

# 經福馬林固定之牛脾臟細胞內免疫球蛋白 之免疫酶染色法

費昌勇 張惟茗 楊揚輝 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

本文係以直接免疫酶染色法染牛脾臟切片中含免疫球蛋白之細胞。其技術乃利用經葉草根過氧化氫酶 ( Horseradish peroxidase ) 標幟之免疫牛 IgG<sub>2</sub> 抗體與組織內含免疫球蛋白之細胞進行結合，藉酶染色標出位置。本法之特點為可適用於福馬林固定之組織。

兩隻白兔以純化之牛 IgG<sub>2</sub> 免疫。取沈降抗體力價高之兔血清，分離出其中之 IgG，與葉草根過氧化氫酶結合。將此標幟抗體做牛脾臟切片之免疫染色，以 diaminobenzidine 呈色出含本酵素之部位；背景染色為蘇木紫。

切片組織內之葉草根過氧化氫酶用含有 0.5% 過氧化氫之甲醇處理 20 分鐘，以抑制假陽性反應。

本法處理後之切片與一般組織切片一樣可置室溫久存。且陽性細胞與背景組織之形態均十分清晰，因此目標細胞 ( target cell ) 在組織學上之相關位置亦易於分辨。浸臘之組織塊 ( block ) 可久存以供日後研究之用。

一般病理室所取得之病材多為固定於福馬林之組織。然而，當須要做診斷時，通常不易取得新鮮冷凍之材料，或是低溶點石臘包埋之組織<sup>(5,8)</sup>；這些條件限制了染色法之使用範圍。若是使用葉草根過氧化氫酶 ( Horseradish peroxidase ) 標幟之抗體，可解決這些困難，此技術特稱為酵素免疫法 ( Immunoperoxidase method )。目前已知本法可染出許多福馬林固定之組織內所含之抗原<sup>(12)</sup>。本法之便利處在於材料可置室溫中長期保存而不影響免疫學染色之結果。

本報告是使用直接酵素免疫染色法 ( direct immunoperoxidase method )，以染出牛脾臟細胞內之免疫球蛋白。

## 材料與方法

牛 IgG<sub>2</sub> 之純化及其鑑定：

牛 IgG<sub>2</sub> 之純化係 Porter 和 Noakes<sup>(6)</sup> 之方法經筆者等修改後如下：

牛血清加飽和硫酸銨至 40% 後取球蛋白沈澱。此球蛋白再經線性塩類濃度遞增之陰離子交換樹脂 ( DEAE cellulose ) 層析：以 0.01 M phosphate buffer, PH7.6 為基本溶液 ( initial buffer )，以含 1 M 氯化鈉之基本溶液為終點溶液 ( limit buffer )。層析所得之第一個尖峰經濃縮後再以 Fractogel<sup>(R)</sup> TSK HW55\* 進行不溶性層析。所得之主尖峰即為牛之 IgG<sub>2</sub>。其鑑定係以標準之抗牛全血清及抗牛 IgG<sub>1</sub>\*\*，IgG<sub>2</sub>\*\* 血清分別做免疫電泳法 ( Immunoelectrophoresis ) 及凝膠沈降法 ( Agar gel precipitation )<sup>(9)</sup> 為之。免疫電泳及凝膠沈降法之結果染色按 Schrejner 和 pesce<sup>(9)</sup> 之方法實施。

兔之免疫法按費和李<sup>(11)</sup> 之方法進行。所得之抗血清按 Reif<sup>(7)</sup> 之 batch technique 法快速析出兔之 IgG。

葉草根過氧化氫酶 ( HRP ) 之標幟法：

本法係按 Wilson 和 Nakane<sup>(14)</sup> 之方法進行。取 60mg 之兔 IgG 和 30mg 之 HRP 結合。結

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌 12 : 37-42, 1986 台灣省家畜衛生試驗所

\*E. Merck, Cat. No. 14981. Frankfurter strabe 250, D-6100 Darmstadt 1, Federal Republic of Germany.

\*\*Nordic Immunological Laboratories. Langestra at 57-61, P.O. Box 22, 5000AA Tilburg, The Netherlands.

