

催化信号放大法的改进

倪灿荣 (第二军医大学长海医院病理科,上海 200433)

[摘要] 目的:探讨酪胺与过氧化物酶发生酶促反应后,用热缓冲液洗以进一步提高和改善催化信号放大法(CSA)的敏感性和特异性。方法:应用7种不同类型的一抗,2张不同肿瘤的组织芯片,同时进行EnVision法、LsAB法、标准CSA法和改进CSA法染色,比较敏感性和特异性。结果:改进CSA法最为敏感,其次是标准CSA法、EnVision法和LsAB法,改进CSA法的敏感性较标准CSA法高2~3倍。4种方法背景染色基本一致,细胞定位准确。结论:改进后的CSA法的稳定性、敏感性好于标准CSA法。

[关键词] 催化信号放大法;免疫组织化学;敏感性与特异性

[中图分类号] R 36 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2007)02-0209-03

Modification of catalyzed signal amplification method

NI Can-rong (Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To verify whether hot PBS washing after the enzymatic reaction between tyramine and horseradish peroxidase can improve the sensitivity and specificity of catalyzed signal amplification (CSA). Methods: Using 7 different types of primary antibodies and 2 tumor microarray system, we carried out EnVision, LSAB, Standard CSA, and modified CSA staining and compared their sensitivities and specificities. Results: The modified CSA method was the most sensitive one among the 4 methods, followed by standard CSA, EnVision, and LsAB method. The sensitivity of modified CSA method was 2-3 times higher than that of standard CSA. The 4 methods had similar background staining and had exact localization of cells. Conclusion: The modified CSA is more stable and sensitive than traditional CSA staining method.

[KEY WORDS] catalyzed signal amplification; immunohistochemistry; sensitivity and specificity

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(2):209-211]

催化信号放大法(catalyzed signal amplification,CSA)又称CARD法(catalyzed reporter deposition),目前该方法主要用于原位杂交信号的检测放大。敏感性可以和核素自显影方法相媲美。也有将CSA用于免疫组织化学的研究^[1-7],但应用不十分广泛,可能是因该方法操作流程太长,成本较高,其敏感性对部分抗原的检测仍不够理想。另一方面,由于酪胺的无特异性的酶促反应和信号的过度放大,认为结果的特异性不能得到有效保证,再加上内源性生物素的干扰,使得对结果的可信度提出疑问。为了在提高敏感性的同时,又使该方法的稳定性和特异性得到更进一步提高,本实验室根据文献报道^[4,7],对该方法的操作流程进行优化组合。

1 材料和方法

1.1 组织标本 肝细胞癌组织芯片(150例组织构建一张组织芯片,均来自本院2001~2005年手术标本)和胃癌组织芯片(150例组织构建一张组织芯片,均为本院1996~2005年手术切除标本),4 μm石蜡连续切片,贴在涂有切片粘合剂的载玻片上,58℃烤18 h。

1.2 试剂 7种特异性一抗的来源、种属和稀释度见表1,EnVision试剂和LsAB kit均购自丹麦DAKO公司,生物素N-羧基丁二酸亚胺酯、酪胺盐、二甲基甲酰胺、三乙醇胺均购自美国Sigma公司,生物素化酪胺盐制备见相关文献^[2]。

表1 IHC所用特异性一抗的来源、种属和稀释度
Tab 1 Source, genera and dilution of primary antibodies

Primary antibodies	Genera	Tissues-microarray	Dilution				Source
			LsAB	EnVision	Standard CSA	Modified CSA	
Cyclin D1	M	HCCs	1 : 10	1 : 15	1 : 100	1 : 600	NeoMarkers
Cyclin D2	M	HCCs	1 : 10	1 : 15	1 : 100	1 : 600	NeoMarkers
Cyclin A	M	HCCs	1 : 10	1 : 15	1 : 100	1 : 500	NeoMarkers
Cyclin B1	M	HCCs	1 : 10	1 : 10	1 : 80	1 : 600	NeoMarkers
Cyclin E	M	HCCs	1 : 10	1 : 15	1 : 100	1 : 600	NeoMarkers
Survivin	R	GCs	1 : 100	1 : 300	1 : 3 500	1 : 7 000	Novus
P53(Do-7)	M	GCs	1 : 50	1 : 100	1 : 1 500	1 : 4 000	DAKO

