及满足同志们的需要，首先将这一部分讲稿予以充实，并整理成册。

本册主要内容系介绍免疫组织化学的技术原理、实验操作，研究进展，及其在肽能神经研究方面的应用，可供从事神经解剖学、组织学、组织化学、生理学、病理学、内分泌学及生物学等有关学科的同志们和有关大专院校的师生参考，并希望读者不吝批评指正。

湖北省解剖学会学术组及王亚威
神经解剖学新进展学习班

1985年1月

目 录

抗血清的制备及免疫荧光技术.....	1—13
单克隆抗体的制备.....	14—22
免疫组织化学PAP技术.....	23—31
免疫细胞化学及神经递质共存.....	32—46
肽能神经定位的研究进展.....	47—83
中枢神经系统的含胰岛素神经元.....	84—88
免疫组织化学技术的某些进展.....	89—95

抗血清的制备及免疫荧光技术

于 一

自 Coons (1942) 创立荧光抗体技术至今已有四十多年的历史^[13~15], 现已被广泛地应用于生物学及医学的研究中, 但应用于神经系统的研究只有十多年的历史。免疫荧光技术系将抗体(或抗原)标记上荧光色素, 使其与相应抗原(或抗体)结合后, 在荧光显微镜下, 呈荧光现象的一种特异免疫荧光反应方法。本方法的优点在于比较快速地测出少量抗原或抗体在细胞内或组织内的定位和分布。它把免疫学的特异性和荧光的灵敏性与显微镜技术的精确性结合起来, 是一项很有发展前途的技术。

免疫荧光技术实际上包括: (1)免疫血清的制备及抗体的提纯。(2)荧光素的标记。(3)标本的制备及染色。(4)荧光显微镜技术等几个重要环节。现分别叙述如下:

一、抗血清的制备: 抗血清的制备方法很多^[13, 46, 49, 45, 48, 51], 其效价视所使用的动物种类、所用抗原的性质及纯度, 是否使用佐剂(Adjuvant)、注射量、免疫途径以及免疫过程的长短而定。

(一)制备抗血清的一般过程:

1. 抗原及其配制:

(1)抗原的种类及其化学组成: 根据抗原物质的免疫原性及反应原性可分为完全抗原及不完全抗原。①完全抗原能在机体内引起抗体形成, 在试管内可与抗体特异性结合, 并在一定条件下出现可见的反应。如酶及大多数蛋白质是良好的抗原, 分子量比较大, 一般在1万以上, 但并非所有大分子量的物质都能产生抗体, 如明胶, 分子量为10万, 对家兔几无抗原性。还有些大分子聚合物, 缺乏分子内部的复杂性, 每个单位都是重复的, 亦无抗原性。所以蛋白质的抗原性不但与分子量的大小有关, 还与其化学结构有关。一般说含苯环氨基酸或含有侧链呈固定排列的氨基酸比含直链的氨基酸容易产生抗体^[5]。在抗原分子上只有很小一部分结构控制着抗原的特异性, 此化学基叫做决定簇, 抗原分子量越大, 决定簇的数目越多, 但只要有一个决定簇即可决定抗原的特异性。蛋白质的决定簇可能是2~6个氨基酸, 大分子的多糖类亦可有抗原性, 其分子上的六碳糖可能是决定簇。②不完全抗原(半抗原)只有反应原的特性, 缺乏免疫原特性或免疫原特性不完善, 在机体内不能引起抗体形成, 当其与蛋白质或胶体颗粒结合后, 则可引起抗体形成, 在试管内可与抗体特异性结合, 在一定条件下出现可见反应。如细菌的多糖和类脂质及小分子的神经肽等均属于半抗原, 在半抗原与蛋白质的结合物中, 蛋白质使结合物具有抗原性, 但它不影响结合物的特异性, 因此任何种蛋白质均可做为抗原特异基的蛋白载体, 半抗原在结合物中决定着结合物的特异性。多肽类半抗原决定簇的特异性主要是由于氨基酸的排列次序及结合不同, 而羧基又是影响特异性的主要部位。

(2)抗原的配制: 了解抗原的上述性质以后, 在配制抗原时对不同的抗原采取不同的方法配制。①当用完全抗原制备抗血清时, 只需配成酶或蛋白质溶液, 如制备多巴胺 β 羟化酶

(D₃H) 抗血清时, 可从牛肾上腺髓质中提取纯酶, 或从市场购买酶精制品, 再用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、纯化, 制成1mg/ml生理盐水或水溶液。如想制备垂体后叶载体蛋白neurophysin 抗血清时, 可从猪垂体中提取之, 并配成溶液即可。②当用半抗原制备抗血清时, 先将半抗原与蛋白质(如牛血清白蛋白, 甲状腺球蛋白或血蓝蛋白 hemocyanin 等)结合, 结合的方法很多, 常用的有戊二醛法和 ECDI 法。例如制备脱氧核苷酸转移酶(Tdt) 抗血清时, 由于 Tdt 的分子量较小, 为32,000, 不易产生抗体, 采用戊二醛聚合法, 把 Tdt 制成酶聚合体, 则可刺激机体产生抗体。制备的具体方法是用 200μg Tdt/ml 和 200μg 牛血清白蛋白/ml溶液中加入戊二醛使其最终浓度为0.1%, 在20℃下, 反应30分钟, 反应停止后, 每毫升反应液加入1%NaBH₄50μl^[10]。

2. 乳剂的配制: 加强特异性抗体产生的原则为延长抗原的吸收速度, 使抗原能较长时间作用于机体, 扩大免疫范围, 使抗体产生器官分布较广, 并激活抗体球蛋白的合成速度与数量, 因此许多学者用了不同的方法, 如用水油乳剂, 延缓抗原的局部破坏和消失, 加入结核杆菌引起淋巴结、脾脏等网状内皮系统内浆细胞增生, 提高抗体的生成。或用明矾、氢氧化铝吸附抗原, 形成一个储存所, 使之慢慢释放抗原, 因为抗原释放得越慢, 越可使大量免疫活性细胞接受这种刺激, 使局部生成浆细胞及增强抗体生成。Freund 氏采用类似的原理, 制备了福氏佐剂, 至今为人们所采用。