合後再經 Sepnacryl s-200 層析，根據 Fei 等<sup>(4)</sup>之報告，取第一個尖峯之前三分之二所得之標幟抗體最為適用。

染色技術：

以 PBS 泡製之 10% 中性福馬林固定之牛脾臟經一般組織切片製做法得 5  $\mu$ m 之腊切片。將該切片以二甲苯脫脂後各按下述三種方法去除組織內固有之過氧化氫酶 (endogenous peroxidase)：(1) 含 0.5%  $H_2O_2$  之甲醇，20 分鐘<sup>(2)</sup>；(2) 含 0.074% 鹽酸之乙醇，15 分鐘<sup>(13)</sup>；(3) 甲醇處理 20 分鐘後再以含 0.0125%  $H_2O_2$  之 PBS 處理 20 分鐘<sup>(12)</sup>。

經上述處理過之切片以 PBS 泡成之 0.1% trypsin 置 37°C 消化 30 分鐘，以去除細胞外之血清蛋白質<sup>(4)</sup>，然後以 PBS 洗 3 次以去除殘餘之消化酶。該切片再以上述 HRP 標幟之抗體按一般螢光抗體染色法。染色後再以 PBS 洗 3 次。

經免疫染色後之組織切片以含 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 及 0.01%  $H_2O_2$  之 Tris-HCl 0.05 M, PH6.0 溶液染色 10 分鐘。再以一般組織切片染色法做蘇木紫之背景染色；經透明、封膠後即可觀察。

## 結 果

牛 IgG 之分離及其鑑定：

硫酸銨層析之球蛋白陰離子交換樹脂層析後共得 4 個尖峯 (圖 1)。取第一個尖峯，經濃縮後以 Fractogel<sup>(R)</sup> TSK HW 55 進行不容性層析得一個對稱之尖峯 (圖 2)。取此尖峯之中央部份，經濃縮後以標準之抗牛 IgG<sub>1</sub> 及 IgG<sub>2</sub> 抗血清反應，結果僅與抗 IgG<sub>2</sub> 之抗血清反應，不與抗 IgG 之抗血清反應，再以標準之抗牛全血清做免疫電泳分析，得知為純化之 IgG<sub>2</sub> (圖 3)。

兔抗牛 IgG<sub>2</sub> 抗血清之製作法：

家兔 2 隻經 2 個月之免疫後每隻各取少量血清，先以凝膠沈澱法測定其抗體力價。筆者等在本試驗中使用其抗體價達 64 倍以上之免疫血清。所採取之免疫血清再經 Reif<sup>(7)</sup> 之 batch technique 分離出兔之 IgG 後進行 HRP 酵素之標幟。

酵素之標幟法：

純化之兔 IgG 與 HRP 酵素按 Wilson 和 Nakane<sup>(14)</sup> 之方法進行 Schiff base 反應後以 Sephacryl S-200 做不容性色層分析。所得之結果如圖 4。取第一個尖峯之前三分之二部份。此部份經 O.D 280 nm 及 O.D 403 nm 之測定後得知其 RZ (Reinheit-Zahl) 值為 0.4，符合實驗要求<sup>(14)</sup>。故以之用於免疫染色。

組織內固有過氧化氫酶之抑制結果：

組織切片經前述之 3 種方法去除固有之過氧化氫酶後，直接以 diaminobenzidine 染色。結果得知只有含 0.5%  $H_2O_2$  之甲醇處理 20 分鐘者，可完全抑制切片上之非特異性紅褐色沈澱。另外兩種處理之切片仍有大量之非特異性紅褐色沈澱。此外，切片上殘餘之牛血清亦為造成假陽性之原因；trypsin 之消化時間越縮短，非特異性之紅褐色沈澱越多。

含免疫球蛋白陽性細胞之現象：

含免疫球蛋白之陽性細胞在細胞質中可見到十分強烈之紅褐色陽性反應 (圖 5)。陽性細胞與週遭之陰性組織呈明顯之對比，其色澤與蘇木紫並無衝突，目標細胞 (target cell) 易於觀察 (圖 5)。這類細胞之紅褐色色澤隨標幟抗體之稀釋而減低。

## 討 論

本研究所得之 HRP 標幟抗體之 RZ 值為 0.4，按照 Wilson 和 Nakane<sup>(14)</sup> 之研究，酵素最好之標幟結果為 RZ 值在 0.3 至 0.6 之間。此值表示每個 IgG 分子可標幟 1 至 2 個 HRP 分子。

酵素免疫染色之技術所面臨之問題為組織細胞內固有之過氧化氫酵素。這些酵素為產生假陽性之主要因素。本研究比較了 3 種不同之方法來去除組織內之固有酵素。結果顯示含 0.5%  $H_2O_2$  之

