

一种改良的 BrdU 免疫组织化学染色抗原热修复技术 *

黄菊芳¹ 刘 晨¹ 王 慧¹ 蒋丽珠^{2△}

(1 中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013 ;

2 大理学院临床医学院神经精神教研室 云南 大理 671000)

摘要 目的 探索一种简单有效的行 BrdU 免疫组织化学染色抗原热修复的方法。方法 :本实验探索了三种抗原热修复方法 :1)漂片煮沸法 2)贴片煮沸法 3)贴片改良法。将贴有冰冻组织切片的玻片置于恒温封闭体系中进行热修复。之后行 BrdU 免疫组化染色 ,采集图像对这三种热修复方法进行比较。针对贴片改良法行 BrdU 与 NeuN、p-CERB 和 DCX 的荧光双标 ,采集图像以观察该方法在免疫荧光双标实验中应用的可行性。结果 :1)漂片煮沸法 脑组织切片在经过热修复处理后 ,切片卷起皱缩 ,不能进行后续实验步骤 2)贴片煮沸法 可见少量 BrdU 阳性细胞 ,但背景深 ,且少数脑片起泡 ,假阳性现象严重 3)贴片改良法 BrdU 免疫组化及与 NeuN、p-CERB 和 DCX 的免疫荧光双标染色背景浅 ,阳性细胞明显。结论 :采用改良的热修复法能充分暴露 BrdU 抗原 ,DAB 显色及免疫荧光染色结果理想 ,此方法为一种较好的行 BrdU 免疫组织化学染色抗原热修复方法。

关键词 BrdU ;免疫组化 ;抗原热修复

中图分类号 R614 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1972-03

Construction of Three-dimensional Bilingual Teaching Resources in Systematic Anatomy*

HUANG Ju-fang¹, LIU Chen¹, WANG Hui¹, JIANG Li-zhu^{2△}

(1 Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013,

2 Department of Neuropsychopathy, Clinical Medical School, Dali University, Dali 671000)

ABSTRACT Objective: To study a convenient and effective technique for heat induced antigen retrieval in BrdU immunohistochemical staining. **Methods:** We explored three heat induced antigen retrieval methods in this experiments: 1) Boiled floating sections method; 2) Boiled patches method; 3) Improved patches method. Put the glass slides posted with frozen sections into a kind of thermostatic and closed device we designed for antigen retrieval. Then we did the BrdU immunohistochemical staining. Pictures were collected to compare the three heat induced antigen retrieval methods. And we did the BrdU immunofluorescent co-labelling with NeuN, p-CERB, DCX and collect pictures to find out whether the improved patches method could be used in BrdU immunofluorescent staining. **Results:** 1) Boiled floating sections method. The frozen sections were too shrunken to be used in the following steps after retrieved the antigen in this way. 2) Boiled patches method. Several BrdU labeled neural stem cells could be confirmed, but the background was too dark. And some of the patches blistered, then a great deal of false positive cells were found in the blistered areas. 3) Improved patches method. The positive products of BrdU immunohistochemistry and immunofluorescent co-labeling with NeuN, p-CERB, DCX were distinct and the background was controlled well. **Conclusion:** Our antigen retrieval technique could fully expose the BrdU antigen , the DAB staining and immunohistochemical staining was controlled well. Therefore, it is an improved technique of antigen retrieval in BrdU immunohistochemical staining.

Key words: BrdU; Immunohistochemistry; Heat Induced Antigen Retrieval

Chinese Library Classification(CLC): R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)10-1972-03

前言

BrdU(5'-bromo-2'-deoxyuridine)为胸腺嘧啶脱氧核苷的类似物 ,在细胞周期的 S 期 DNA 合成时可整合到细胞核中 ,

是揭示在体脑神经干细胞增殖能力的一个可靠标记物 ,目前已被广泛用于神经干细胞领域的研究^[1,2]。其中 BrdU 的免疫组织化学染色是研究神经干细胞增殖规律的重要形态学指标。由于实验要求 ,动物组织在取材过程中多采用福尔马林进行灌注固

* 基金项目 湖南省自然科学基金(No 08JJ5042) ,国家自然科学基金(No 30860089)