	液体石蜡/ml	羊毛脂/ml	结核菌(卡介苗)/ml	盐 水
Freund氏佐剂的配方	85	15	200	
医科院基础所使用的配方	100	35	100	35(1.8%)

只用石蜡油及羊毛脂者为不完全福氏佐剂。

乳化方法: 用抗原与等量的 Freund 氏完全(或不完全)佐剂在乳钵中或用注射器充分混匀, 使成乳状液, 用玻璃棒取一滴滴于水面上, 若仍保持滴状而不散开, 则可应用。

3. 免疫注射:

(1) 动物的选择及护理: 应选择健康动物, 雌雄均可, 雌性应避免怀孕, 在免疫过程中应特别注意营养和卫生管理。

(2) 注射剂量: 剂量应合适, 太少则不能有效地刺激产生抗体; 太多反而抑制抗体生成。

(3) 注射途径: 有皮内、皮下、淋巴结和肌肉等多种方法注射。有的整个免疫过程只用单一途径注射, 这种方法产生的抗血清效果可能最好。还有人采用多种途径注射, 如先在足跖皮下注射少量佐剂, 7~10天待淋巴结肿大, 再于淋巴结处注入抗原, 此种方法可能节省抗原量。如抗体效价上升不满意, 还可从耳静脉中再次注入抗原, 但耳静脉注射需用脱敏注射的方法, 以防过敏性休克而死亡。

(4) 注射次数:

1) 未免疫动物单次注射, 抗体生成较慢, 效价低, 持续时间短, 但特异性高。

2) 再次抗原刺激, 出现再次反应; 效价上升较快, 达到顶峰较高, 持续时间长。

3) 间隔一定时间, 多次注射可得高效价免疫血清, 但抗体特异性降低。

(5) 注射间隔时间: 间隔时间太短, 起不到再次反应的效果; 太长, 则影响血清的特异性。具体间隔时间要以抗原性质及抗体反应而定, 一般间隔1~2周, 动物注射抗原一个月后, 或按规定注射程满以后, 无良好反应, 效价不高, 再次注射1~2次, 若仍不佳者应弃去。

(6) 检查与放血: 末次注射12~20天试血测定效价达到要求时, 应立即采全血分离血清。测定效价的方法多种多样, 用琼脂双扩散法, 效价在1:32以上; 用环状沉淀法, 效价在1:4000以上, 用放射免疫法, 稀释5000倍, 结合率在40%以上即可从颈动脉放血, 低温贮存备用。

(7) 建议的免疫方法^[1]:

兔子: 应用相等容量的福氏完全佐剂, 乳化每1ml生理盐水内含有3毫克蛋白质的溶液, 可以一次把一个完全的免疫过程(9毫克蛋白质)所需的, 足够的材料乳化好, 并贮藏于低温下。

第一天, 每一后腿肌注1毫升乳剂

第15天, 每一后腿肌注1毫升乳剂

第29天, 每一后腿肌注1毫升乳剂

第39天, 试血, 可把动物放血至死或大致按一个月的间隔定期放血, 抗体含量常为每毫升1~3毫克。

绵羊: 应用相等容量的福氏完全佐剂, 乳化每2.5毫升生理盐水内包含2毫克蛋白质的溶液, 可以一次把一个完全的免疫过程所需的足够的材料乳化好, 并贮藏于低温下。

第一天, 每一后腿肌注2.5毫升乳剂

第15天, 每一后腿肌注2.5毫升乳剂

第30天, 每一后腿肌注2.5毫升乳剂

第45天, 试血。

如抗血清满意, 可将绵羊放血至死或按大约两个月的间隔定期放血, 血量可高达500毫升。

豚鼠:

第1天, 每一后腿脚掌注入0.1毫升乳化抗原(用相等容量的福氏完全佐剂乳化, 每毫升生理盐水内含有0.1毫克的抗原)。

第15天, 腹腔注射0.25毫升乳化抗原(用相等容量的福氏完全佐剂乳化每毫升生理盐水内含有2.0毫克的抗原)。

经2~3周后, 用0.1毫升每毫升生理盐水内有2毫克抗原的溶液作皮内注射, 如24小时出现强烈的阿瑟斯反应(Arthus reaction)即行放血。如反应弱, 2周后, 重复皮内注射, 在获得强阿瑟斯反应后5天放血。

(二) 免疫血清制备方法的举例:

免疫血清有第一级抗血清(特异性抗血清), 如抗DBH血清, 抗脑啡肽血清, 及第二级抗血清(或称抗抗体血清), 常用的有动物抗人两种球蛋白血清和羊抗兔两种球蛋白血清。下面以制备抗脑啡肽血清及羊抗兔血清为例, 简述其制备过程。

1. 抗甲硫脑啡肽血清的制备方法^[6,9,45]:

(1) 抗原的制备:

本室方法: 取甲硫脑啡肽 (Met-Enk) 10mg, 牛甲状腺球蛋白 (BTG) 50mg, 溶于蒸馏水中, 另将碳二亚胺 1-ethyl-3-(3-6-dimethylaminopropyl carbodiimide 简称 ECDI) 2.5mg 溶于 0.5ml 蒸馏水中, 将两种溶液混合, 室温下徐徐震荡 20 小时, 再加 1M 盐酸羟胺 2ml, 静置 2 小时, 4℃ 透析, 至溶液总体积为 5ml, 贮存于低温冰箱内备用, 放射免疫法测定 Enk 与 BTG 联接率为 85%。

上海市高血压所: 用 Met-Enk 5mg 溶于 1.5ml 水中, 加 PL-Succ (多聚赖氨酸琥珀酰) 6mg, 溶解后, 加 Met-Enk 14×10^4 脉冲记数/分钟, 滴加碳二亚胺水溶液 0.5ml (12 毫克), 20~30℃ 反应 1.5 小时, 再加 ECDI 0.5ml (10mg), 继续反应半小时后, 4℃ 充分透析, Met-Enk 结合率为 81%。

第二军医大学: 用 ECDI 或戊二醛将 Met-Enk 与猪甲状腺球蛋白结合, 用 ECDI 做偶联剂时 Met-Enk 与 TG 结合率为 18.6%, 用戊二醛做耦联剂时 Met-Enk 与 TG 结合率为 80.3%。