甲醇處理為一可行之方法。此一結果與雞之脾臟組織相同<sup>(4)</sup>。目前已知以甲醇及 $H_2O_2$ 之處理可強烈抑制組織內之過氧化氫酵素，但不影響抗體抗原反應<sup>(10)</sup>。此一方法不但適用於本報告所提之直接酵素免疫染色，同時亦可應用於間接法，PAP法，甚至最近發展之ABC法<sup>(11)</sup>。

吾人可由下列兩點了解本研究所染出之紅褐色陽性細胞不是細胞外之血清所造成之假陽性結果：(1)陽性細胞之形態與漿胞完全一致；(2)陽性細胞與其他之陰性細胞對比十分強烈。此外，陽性細胞之色澤會隨酵素標示抗體之逐漸稀釋而漸淡。這些均可說明本報告所揭示之方法應用於細胞內球蛋白之特異性染色。

本實驗所用之抗牛 $IgG_2$ 抗體含有抗牛免疫球蛋白之L鏈抗體，故應仍可與其他之免疫球蛋白發生反應而產生褐色之陽性細胞。故以本實驗中所染出之陽性細胞並非一定是含 $IgG_2$ 之細胞，而可能仍有含其他免疫球蛋白之細胞。

本報告所揭示之方法相信可應用於一般牛組織中所含之抗原。螢光抗體染色法對組織中抗原之特異性與本法之特異性相同<sup>(9)</sup>，但前者有自體螢光細胞 (autofluorescent cells) 和特異性螢光細胞分辨上之困擾。此外，本法亦可應用於冷凍切片組織。其最後完成之永久切片 (permanent preparation) 可長期保存，其染色結果不會因長期保有而褪色。故可與過去或未來之研究結果做比較。本法之切片所顯示之細胞結構十分清晰，對定量分類細胞之工作亦可準確執行。

本法之敏感性、特異性、安定性及便利性等各項優點適於一般病理室運用。

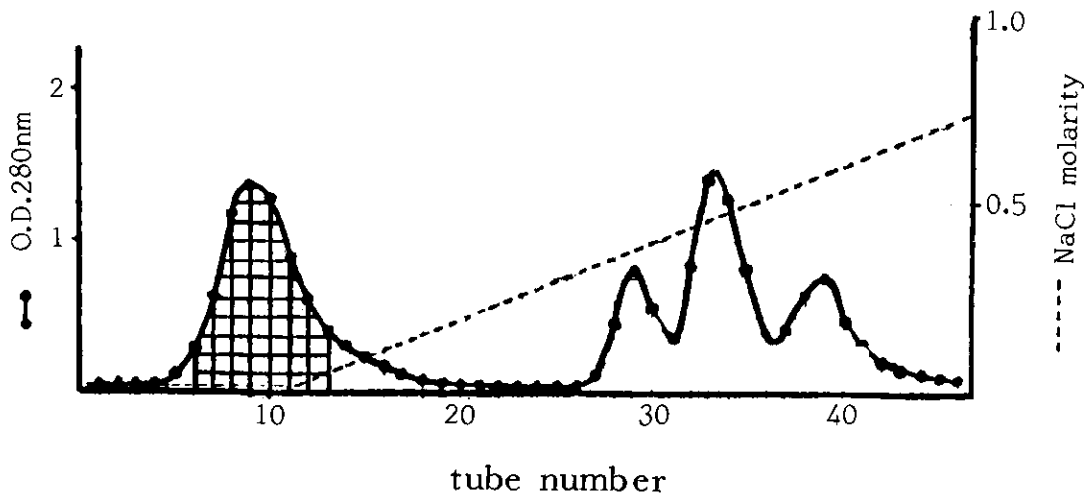


圖1、硫酸銨鹽析牛血清蛋白之線性鹽類濃度遞增層析之曲綫，陰影部份為回收之蛋白質 (  $3 \times 20$  cm )。

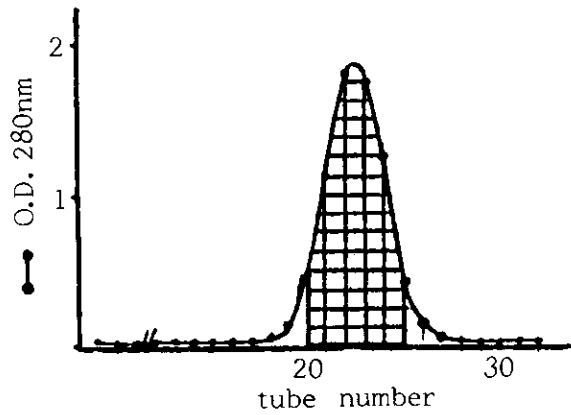


圖 2 自圖 1 之離子交換樹脂層析所得之球蛋白再經不容性層析所得之結果，陰影部份為純  $\text{IgG}_2$  (  $2.5 \times 100 \text{ cm}$  )

