

# 1 酶组织化学

酶组织化学是通过细胞内的酶催化底物的作用并借助显色反应在切片或涂片上显示组织或细胞内源性酶的活性及定位的方法。自 Klebs 于 1868 年首次采用这一方法显示组织中的过氧化物酶以来,已近 130 年的历史,但直至 20 世纪,酶组织化学才得到长足发展并成为组织化学中一门独立的分支。目前用这一技术显示的酶已逾一百种。20 世纪 70 年代后,随着免疫组织化学技术的不断开拓,酶组织化学的发展趋缓,免疫组化与酶组织化学相比虽有许多优点,但在某些方面前者并不能完全代替后者,故酶组织化学仍有应用价值。

## 1.1 酶组织化学的原理及一般原则

### 1.1.1 酶组织化学的基本原理

酶组织化学就是利用细胞内的酶催化分解合适的底物,生成中间产物,即初反应产物(primary reaction product 简称 PRP)。然后其中之一再与辅助物经一或二步反应生成有色不溶的终反应产物(final reaction product, FRP),沉积在原位以显示酶的存在。在此过程中可能会出现 PRP 的弥散而造成定位不准确。弥散受三个因素左右,一是底物在酶催化下水解的速度;二是 PRP 在缓冲液中的弥散系数;三是 PRP 与辅助物反应的速度。选择合适的底物和辅助物可以使水解反应和 PRP 与辅助物的反应迅速进行以减少弥散,有时辅助物的浓度过高不但会抑制酶的活性,而且还会影响 FRP 的形成,一般以不超过 1 mg/ml 为宜。

### 1.1.2 酶组织化学的一般原则

酶组织化学欲取得满意的结果,必须遵循一些基本的原则,它们是:

- (1) 对标本的处理和制片过程不能影响酶的活性及分布;
- (2) 所选择的底物和辅助物必须能迅速和同步地渗透到组织和细胞中去;
- (3) 所选择的底物最好只能被一种酶催化分解;
- (4) 所选择的辅助物不能影响酶的活性和其他反应剂穿透进入细胞;
- (5) PRP 必须能迅速与辅助物进行反应,且 FRP 是水不溶性的有色而稳定的物质;
- (6) 所有参加反应的试剂都不能与组织细胞内除了所检测的酶以外的任何成分自行吸附或结合。

## 1.2 酶组织化学对组织处理的要求

组织经一般固定剂固定、常规石蜡包埋的方法处理后酶的活性几乎都会丧失,仅极少数情况例外(如氯乙酸酯酶),除非针对具体的酶使用特殊的固定剂和特殊的包埋方法,才可以部分保持酶的活性,如用丙酮固定,低温乙醇脱水,低温石蜡包埋,可部分保持大鼠肝脏内的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶的活性。所以酶组织化学一般都使用冷冻切片。新鲜组织立刻用液氮速冻,为了使组织结构保持得更好,也可使用经液氮冷却的异戊烷(isopentane)。速冻时最好

使组织包埋于 OCT 以便容易切片。速冻的组织在  $-20^{\circ}\text{C}$  酶的活性仍易丢失，故只能短期暂存，如要长期保存组织块，应置于  $-70^{\circ}\text{C}$ 。在冷冻保存时，还要防止水分蒸发使组织变干。冷冻切片在染色前可以预固定也可以不固定，为了使组织形态结构保持良好，常用低浓度（1%~4%）的多聚甲醛、甲醛或戊二醛进行预固定。其中甲醛能较好地保持酶的活性。

细胞涂片和培养细胞在制备后应迅速使其干燥，以保持酶的活性，在干燥的情况下，室温可保存数周相反放在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱或无包装放在  $-20^{\circ}\text{C}$  常使酶失活。如想保存较长时间，则应密封放在  $-20^{\circ}\text{C}$ ~ $-70^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.3 酶显示方法

酶组织化学中酶的显示方法众多，归纳起来，有以下几类：

(1) 同步显示法细胞中的酶催化底物水解生成的 PRP 立即与辅助物如偶氮盐或金属离子等反应成为有色不溶的 FRP，沉积在原位以显示酶的存在。

(2) 二步显示法也称孵育后偶联法，此法中，酶促底物的水解反应和 PRP 与辅助物的显色反应是前后分开进行的，其优点是可以充分满足这两种反应的最适 pH 尤其当它们各自要求的 pH 相差较大时。另外，有时酶促底物的水解反应要求较长的孵育时间，而有些辅助物在这段时间中已开始分解，用二步显示法可避免此不足。此法的局限性是要求 PRP 停留原位不发生弥散。

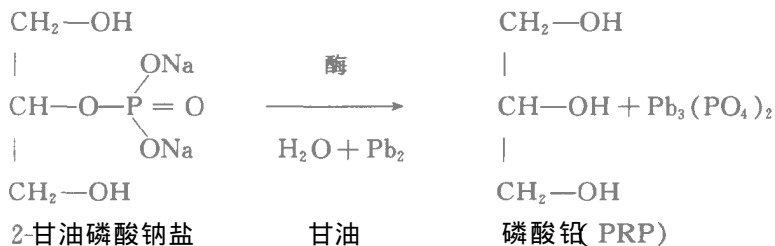
(3) 底物自身显示法酶促底物水解反应后，有色底物的溶解基团被去除而生成不溶的有色物质，或者底物分子内部重组生成有色的不溶物质沉积原位以显示酶的存在。

现就常用的几种方法简述之。

#### 1.3.1 金属离子沉淀反应

酸性磷酸酶的 Gomori 反应是典型的例子，其原理如下：

##### 1. 酶促反应



##### 2. 显色反应



用此法显示的酶还有 ATP 酶和 5'-核苷酸酶等。

#### 1.3.2 偶氮盐偶联反应

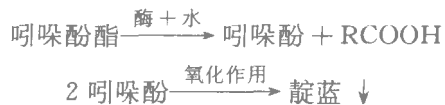
在这类反应中，PRP 与偶氮盐结合，生成不溶的偶氮染料，以碱性磷酸酶为例说明之。



用此法显示的酶还有酯酶、转肽酶、肽酶等。

### 1.3.3 靛蓝反应

在这类反应中，底物被酶分解为两个 PRP，其中之一可在一定的条件下形成不溶的靛蓝。以酯酶反应为例：



靛蓝反应还可用来显示胆碱酯酶、磷酸酶、糖苷酶和非特异性酯酶等。

### 1.3.4 四唑反应

底物被某些氧化酶或脱氢酶氧化脱氢后，产生的氢离子传递给四唑盐，四唑盐在这里作为一种受氢体，还原后形成有色的沉淀物。常用的四唑盐有两种，一种是双四唑盐，如氮蓝四唑 (nitroblue tetrazolium 即 NBT)，还原后产生的深色沉淀不溶于脂肪；另一种是单四唑盐如 MTT[3(4, 5-dimethyl thiazolyl-2YL)2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 还原后生成有色的细颗粒，能溶解于脂肪。

单胺氧化酶和几乎所有的脱氢酶都可以用此法显示。

## 1.4 酶组织化学的应用

酶组织化学用来确定组织细胞有无某种酶的活性，故至少在以下五个方面有其应用价值。

### 1.4.1 了解组织细胞的代谢活动

酶组织化学既可以在原位观察生理情况下组织中不同部位的细胞代谢的差异，还可以研究病理状态下细胞代谢活动的改变。如心肌梗死发生的 4~6 小时内，HE 切片上是不会发现明显变化的，而用酶组织化学可显示心肌在梗死早期（2 小时左右）即出现能量代谢变化，梗死心肌细胞内的琥珀酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、细胞色素氧化酶和磷酸化酶的活性均明显下降；又如 Reye 病时，酶组织化学可显示肝细胞缺乏琥珀酸脱氢酶。这些酶活性变化的检测有助于病理诊断。

### 1.4.2 细胞类型的判定

在细胞培养和临床细胞学检查时，有些细胞可以通过酶组织化学而确定其类型。如在血液细胞范围内，非特异性酯酶被认为是单核细胞和巨噬细胞的特异性标记，据此可与其他血细胞区别，但这种特异性是有一定范围的，因为上皮细胞和脂肪细胞此酶的活性也很高；另外，氯乙酸酯酶可以作为中性粒细胞的特异性标志。由于很多酶都有广泛的细胞分布，因此单依靠酶组织化学有时很难对细胞进行分类。目前，细胞类型的判定大部分已被免疫组化所替代。