M:Murine monoclonal antibody;R:Rabbit multi-clonal antibody

1.4 免疫组织化学操作流程 LsAB 法、EnVision 法和标准 CSA 法参阅相关文献^[5],改进后 CSA 法操作流程:(1)石蜡切片脱蜡至水,PBS 洗 3×3 min;(2)抗原修复^[5],自然冷却后 PBS 洗 3×3 min;(3)H₂O₂ 甲醇抑制内源性过氧化物酶 20 min,PBS 洗 3×3 min;(4)20% 蛋白(封闭内源性生物素结合位点) 37℃ 30 min,PBS 洗 3×3 min;2% 酪蛋白(casein; X0909,DAKO 公司产品)-PBS 洗 20 min;(5)适当稀释特异性一抗(稀释度见表 1) 4℃ 过夜,PBS 洗 3×3 min;(6)生物素化二抗 1:400 20 min,37℃,PBS 洗 3×3 min,S-HRP 1:400 20 min 37℃,PBS 洗 3×3 min;(7)生物素化酪胺/H₂O₂

(0.007 mmol/L)37℃ 15 min,PBS 洗 3×3 min;(8)将切片浸入 98℃,PBS 洗液中洗 2×5 min,室温下 PBS 洗 2×3 min;(9)S-HRP 1:200 37℃ 20 min,PBS 洗 3×3 min,如信号弱可重复前述 7~9 步几次;(10)0.04% DAB+0.03% H₂O₂ 显色反应 5~8 min;(11)苏木精衬染,常规树脂封片。

对照组:用 PBS 代替一抗和生物素化酪胺,结果为阴性。

2 结 果

4 种方法的一抗经最佳稀释后(表 1),其阳性率和阳性强度基本一致(图 1~3)。

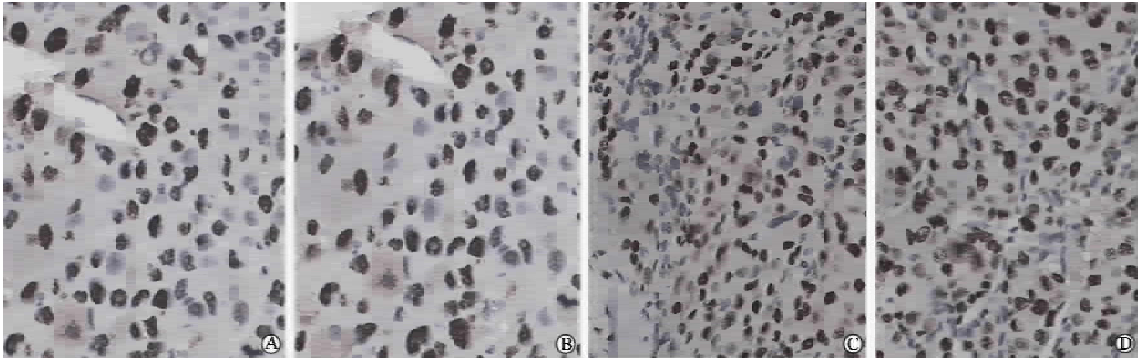


图 1 4 种方法的不同稀释度分别检测肝癌组织芯片中 Cyclin D1

Fig 1 Cyclin D1 immunohistochemistry staining of TMA of hepatocellular carcinoma with 4 different dilutions (×200)
A:LsAB with dilution 1:10;B:EnVision with dilution 1:15;C:Standard CSA with dilution 1:100;D:Modified CSA with dilution 1:600

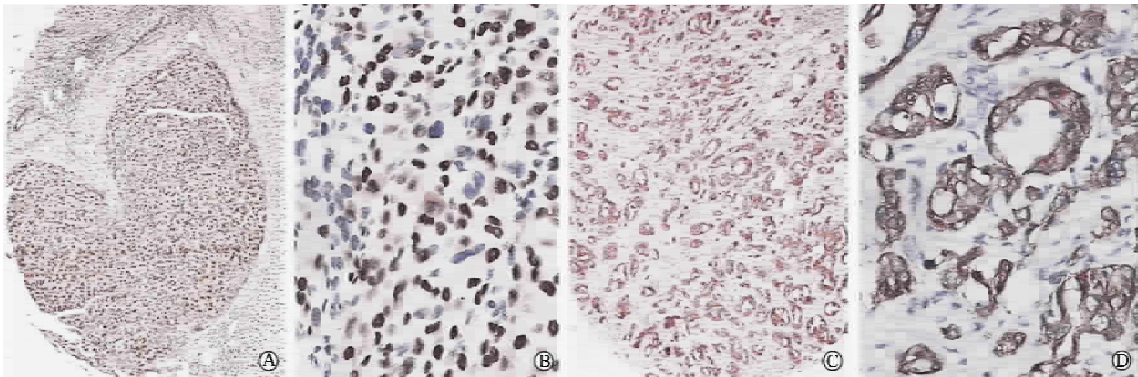


图 2 标准 CSA 法和改进后 CSA 法 Cyclin B1 在肝癌组织芯片中的染色结果

Fig 2 Cyclin D1 immunohistochemistry staining using standard CSA (A,B) and modified CSA(C,D)