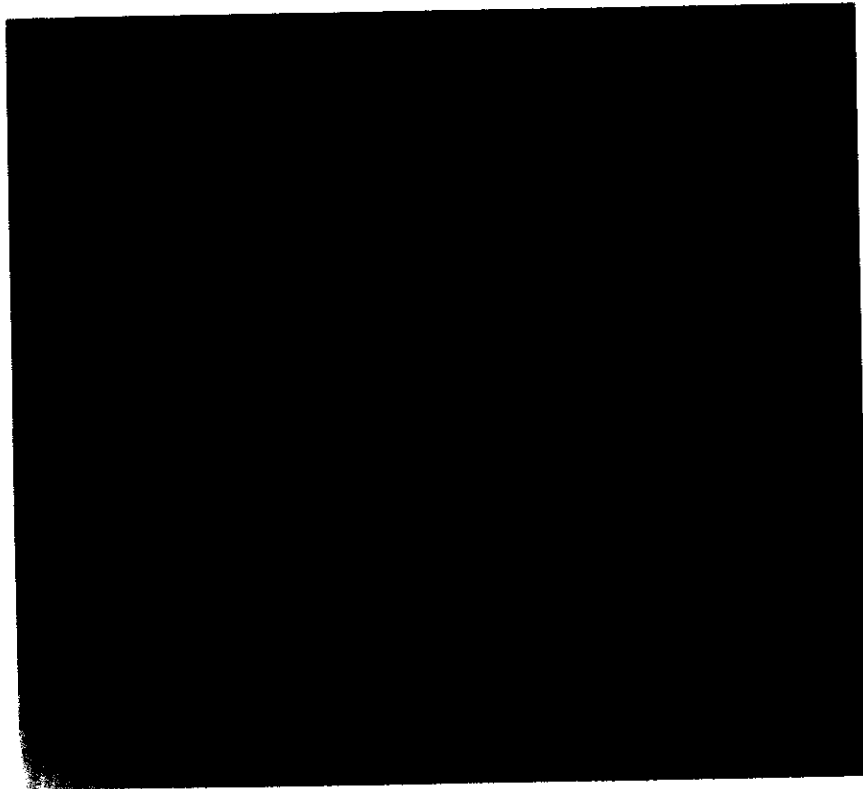


圖 3 牛之全血清 (S)，純化之牛  $\text{IgG}_2$  ( $G_2$ ) 與不同種類之抗體進行免疫電泳試驗之結果。C = 抗牛全血清抗體；D = 自製之抗牛  $\text{IgG}_2$  抗體。

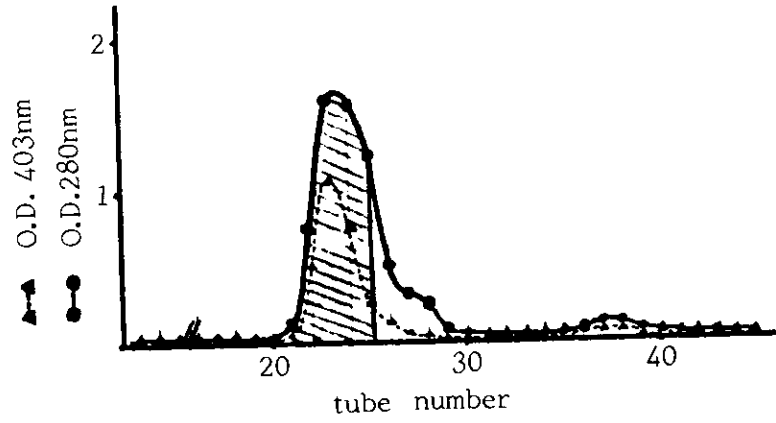


圖4 葉草根過氧化氫酶與兔 IgG 結合後經 S - 200 層析後之結果  
( 2 × 115 cm , PBS )