### 1.4.3 细胞定位

在组织中有些特殊细胞的定位可以依靠酶组织化学，如在小肠中用乙酸胆碱酯酶 (ACE) 进行神经节细胞和神经纤维的定位；在皮肤中用 ATP 酶进行朗汉斯 (朗罕氏) 细胞的定位；在各种组织中用非特异性酯酶进行巨噬细胞的定位等。

### 1.4.4 癌变过程的研究

应用酶组织化学研究癌变过程主要在肝脏中进行，用化学致癌剂诱发大鼠肝癌的最早期肝脏的 HE 切片未显示明显变化，但用组织化学和酶组织化学能观察到肝内一些肝细胞灶已发生糖代谢紊乱。具体讲，用过碘酸雪夫反应显示这些肝细胞有糖原沉积的增加，铅盐

法酶组织化学可发现糖原过度沉积的肝细胞葡糖-6-磷酸酶(G-6-P)的活性明显下降,同时糖原磷酸化酶的活性也下降,但用四唑盐法却可见6-磷酸葡糖脱氢酶活性增高,这些酶活性的改变与肝细胞糖原的过度沉积有关。随诱癌过程的进展,沉积的糖原可逐步减少,出现嗜碱性肝细胞灶,此时, $\gamma$ -谷氨酸转氨酶活性(GGT)可显示阳性。同样的现象在长期服用避孕药的妇女的肝脏中也可出现。也有报道,在人肝再生结节性增生灶中有与动物肝相似的糖原过度沉积及其有关酶活性的改变。但这种糖代谢的改变究竟与肝细胞的癌变有何关系尚有待进一步深入研究。笔者曾用酶组织化学对大鼠肝癌的癌变过程的GGT活性进行过研究。在非致癌剂D-半乳糖胺与致癌剂3'-Me-DAB所致肝组织损害的材料中,肝细胞GGT酶组织化学的反应不同,前者为阴性而后者为阳性。酶组织化学结合 $^3\text{H}$ -dT放射自显影的结果显示,GGT阳性肝细胞结节中肝细胞的增殖远较GGT阴性结节中的活跃,而这种增生迅速的肝细胞被认为是一种癌前的病变,因此GGT可作为肝癌的癌前病变的标记。用GGT的酶组织化学结合甲胎蛋白(AFP)免疫组织化学的双染色,观察了3'-Me-DAB诱发大鼠肝癌的癌变过程,发现由卵圆细胞演变而来的过渡细胞和小肝细胞及其增生结节AFP和GGT均可显示阳性,另外去分化肝细胞及其嗜酸性增生结节中的肝细胞当出现异形时,AFP和GGT也阳性,从而提出肝癌的发生可归纳为二大来源,其一来自肝内干细胞或卵圆细胞的增生,由卵圆细胞演变而成的,一般为小细胞性嗜碱性增生结节,癌变后形成的肝细胞癌分化程度也较低。肝癌的另一种来源可能通过原有肝细胞受致癌剂的引发或始动作用而成的所谓的抵抗细胞,增生后主要形成嗜酸性肝细胞增生结节,形成的肝细胞癌分化程度相对较高。这些结果对研究人肝癌的组织发生和分型可能有着重要的参考价值。如上所述,GGT和G-6-P可分别作为肝癌的癌前病灶的阳性和阴性标记来显示肝癌的癌前病灶,故借助定量立体学的方法还可对其进行定量分析。

#### 1.4.5 免疫组化和杂交组化的显示手段

酶组织化学又是免疫组织化学和杂交组织化学常用的一种显示方法。无论是免疫酶组化还是标有生物素或 digoxigenin 探针的杂交组化,其最后一步常要依靠标记酶催化底物形成不溶的有色物质沉淀于原位以显示被检物质的存在。常用的标记酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

(张锦生)

#### 参 考 文 献

- [1] 张锦生, 应越英, 徐元鼎. 以  $\gamma$ -谷氨酸转氨酶为标记对实验性肝癌癌变过程的研究. 上海第一医学院学报, 1983, 10(4): 263
- [2] 徐元鼎, 张昭成, 张锦生等. 3'-Me-DAB 诱发大鼠肝癌的实验病理研究. 中华病理学杂志, 1988, 17(2): 87
- [3] Bannasch P. Pathobiology of chemical hepato-carcinogenesis: Recent progress and perspectives. Part II. Metabolic and Molecular changes. J. Gastroenterol and Hepatol, 1990, 5: 310
- [4] Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Edinburgh, London, New York. Churchill Livingstone, 1981
- [5] van Basten CDH, Broekhuizen R, van Houte AJ et al. Laboratory Course on Modern Histochemistry. A Syllabus by Department of Pathology, University Hospital, Utrecht, The Netherlands. 1989
- [6] Mehta R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. Cancer Letters 1995, 93: 85

# 2 免疫组织化学

## 2.1 免疫组织化学中的免疫化学

免疫组织化学中常用的免疫化学方法有抗原的提取和纯化, 抗体的制备及免疫球蛋白的提取、抗体的标记。近年来, 免疫化学方法已经进入分子生物学阶段, 对极微量而难以提取的抗原, 可根据 cDNA 的顺序来合成多肽而获得, 而单克隆抗体则已用基因工程方法来大量制备。尽管如此, 一般实验室仍使用常规方法, 分述于后。

### 2.1.1 抗原的提取和纯化

提纯抗原的目的是制备特异性抗体, 抗原越纯制备的多克隆抗体特异性越高。从理论上讲, 单克隆抗体对抗原的纯度要求不高, 但实际上不纯的抗原会给克隆筛选带来一定的困难, 故如果可能, 仍应尽量应用高纯度的抗原, 特别是在制备抗原目标明确时。

#### 1. 抗原的概念

凡能在机体内引起体液免疫和(或)细胞免疫反应的物质, 称为抗原。抗原具有两方面的特性, 抗原能使机体产生抗体和(或)致敏淋巴细胞, 称之为免疫原性; 抗原还能与相应的抗体及致敏淋巴细胞发生特异性的结合或反应, 称为免疫反应性。有免疫反应性而缺乏免疫原性的抗原称为半抗原。半抗原与载体(通常是大分子物质)结合, 可变为全抗原。载体不仅增加了半抗原的大小, 可在体内激发免疫反应, 而且还直接与免疫记忆有关。

#### 2. 抗原的分类

抗原有可溶和不溶性两类, 后者主要包括一些颗粒性抗原, 如细胞、细胞器、某些病原体等。根据性质, 抗原又可分为: ①结构抗原, 为组成细胞结构的成分, 如细胞骨架蛋白; ②分泌抗原, 为细胞所产生和分泌的酶、激素、粘液蛋白等; ③沉积抗原, 如肾小球肾炎时沉积在肾小球基膜的免疫球蛋白、补体和免疫复合物等; ④入侵抗原, 主要指病原微生物。

#### 3. 抗原提纯的一般原则

免疫组化方法检测的抗原中, 蛋白质占了大多数, 故此处叙述的一般原则以蛋白抗原为主要对象。

(1) 抗原检测方法的选择及建立为确保抗原提取纯化的成功, 在正式开始前, 就先建成合适的定性或定量的检测方法, 以跟踪检测一系列提纯过程中抗原是否存在, 其含量和活性如何。这些方法大致可分为特异和非特异性两种。特异的方法是利用抗原的特异性反应, 包括抗原(酶)与底物、抗原与受体、抗原与已知抗体之间的反应以及抗原的生物效应来判定抗原的存在和活性。此方法可靠, 但必须具备一定的条件, 如少量的标准抗体、特异的酶活性测定方法、受体测定方法和生物效应测定方法等。非特异性的方法是利用抗原已知的理化性质, 如溶解度、沉降系数、凝胶层析行为、电泳行为、等电点(pI)等来估计抗原的存在、活性和含量。如用制备电泳纯化大鼠甲胎蛋白(AFP), 当聚丙烯酰胺凝胶浓度  $T =$