A(×40) and B(×200) are weak positive (positivity 20%); while C(×40) and D(×200) are strongly positive (positivity 80%)

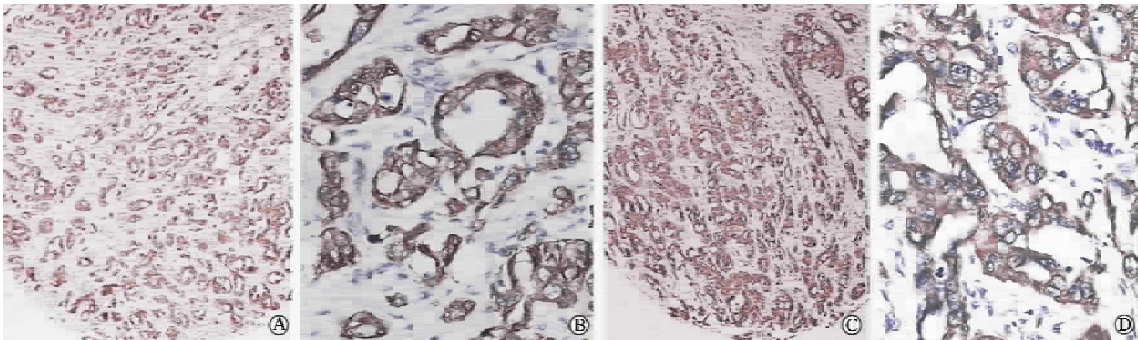


图 3 标准和改进后的 CSA 法 Survivin 在胃癌组织芯片中的表达

Fig 3 Survivin immunohistochemistry staining using standard CSA (A,×40;B,×200) with dilution 1:3 500 and modified CSA (C,×40;D,×200) with dilution 1:7 000

改进 CSA 法特异性一抗的稀释度最高,最为敏感,其次是标准 CSA 法、EnVision 法和 LsAB 法。改进后的 CSA 法要较标准 CSA 法高 2~3 倍,4 种方法背景染色基本一致,细胞定位准确。

同时采用相同邻近的肝癌组织芯片,标准 CSA 和改进 CSA 法的相同稀释度分别检测 Cyclin D1、D2、A、B1 和 E 5 种特异性一抗,采用相同的稀释度 1 : 300,结果标准 CSA 法 Cyclin D1、B1 表达均呈弱阳性,阳性检测率为 10%~20%(图 2A、2B),其他 3 种 Cyclin D2、A 和 E 均为阴性;改进 CSA 法 Cyclin D1、D2、A、B1 和 E 均达到中等强度阳性以上,其阳性检测率达到 20%~80%(图 2C、2D)。改进 CSA 法的稳定性要好于标准 CSA 法,在胃癌组织芯片中,分别检测 Survivin(图 3)、p53 和 PTEN 3 种抗体获得同样的结果。

用上述 4 种方法检测 MDM2 和 ATM 的效果均不理想,阳性检测率仅 2%~5%,而且定位在细胞质内占多数。这说明,所有的抗原均能检测到,不仅仅取决于要采用敏感的方法,还取决于一抗的质量以及适合何种组织切片。

本研究还对 CSA 方法进行优化,首先对生物素化酪胺后的热 PBS 洗涤温度和洗涤时间进行比较,同时应用肝癌组织芯片 Cyclin D1 1 : 600 稀释,洗涤温度设定 60℃、80℃和 95℃,时间分别为 5 min、10 min 和 20 min,结果洗涤温度 95℃稍好,10 min 最佳。其次在一抗前用 20%蛋清-PBS 洗和 2%酪蛋白来抑制内源性生物素和酪胺化合物的干扰,对胃肠道组织尤其需要。