作者简介 黄菊芳(1965-) ,女 ,博士 ,教授 ,主要研究方向 条件恐惧记忆的神经生物学机制 ,

E-mail: huangjufang@mail.csu.edu.cn

△通讯作者 蒋丽珠 E-mail: jianglizhu97@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-03-05 接受日期 2011-03-30)

定,因此,在进行 BrdU 免疫组织化学染色之前要进行抗原修复。自 Gratzner 报道使用 BrdU 多克隆抗体标记干细胞以来^[3], BrdU 免疫组织化学染色多采用胰酶消化的方法行抗原修复,但该方法存在阳性标记分辨率低,操作步骤繁琐等缺点^[4]。近年来许多研究者已经着手开发新的神经干细胞标记物,如 ethynyl deoxyuridine (EdU)等^[5],但鉴于 BrdU 标记法在神经干细胞研究领域的公认性,也有研究致力于探索更为简单有效的 BrdU 免疫组织化学染色抗原修复方法,如热修复法等^[6]。在本研究中,我们根据常规生物学实验室均具备的条件,探索了一种改良的 BrdU 免疫组织化学染色抗原热修复技术,观察成年大鼠海马齿状回神经干细胞的增殖的情况,以期获得优化的实验资料,为进一步研究新生神经细胞打下基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和实验动物

BrdU、BrdU 单克隆抗体(来源于小鼠)均购自于 Sigma 公司,抗小鼠 IgG 以及生物素结合的 ABC 复合物均购自 Vector 公司,BrdU 多克隆抗体(来源于大鼠)、p-CREB 单克隆抗体(来源于兔)、DCX 单克隆抗体(来源于兔)均购自 abcam 公司,NeuN 单克隆抗体(来源于兔)和山羊抗兔 CY3 荧光二抗均购自 Millpore 公司,山羊抗大鼠 488 荧光二抗购自 Jackson 公司,实验动物为成年健康 SD 雄性大鼠 12 只(体质量 200~250 g)购自湖南农业大学实验动物学部。

1.2 注射 BrdU

成年大鼠腹腔注射 BrdU(Sigma,每公斤体重 200 mg,每 12 h 一次,共注射二次)标记增殖的神经干细胞,此后继续饲养动物 10 d,让 BrdU 充分地整合到神经干细胞的细胞核内^[7],然后灌注取材。

1.3 组织制备

将实验动物用 10%水合氯醛麻醉后,用 4%多聚甲醛经左心室灌注固定,取脑并将脑组织置于相同固定液中后固定,4℃冰箱过夜,用梯度蔗糖浸泡沉底,-20℃三顿恒低温切片机制片,片厚 40μm。留取含海马的切片备用。

每只动物脑组织从距前囟 -3.48~-4.20 mm 每隔 6 张选取一张切片,取 6 张海马齿状回结构完整的脑片,并保证每只动物所观察的部位大体接近,用于 BrdU 免疫组织化学染色。

1.4 热修复抗原

将得到的 12 只实验动物的脑片分成 A、B、C 三组,每组 4 只,采用三种不同的方法行抗原热修复。

1.4.1 漂片煮沸法 取 A 组动物的脑组织冰冻切片用 0.01 mol/L 的 PBS 清洗后(下同),置于盛有煮沸的 0.01 M 枸橼酸钠溶液(pH 值 6.00)的烧杯中热修复 30 min。

1.4.2 贴片煮沸法 取 B 组动物的脑组织冰冻切片清洗后,贴片于阳离子玻片(购于三顿公司)上,干片过夜后复水 15 min,插片于玻片架上,置于盛有煮沸的 0.01 M 枸橼酸钠溶液(pH 值 6.00)的烧杯中热修复 30 min(修复过程中用电炉持续加热)。