12% 时, 已知电泳最快的三条带分别是白蛋白、AFP<sub>a</sub>、AFP<sub>b</sub> 因此根据 AFP 的电泳形为可定出 AFP 的存在; 又如在纯化波形蛋白和结蛋白时, 也是用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 来进行检测的。此法虽然可靠性差些, 但它不需要特殊的条件, 只要预先知道所提抗原的一些理化性质, 就能作出判断。

(2) 组织材料来源的选择分离纯化的过程就是将不要的成分不断去除、欲提纯成分不断浓缩的过程。因此一种组织中欲提纯抗原含量越高, 提纯也越容易。胎儿血清或 AFP 阳性的肝癌病人腹水中 AFP 的含量高 故人的 AFP 常从这两种体液中提取。大鼠怀孕 14 天后 羊水中 AFP 逐步升高, 故大鼠 AFP 常从孕 18 天左右的大鼠羊水中提取, 波形蛋白 (vimentin) 从猪或牛的晶状体中提取, 人肌红蛋白从人骨骼肌中提取, 而大分子细胞角蛋白则从角化上皮中提取。除此之外, 还应考虑材料来源是否经济、方便, 能否大量收集。

(3) 保持抗原分子的稳定性提取纯化蛋白抗原的步骤很多, 往往费时较长, 因此在每一道纯化步骤中都应考虑到蛋白抗原分子的稳定性。缓冲液的 pH 对蛋白质的稳定起重要作用, 应十分小心。大多数蛋白质含有相当数量的巯基, 如果巯基被氧化, 形成分子间或分子内二硫键, 有时会导致蛋白质活性丧失, 2-巯基乙醇、半胱氨酸、还原性谷胱甘肽等化合物均能防止这种氧化作用。另外, 铅、铁、铜等重金属离子常与巯基反应, 为保护蛋白质中的巯基, 必须在缓冲液中加入浓度为  $10^{-4} \sim 3 \times 10^{-4} \text{M}$  的 EDTA 以螯合掉大部分以至全部有害的金属离子。有些蛋白质在疏水的环境较稳定, 为此可用蔗糖、甘油以至二甲基亚砷 (DM-SO) 等。有些蛋白质则需要极性介质以保持其活性, 这时可用 KCl、NaCl、NH<sub>4</sub>Cl 或 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 以提高溶液的离子强度。在蛋白质抗原提取过程中最令人头痛的是蛋白酶的水解作用。蛋白酶有内肽酶和外肽酶之分, 防范蛋白水解酶措施有两方面, 一方面可将抗原设法与蛋白水解酶分隔开, 如可先提出溶酶体或用亲和层析法去掉水解酶; 另一方面可使用蛋白水解酶的抑制剂, 可逆的抑制剂如 Pepstatin 可抑制门冬氨酸蛋白酶, 不可逆的抑制剂如 DIPF (二异丙基氟磷酸)、PMSF (苯甲基磺酰氟) 是丝氨酸蛋白酶抑制剂。除了对冷敏感的蛋白, 如纤维连接蛋白 FN 外, 一般蛋白质的提纯均应在 0~4℃ 进行。

#### 4. 抗原分离纯化的一般步骤

(1) 增溶溶解由于全部分离步骤通常在水溶液中进行, 因此增溶溶解对于任何要纯化的蛋白质抗原都是必要的一步。所谓增溶溶解就是采用各种方法使蛋白抗原从细胞内细胞器内释放出来, 溶解于缓冲液中, 并保存其完整性和活性。如果欲提取的蛋白抗原 (如细胞骨架蛋白) 不溶于一般的盐溶液中, 那么, 增溶溶解可以洗去大量不需要的可溶蛋白, 以利于最后的分离纯化。如果欲提取的蛋白抗原位于细胞器内 (如线粒体、溶酶体、微粒体等) 则应采取温和的方法来破碎细胞, 保持细胞器的完整, 分离细胞器后, 再提纯蛋白抗原。在破碎细胞时, 为促进蛋白质的溶解, 常加一定浓度的离子性去垢剂, 如十二烷基硫酸钠 (SDS) 或非离子性去垢剂 (Triton-X100 等)。SDS 因极性较大, 有时会影响抗原的活性, 故 Triton-X100 更为常用。增溶溶解的常用方法有: ① 渗透溶胞: 为破碎细胞最温和的方法之一, 将细胞放在低渗溶液中, 另一温和的破裂力 (如把细胞反复吸入和挤出吸管) 即可达到目的, 此法常用于培养细胞的破碎。 研磨: 使用不同的工具和不同的操作方法, 其破碎程度不一, 有的比较温和, 有的比较剧烈 (最温和的是用手操作研钵, 其次常用手操作玻璃组织匀浆器进行研磨, 电动组织匀浆器效力较大)。为提高研磨效率, 可添加研磨剂 (如氧化铝粉, 直径 45~50 μm 的玻璃珠), 研磨剂有可能吸附一定的蛋白质, 用时须小心。 绞切器: 用绞切器是

比较剧烈的方法，绞切器容量有大有小，以适合处理大小不同的样品，上海标本模型厂出品的 DS-1 高速组织捣碎器，螺旋桨形刀的转速为 10 000~12 000 r/min 连续工作 30~45 s 以上 温度将升高 10 左右，故必须在冰浴下进行。超声波：用超声振荡器破碎细胞也是一种很有效的手段，缺点是会产生热，因此也需要冰浴，并且尽量缩短操作时间。挤压：在高压下迫使细胞悬液通过微孔以破碎细胞，此法虽然既温和又彻底，但需要复杂的设备，而且容纳的样品量有限。⑥从细胞器组分中提取蛋白抗原：如果蛋白与细胞器的结合比较疏松，只需将细胞器悬浮于高离子强度的溶液(0.5~5 M 的氯化钾或氯化铵)中就可达到目的 对于结合牢固者，应用低浓度、温和的去垢剂加上温和的超声处理才能达到目的。

(2) 分离纯化提纯的方法应先粗后细，先简后繁，即在开始时应使用简便的方法，而把耗时长、分辨率高的方法放在后面使用。也不是一成不变的，在正式提取前，应先作小样本的预实验，摸索最佳方案。

(3) 抗原纯度的鉴定提取获得的抗原就测定其纯度，而纯度水平取决于所用方法的分辨率和灵敏度，低分辨率、低灵敏度的方法测定认为是纯的抗原，改用高分辨率的方法测定时就可能是不纯的。PAGE 分析只有单条带或固有的条带时，即可认为是纯抗原，而用等电点聚焦电泳来测定比 PAGE 更可靠，另外免疫电泳也常用来测定抗原的纯度。

#### 5. 常用的分离纯化方法

(1) 差别溶解法其中最常用的是盐析法，又以中性盐硫酸铵最常用，使用时要注意：市售的硫酸铵需进行纯化。饱和硫酸铵溶液先要用氨水调 pH 至 7.4 或合适的 pH 值。蛋白质浓度要合适，在相同条件下，蛋白质浓度越高越易沉淀，但蛋白质浓度太高易引起其他蛋白质的共沉。④盐析后，要及时透析脱盐。除了盐析法，还可用有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、PEG 沉淀法等，特别是低分子量的聚乙二醇(PEG400) 分离效果很好，几乎可与凝胶电泳相比较。

(2) 层析法层析法包括：离子交换层析法，如阴离子交换剂 DEAE-纤维素，吸附 pH 在 7~9 之间 阳离子交换剂 CM-纤维素 吸附 pH 在 4.5~6 之间 注意 在吸附时 缓冲液的浓度不能大于 0.05 M，洗脱一般用梯度浓度缓冲液进行，也可用浓度与吸附相同的缓冲液洗脱 如用 DEAE-52 纯化 IgG 时)。选择性吸附层析，如羟基磷灰石可选择性地吸附上性和酸性蛋白而排除碱性蛋白。③分子筛层析，常用的是葡聚糖凝胶，依所分离的蛋白质的分子量来选择凝胶，操作时必须注意一定要把静水压控制在所要求的范围内。亲和层析，是一种很有效的纯化方法，但往往需要有已经纯化的特异性抗体或特异性亲和物质，具体方法见有关专著。