3 讨 论

提高免疫组织化学技术的敏感性有几种途径,一是依靠各种免疫组织化学技术的前处理,例如酶的消化、高温的抗原修复,虽然基本原理不十分清楚,但却十分有用。其次是增加免疫组织化学方法的放大倍数,主要是酶结合量的增加,例如 EnVision 法,一个 EnVision 葡聚糖多聚物结合 100 个左右的酶分子和 15 个抗体分子,要比二步法 S-P(LsAB)上结合的酶分子多许多倍。虽然 EnVision 法的敏感性大大提高,方法也简便,但其大分子对于核内抗原的定位不如 LsAB 法,存在穿透核膜困难的问题。因而,有时 EnVision 法不如 LsAB 法敏感。尤其是活细胞核内抗原定位更为困难。CSA 法的应用^[1-2,10],既克服了 LsAB 法敏感性不高的缺点,又保留了较好的细胞穿透性。该方法的主要原理是酪胺/H₂O₂与过氧化物酶(HRP)的酶促反应而产生大量的酶促产物,该产物能与周围的蛋白质残基(包括色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基)结合,原位在抗原抗体结合部位沉积大量的标记生物素或其他半抗原,与随后加入的 streptavid-HRP,或抗生物素-HRP 结合,如经几次这样的循环放大,可以网络许许多多的酶分子,最后通过 DAB/H₂O₂的显色反应,其敏感性得到几何级放大^[1-4,10-11]。CSA 方法的改进和敏感性提高工作,一直受到人们的注意,不断有改进的文献报道^[4,6-7]。作者根据文献报道,并结合实验室工作需要,对提高 CSA 方

法的敏感性、稳定性方面进行探索。改进的 CSA 法主要在生物素酪胺与 HRP 进行酶促反应后,加用 98℃ PBS 液洗 5~10 min。其原理不十分清楚,但可以明显地提高方法的稳定性和敏感性。虽然其原理不十分清楚,但可以肯定,通过热的 PBS 作用后,其酪胺与蛋白的结合更加稳定,防止结合有生物素的反应产物在洗涤过程中脱落,另外,还可以减少生物素酪胺分子不稳定的二聚物产生。Volante 等^[4]认为,用热 PBS 液洗后,便于有效地暴露生物素的结合位点,使更多的 streptavidin-HRP 与之结合,认为改进后的 CSA 法不但使方法更为敏感,还可以提高方法的特异性。另一个最主要的原因是热洗后,稳定了生物素化酪胺分子与蛋白质的结合,游离的生物素减少。本实验结果证实,改进后的 CSA 法,对细胞周期素等核内抗原的定位,有其独特的优点,定位准确,稳定性较标准的 CSA 法好,其敏感性和穿透性好于 EnVision 法和标准 CSA 法。

[参 考 文 献]

[1] 倪灿荣,范 森,许炳基. CSA 系统在免疫组织化学中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志,1999,15:267-269.

[2] 倪灿荣,郑建明,朱明华,等. 催化信号放大系统的制备及其在免疫组化和原位杂交中的应用[J]. 第二军医大学学报,2000,21:336-339.

[3] Reubi J C, Kappeler A, Waser B, et al. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst 2A in human tumors[J]. Am J Pathol,1998,53:233-245.

[4] Volante M, Pecchioni C, Bussolati G. Post-incubation heating significantly improves tyramide signal amplification[J]. J Histochem Cytochem,2000,48:1583-1585.

[5] 倪灿荣,马大烈,戴益民 主编. 免疫组织化学实验技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006:36-40.

[6] Kammere U, Kapp M, Gassel A M, et al. A new rapid immunohisto-chemical staining technique using the EnVision antibody complex[J]. J Histochem Cytochem,2001,49:623-630.

[7] Hasui K, Murata F. A new simplified catalyzed signal amplification system for minimizing non-specific staining in tissues with supersensitive immunohistochemistry[J]. Arch Histol Cytol, 2005,68:1-17.

[8] 倪灿荣,李芳梅,朱明华,等. 提高组织芯片成功率的方法和体会[J]. 中华病理学杂志,2002,31:559-560.

[9] 朱明华,倪灿荣,祝 峙,等. 应用组织芯片检测肝细胞癌组织中 8 种 p53 相关基因的表达[J]. 癌症,2003,22:680-685.

[10] Komminoth P, Werner M. Target and signal amplification: approaches to increase the sensitivity of *in situ* hybridization[J]. Histochem Cell Biol,1997,108:325-333.

[11] Speel E J, Hopman A H, Komminoth P. Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card[J]. J Histochem Cytochem,1999,47:281-288.

[收稿日期] 2006-08-14 [修回日期] 2007-01-09
[本文编辑] 曹 静