(2) 乳化: 将抗原与等量 Freund 氏完全佐剂用注射器 (有人用电动搅拌) 混合 20 分钟, 使成乳状液。

(3) 免疫注射: 雄性大耳白兔, 体重 2~2.5 公斤, 一次免疫 5~10 只, 于背部剪毛、消毒。

本室采用多次注射法:

第一次注射: 1ml 乳剂, 脊柱两旁, 皮内多点注射 (一般分 20 点, 每侧 10 点, 每点 50 μ l)。

间隔 2 周。

第二次注射: 剂量减半, 为 0.5ml 乳剂, 分 10 点注射。

间隔 2 周。

第三次注射: 剂量仍为 0.5ml, 分 10 点皮内注射。

一周后, 采耳静脉血, 检查效价。

再一周后, 第四次注射, 剂量 0.5ml 乳剂。

一周后检查, 效价有上升趋势。

一周后, 第五次注射, 剂量 0.5ml 乳剂, 此次注射 10~20 天后, 从颈动脉放血, RIA 测定效价, 稀释 5000 倍, 结合率在 60% 以上。

上海采用两次注射法:

第一次注射: 2ml 乳剂, 含 200 μ g Met-Enk, 分 40~50 点, 背部皮内注射, 同时每只兔注射百日咳疫苗, 皮下多点总量为 0.5ml。

第二次注射: 70 天或 105 天强化注射一次, 剂量 2ml 乳剂含 20 μ g Met-Enk, 背部皮内多点注射。

二周后放血, 测效价, RIA 测定稀释 5000 倍, 结合率在 40% 以上。

2. 羊抗兔丙种球蛋白血清的制备^[2]:

(1) 本室制备方法: 从正常兔血清中提纯 IgG, 制成蛋白质溶液, 将抗原溶液与等量 Freund 氏完全佐剂混合, 制成乳剂, 给 2 岁以上山羊臀部肌肉注射, 第一次剂量为 2.5mg IgG, 间隔 2 周行第二次注射, 剂量加倍为 5mg, 自第三次至第五次注射, 每次剂量均为 5mg IgG, 每次注射间隔均为 2 周, 末次注射后 10~20 天, 采血检查效价, 琼脂扩散可达 1:128。

(2)北医微生物教研组制备方法:用1:3抗原与不完全佐剂(无水羊毛脂一份,液体石蜡二份)混合,制成乳剂,给健康羊肩胛部皮下及大腿肌肉注射,每次同时注射两处,第一次总剂量为50mg兔 γ -球蛋白,间隔10天,用同样剂量、同样方法进行第二次免疫注射,再间隔10天,进行第三次注射,第三次与第四次注射剂量为100mg,第五、第六次注射剂量为150mg,末次注射后20天试血,环状沉淀试验,效价在1:4000以上。

(2)免疫球蛋白的提取^[8]:

(一)免疫球蛋白的初提:各种血清蛋白质在不同浓度的硫酸铵溶液中的溶解度不同,所以利用30~50%硫酸铵溶液使血清中的球蛋白形成沉淀,从而将其分离出来。

1. 饱和硫酸铵的制备方法:必须提前配好,以使硫酸铵溶液充分饱和,将500毫升蒸馏水加热至70~80℃,然后将400克(C.P)硫酸铵溶于其中,搅拌使其充分溶解,并趁热过滤,去除不溶解物质,待至冷却至室温,在容器底部有硫酸铵结晶析出,上清液即为饱和液。调pH至6.5~7.0备用。

2. 球蛋白沉淀的步骤:(1)血清X毫升加入X毫升生理盐水或PBS,再加2X毫升的饱和硫酸铵(硫酸铵最终浓度为50%)。(2)室温放置30分钟至1小时,将混合物于4℃下离心,9,000转/分,15分钟。(3)弃去含有清蛋白部分的上清液,将球蛋白沉淀溶于x毫升生理盐水中或PBS中,待充分溶解后加入1/2x毫升饱和硫酸铵(硫酸铵最终浓度为33%)。(4)混合物室温放置30分钟至1小时,在4℃下离心,9,000转/分,15分钟。(5)弃上清液后将沉淀物溶于x毫升生理盐水中,再重复第3步两次,即用33%硫酸铵提3次,将最后一次沉淀物溶于少量生理盐水或PBS中。(6)将球蛋白溶液装透析袋中,透析脱盐,去除残留的硫酸铵。

(二)免疫球蛋白的纯化^[8]:在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀中所得的免疫球蛋白中,仍有微量其他蛋白混入,须用离子交换法获得纯净的免疫球蛋白,常用的离子交换剂有DEAE—纤维素。

DEAE—纤维素柱层析的步骤:1. 装柱:先用0.01M磷酸缓冲液(pH7.6)将DEAE纤维素浸泡过夜(4℃),按10~15克DEAE—纤维素干重交换1克蛋白,计算柱高及DEAE用量,装柱。2. 加样与洗脱:将透析过的免疫球蛋白液全部加入层析柱后,用PB 0.01M、pH7.6的缓冲液洗脱。用20%磷酸基水杨酸液试验洗脱液,待蛋白出现,即刻收集,直至蛋白洗脱完毕,此段蛋白即为IgG。

(三)免疫球蛋白的浓缩:经DEAE—纤维素层析洗脱下的蛋白含量,每毫升小于10毫克需浓缩成20mg/ml以上,才适合于荧光色素的标记。浓缩法,可用电扇吹。浓缩后再用PBS透析1—2天取出,低温保存或冷干后低温保存。

(四)免疫球蛋白IgG的鉴定:用免疫电泳定性,用72型分光光度计测定每毫升蛋白质含量。

近年来国外采用SPA亲和层析法提取IgG。SPA是葡萄球菌壁上提取的一种蛋白质叫Staphophccocus protein A简称SPA,它可与多种哺乳动物的IgG的Fc段相结合,其亲和力和动物种类不同而异,如对猪、兔、人、豚鼠、猴、小鼠、狗、猫、水貂及北极熊的亲和力很强。SPA与IgG结合后不影响抗体的活性,国外用protein A Sepharose CL 4B层析法,分离提纯IgG,操作简便并节省时间^[2]。