(3) 制备电泳法此法分辨率高，纯度满意，方法简便，周期短，常用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)，但使用该法的前提是被分离的蛋白的电泳区带必须与其他成分的区带分得较开。笔者曾用此法满意地纯化了甲胎蛋白(AFP)和结蛋白。提取纯化 AFP 时 收集孕 16~18 天的大鼠羊水，用不连续系统 PAGE 制备，分离胶浓度为 12%，Acr : Bis = 50 ; 浓缩胶浓度为 3%，Acr : Bis = 20。分离胶高 11.5 cm 宽 17 cm 厚 0.5 cm 浓缩胶高 3 cm，宽厚同分离胶。每次电泳用 3 ml 羊水。采用稳定电源，浓缩阶段电流为 17 mA 分离阶段为 40 mA。用冷却装置使电极缓冲液保持在 10 以下。电泳 10 h 左右，然后在胶两侧各切下宽约 0.5 cm 的长条 经 15%三氯醋酸固定 15 min 置于考马士亮蓝 R-250 加温(60 )，染色 5~10 min，LKB 脱色后，位于最前面的三条带分别是白蛋白、AFP<sub>a</sub>、AFP<sub>b</sub>。将染色后

的胶复原至原来位置，以两侧染色胶为标记，切下含 AFP 的凝胶 冰浴下研碎 加 20 ml 生理盐水，4℃ 下搅拌过夜以浸出 AFP 经 22 000 g 低温离心 20 min，收集上清液，用蔗糖浓缩 即为纯的 AFP。经免疫电泳鉴定，它与抗大鼠羊水的抗血清只生成一条沉淀弧，与抗大鼠血的抗血清不生成沉淀弧，它已达到免疫纯化的水平。3 ml 羊水经电泳分离纯化可得 0.6~1.1 mg 的纯化 AFP 回收率为 20%~36%。结蛋白用鸡肫进行粗提后，也可用相似的方法得到进一步的纯化。

脂质、糖和糖蛋白，以及颗粒性抗原的纯化方法可参考有关工具书。

## 2.1.2 合成肽的选择及半抗原的处理

### 1. 半抗原

如前所述，有免疫反应性而缺乏免疫原性的抗原称为半抗原。许多小分子化合物属于半抗原，应用中最常见的半抗原为人工合成多肽。由于半抗原缺乏免疫原性，所以如果要将其用作免疫原，必须先将其连接在一个大分子载体上才能使用，根据不同特性的多肽可以选择不同的连接方法，常用者有戊二醛法、*m*-Maleimidobenzoyl-*N*-Hydroxysuccinimide Ester 法 (MBS 法) 等，戊二醛法虽然较常用，但往往不能用于含侧链氨基酸的多肽，而在下节中讲到的选择位于蛋白表面的多肽时其中一个主要原则为选择蛋白质中的亲水区域，而亲水区域往往含有支链氨基酸，使用戊二醛法时可能会出现大分子的交联而形成沉淀物；选用 MBS 法现在非常流行，但该法的关键步骤为在合成肽的末端加上一个半胱氨酸残基，然后利用上面的活性-SH 基与大分子物质交联，目前国内合成的多肽对活性-SH 基保护手段可能尚不令人满意，具体连接方法的选用请参考半抗原联接的相关专著。

### 2. 人工合成多肽 (简称合成肽)

随着人类基因组计划的进展，很容易得到越来越多的基因序列。根据基因序列，挑选其中的某个片段翻译成多肽序列并进行人工合成后制备抗体已经成为非常重要的方法，这种方法在对功能未知的基因研究中特别有用。由于合成肽是半抗原，一般在用于免疫前先要把合成肽与一个免疫原性很差的大分子物质交联，合成肽在大分子物质上起到一个抗原决定簇的作用。

用合成肽作为免疫原制备抗体有三个明显的优点：一是知道一段 DNA 序列后马上就可以合成多肽制备抗体，这种抗体往往在分子生物学研究中有不可替代的作用；二是进化中非常保守的蛋白质由于免疫原性弱，很难制备高效价抗体，而用合成肽技术则可以挑选该蛋白质中与其他蛋白质差异最大的部分合成多肽，往往能获得高效价抗体。三是抗合成肽抗体可以准确的知道抗体是抗蛋白质的哪一段，在蛋白质结构域的研究中具有不可替代的作用。

用合成肽制备的抗体由于抗体的片段很小，如果所挑选的多肽不位于蛋白质表面，该抗体就可能只能与变性的蛋白质 (三级结构被破坏) 有免疫反应而无法与未变性的蛋白质反应。这种抗体在研究蛋白质分子的结构域中很有用，但不能用于免疫组化染色。显而易见，要成功制备能用于免疫组化染色和检测未变性蛋白质的抗体，合成多肽前挑选位于蛋白质表面的多肽序列是成功的关键所在。一般说来，挑选位于蛋白质表面的多肽应遵循以下原则：①如果可能，使用几段多肽；②如果羧基端为亲水区域，选用羧基端多肽；③如果氨基端为亲水区域，选用氨基端多肽；④选用非两端多肽时，选用亲水常数高的肽段，但肽段长度应比所选用的羧基端或氨基端肽段长些。多肽的长度一般以 10~20 个氨基酸残基为好，短于 10 个氨基酸残基往往很难获得满意的抗体，长于 20 个氨基酸残基技术上一般不容易做到。

### 2.1.3 细菌超表达克隆化基因作为抗原的常用方法及原则

由于合成肽与载体交联的困难以及所制备的抗体在检测完整、未变性的蛋白质时的局限性，在可能的情况下，制备用于免疫组化的抗体时，可以采用克隆化基因体外表达的蛋白质产物经纯化后作为抗原免疫动物。

已知基因的 cDNA 可以购买、向其他实验室索取，也可以用 RT-PCR 自己扩增后插入细菌扩增质粒中备用。表达时可采用原核生物表达法、真核生物表达法等，后者包括近年来发展起来的病毒转染细胞表达法、昆虫细胞表达法等。一般说来，用真核细胞表达蛋白质产量可能很低，但可在表达同时完成蛋白质翻译后修饰，常为研究蛋白质功能等时采用；用原核生物表达蛋白质往往产量较高，并且能够满足作为免疫原的需要，所以以制备抗体为目的时，常常采用原核生物表达蛋白质的方法来制备抗原。具体的操作方法详见相关的分子生物学参考书目，以下仅简要地介绍其使用的主要原则：①如有可能，尽可能表达全长的蛋白质。②构建好表达载体后，在开始表达前，应先做小样表达，以空载体为对照，用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)考马氏亮蓝 R250 染色法观察有无与预期分子大小一致的新条带出现。若无此新条带出现，应仔细检查插入 cDNA 的读码框(open reading frame)是否正确，如果读码框准确无误，应考虑更换表达载体或表达细菌，因为此时即使有微量的正确蛋白表达，其量也远不够用于纯化抗原。检查表达产物是否为包涵体型，详细方法参见相关分子生物学书目。

### 2.1.4 抗体的制备

#### 1. 多克隆抗体的制备

(1) 动物的选择选择什么动物来免疫取决于：(a)所需抗血清的量，小白鼠只能提供 1.0~1.5 ml 的血液，而山羊却能提供好几升。(b)能供免疫用的抗原的量，小白鼠不到 50  $\mu\text{g}$  的抗原量就足够免疫，而山羊却要几毫克。(c)动物的品系，免疫动物与提供抗原的动物之间的种系差异越大越好，比如哺乳类动物的比较保守的蛋白抗原可选择非哺乳类动物(如禽类)来制备抗体。常用的动物有兔、羊、马、猪等。小规模制备以兔(新西兰兔、年轻、健壮、体重在 2.5 kg 左右、雄性)为最常用。

(2) 佐剂佐剂可增强免疫反应，提高抗体的效价。目前常用的是福氏佐剂。此佐剂由 85% 石蜡油和 15% 的羊毛脂组成，如加卡介苗 100 ml 佐剂中含卡介苗 200 mg 则为完全福氏佐剂(FCA)。一般首次注射时用 1/2 体积 FCA 加 1/2 体积的抗原溶液进行乳化，第二次或第三次注射时用不完全福氏佐剂或不用佐剂。判断乳化是否充分，可将一滴乳化好的液体滴在水面上，如能长时间保持圆珠形而不散开，表示乳化达到要求。

