

免疫电镜操作步骤

免疫电镜技术的操作程序分为抗体的制备, 标本的处理, 免疫标记, 对照实验、结果的观察和解析五部分。

1. 抗体的制备:

特异性高、亲和力强的高效价抗体是获得理想的免疫标记结果的首要条件。抗体可购买或自己制备。大分子完全抗原, 可直接免疫动物如家兔、山羊、豚鼠、小鼠来获得抗体。半抗原, 用偶联剂使半抗原与大分子物质结合成复合物, 再去免疫动物产生抗体, 大分子物质称为载体蛋白, 以甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白或血蓝蛋白最为常用。偶联剂为戊二醛或碳二酰亚胺等。目前细胞杂交瘤技术制备的单克隆抗体最为理想。

2. 标本的处理

A 为了既能将抗原准确定位甚至定量, 又能观察到近似于生活状态下的细胞超微结构, 必须选择合适的固定剂, 慎重处理样品。

1) 单细胞: 培养细胞或血细胞应随用随取。悬浮培养细胞可先离心 (800 rpm, 5 min), 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗 1 次后进行固定。贴壁细胞则可先将其培养在玻片上, 用 PBS 轻轻冲洗后立即固定, 也可用胰酶将细胞消化下来, 按悬浮培养细胞的制备方法制备。

2) 组织: 取组织块时做到越快越好, 最好在停止血流前就取材。若观察的对象为肺、大脑、脊髓或内分泌器官等比较柔软的组织, 应先做灌注固定, 再用锐利的刀片将其切成约 2 mm×2 mm×1 mm 大小的组织块, 切时要避免挤压与牵拉, 然后投入到固定液中继续固定。

3) 固定: 固定剂常会对抗原的活性产生不同程度影响, 为了保存细胞的超微结构和抗原的活性, 应通过预试验, 确定固定剂的种类、浓度、温度、pH 及固定时间和方式, 可用已知效价的抗原进行试验, 选择合适的固定方法。

B 以下是常用的免疫电镜标本固定液的类型

(1) 多聚甲醛-戊二醛固定液 (简称 PG): 1% 多聚甲醛对组织细胞的抗原性影响不大, 若加入超过 0.1% 戊二醛, 抗原性就会迅速减弱; 当戊二醛的浓度低到 0.01%~0.05% 时, 对抗原性的影响便不显著, 而细胞超微结构的保存也可获得很大改善。所以推荐用 1% 多聚甲醛加 0.01%~0.05% 戊二醛作为免疫电镜标本的固定剂, 固定时间为 4~5 h。对有些抗原性较强的标本, 也可采用 4% 多聚甲醛加 0.05%~0.5% 戊二醛进行固定。某些抗原对戊二醛极

其敏感，固定液只能用 2~4%多聚甲醛，而不能加戊二醛。不充分的固定会造成抗原提取或移位，同时醛类等交联固定剂会改变蛋白质分子的结构而影响其抗原性，所以在不明显影响抗原性的前提下，选择合适的固定浓度和时间，尽可能强一些为好。

(2) 过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛混合固定液（简称 PLP）：PLP 液含 0.01 mol/L 过碘酸钠、0.075mol/L 赖氨酸、2%多聚甲醛及 0.037mol/L 磷酸缓冲液。其机制是借助过碘酸盐氧化抗原，一般为糖蛋白的糖类部分，使其羟基变为醛基，这样赖氨酸的双价氨基就能与醛基结合从而把抗原交联起来。由于大多数组织抗原含蛋白质与糖类，抗原决定簇位于蛋白部分，该固定剂有选择性地固定糖类，这样既稳定了抗原，又不影响抗原决定簇与抗体的结合。加入低浓度的多聚甲醛则能稳定蛋白与脂类。因为赖氨酸价格较贵，此固定液不如 PG 固定液经济。

(3) 苦味酸-多聚甲醛-戊二醛固定液（简称 PAPG）：PAPG 液含 4%多聚甲醛、15%（V/V）苦味酸、0.5%戊二醛、pH 为 7.3。苦味酸穿透迅速，可在不影响抗原活性的前提下固定蛋白质，改善对膜和胞质的保存。特别是不能采用高浓度的戊二醛与钨酸做后固定时（如包埋后的免疫标记），在前固定液中加入苦味酸对超微结构的保存有很大帮助。

C 固定方法与时间

1) 灌注固定：这是固定效果最好的方式，能使超微结构得到很好的保存。以大鼠为例，麻醉后，用注射针头经左心室向主动脉灌注固定液，静脉压为 120mm Hg 柱，在 5~15 min 内每 200g 体重灌注 150 ml 固定液。

2) 浸没固定：将手术或灌注后切成的标本块浸没在固定液中固定，浸没固定时间常为 2~5h，游离细胞固定 0.5~1h。

3) 包埋，包埋剂类型：环氧树脂包埋剂和低温包埋剂。

1) 包埋前免疫标记

即对已固定的样品先进行免疫标记，然后进行包埋、超薄切片并观察结果，一般选用环氧树脂包埋剂。环氧树脂本质是疏水性的，在包埋前样品必须先进行完全脱水，然后在温箱中进行热聚合。热聚合会使大多数抗原变性，因此该包埋剂不适用于包埋后免疫标记。

2) 包埋后免疫标记

指组织标本经固定及树脂包埋，制作成超薄切片后再进行免疫化学标记的方法，此方法多用低温包埋剂，如 Lowicryl 系列包埋剂、LR White 包埋剂和 LRGold 包埋剂。这三种包

埋剂均能在低温下 (-35℃~-80℃) 用紫外光 (波长 315~360nm) 进行聚合, 避免了高温对抗原性的负面影响, 提高了阳性标记率, 而且对胶体金的非特异性吸附少, 对温度敏感的抗原应选择使用低温包埋剂。