三、荧光抗体的制备^[7,8]:

(一)荧光色素的选择: 荧光素的种类很多, 但能用于荧光抗体染色的并不太多, 它必须具备: 1. 不损伤抗体特性。2. 必有化学基团可与蛋白质牢固地结合。(3)荧光素的用量少, 而荧光强。常用的有异硫氰酸荧光素及罗丹明200。

(二)荧光素标记抗体的方法: 标记蛋白质的具体方法很多, 特别是近年来各实验室都有所改良, 有的用低温条件, 有的用室温, 有的用透析法。

1. 冷标法: 在冷室中进行操作。取血清(或免疫球蛋白溶液)(10~20mg/ml)与一倍量的碳酸钠——碳酸氢钠缓冲液(pH9.1, 0.5M)置入有盖的小瓶内混合, 并将此混合液在0~2℃温度下搅拌(用电磁搅拌器), 同时缓慢加入异硫氰酸盐荧光素溶液(EITC的用量是1mg/50mg蛋白质), 并控制在15分钟内加完, 再搅拌1小时后, 测结合液的pH值, 并用 Na_2CO_3 调pH值至9.1, 将盖塞紧, 以避免吸收空气中的二氧化碳。继续搅拌18~24小时, 结合即告完成。

2. 热标法: 在25℃条件下进行操作。(1)按1mg荧光素 FITC/50mg蛋白质的比例, 称取所需量的FITC, 溶于2ml 0.1M Na_2HPO_4 、pH9中, 制成 FITC 溶液。(2)将欲标记的蛋白质液(例如4毫升), 放在有盖的小瓶内(容量15~20毫升), 并与1毫升的0.2M Na_2HPO_4 液慢慢混匀。(3)加完FITC后, 及时用0.1M Na_3PO_4 数滴调节反应液使pH值至9.5, 再加入0.85%NaCl 1毫升, 使反应液总量为8毫升左右, 恒温在25℃, 不需搅拌, 约30分钟, 结合即告完成, 将反应液置冰箱中冷却, 准备提纯之用, 如有任何沉淀尚需离心除去。

(三)荧光抗体的提纯: 结合以后的荧光标记蛋白液必须将未结合的荧光色素除掉。最有效的方法是用Sephadex G25或G50的凝胶层析过滤。

凝胶层析法: 1. 装柱: 将 Sephadex G25 按需要量称取后, 加约3~5倍体积的水, 并置沸水浴中煮沸2小时, 等到凝胶颗粒吸水最大, 膨胀之后, 冷却, 即可装柱。装柱可采取搅匀胶液, 一次倾入柱内, 让凝胶颗粒自由沉积在柱子里。柱子的体积为样品量的6倍较为合宜。2. 层析: 先将柱用洗脱液即0.01M、pH7.1磷酸生理盐水(PBS)平衡, 等到凝胶柱表层的洗脱液几乎流净(不能流完), 尚余一薄层洗脱液时, 即关闭下口停止流动, 然后加样, 加样时用滴管吸取荧光结合蛋白液小心沿管壁滴下。加样完成后即可开放柱子的下口, 当样品几乎全部进入凝胶柱时, 立即滴入洗脱液, 并控制流速在每分钟1毫升或10~20滴。由于标记的蛋白液有荧光, 在柱中走动时看得很清楚, 因之可以等到荧光流到下口甚至流入导管内时开始收集。直至荧光部分流完为止。只收集流动快的前段。(3)透析: 用0.01M、pH7.1磷酸缓冲生理盐水透析1、2天。

(四)脏粉吸收: 为了除掉非特异性荧光染色作用, 结合液还需在用前经过动物脏粉之吸附。一般将小白鼠的肝脏剪成小块, 用生理盐水将血洗净。然后匀浆冷冻保存, 或制成干粉低温保存也可。用时取匀浆或脏粉10mg/ml加入结合液, 0~2℃搅拌60分钟后, 高速(1万g)0~2℃离心30分钟, 取上清液备用, 或透析后使用。

(五)荧光抗体的鉴定: 用琼脂扩散法必在1:4以上才可使用, 或者测定荧光抗体的F/P比值, 比值过低则敏感性亦低, 比值过高则非特异性染色增高。比值的测定方法是先分别制备荧光素和球蛋白的定量标准曲线, 然后测定荧光抗体中荧光素和球蛋白的光密度, 从标准曲线上查出每毫升中蛋白及荧光素含量, 再按以下公式计算:

1. 克分子比:

$$\frac{16 \times 10^4}{390} \times \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{球蛋白 mg/ml}} = 0.41 \times \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{球蛋白 mg/ml}}$$

一般以 1~2 为合适。

2. 重量比:

$$\frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{球蛋白 mg/ml}}$$

一般以 1~3.5 $\mu\text{g/ml}$ 为合适。

七十年代后期,有人用荧光素标记的SPA代替荧光抗体(如 FITC 标记的羊抗兔 IgG 或 FITC 标记的兔抗人 IgG) 进行免疫荧光染色,亦取得较好效果^[37]。FITC-SPA 的标记方法基本与冷标法相同,具体操作方法是:将 SPA 与 FITC 用 0.5M pH9 碳酸盐缓冲液溶解,SPA 浓度为 10mg/ml,按 FITC 和 SPA 比例为 0.05mg:10mg,将 FITC 加入 SPA 溶液中,在 4℃ 下搅拌过夜,经 Sephadex G25 去掉游离 FITC,收集 FITC-SPA 组分备用,F/P 克分子比为 2.5~3.0。

四、组织标本的制备、染色方法及原理: [7, 8, 35, 36]