(3) 免疫方法 ①途径 可以肌内、静脉、皮内、皮下或腹腔注射，一般以皮内注射效果最好，多部位比单部位好，大动物一般不用腹腔注射，颗粒抗原和使用佐剂时不能作静脉注射。另外还可用淋巴结内注射来免疫，可获得高效价抗体。次数及间隔时间，一般而言动物越大间隔时间越长。豚鼠、大鼠为 7~8 天，兔子为 10~15 天，羊为 14~28 天，有时第三次注射的间隔时间更长些，效果更好。以微量抗原淋巴结内注射免疫家兔为例，一般选择 2.5 kg 左右的新西兰种公兔，先在其两脚垫各注射完全福氏佐剂 0.2 ml(卡介苗每只兔为 5 mg)，10 天后，见腭窝淋巴结肿大后，将与完全福氏佐剂混合并乳化好的抗原准确无误地注射至肿大的淋巴结内。以后每隔 20 天用不完全福氏佐剂乳化抗原，以同样方法加强两次。每次注射的抗原量为 20~50  $\mu\text{m}$ ，末次注射两周后兔耳静脉放血测定效价，用琼脂双扩。

散法测效价可达 1:128, 但具体效价还要看操作者的熟练程度及动物的反应性。由于各动物之间的个体差异较大, 故每次应多免疫几只动物从中选择效价高者的血清使用。

(4) 效价测定 ①环状沉淀试验, 需较多的抗血清, 现已很少用。琼脂免疫双扩散, 缺点是其敏感性较差, 且有时会出现假阴性(如使用半抗原或单克隆抗体时)。对流免疫电泳, 比琼脂免疫双扩散敏感, 较简便、实用。酶联免疫吸附试验(ELISA)。⑤免疫组织化学方法, 此法必须要请对免疫组织化学染色有相当经验的技术人员, 在肯定阳性的组织切片上进行, 否则会出现假阴性。

(5) 放血或定期抽血兔和羊是从颈总动脉来放血, 豚鼠和大鼠则可从心脏穿刺抽血, 小鼠可采取球后静脉窦取血, 鸡往往从腋动脉取血。采血过程中, 动作要轻柔, 尽量避免溶血待血液凝固后及时离心收集血清加叠氮钠分装低温保存。

## 2. 单克隆抗体的制备

上述免疫动物后获得的抗血清中的抗体是混合性多克隆抗体, 在免疫效果最满意的抗血清中, 针对目的抗原的特异性抗体最多占抗血清中所含抗体的 10%, 即使是经特异性抗原亲和层析后获得的特异性多克隆抗体, 其抗体的结构也是不均一的。长期以来, 人们一直想获得一种在分子结构上完全均一的抗体。1975年, Koehler和 Milstien 用小鼠脾脏中能分泌抗体的浆细胞与小鼠骨髓瘤(浆细胞恶性肿瘤)细胞融合, 获得了具有浆细胞分泌特异性抗体又有恶性肿瘤细胞无限增殖能力两种特性的杂交瘤细胞, 经克隆化培养后获得了单克隆的分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株, 从而获得了分子结构上完全均一的单克隆抗体。单克隆抗体与多克隆抗体相比, 各有所长。详见表 2-1。

表 2-1 多克隆抗体与单克隆抗体的比较

特 性	多克隆抗体	单克隆抗体
分子结构	不均一	均一
与抗原决定簇反应	多个, 多价	单一, 单价
特异性	取决于抗体	较强
亲和力	不均一,	均一, 取决于抗体
免疫组化染色	较强, 背景深	取决于抗体, 背景清晰
免疫亲和层析	较差	取决于抗体, 但可以很好
琼脂双扩散	可见	一般不可见
ELISA	结果取决于抗体	效果满意
免疫印迹	一般结果好	取决于抗体, 效果可很满意

单克隆抗体 (McAb) 的制备一般包括下列步骤:

(1) 免疫动物绝大多数 McAb 是用小鼠的免疫活性细胞与小鼠的骨髓瘤细胞融合而建立杂交瘤细胞株的, 一般用腹腔注射的途径来免疫小鼠以获得分泌特异性目的抗体的免疫活性细胞。因为绝大多数的小鼠骨髓瘤细胞株是在 BALB/c 小鼠中建立起来的, 所以目前使用最多的小鼠为雌性 BALB/c 小鼠。可溶性抗原的剂量, 最低每次可用 1  $\mu\text{g}$  常用量为 10~20  $\mu\text{g}$ /次, 当制备单克隆抗体的目的为用于免疫组化时, 用量不要太大, 太大的剂量会获得大量低亲和力的抗体, 用于免疫组化染色效果不能令人满意; 但当目的为用于亲和层析且抗原量充足时, 每次可用到 50~100  $\mu\text{g}$ 。每次腹腔注射的体积不要超过 0.5 ml 如抗原为细胞, 每次用量为  $10^6$  细胞。一般腹腔注射 3 次(每次间隔 3 周)后取静脉血(尾静脉或眼球后静脉)用 ELISA 法测效价, 选效价最高的小鼠在融合前 3 天做尾静脉注射加强, 抗

原可用  $10\sim 30\ \mu\text{g}$  体积不超过  $0.2\ \text{ml}$ 。静脉注射 3 天后做细胞融合。

(2) 细胞融合常用聚乙二醇(PEG)作融合剂,PEG 分子量为  $1\ 000\sim 3\ 000$ ,常用  $1\ 500$  其浓度为  $50\%(W/V)$ ,融合时,骨髓瘤细胞(现在最常用为 SP2/0)与小鼠脾细胞的比例有  $1:4\sim 1:12$  之间,常用为  $1:10$ 。融合前一周复苏 SP2/0 细胞,维持在含抗支原体抗生素的培养液中,融合前一天将单层细胞作  $1:10$  稀释后培养备用。采脾细胞时颈椎脱臼法处死小鼠,用碘酒、酒精消毒后在无菌状态下取出小鼠脾脏,小心去除脾脏周围所有结缔组织,用无菌剪刀剪碎脾脏后在  $200$  目筛网上用注射器内芯研磨后冲洗,可得到单个的脾细胞,用  $37^\circ\text{C}$  无血清培养液洗涤,  $300\ \text{g}$  离心  $5\ \text{min}$ 。离心脾细胞时开始收集 SP2/0 细胞,一般一个小鼠脾脏可获得淋巴细胞  $5\times 10^7\sim 2\times 10^8$ ,每次融合需要骨髓瘤细胞  $2\times 10^7$ 。收集 SP2/0 细胞后用另一支离心管与脾细胞同时离心一次后,再重复洗涤、离心一次。然后将两种细胞混合在一支离心管中洗涤离心( $800\ \text{g}$ ,  $5\ \text{min}$ )。小心将每一滴培养液吸干后于一分钟内均匀加入  $1\ \text{ml}$  PEG( $37^\circ\text{C}$ )加入 PEG 时边加边轻柔震荡将 PEG 与细胞混匀加完后静置一分钟,然后用  $10\ \text{ml}$  刻度吸管吸取  $10\ \text{ml}$  无血清培养液( $37^\circ\text{C}$ )于第一分钟内均匀加入  $1\ \text{ml}$  第二分钟内均匀加入  $2\ \text{ml}$ ,然后再滴入其余培养液。加培养液时边加边震荡是细胞融合的至关重要的手法。细胞融合完毕后离心弃培养液,用 HAT 重悬浮细胞后均匀加入  $10$  块  $96$  孔培养板中。

(3) 选择培养常用 HAT(次黄嘌呤、甲氨蝶呤、胸腺嘧啶核苷)培养液来进行选择培养。其原理是 HAT 培养液中的甲氨蝶呤抑制细胞主要途径的 DNA 合成,由于骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)和胸腺嘧啶激酶,不能进行替代途径的 DNA 合成,在 HAT 培养液中主要途径 DNA 合成被抑制后就无法生存。脾细胞虽有这两种酶,在 HAT 培养液中能够进行替代途径的 DNA 合成,但在没有致分裂原和其他生长因子的情况下,脾细胞也不能生存。只有脾细胞和骨髓瘤细胞融合后所形成的融合细胞既有正常细胞的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)和胸腺嘧啶激酶能维持细胞 DNA 合成的替代途径,又具有骨髓瘤细胞的无限生长能力(恶性肿瘤细胞的特征),在 HAT 培养液中可以顺利增殖。经选择后生长的杂交瘤细胞还不能保证是单克隆的(融合顺利时每孔内可生长  $1\sim$  数个克隆),而且很多克隆并不分泌特异性的目的抗体,故必须进行阳性筛选和亚克隆培养。