1.4.3 贴片改良法 取脑组织冰冻切片清洗后,贴片于阳离子玻片(购于三顿公司)上,干片过夜后复水 15 min,将玻片放入

盛有预热至 95℃的 0.01 M 枸橼酸钠溶液(pH 值 6.00)的 50 ml 离心管中,拧好瓶盖,在恒温水浴锅中行沸水浴热修复 30 min。

1.5 免疫组织化学 DAB 染色

自然冷却至室温并清洗后,置于 37℃的 2 N 盐酸中 30 min(为使核变性),清洗后用 3%双氧水溶液处理 15 min,以去除内源性过氧化物酶,用 5%的 BSA 室温下封闭 1 h,按 ABC 法行免疫组织化学染色。一抗为小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Sigma,1:1000),室温过夜,二抗为生物素化兔抗小鼠 IgG(Vector,1:200),37℃孵育 2 h,ABC 复合物(Vector,1:200)37℃孵育 1 h,0.05%的氯化镍加强染色,在 0.05% DAB(Sigma)和 0.03% H₂O₂ 反应液中显色。清洗后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.6 免疫荧光双标染色

采用贴片贴片改良法行抗原热修复后,自然冷却至室温并清洗,然后置于 37℃的 2 N 盐酸中 30 min(为使核变性),清洗后用 5%的 BSA 室温下封闭 1 h,按两步法行 BrdU 与 NeuN, p-CREB 和 DCX 的免疫荧光双标实验^[8],一抗为大鼠抗 BrdU 多克隆抗体(abcam,1:500),兔抗 NeuN 单克隆抗体(Millpore,1:500),兔抗 p-CREB 单克隆抗体(abcam,1:750)和兔抗 DCX 单克隆抗体(abcam,1:300),4℃孵育 48 h,荧光二抗为山羊抗大鼠 488(Jackson,1:500)和山羊抗兔 CY3(Millpore,1:600),37℃孵育 2 h,清洗后用 50%甘油封片。

1.7 图像采集

每张免疫组织化学 DAB 染色的切片采用 Nikon Coolpix950 数码相机在 Motic 显微镜 10 倍物镜下定位齿状回,20 倍物镜下摄片。每张免疫荧光双标的切片采用 Nikon 共聚焦荧光显微镜在 10 倍物镜下定位齿状回,20 倍物镜下摄片。

2 结果

采用漂片煮沸法进行抗原热修复后,脑组织切片卷起皱缩,无法展平,不能进行后续实验步骤。

采用贴片煮沸法进行抗原热修复后,经 DAB 显色海马齿状回可见少量的阳性细胞,但由于背景太深,大部分疑似的阳性细胞无法确定。且经过热修复处理后有少数脑片起泡,起泡部位周围在显色后假阳性现象严重,即被标记的细胞呈弥散样大量分布,且细胞呈现致密的黑色标记,不见 BrdU 阳性细胞特有的点状标记(图 1A)。以 PBS 替代一抗的阴性对照反应均为阴性(图 1B)。

采用贴片改良法进行抗原热修复后,经 DAB 显色 BrdU 免疫反应产物定位于细胞核,位于海马齿状回的所有细胞核的形态均相似,呈圆形或椭圆形,背景较浅,点状阳性标记明显,组织贴片无起泡现象(图 1C)。以 PBS 替代一抗的阴性对照反应均为阴性(图 1D)。

从图 2 可知,采用贴片改良法进行抗原热修复后,行 BrdU 与 NeuN, p-CREB 和 DCX 的免疫荧光双标实验发现,Brdu 阳性标记定位明确,其它与之双标的标记物亦可正常显色,未受该法热修复过程的影响。

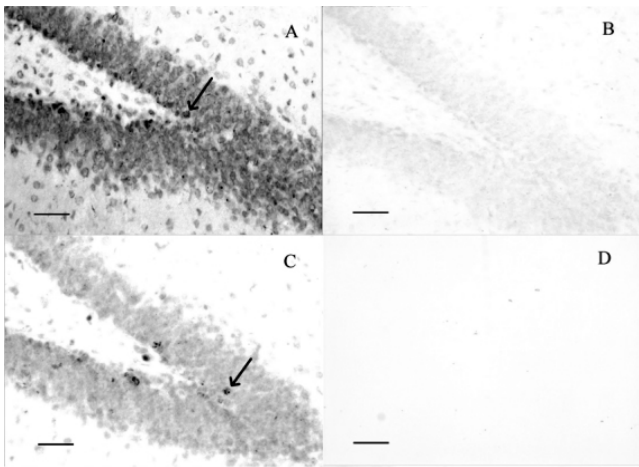


图 1 A.贴片煮沸法组 BrdU 阳性细胞。B. 贴片煮沸法组阴性对照。C. 贴片改良法组 BrdU 阳性细胞。D. 贴片改良法组阴性对照。(箭头所指处为 BrdU 阳性细胞 ,Bar=50 μ m)