(一)组织标本的制备方法:涂片、石蜡切片及冰冻切片等均可使用。据根检查的目的,可适当地加以选择。总的要求是:(1)保存被检物(抗原或抗体)在细胞或组织中准确的定位及免疫活性。(2)组织切片要薄,使抗体容易透过细胞膜。(3)保持组织结构的完整。(4)不引起标本产生明显的自发荧光及非特异性荧光。为达此目的,组织或切片标本应事先固定,固定的方法与时间依抗原抗体不同而异。对蛋白质及肽类多采用乙醇、甲醇或丙酮固定。对多糖类的抗原,可采用苦味酸-乙醇-甲醛混合液成 Bouin 氏液固定。神经组织多用 4% 多聚甲醛溶液灌注固定。在多聚甲醛溶液中加入 5% 左右的蔗糖,可以防止抗原的扩散,然而蔗糖浓度太高,又可增加非特异荧光的产生。戊二醛亦可使用,但应采用低浓度(如 0.1~0.25%),否则减弱抗原-抗体反应。过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛溶液固定效果亦较好。还有人采用切片后固定的方法,即用于冰或液氮使脑组织骤冷,在 -18℃,恒冷箱内切片,切片后放氯仿与甲醇,或乙醇与丙酮混合液冷固定,效果亦可。石蜡或冰冻切片后立即染色,如不能立即染色,可贮存于干燥器内,低温保存数天或数月,甚至一年仍可染色。如切片贮存时间过久,可增加组织的自发荧光。

(二)染色的种类及方法:

1、直接法:将荧光色素标记在第一级抗体(各种特异性抗体)上,直接测定相应抗原。优点是方法简便,非特异性染色因素少,并可进行双重荧光抗体染色。缺点是不够敏感,且一种标记抗体只能测一种抗原。

标记: $\text{Ab} + \text{荧光色素} \rightarrow \text{Ab}^*$

反应: $\text{Ag} + \text{Ab}^* \leftarrow \text{Ag} \cdot \text{Ab}^*$

染色步骤:切片经 PBS 漂洗后,拭去切片周围的 PBS → 滴加荧光素标记的第一级抗体(各种特异性抗体,事先用 PBS 做适当的稀释), 37℃, 孵育 30 分钟左右 → PBS 冲洗三次, 共 15 分钟 → 蒸馏水洗 → 甘油缓冲液封片 → 荧光显微镜检查。为了减少非特异性染色及加强抗原抗体的相互作用,在 PBS 中常加 0.2~0.3% Triton X-100,并用此溶液稀释抗体。

双重直接染色法：为同时显示两种抗原，可将不同的荧光素标记在两种抗体上，如抗体A用FITC标记，抗体B用RB₂₀₀标记，经染色后，在荧光镜下观察，抗体A为绿色，抗体B为红色。

染色步骤：先用稀释的抗体A染色，37℃ 30-60分钟（比单一抗体染色时间长）→PBS冲洗三次，共15分钟→抗体B染色，37℃，30分钟→PBS冲洗三次→镜检。注意两种荧光抗体染色的先后是选择荧光素与蛋白质比值较高的标记抗体液先染色，F/P比值较低的标记抗体液后染色。

2、间接染色法：免疫血清（未标记荧光素的第一级抗体）与其相应的抗原作用，使成抗体与抗原之结合物，然后用标记荧光素的抗体（羊抗兔或兔抗人丙种球蛋白荧光抗体）染色，即成为发荧光的抗原-抗体-抗抗体结合物。由于夹层球蛋白分子上有多个抗原决定簇，因而能结合多个荧光抗体分子，故间接法比直接法敏感。间接法的另一优点是标记一种抗球蛋白抗体，可用于多种抗原-抗体系统。其缺点是因素多，易出现非特异荧光。

标记： $G-Ab+荧光色素 \rightarrow G-Ab^*$

反应： $Ag+Ab \rightarrow Ag \cdot Ab$

$Ag \cdot Ab + G-Ab^* \rightarrow Ag \cdot Ab \cdot G \cdot Ab^*$

间接法染色步骤：（1）于标本上滴加不同稀释度的已知抗体（免疫血清），放染色盒37℃ 30分钟左右，取出，PBS（0.01M，PH7.4）流水冲洗。（2）浸泡于PBS中，共三缸，每缸5分钟，时时振荡，再经蒸馏水（PH7.4）浸泡1—2分钟，电风扇吹干。（3）滴加荧光抗体，放染色盒37℃，30分钟。荧光抗体的稀释原则是使特异性染色呈阳性，而非特异性染色保持阴性的临界浓度。（4）再用PBS冲洗，如第二步。（5）缓冲甘油封片，镜检。

3补体法：是间接法的变型，系利用补体结合反应的原理。补体可被任何哺乳动物的抗原抗体所固定，因此只要有一种标记的补体或抗补体，就能检查所有的抗体系统。此法最灵敏。补体法又可分为直接法及间接法两种。荧光补体直接法是将荧光素标记在补体上。荧光补体间接法是将荧光素标记于抗补体上。下面主要介绍抗补体法染色的原理与步骤：

原理：标记：抗补体+荧光素→抗补体*（AC*）

反应： $Ag+Ab+C(补体) \rightarrow Ag \cdot Ab \cdot C$

$Ag \cdot Ab \cdot C + 抗补体^* \rightarrow Ag \cdot Ab \cdot C \cdot Ac^*$

染色所需的材料：

（1）先将免疫血清置56°—60℃水浴中，灭活20-30分钟，去除不耐热的补体C₁~C₄。

（2）补体用新鲜豚鼠血清，并用生理盐水按1:10稀释。

（3）将灭活的免疫血清与等量的新鲜豚鼠血清混合。

（4）荧光素标记的抗补体抗体。

染色步骤：

（1）染色：每张玻璃片上贴有三个切片，用下列抗血清染色，在37℃下，作用30-60分钟，标本A上滴加灭活的免疫血清及等量的新鲜豚鼠血清混合液；标本B上滴加稀释的灭活的免疫血清；标本C上滴加正常兔血清。

（2）PBS冲洗15分钟，换三次。

（3）加荧光素标记的抗补体抗体，37℃，30分钟。

（4）PBS冲洗三次，共15分钟，蒸馏水洗一次。

(5) 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜观察。标本A为阳性反应, 标本B和C为阴性反应。