(4) 阳性克隆筛选阳性克隆的筛选最常用的方法为 ELISA 和点印迹法。这两种方法敏感,能检出大部分的单克隆抗体,但不是所有的单克隆都能用于免疫组化。一般说来,先用 ELISA 法筛选出阳性克隆后,根据将来使用的目的,选用相应的方法再次筛选克隆。如制备单克隆抗体的目的是用于免疫组化,就应再用免疫组化法再次筛选克隆,筛选时可根据使用目的,选用冷冻切片或石蜡切片,并用较敏感的方法如 ABC 法或 EnVision 两步法。

(5) 克隆化筛选到理想的克隆后,必须进行单克隆化。过去常用的方法有软琼脂培养法,显微操作法等,现已因方法复杂,效率不高而很少使用。现一般用有限稀释法进行克隆,即在筛选出的克隆中每孔取出一定的细胞,在  $96$  孔培养板中进行纵向倍比稀释后再做横向倍比稀释,等克隆长出后再次挑只有一个克隆生长的孔筛选,阳性孔再重复上述有限稀释法培养,直到所有孔中都产生同一种抗体时,说明克隆化已经完成。如果一部分孔阳性而另一部分孔阴性,则说明至少还有两个不同的克隆同时存在,还需要进一步克隆化。

(6) 扩大培养杂交瘤克隆化后,有两种方法可用于扩大培养并生产单克隆抗体。一

是体外培养，体外培养的上清中抗体浓度较低，一般仅为 5~40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  且培养成本较高。由于抗体浓度太低，纯化时一般要用葡萄球菌蛋白 A 或 G (Protein A 或 Protein G) 做亲和层析，成本也较昂贵。二是体内法，即腹水瘤法。方法是先用石蜡油注射在小鼠腹腔内以刺激腹水生长，7 天后在腹腔内接种  $2 \times 10^7$  杂交瘤细胞。体内法可获得含高浓度单克隆抗体的腹水，其浓度可达 10  $\text{mg}/\text{ml}$  成本低。纯化时可用简便、价廉的  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  沉淀法。

需要指出的是，在杂交瘤制备的每一个过程中，都应该将一部分细胞冷冻保存，以备在某一步骤失败后不须从头开始。

### 3. 抗体的纯化

抗体存在于抗血清或腹水及培养液中，其他成分甚多，如要标记抗体时，必须提纯抗体，以免受杂蛋白的干扰。用不同的方法，可得到不同纯度的抗体：中性盐析法只能得到粗的 IgG；离子交换层析法 (DEAE-52) 可得到较纯的 IgG 组分；葡萄球菌蛋白 A (SPA) 亲和层析法可得到更纯的 IgG 组分；而用抗原亲和层析柱进行亲和层析或用免疫沉淀法则可得到只针对该抗原的特异性 IgG。如再将这特异性的 IgG 用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶进行酶解，则可得到特异性抗体的 Fab 段，前者酶解产生二分子的 Fab 和一个完整的 Fc 段，后者则产生一个  $\text{F}(\text{ab}')_2$  和 Fc 段的碎片。Fab 的优点是分子量小，易渗透，而且也可进行标记，同时因无 Fc 段，可消除抗体与具有 Fc 受体的无关细胞的结合，从而大大减少假阳性。

#### 2.1.5 抗体的标记

抗体的标记物很多，计有五大类，即荧光素、酶、胶体金、铁蛋白和其他。本文主要介绍荧光素和酶的标记方法，另外还简要介绍生物素的标记。

##### 1. 荧光素标记

可标记的荧光素有异硫氰酸荧光黄 (FITC)、rhodamine 类和其他，最常用的还是 FITC。FITC 在紫外线激发下发出翠绿色的荧光，标记的方法较简单，其原理是 FITC 与 IgG 上的自由氨基形成硫碳氨基键而结合。具体常用 Marshall 法，高浓度 (30~40  $\text{mg}/\text{ml}$ ) 的 IgG 与一定量 (1  $\text{mg}$  的 IgG 与 0.02  $\text{mg}$  的 FITC 结合) 的 FITC 在 pH 为 9 的情况下避光 4  $^\circ\text{C}$  搅拌 6 小时，然后移到 4  $^\circ\text{C}$  冰箱过夜，第二天过 Sephadex G-25 柱去除游离的 FITC。分装后低温保存。

##### 2. 酶标记

免疫组化中可用的酶有 10 多种，如辣根过氧化物酶 (HRP)、葡糖氧化酶、碱性磷酸酶 (AP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、苹果酸脱氢酶、6-磷酸葡糖脱氢酶、溶菌酶、葡糖淀粉酶等。最常用的是 HRP。应选用活性高的 HRP (RZ 值须大于 3)，HRP 标记方法有戊二醛法，其原理是利用戊二醛的两个醛基分别与 HRP 和抗体 IgG 上的游离氨基反应，形成  $-\text{CH}=\text{N}-$  基将 HRP 与抗体连结起来。具体又有一步法和两步法，但总的来说，因 HRP 中的游离氨基有限，标记率不高。目前常用的是过碘酸钠法，其原理是过碘酸氧化 HRP 上的糖基使之成为醛基，后者再与抗体 IgG 上的游离氨基反应而完成标记。此法标记率高，理想情况下，70% 的 HRP 可结合到 99% 的 IgG 分子上。运用此法标记抗体时，要防止过度标记而丧失抗体的效价，因此控制酶和过碘酸钠的量以及氧化的时间极其重要。

##### 3. 生物素标记

生物素在与抗体 IgG 偶联前必须先活化，活化步骤如下：

(1) 称取生物素 25  $\text{g}$  溶解于 30  $\text{ml}$  二甲基甲酰胺溶液中，再依次加入 N-琥珀酰亚胺酯

1.5 g 和双环己基碳化二亚胺 2.0 g 在室温下密闭磁力搅拌 20~24 小时,使其析出沉淀物即双环己基尿的副产品。

(2) 减压过滤,除去白色沉淀物,并用二甲基甲酰胺滴加洗涤数次,滤液于 0 过夜若再次析出白色沉淀物时,再经减压过滤处理。

(3) 除去白色沉淀物的滤液加热至 100 左右(用减压蒸馏装置)减压抽去溶剂二甲基甲酰胺。

(4) 获得的固体物用少量己醛洗涤数次,再进一步除去双环己基碳化二亚胺和减压除去溶剂二甲基甲酰胺,最终获得的固体物即活化的生物素纯品,放在  $P_2O_5$  干燥器中充分干燥。

(5) 干燥后的纯品固体物用异丙醇重结晶两次,结晶熔点 202~208 °C 元素分析: C = 49.07% H = 5.61% N = 2.18% .

(6) 结晶活化生物素纯品置干燥器中, 4 保存。

注:SIGMA 公司已有活化好的生物素出售,以上活化这一步可省去。

活化生物素与抗体偶联的方法如下:

(1) 将活化生物素按浓度 1 mg/ml 溶解于二甲基亚砷中。

(2) 将待偶联而已纯化的抗体按浓度 1 mg/ml 溶于 0.1 mol/L, pH9.0 的碳酸氢钠溶液中。

(3) 将活化生物素溶液与待偶联的抗体溶液按 1:8 比例混合,在室温下温育 4 小时。

(4) 在 4 下对 0.05 mol/L, pH7.2 的 PBS 透析 24 小时 其中换液 4 次 以除去未结合的游离生物素。

(5) 加入 0.02%  $NaN_3$  于已结合有生物素的抗体溶液中,分装后, 4 保存。

#### 4. 标记抗体的纯化

标记后的抗体溶液中尚有很多不需要的成分,为了提高标记抗体的特异性减少背景染色,必须对标记好的抗体进行纯化。以 HRP 为例,标记后抗体溶液中含有 HRP-IgG 这是我们需要,另外还含有游离的 HRP 和 HRP 的二聚体,如不除去会加深背景染色,除此,还有未标记的 IgG 和 IgG 的聚合体,这些会对酶标抗体产生竞争抑制,所以必须进行纯化,纯化的常用方法有 50% 饱和硫酸铵沉淀或凝胶层析 (Sephadex G-200)。