Fig. 1 A. BrdU positive cells in the boiled patches method group. B. Negative control of the boiled patches method group. C. BrdU positive cells in the improved patches method group. D. Negative control of the improved patches method group.(Arrow towards to the BrdU positive cell, Bar=50 μ m)

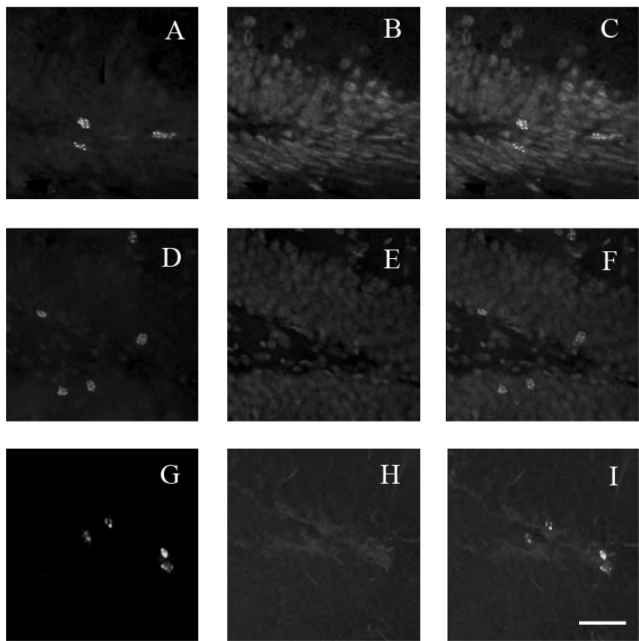


图 2 采用贴片改良法热修复抗原后 BrdU 与其它标记物行免疫荧光双标染色的实验结果。A~C 为 BrdU 与 NeuN 双标结果 ,D~F 为 BrdU 与 p-CREB 双标结果 ,G~I 为 BrdU 与 DCX 双标结果。(绿色为 BrdU 红色为与之双标的指标 ,Bar=50 μ m)

Fig. 2 The immunofluorescent results of co-labeling BrdU and other markers after retrieved the antigen with the improved patches method. A~C indicated the results of co-labeling BrdU and NeuN; D~F indicated the results of co-labeling BrdU and p-CREB; G~I indicated the results of co-labeling BrdU and DCX. (The green ones are BrdU, the red ones are other markers co-labeled with BrdU, Bar=50 μ m)

3 讨论

免疫组化技术作为形态学技术的基础已经成为大家的共

识 ,但大多数抗体只适用新鲜组织切片或未固定的冰冻组织切片 ,因为采用常规的福尔马林固定组织后 ,许多抗原决定簇被醛基交联封闭 ,以至于无法和抗体结合^[9]。因此 ,必须进行抗原修复。

目前 ,抗原修复的方法主要有蛋白酶消化法、硼氢化钠 (NaBH₄)修复法和热修复法^[10]。蛋白酶消化法和硼氢化钠修复法是以化学的方式使醛基断裂 ,暴露抗原决定簇 ,所用的蛋白酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶等。一般来说 ,胰蛋白酶的消化能力较胃蛋白酶弱 ,主要用于细胞内抗原的修复 ,胃蛋白酶主要用于细胞间抗原的修复。国外文献报道行 BrdU 免疫组织化学染色多采用胰酶消化 ,但是 ,用胰酶消化后组织易破烂 ,容易造成染色结果不均一^[4]。热修复法是在高温条件下 ,通过抗原修复液中的离子与蛋白质相互作用充分暴露抗原决定簇 ,同时 ,当用 ABC 法进行免疫组织化学检测时 ,内源性生物素是导致假阳性结果出现的主要原因之一 ,而生物素是一类对高温比较敏感的物质 ,利用高温可部分或完全灭活其活性^[11]。因此 ,综合以上因素 ,热修复法是值得探索的 BrdU 免疫组化抗原修复方法。