(三) 非特异性染色的消除方法: 非特异性染色产生的原因很多, 例如组织中可能存在类属抗原, 可与组织中相应抗体结合; 免疫血清不够纯, 混杂一些抗其他组织成分的抗体或由于荧光抗体中游离的荧光素未被完全去除, 吸附于组织上而呈现非特异性染色。为了减少非特异性染色除注意提高免疫血清的纯度及特异性, 荧光素标记蛋白要有适宜的程度, 选择最佳染色方法外, 最重要的是对抗体进行稀释, 选择最佳的稀释度。其原则是使特异性染色呈阳性, 而非特异性染色保持阴性的临界浓度。第一级抗体常用1:30, 1:40, 1:50, 最高到1:100或500。第二级抗体常用1:4, 1:8, 1:16或1:32的稀释度。

(四) 对比染色: 为了更好地辨认免疫荧光反应的部位及组织结构, 可采用对比染色。染色时对所用的染料应加以选择。如荧光抗体用FITC标记时, 对比染料可用兰色或红色的, 如0.02%结晶紫溶液, 0.01%伊文氏蓝荧光素(发橙红色荧光)或用RB₂₂₂标记牛血清白蛋白进行反衬染色。

(五) 对照试验: 确定特异性荧光前, 必经排除非特异性荧光的可能, 故应作对照试验。对照的方法很多。

1. 标记非对应抗体染之, 应阴性。

2. 标记正常动物的球蛋白(该动物与制备免疫血清的动物相同), 应染不上。

3. 特异性抗原吸收试验: 标记抗体预先以过量抗原吸收, 高速离心去除抗原-抗体结合物, 用上清液染之, 应阴性。如抗原-抗体结合物是可溶性的, 不能用离心去掉时, 则不能用此法。

4. 阻断试验: 即用大量未标记的抗体结合于特异性抗原决定簇上, 使标记的抗体结合不上, 而无荧光。

(六) FITC—SPA染色法:

原理: SPA可与哺乳动物的IgG分子之FC相结合, 其结合是非免疫性的。FITC—SPA可以代替FITC—IgG, 使之呈现荧光反应。

Ag-Ab-FITC-SPA

染色步骤:

1、切片: 用PBS漂洗。

2、滴加稀释的第一抗体(1:50—1:500), 37℃, 30分钟—1小时。

3、PBS冲洗三次, 共15分钟。

4、FITC—SPA(1:30—1:50), 37℃, 作用30分钟。

5、PBS冲洗三次, 共15分钟。

6、蒸馏水洗—→甘油缓冲液封片。

7、荧光显微镜观察、照相。

五、荧光显微镜术及照相: 荧光显微镜与普通显微镜不同之处在于光源、滤光板和能通过紫外线的聚光器等。

(一) 光源: 高压汞灯HBO200, 此灯泡发射光的波长在280—600mμ的范围, 其主要峰在365mμ和435mμ, 因而能发射丰富的紫外光和蓝紫光。

(二) 滤光板: 分隔热、激发和吸收滤光板。

1、隔热滤光板: 在光源前面装置一水槽(石英玻璃制)内盛4%的硫酸铜溶液, 或者

用混有硫酸铜的硬质玻璃制成,也可用 Woods 玻片+5% CuSO₄溶液的滤板,可以除去由光源产生的红外线和红光,以阻挡热能通过,防止高热对滤光片、透镜及标本的损坏。常用 KB 1/2 mm 和 KG 2/2-4 mm。

2、激发荧光玻片:放在聚光镜的前面,一般只让325-500mμ波段通过,激发标记抗体发射荧光。国际上通用代号BG(兰战滤光板)其最大透光度在410mμ,其透光域较接近于 FITC 的最大吸收光波波长(495mμ),故特异荧光强。UG为紫外光滤片,最大透光度在365mμ。

3、吸收(或称反差)滤光板:放在接目镜下,不让紫外光通过,保护眼睛。国际上标号为OG。桔黄色。或GG(淡绿色)。主要让410-650mμ波段通过。

如观察FITC标记的抗体,激发光滤光板选BG₁₂、UG₁,配以OG₁、GG₉吸收滤光板及明视野聚光器,荧光为翠绿色,背景是暗褐色。

(三)聚光器:以石英聚光器较好,明视野或暗视野聚光器皆可,但以明视野为好。

(四)荧光照相:由于荧光较一般透射光为弱,颜色也不一样,感光能力较低,所以拍摄片时曝光时间都需要相应延长。一般21°黑白片(35毫米)感光时间需10—15分钟,而彩色照相需要15—30分钟,必须经过试验得到正确的曝光时间。

六、应用:荧光抗体法在医学的各个领域几乎都有应用,如病原菌、病毒的快速诊断,自身免疫病的研究,肿瘤病因及发病机制的探讨等,在神经系统方面研究神经介质及其代谢酶的定位,神经分泌及神经多肽的定位,合成及分泌以及运输等理论问题。简介如下。

(一)与神经介质代谢有关的酶的定位:1969年Geffen, Livett和Rush^[23]首先提纯了多巴-β-羟化酶DβH,并将免疫荧光技术应用于神经生物学,他们用乙醇固定,石蜡切片显示DβH分布,在肾上腺髓质及交感神经节中,但当时的结果不十分满意,1972—73年Hartman等^[27-29]在技术上做了三点重要改进,如(1)用氯仿-甲醇固定,使组织中蛋白凝固,脱去胞膜上脂类,有助于抗体的进入。(2)在抗血清及PBS液中加入0.3% triton x-100,以便减少非特异性荧光染色。(3)用干冰,液氮或异戊烷制备冰冻切片,经改进后能清楚地看到DβH分布在中枢神经系统内的去甲肾上腺素能神经元(如兰斑处),神经纤维膨体及神经终末内,并与甲醛诱发荧光法显示的NA神经元的分布基本一致,此外,在颈上神经节的细胞体及轴索内,脑、心、回肠及肾脏的血管壁上都可见到DβH阳性反应。但是DβH的免疫荧光反应不出现于DA能神经元(如尾壳核及黑质)及DA能神经纤维内,从而证明DβH是NE能神经元的标志。