3. 免疫标记

根据免疫标记与标本包埋之间的不同关系, 可分为包埋前免疫标记、包埋后免疫标记和不用包埋的冷冻超薄切片免疫标记。根据具体的标本、抗原的部位及性质并结合实验室的具体条件选择恰当的方法。这三种免疫标记方法, 都包括非特异性位点的封闭、抗体与抗原特异性结合的免疫反应、反应部位的示踪显示等基本步骤。

1) 包埋前免疫标记

优点一是切片在免疫标记前不经锇酸固定、脱水、树脂包埋及高温聚合的过程, 抗原活性不会受到上述过程的影响, 而且抗原暴露充分, 标记的阳性率高, 非特异性反应少。

优点二是免疫标记后还可进行半薄切片, 在免疫反应阳性部位做定位超薄切片, 进一步提高电镜的检出率。

优点三是免疫标记完毕后, 用戊二醛与锇酸再次固定组织, 可使抗原抗体的结合更加牢固, 并有利于膜结构的保存。

包埋前免疫标记主要用于细胞膜表面抗原的免疫定位, 以及用于某些易被脱水剂和树脂成分溶解和变性的抗原的检测。包埋前免疫标记细胞内抗原受到标记抗体的穿透性限制, 为了提高对细胞内抗原的标记率可以采取以下措施:

(1) 厚切片

厚切片进行包埋前免疫标记, 需将固定后的组织厚切片 (单细胞团不需厚切片), 以利于标记抗体的穿透。厚切片的方法有以下几种:

1) 冰冻切片

用恒冷箱冰冻切片机将固定后的组织块切成 8 μm 左右的厚片。将切下的厚片放入盛有 PBS 的小玻璃瓶内备用。也有的将厚片直接贴在载玻片上进行免疫标记, 这样做虽然操作比较方便, 但因抗体只能与厚片的一面接触, 所以会在一定程度上影响标记的阳性率。

2) 振动切片

振动切片可以切出 20 μm~30 μm 的厚片, 免疫电镜用只需 20 μm~80 μm 的切片。振动切片的优点是可以避免冰冻对组织带来的损害, 但它切出来的切片过厚, 即使在使用穿

透剂条件下, 免疫试剂也仅能穿透切片表面 $8\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m}$, 而更深层的组织就不易被标记。

(2) 增加细胞膜的通透性

用 0.01% Saponin 或 0.1% Triton X-100 等活性剂处理 5~8min, 以增加细胞膜的通透性。但这些化学物质会对超微结构产生一定程度的破坏, 所以应根据不同的组织或细胞, 严格控制活性剂的应用浓度与时间。也可用冻融的方法增加细胞膜通透性, 标本先进行防冰晶处理 (厚片在含 15% 甘油、20% 蔗糖的 PBS 中振摇沉底), 在液氮中速冻 0.5~1min 后用 PBS 迅速回温。

(3) 选用相对分子质量较小的标记物

辣根过氧化物酶与 IgG 的 Fab 片段交联物, 分子质量较小, 约 100kD, 较易进入细胞内。也可用 IgG Fab-1nm 金作为标记物, 标记后经银加强染色的纳金包埋前标记法。由于该标记物较易穿透到组织和细胞内, 且定位比酶标抗体精确, 因此被广泛用于膜受体的精确定位。

2) 包埋后免疫标记

包埋后免疫标记具有超微结构保存较好、方法简便可靠、阳性结果重复性高的优点, 可对同一组织块的连续切片做各种对照免疫标记, 能十分准确地解释免疫标记结果, 而且还能在同一张切片上进行多重免疫标记, 尤其适合于颗粒性标记物 (胶体金标记) 的免疫化学定位标记, 是目前应用最广的免疫电镜技术。但是该方法也有明显的缺点, 抗原在脱水、浸透及树脂包埋过程中可能被破坏, 且抗原被树脂遮盖不易与抗体接触, 使免疫标记的阳性率下降。尤其是后固定剂锇酸对抗原的破坏较严重, 因此常常避免使用。为了得到精细的超微结构并提高阳性标记率, 必须注意以下几个方面:

3) 冷冻超薄切片免疫标记

冷冻超薄切片免疫电镜技术的特点是组织不经脱水包埋直接冷冻, 在冷冻状态下进行超薄切片, 然后进行免疫标记。该项技术克服了上述两种方法的缺点, 能更理想地保存一些生物大分子的活性, 极大地提高了免疫标记的敏感性, 但在冷冻过程中超微结构会受到冰晶的破坏。1996年, LiouW 等改良了冷冻超薄切片技术, 用甲基纤维素和醋酸铀混合液 (含 1.5%~2% 甲基纤维素, 0.3%~3% 醋酸铀的水溶液) 代替传统的蔗糖溶液作为将冷冻切片从冷冻槽中转移到镍网上的溶液, 得到了保存良好的超微结构, 使该项技术更加完美, 应用也越来越广泛。但该项技术必须有特殊的冷冻超薄切片机, 且技术难度较高。

4.对照实验

为了证实免疫标记结果的特异性,必须同时进行对照实验。在抗体的特异性无问题的前提下,对照实验有以下几种:

用未经免疫的同种动物正常血清代替第一抗体,结果应为阴性。不加一抗,结果应为阴性。用不含有靶抗原的标本进行免疫标记,结果应为阴性。对肯定含有靶抗原的标本进行免疫标记,结果应为阳性。

5.结果的观察和解析

在电镜下观察免疫标记的结果,通过标记物(胶体金、铁蛋白或酶底物)显示免疫反应部位以定位抗原的存在位置,注意区分特异性标记和背景的非特异性标记,进行正确的结果分析。