根据热修复法中加热手段的不同 ,常将其分成微波修复法 ,电炉加热法等^[12] ,这些方法的共同点是组织切片直接接触煮沸的修复液 ,我们在实验中发现这种单纯的煮沸热修复法虽然操作简单 ,但由于切片厚度较薄 ,在热修复过程中卷起皱缩 ,无法展平 ,不能进行后续实验 ,所以只能将组织切片贴附在玻片载体上行热修复。而如果将贴有组织切片的玻片直接放入开放体系 (煮沸的修复液)中进行抗原热修复时 ,容易产生较深的背景 ,假阳性现象严重 ,不利于阳性细胞的判别 ,这可能是由于沸腾的修复液热对流现象明显 ,难以保证温度均一 ,且在煮沸过程中产生的大量气泡可能会造成组织掉片或起泡等现象 ,不利于后续实验的进行。因此 ,我们通过摸索 ,利用实验室中最常规的资源 ,设计了以上所述的改良方法 ,该方法为抗原热修复提供了一个恒温密闭的体系 ,避免了单纯的煮沸法难以保证温度均一恒定的弊端 ,实验证明该方法能充分修复 BrdU 抗原 ,对组织没有破坏作用 ,DAB 染色结果较单纯的煮沸法好 ,背景控制适当 ,且不影响 BrdU 与其它抗体的免疫荧光双标染色 ,对实验室条件要求低 ,简单易行 ,是一种较好的行 BrdU 免疫组织化学染色抗原热修复的方法。

参考文献 (References)

[1] Higuchi Y, Hattori H, Kume T, et al. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine[J]. Eur J Pharmacol, 1998, 342 (1) : 47-49

[2] Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells , but the dentate gyrus contains restricted progenitors [J]. J Neurosci, 2002, 22 (5) : 1784-1793

[3] Gratzner HG . Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication [J]. Science, 1982, 218(4571): 474-475

[4] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation [J]. Brain Res Rev, 2007, 53(1): 198- 214

(下转第 1968 页)

参考文献(References)