73年后神经系统的免疫荧光技术有很大的发展。Goldstein等^[24,25]报告黑质及兰斑内的神经细胞体有中等强度的DDC(又称AADC, 芳香族L-氨基酸脱羧酶),在5-HT神经细胞体中亦有弱的DDC免疫荧光反应。1976年Hökfelt报告^[30]了酪氨酸羟化酶(TH tyrosine hydroxylase)在中枢神经系统的分布,指出大脑皮层的许多部位,有TH阳性纤维及终末网,间脑,中脑内多巴胺神经元的胞体及轴突、树突亦有TH免疫荧光反应,肾上腺素能及去甲肾上腺素能神经细胞体虽有很强的免疫荧光反应,而树突、轴突及神经终末的免疫荧光反应较弱。1977年Halasz^[26]报告嗅球内有DDC阳性反应的细胞体,79年他又用双重荧光抗体染色法证明TH和DDC两种酶共存于嗅球内同一神经元内。

总之,利用免疫荧光技术与甲醛诱发荧光组织化学技术相结合,对多巴胺神经元、去甲肾上腺素能神经元,肾上腺素能及5-羟色胺能神经元在中枢神经系统内的分布及定位,以及单胺类的生理学、病理学意义的阐明作出了很大贡献。

(二)关于神经肽的定位:目前在脑中发现的神经肽约有十几种,其中多数都能用免疫荧光方法显示。但是由于有些神经肽的分子量太小,如脑啡肽只有600,制备抗血清比较困难,又由于这些肽类在神经细胞体内的含量很少,难于用免疫组化方法显示,故有些学者采用秋水仙碱预处理,阻断轴浆运输,使肽类堆积在细胞体内,则易于用免疫组化技术显示,因此近年来能看到的肽能神经元逐渐增多。此外,在各种神经肽抗血清之间常出现交叉反应,故Hökfelt建议把这些小肽的免疫阳性反应称之为某物质样的免疫反应。

自1976年至1979年许多学者用免疫荧光技术研究了P物质,脑啡肽及内啡肽在神经系统的定位,有少数学者研究了VIP(舒血管肠肽),CCK(胆囊收缩素)的定位,至今已基本搞清了这些肽在中枢及外周神经系统的分布。Phillis和Limacher(1974)^[43]、Hökfelt等(1976—77)^[30-34]、Larsson等(1976—77)^[38-41]都先后报告了P物质在外周及中枢内的主要分布区域。Elde(1976)^[10]、Uhl等(1979)^[48]及Simatov(1977)^[45]报告脑啡肽的分布与P物质基本相似。脑啡肽的神经纤维比神经细胞体的分布更为广泛,Bloom等(1978)^[11]报告 β -内啡肽的神经元主要见于丘脑下部弓状核,视前区、膈区、缰核等,在正中隆起处含 β -内啡肽的神经纤维及终末很多。Bryant等(1976)^[12]、Larsson等(1976)^[38,39]、Fuxe等(1977)^[22]及Hökfelt等(1979)^[39]发现VIP不仅在消化道的神经丛及腺体周围,而且也分布在中枢神经系统。Larsson等(1976)还报告了CCK的分布。

自1979年以来,学者们除了继续用免疫荧光技术研究各种新合成的肽类在神经系统的分布,例如Uhl(1979)^[49,50]报告神经降压肽在中枢神经系统的分布,Seybold和Elde(1980)^[44]、Watkins^[52]报告后叶加压素及催产素在丘脑下部的分布外,更多的是用免疫荧光技术与酶免疫技术或放射自显影术相结合研究各种神经肽的共存,以及肽类与单胺类介质的共存。例如P物质与5-HT共存(Chen-palay 1978)^[17]、P物质与Enk或Enk与NE共存(Liger 1981)^[42]此外,用免疫荧光技术与荧光示踪技术相结合研究肽能神经通路,如Hökfelt和kuypers(1979)^[34]发现延髓的脑啡肽神经元可下行投射到脊髓,Swanson和Sawchenko(1982)^[47]报告下丘脑室旁核有后叶加压素,抗催产素,脑啡肽及生长抑素的纤维投射到延髓迷走背核复合体及脊髓。

参 考 文 献

- 1、上海市农业科学院畜牧兽医研究所译(1973)荧光抗体技术 P₁。上海科学技术情报研究所
- 2、王益寿 1984 葡萄球菌蛋白A 湖北省人民出版社
- 3、北京医学院微生物教研组(1973) 荧光抗体技术,内部资料
- 4、北医微生物教研组,北京市肿瘤研究所(1977) 北医学报 1:42
- 5、杨贵贞 1964年全国免疫学专题学术会议专题报告
- 6、吴德林等(1982):第二军医大学学报 3:199
- 7、周文郁(1982):免疫组织化学方法 组织化学手册(陈啸梅等编) 人民卫生出版社
- 8、侯建存(1980):免疫荧光和酶标记免疫测定技术 P109 免疫化学技术(王世中主