#### 5. 标记抗体的质量评估和保存

抗体标记后,质量如何,能否用于免疫组化,应进行鉴定,可用标记率这一指标进行评估 荧光标记时可测定 F/P 比值,F 为荧光素量,P 为蛋白总量,合适的 F/P 克分子比值为 1~2; HRP 标记时 标记率为  $OD_{403\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  合适的标率在 0.3~0.6 相当于 1~2 个 HRP 分子结合于一个抗体分子上。但单用标记率并不可靠,还须用阳性切片作免疫组化染色以估计标记抗体的质量,如果染色背景很清,阳性结果明显而清晰,标记抗体的效价仍保持较高,说明抗体标记成功。标记抗体可加小牛血清白蛋白(终浓度为 5 mg/ml)然后分装 贮于 -20~-30 。

(朱虹光)

## 2.2 组织细胞的处理

### 2.2.1 组织细胞处理的重要性

无论是常规 HE 染色还是免疫组织化学、杂交组织化学染色,组织细胞的恰当处理至关

重要，关系到：①组织细胞的结构和形态能否很好保存。②生物大分子的活性如酶活性或抗原性能否尽可能保存。能否顺利并重复地获得高质量的组织切片（完整而无裂缝，无皱褶，无碎裂；冷冻切片时无冰结晶；染色鲜艳，对比好）。如果组织细胞处理不当，不仅会影响实验的成功，而且即使获得了阳性结果，却无法记录下来形成令人信服的清晰的高质量照片。因此组织细胞处理是免疫组织化学和杂交组织化学是否成功的首要关键。

### 2.2.2 取材

免疫组化用的组织可来自手术切除标本、钳取活检、穿刺活检，也可取自尸体剖验或穿刺，但杂交组化，尤其是检测 mRNA 时，尸检材料常较难取得满意结果。尸体组织最好在死亡后立即取材，否则因自溶抗原将丧失或弥散，核酸分子被降解破坏。在取材时，除取病灶或含待测抗原、目标核酸的部位外，还应取病灶与正常交界处，即所取组织切片中同时应有抗原阳性和阴性区，以形成自身对照。坏死组织不仅抗原和核酸被破坏殆尽，而且会引起很强的非特异着色，故取材时应尽量避开坏死区。另外，取材时组织如受挤压，其边缘部位不但细胞形态发生人为的变形，同样也会加深非特异着色，故操作时须用锋利的刀刃，镊取时动作要轻。经窥镜直接钳取的组织往往会有挤压，观察结果时应有所考虑。

细胞片的制备因所取细胞的来源不同，可采取下列不同的方式：

(1) 组织印片将洁净载玻片轻压于已暴露病灶的新鲜组织切面，细胞即粘附于玻片，晾干后浸入冷丙酮或醋酸-乙醇固定 10 min，自然干燥后染片或于 -20℃ 保存。

(2) 细胞培养片贴壁细胞培养时，置小玻片于培养瓶中，使细胞在小玻片上生长，达适当密度后取出固定，供染色。也可将细胞培养在多格培养片 (slide's chamber) 上，然后同上处理。多格培养可在同一玻片上同时检测多种细胞，既保证了染色条件一致，又能大大节省时间。

(3) 细胞悬液涂片大多数细胞片由细胞悬液制成，其来源包括：①血液、尿液、脑脊液；②体腔积液；③组织穿刺吸取，如骨髓、淋巴结或其他实质性组织；④悬浮培养的细胞或贴壁细胞经消化后形成的悬液。悬液中细胞浓度为  $10^6/\text{ml}$  左右时，可直接涂于载玻片上，但要均匀、不重叠。若浓度过低，可经低速离心沉淀后再涂，反之浓度过高应予适当稀释。涂片的范围应小于 1 cm 直径，以节约试剂。若用细胞离心涂片器 (cytospin) 则涂片效果更好。在制备细胞悬液时，若经反复离心、洗涤，细胞粘性降低，染色时可能发生脱片，必要时载玻片需预涂粘附剂。细胞片制成后同样经干燥、固定、冷藏。

细胞片标本制备时不经过繁复的处理过程，故对细胞表面抗原的保存较好，但如要检测分泌性抗原，细胞应经充分洗涤以除去血液或组织液中抗原粘附所引起的干扰。此外，在显示胞质内抗原时，需预先用皂角苷 (saponin) 等处理，增加细胞膜的通透性，使抗体得以进入。

### 2.2.3 固定

#### 1. 固定的目的和意义

固定的目的是：①抑制细胞内溶酶体酶的释放和活性，防止自溶；抑制组织中细菌的繁殖，防止组织腐败。②使细胞的蛋白质、脂肪、糖等各种成分凝固成不溶性物质，以防物质扩散并维持原有的组织形态结构；固定后的组织对染料有不同的亲和力，染色后可产生不同的折射率，颜色更为清晰鲜明，便于观察。固定剂往往兼有硬化作用，便于以后切片。

#### 2. 固定时须注意的事项

固定时应注意：①新鲜组织尽快取材，越早固定越好。不同的固定剂它们的性能不

一，根据研究目的选用合适的固定剂。固定要充分和彻底，固定液要充足，其与组织的体积比要足够大（最好在 20 倍以上）；固定时间要足够；为了使组织在短时间内获得均匀一致的固定，组织的厚度必须在 5 mm 以内以 2~3 mm 为宜。有时为了很快地使组织得到均匀的固定，可采用整体动物或器官灌流的方法进行预固定。在进行免疫组织化学染色时，为了防止蛋白抗原分子之间过多的交联，固定时间不宜太长。

### 3. 常用固定液的优缺点

(1) 甲醛（福马林 formalin）即市售的甲醛（37%~40%）常用为 10% 的福马林，实际上是 4% 的甲醛溶液。其优点较多，包括组织穿透力强，组织收缩小，脂肪、神经、髓鞘固定较好；也可固定高尔基体和线粒体等；对糖有保护作用；细胞核染色佳；因可使蛋白游离氨基之间发生共价交联，故对低分子的多肽和蛋白也有良好的固定作用；另外就是价格低廉。缺点是甲醛易氧化为甲酸，使溶液变酸，过酸可影响核的染色；固定时间长，组织中可产生甲醛色素影响观察，可使抗原结构（尤其是空间构象）发生变性而影响免疫组化染色。

使用缓冲甲醛（pH 为 7.0）可克服酸性，有利于某些抗原性的保存。应该作为免疫组织化学常规的组织固定剂。

(2) 乙醇（酒精）用于固定时以 80%~95% 的浓度为好。优点：固定兼有硬化和脱水的作用；能很好保存尿酸结晶和糖类；对蛋白有沉淀作用，故对高分子蛋白的固定有良好效果，如浆细胞内的免疫球蛋白。缺点：渗透力不如甲醛；且能溶解脂肪、类脂和色素；核蛋白被乙醇沉淀后能溶于水，故核着色不良，不利于染色体的固定；高浓度乙醇固定组织硬化明显，时间长可使组织变脆；另外乙醇本身是还原剂，易被氧化，不能与铬酸、重铬酸钾、钨酸等混合。由于乙醇有上述众多缺点，已很少单独使用于固定。

(3) A-F 液（乙醇-甲醛液）是由无水乙醇或 95% 乙醇（A）90 ml + 甲醛原液（F）10 ml 配制而成。优点：有固定兼脱水作用，固定后可直接入 95% 乙醇继续脱水。缺点：已在“乙醇”中阐明。

(4) Bouin 液配制方法有两种，一种是用苦味酸饱和水溶液 75 ml + 甲醛原液 25 ml + 冰醋酸 5 ml；另一种是用 80% 乙醇 150 ml + 甲醛原液 60 ml + 冰醋酸 15 ml + 结晶苦味酸 1 g，需要用前配制。其优点是渗透力强，收缩小，染色鲜艳，且不会使组织变硬、变脆。缺点为固定后的组织必须经水或 70%~80% 的乙醇洗涤 12 h 以上，以清除组织块上的黄色，而且配制较繁复，有时须新鲜配制。

(5) Carnoy 液优点是穿透力很强，适合外膜致密的组织，对显示 DNA、RNA 的效果很好，亦适用糖原和尼氏小体的固定，固定后不需水洗，可直接投入 95% 的乙醇进行梯度脱水。氯仿等有机溶剂对人体有害是其缺点。