- [1] 李轶梅,李劲,吴晓玲. LEEP 治疗宫颈上皮内瘤变 133 例疗效及其预后影响因素分析[J]. 现代妇产科进展, 2008, 17(4): 298-301.
Li Yi-mei, Li Jing, Wu Xiao-ling, et al. LEEP treatment of cervical intraepithelial neoplasia, 133 cases of analysis of efficacy and prognostic factors. Advances in modern obstetrics and gynecology, 2008, 17(4): 298-301
- [2] 郎景和. 宫颈上皮内瘤变的诊断和治疗 [J]. 中华妇产科学杂志, 2001, 36 (5): 262
Lang Jing-he. Cervical intraepithelial neoplasia diagnosis and treatment. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology. 2001, 36 (5): 262
- [3] Evan S. Glazer, Steven A. Curley. The Ongoing History of Thermal Therapy for Cancer [J]. Surgical Oncology Clinics of North America, 2010, 20(2): 229-235
- [4] Fambrini M, Penna C, Fallani MG, et al. Management of cervical intraepithelial neoplasia: the role of biopsy [J]. Inter J Gynecol Obstet. 2003, 82(2): 219-220
- [5] 吕卫国, 沈源明, 叶枫等. 阴道镜直视下活检诊断宫颈上皮内瘤变准确性的评价[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(5): 303-306
Lu Wei-guo, Shen Yuan-ming, Ye Feng, et al. Colposcopy under direct vision biopsy accuracy of cervical intraepithelial neoplasia assessment [J]. Chinese Medical Journal, 2006, 86(5): 303-306
- [6] 闫贵贞, 高玉洁. 阴道镜在诊断宫颈病变中的临床价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(1): 53-54
Yan Gui-zhen, Gao Yu-jie. Colposcopy in the diagnosis of cervical lesions in the clinical value of [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006, 22 (1) : 53-54
- [7] 宋华, 陈英娟, 冯宁等. TCT 和 LEEP 环切电刀在诊治宫颈疾病中的应用[J]. 中国妇幼保健 2008 23(31): 4484-4485
Song Hua, Chen Ying-juan, Feng Ning et al. TCT and LEEP circumcise electric knife in the treatment of cervical diseases [J]. China's Maternal and Child Health 2008, 23 (31) : 4484-4485
- [8] Fambrini M, Penna C, Fallani MG, et al. Management of cervical intraepithelial neoplasia: the role of biopsy [J]. Inter J Gynecol Obstet. 2003, 82(2): 219-220
- [9] 沈铿, 郎景和, 黄惠芳等. 宫颈锥切术在宫颈上皮内瘤变诊断和治疗中的价值[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36(5): 264-266
Shen Keng, Lang Jing-He, Huang Hui-Fang, et al. Cervical conization in cervical intraepithelial neoplasia diagnosis and treatment of the value of [J]. Journal of Obstetrics and Gynecology, 2001, 36 (5) : 264-266
- [10] Das SS, Elias AH. Diagnosis and treatment of cervical intraepithelial neoplasia in a single visit [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2006, 38(3): 246-250
- [11] Emam M, Elnasar A, Shalen H, Barakat R. Evaluation of a single-step diagnosis and treatment of premalignant cervical lesions by LEEP [J]. Int J Gynaecol Obstet. 2009, 107(3): 224-227
- [12] Noehr B, Jensen A, Kjaer SK. Depth of cervical cone removal by loop electrosurgical excision procedure and subsequent risk of preterm delivery [J]. Obstet Gynecol. 2009, 114(6): 1232-1238
- [13] 赵丽芬, 朱晓华, 武晓敏等. 宫颈环型电刀切除术治疗 212 例宫颈上皮内瘤变价值探讨[J]. 实用妇产科杂志, 2006, 22(8): 481-483
Zhao Li-hua, Zhu Xiaohua, Wu Xiaomin, et al. Cervical loop electrosurgical excision procedure treatment of 212 cases of cervical intraepithelial neoplasia value of [J]. Practical Obstetrics and Gynecology, 2006, 22 (8) : 481-483
- [14] Darwish A, Gadallah H. One-step management of cervical lesions [J]. Int J Gynaecol Obstet, 1998, 61(3): 261-701
- [15] Komsun Suwannarurk, Sutapit Bhamarapavati, Yuthadej Thaweekul, et al. The accuracy of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia diagnosis with loop electrosurgical excisional procedure under colposcopic vision [J]. J Gynecol Oncol. 2009, 20(1): 35-38
- [16] Mohamed Emam, Aboubakr Elnashar, Hesham Shalan and Rafik Barakat. Evaluation of a single-step diagnosis and treatment of premalignant cervical lesion by LEEP [J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2009, 107(3): 224-227

(上接第 1874 页)

- [5] Chehrehasa F, Meedeniya AC, Dwyer P, et al. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system [J]. J Neurosci Methods, 2009, 177(1): 122-130
- [6] Tang X, Falls DL, Li X, et al. Antigen-retrieval procedure for bromodeoxyuridine immunolabeling with concurrent labeling of nuclear DNA and antigens damaged by HCl pretreatment [J]. J Neurosci, 2007, 27 (22): 5837-5844
- [7] Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, et al. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory [J]. Neurosci, 2005, 130: 843-852
- [8] Sauerzweig S, Baldauf K, Braun H, et al. Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker [J]. J Neurosci Methods. 2009, 177(1): 149-159
- [9] 王伯云, 主编. 病理学技术 [M]. 人民卫生出版社, 2001: 368
Wang Buo-yun. Pathology Technology [M]. People's Medical Publishing House, 2001: 368
- [10] 郑晖, 蒋海鹰, 颜亚晖. 浅谈常规病理制片及免疫组化染色的质控问题[J]. 诊断病理学杂志, 2003; 10(2): 119-120
Zhen Hui, Jiang Hai-ying, Yan Ya-hui. Discussion about the quality control problems of conventional section preparation and immunohistochemistry [J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2003; 10 (2): 119-120
- [11] Cooper K, Hafajee Z, Taylor L. Comparative analysis of biotin intranuclear inclusions of gestational endometrium using the APAAP, ABC and the PAP immunodetection systems. J Clin Pathol, 1997, 50: 153-156
- [12] 纪小龙, 主编. 新编免疫组织化学 [M]. 人民军医出版社, 2005: 19
Ji Xiao-long. New Immunohistochemistry [M]. People's Military Medical Press, 2005: 19