编) 科学出版社

9. 陆以信(1980): 生物化学与生物物理学报12: 115
10. 森川茂(1983): 酶免疫组织化学, 新酶组织化学 (武内忠男、小川和朗主编、朱逢春主译) P 331 人民卫生出版社
11. Bloom, F. etal (1978): Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)75:1591—1595
12. Bryant, M. G. etal (1976): Lancet 1:991—993
13. Coons, A. H. etal (1942): J. Immunol, 45:195—170
14. Coons, A. H. and Kaplan, M. II (1950): J. Exp. Med 91:1
15. Coons, A. H. etal (1951): J. Exp. Med, 93: 193
16. Cheah, T. E. and Geffen, L. B. (1970): Proc. Aust. phys. pharm. Soc. 1:1
17. Chan-palay, V. etal, (1918): proc. Nat. Acad Sci (Wash) 75: 1582—1586
18. Dalsgaard, C. J. etal. (1982): Neurosci, 7:647—652
19. Elde, R, etal (1976): Neurosci, 1:349—351
20. Fuxe, K, etal (1970): Res. Commun, Chem, Path. Pharmacol 1:627—636
21. Fuxe, K, etal (1971): Progr. Brain Res 34:127—138
22. Fuxe, K, etal (1977): Neurosci. Lett 5:241—246
23. Geffen, L. B. etal (1969). J. Physiol. (Lond), 204, 593—605
24. Goldstein, M, etal, (1971): Experientia (basel) 27:951—2
25. Goldstein, M, etal, (1972). Pharmacol. Rev. 24:293—309
26. Halasz, N. etal (1977): Brain Res 126:455—474
27. Hartman, B. K. and Udenfriend, S. (1970): Molec. Pharmacol 6:85—94
28. Hartman, B. K. etal, (1972): Proc. Nat. Acad. Sci (Wash) 69:2722—2726
29. Hartman B. K. (1973): J, Histochem. Cytochem. 21:312—332
30. Hökfelt, J, etal (1976) Abstract. Swe. Med. Biol, 54/6. 427—453.
31. Hökfelt, T. etal (1977): Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74:3081—3085.
32. Hökfelt, T, etal (1977): Neurosci 2:885—896.
33. Hökfelt, T, etal (1977): Neurosci Lett, 5:25—31.
34. Hökfelt, T and Kuypers, H. G. JM. (1979): Neurosci. Lett 14:55—60.
35. Johansson, D. (1982): in Modern Trends in neuroscience. Beijing Medical college and Karolinska Institute, Beijig.
36. kawamura, A. Jr (1977): Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. University of Tokyo press.
37. Kiernan, J. A: Histological and histochemical methods theory and practice. P 292. Pergamon press oxford—New York—Toronto Sydney—Paris—Frankfurt. Copyright C 1981.
38. Larsson, L. I. etal. (1976) Brain Res, 113:400—404.
39. Larsson, L. I. etal, (1976): Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)73:3179—3200
40. Larsson, L. I, etal (1977): Science 197:1374—1375.
41. Larsson, L. I, etal. (1977): Life Science 21:503—508

42. Liger, L. et al, (1981) : *Neurosci Lett Suppl.* 7:260
43. Phillis, J. W. and Limacher, J. J. (1974) : *Brain Res* 69:158—163
44. Scybold V. and Elde, R (1980) : *J. Histochem and Cytochem.* 28(4):367
45. Simantov, R. M, et al (1977) : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74:2167.
46. Spruill, W. A. and Steines, A. L (1979) : *Advances in cyclic nucleotide Res.* 10:169.
47. Swanson and Swanson, J. W. (1982) : *J. Comp. neurol.* 205:260—272
48. Uhl, G, R. et al (1979) : *Brain Res.* 161(3):522—526
49. Uhl, G, R. et al (1979) : *Brain Res.* 166:75—94.
50. Uhl, G. R. et al (1979) : *Brain Res.* 167:77—91.
51. Vaitukaitis, J. et al (1971) : *J. Clin. Endocrinol* 33:988
52. Watkins, W. B. (1983) : *Neuropeptide* 3:477—492.
53. Watson, S. et al (1977) : *Life Sci.* 21:733—738
54. Yang, H. Y. et al (1977) : *Neuropharmacol.* 16:303—307.

单克隆抗体的制备

陈兆聪

传统的抗血清技术,在免疫学、生化学、分子生物学、组织化学以及临床诊断治疗等方面,早已广泛使用,并业已证明是一种十分有用的技术,但它也存在着一些固有的缺点,如①抗原必须尽可能地纯制,例如要制备蛋白质抗原,必需将它纯化成在聚丙烯酰胺凝胶电泳时只生成一条斑带。有时为了获得更高的特异性,例如要研究分子中不同亚基的作用机理,还必须制备不同的蛋白质亚基,用相应的亚基来免疫动物,这些工作都颇为繁重,有时也相当困难。②尽管所用的抗原是尽可能地纯制的,但所产生的抗血清仍将是多克隆的,仍然存在交叉免疫反应。③为了提高抗血清的特异性,往往要反复地进行吸附,不但手续烦琐,而且在反复吸附之后,所需的抗体活力,也随着损失一部份,因此,所得到的抗体滴度也较低。④在用新的动物免疫接种时,在亲和力、结合力等方面的重复性都较差。⑤产量相当有限。

1975年间世的单克隆抗体技术,正好克服了上述的缺点,它的最大优点在于:①无须纯制抗原能获得特异性很高的纯抗体。②无须反复吸附。③高滴度。④可大批生产,源源不断供应。因此,这个技术极大地扩大了抗体技术的应用范围,在短短的数年中,它的应用遍及了医学和生物学的各个领域,作出了很大的贡献。

一、基本原理

单克隆抗体技术也称为B淋巴细胞杂交瘤技术,这种技术就是将能分泌抗体的B细胞和经过人工选择的具有某些酶缺陷的骨髓瘤细胞进行融合。这种融合过的细胞就称为B淋巴细胞杂交瘤。按照克隆选择学说^[5]。机体在尚未接触外来抗原之前,就已经存在各种各样的B细胞,每个B细胞及其克隆(由单一的B细胞无性繁殖的后裔)只产生针对一种抗原决定簇的抗体分子。各种B细胞表面都有相应的特异性的受体,当抗原侵入体内后,其决定簇就和相应的B细胞表面的受体结合,促使这个B细胞致敏,发生母细胞转化,克隆增殖并分化成为分泌针对这种抗原决定簇的抗体的浆细胞。在制造单克隆抗体的过程中,首先要用抗原给动物实行免疫注射,其目的就在于使相应的B细胞致敏和克隆增殖。实验表明,只有母细胞转化的B细胞或浆细胞和骨髓瘤细胞融合后才能生成分泌特异抗体的杂交瘤^[1]。

当杂交瘤细胞生长之后,在众多的杂交瘤细胞克隆之中,必定有一个克隆的杂交瘤细胞能分泌我们所需的抗体,用有限稀释的方法,可以将这个克隆的细胞分离出来,加之扩大培养,由于杂交瘤细胞具有亲代细胞一瘤细胞一持续增殖和B细胞分泌抗体的双重特性,所以在原则上这种杂交瘤细胞克隆具有无限增殖和源源不断产生抗体的能力。又由于这种抗体来源于单一克隆的B细胞,所以它是单一的针对特定抗原决定簇的抗体,因此称之为单克隆抗体。

骨髓瘤细胞的选择和HAT(hypoxanthine-aminopterin-thymidine)培养基^[13,14,18];单克隆抗体技术之所以称为B淋巴细胞杂交瘤技术,就是由于这个技术的主要点是用骨髓瘤细胞