(6) 以重铬酸钾为主的固定液如 Zenker 液、Helly 液、Müller 液等各有优缺点。Zenker 液固定的组织细胞核、细胞质染色颇为清晰。Helly 液对细胞质固定好，尤其适于显示各种胞质颗粒，对显示胰岛和脑垂体前叶各种细胞有良好效果。Müller 液固定作用缓慢，收缩很小，固定所需时间长。它们共同缺点是，配制繁复，有时需使用有毒物质（如升汞）。

(7) PLP 固定液配制方法见附录。优点：其固定的机制是先由过碘酸氧化糖蛋白的糖基产生醛基，再通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合，使糖之间发生交联，故对保存糖蛋白的抗原性有较好效果。缺点是配制繁复，不经济。

(8) 戊二醛-多聚甲醛缓冲液在 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中加入 0.5%~1% 戊二醛，

可用于免疫电镜组织的固定，也可用于光镜免疫组织化学组织的固定。

(9) 其他 1% 铬酸固定液，配好后应置 4℃ 冰箱可保存 1~2 周，变色后则不可再用。多用于电镜材料的固定。丙酮常用于冷冻切片或细胞涂片的后固定，保存抗原较好，用前在 4℃ 冰箱预冷，切片在冷丙酮中只需固定 5~10 min。AAA 液（无水乙醇 85 ml + 冰醋酸 5 ml + 甲醛原液 10 ml）及乙醇冰醋酸固定液（无水乙醇 95 ml + 冰醋酸 5 ml）多用于冷冻切片后固定。

#### 5. 常见抗原所选择的组织细胞处理方法

细胞表面抗原一般可选择固定或不固定，然后进行冷冻切片。神经多肽、胺类、酶等可采用甲醛或多聚甲醛固定，冷冻切片。细胞内水溶性抗原应先冷冻切片，后经冷冻干燥，甲醛蒸气固定，再作免疫组化染色。内分泌多肽常用 Bouin 液固定，石蜡切片即可获满意结果。免疫球蛋白类可用甲醛或 Zenker 液固定，冷冻切片或石蜡切片则根据所用抗体而定。肽类激素和肿瘤胚胎抗原均可用 Bouin 液固定，石蜡切片。一些细胞外抗原最好采用冷冻切片，乙醇、丙酮固定。如要进行免疫电镜研究，则以戊二醛-多聚甲醛缓冲液作前固定。

以上固定剂的选择仅供参考，针对不同的研究对象，应在预实验时摸索出最佳的固定和切片方案。如进行肝组织 AFP 免疫组织化学染色时，丙酮-甲醛固定石蜡包埋的切片能较好保存 AFP 的抗原性 阳性染色强 几乎没有背景染色 其次是 PLP 固定液和苦味酸-多聚甲醛固定液。

### 2.2.4 脱水

#### 1. 脱水的目的

因水不能与石蜡相混合，故石蜡包埋前必须脱去组织块中的水分。使用不同浓度的脱水剂（常用乙醇）逐步将组织中的水分置换出来，这一过程称为组织脱水。

#### 2. 常用脱水剂

有乙醇、丙酮、正丁醇、叔丁醇、环己酮等。常用乙醇 因为其脱水能力强 可与水按不同比例混合，与透明剂二甲苯互溶。

#### 3. 脱水的注意事项

(1) 由低浓度到高浓度，一般从 70% 乙醇开始，如组织含水多，则从更低的浓度开始（如 30%~40% 的乙醇）。以防止组织收缩过快变脆。

(2) 脱水时间要适当 时间短 脱水不彻底 透明及浸蜡受影响 切片难切 质量差 染色效果也差；时间过长，组织会收缩变硬变脆。各级乙醇最长不要超过 12 h 无水乙醇不要超过 4 h。如中途因故不能进行下去，应将标本退回至 80% 乙醇保存。脱水时间因根据组织块大小、厚薄以及不同的组织作适当调整。如脂肪组织、疏松的纤维组织可适当增加脱水时间；而胃粘膜、支气管粘膜活检组织应适当缩短脱水时间。因此脱水掌握得好坏是影响制片质量的重要环节之一。

(3) 为保证脱水彻底，最后两次无水乙醇必须保持无水，故各级乙醇应定时更换，一般两周更换一次，可根据处理的标本量灵活掌握；同时在水酒精中放置无水硫酸铜吸水。

#### 4. 脱水的步骤和时间（见附录 I. 二）

在免疫组织化学染色时，脱水和透明等过程可尽量在较低温度下进行，以减少抗原损失，如能用低熔点石蜡 48~52℃ 保存抗原 效果会更好。

为了进一步缩短固定、脱水、包埋的时间 尽可能保存组织的抗原性 提高免疫组化染色的阳性结果,组织块应尽量修得小一些、薄一些,使组织能在较短的时间内充分地完成固定、脱水、透明和浸蜡。

### 2.2.5 包埋

包埋的目的是使组织块保持一定的形状和硬度,以便在切片机上切成薄片。常用的有石蜡包埋和冷冻包埋两种方法。

#### 1. 石蜡包埋

组织脱水后,因为酒精等脱水剂不能溶解石蜡,所以在浸蜡前需要一个既能与酒精混合又能溶解石蜡的媒剂进行处理,以便能使石蜡渗入到组织中。由于所用媒剂的折光率与组织蛋白质的折光率相近,可使组织透明,因此把这一过程称之为透明。透明之后浸蜡,然后进行包埋,包埋时应把欲观察的一面朝下。

#### 2. 冷冻包埋

冷冻包埋能较好地保存抗原,新鲜及已固定材料均适合于冷冻包埋、切片。为了防止冷冻过程中产生的冰结晶破坏组织细胞结构并使抗原扩散,可采取以下方法来减少或阻止冰结晶的产生:①预处理:目的是减少组织中的水分以减少冰结晶的产生,方法是将已固定、冲洗的组织块放入 20%~30%蔗糖缓冲液内,4℃冰箱过夜,再将组织块埋于 OCT 包埋剂或甲基纤维素内,以备速冻,但实际操作时可不一定经过蔗糖缓冲液预脱水。②速冻:目的是使温度很快下降迅速通过冰点,防止冰结晶产生。可采用液氮法:将 OCT 包埋的组织块投入液氮数秒,等组织块冻结后,立即移入低温冰箱(装入封口塑料袋内密封)或放入恒冷切片机恒冷室内以备切片。也可采用干冰-丙酮法:将 200 ml 丙酮注入小型广口保温瓶或保温杯内,逐渐加入干冰至饱和不再冒泡为止,温度可达 -70℃ 将装有 50 ml 异戊烷的小烧杯缓慢置入干冰-丙酮饱和液中;然后将 OCT 包埋的组织块投入异戊烷内速冻半分钟至一分钟。

### 2.2.6 切片

供免疫组化用的石蜡切片应注意以下几点:

(1)切片要求平整切片时尽量避免因切片刀的缺口造成组织破损或划痕,影响形态完整,出现非特异着色。

(2)获得不间断的连续切片不间断的连续切片便于在相邻切片上作不同染色(包括常规 HE 染色)供观察时对照、比较。

(3)切片附贴需牢固免疫组化染色常需长时间、反复多次浸泡于试剂以及振荡洗涤,有的尚须经蛋白酶消化,容易造成切片漂浮、脱落。以下措施可防止脱片:①载玻片须经仔细清洗(清洗液浸泡、流水漂洗、烘干)绝无油污;②附贴切片前,在洁净载玻片上涂抹粘附剂,后者可选用白胶、多聚赖氨酸或氨丙基三乙氧基硅烷(具体方法见附录 I.十);③石蜡片在温水中充分展开,去除皱折,然后以已经粘附剂预处理过的载玻片捞取、附贴;④载有切片的玻片经 56℃ 1h 后 37℃ 过夜彻底烘片;⑤备用的切片可装在盒中 4℃ 冰箱保存,如需长期保存,切片宜用铝箔包裹后进冰箱,染色前取出再经 37℃ 烘过夜。

供免疫组化用的冷冻切片同样要求附贴平整,并有连续性。为此载玻片也应清洁无油污,但一般无需涂抹粘附剂。切片时,使用恒温冷冻切片机,箱内温度 -25℃ 防卷板角度恰当的情况下,可获得满意的切片。若使用开放式冷冻切片机则往往受气温、操作熟练程度