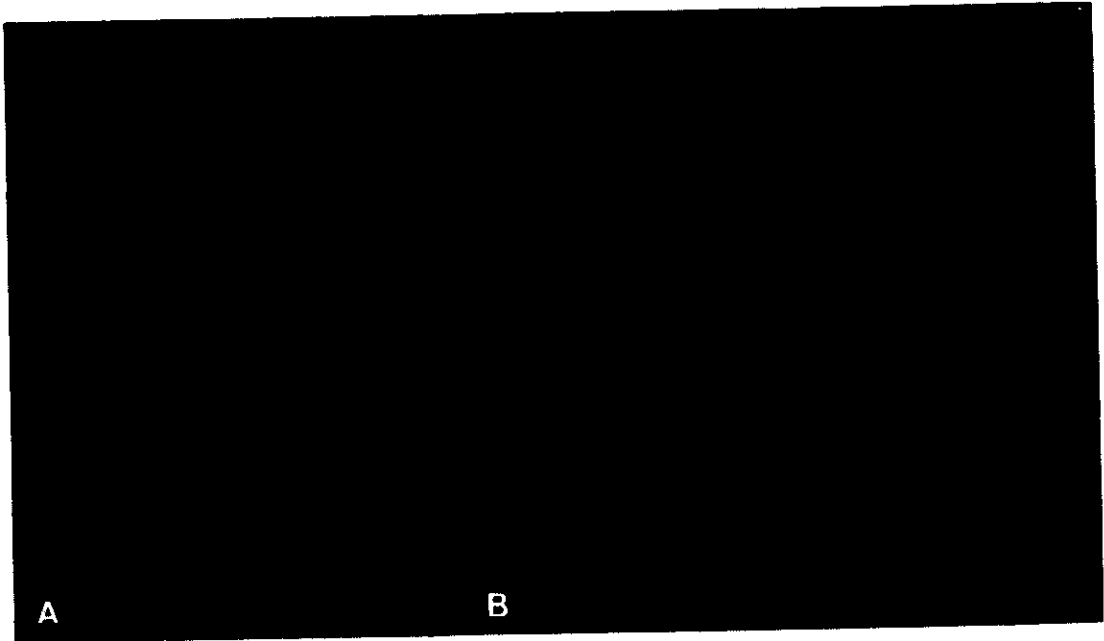


圖5 經免疫染色後陽性細胞呈紅褐色反應，背景染色為蘇木紫  
A<sub>2</sub> × 400 ; B : × 1,000

## 參 考 文 獻

1. 費昌勇、李永基 ( 1983 ) 雞血清中 IgG 和 IgM 之純化及其特異性抗體之製備。中華民國獸醫學會雜誌 9 : 119-124 。
2. Burns, J. 1975. Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme ( PAP ) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry* 43 : 291-294 。
3. Burns, J., M. Hambridge and C.R. Taylor. 1974. Intracellular immunoglobulins. *J. clin. Path.* 27 : 548-557 。
4. Fei, A.C.Y., P.H. Chang, and K.K. Young. 1984. Detection of intracellular immunoglobulin in formalin-paraffin sections of the chicken spleen using immunoperoxidase technique. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica* 23 : 199-203 。
5. Heron, I. 1970. A paraffin embedding method of kidney immunofluorescent studies. *Acta. path. microbiol. scand. Sec. B.*, 78 : 444-450 。
6. Porter, P. and D.E. Noakes, 1970. Immunoglobulin IgA in bovine serum and external secretions. *Biochem. Biophys. Acta.* 214 : 107-116 。
7. Reif, A.E. 1969. Batch preparation of rabbit IgG globulin with DEAE cellulose. *Immunochemistry* 6 : 723-731 。
8. Sainte-Marie, G. 1962. A Paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 10 : 250-256 。
9. Schreiner, J. E. & A.J. Pesce. 1974. *Immunochemistry*, p97-127 In J. M. Brewer, A.J. Pesce, R.B. Ashworth ( E.D. ). *Experimental Techniques in Biochemistry*, 1st ed. Princefall, Inc. New Jersey, U.S.A.
10. Streefkerk, J.G. 1972. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J. Histochem. Cytochem.* 20 : 829-831 。
11. Taylor, C.R. 1978. Immunoperoxidase techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 102 : 113-121 。
12. Taylor, C.R. and D.Y. Mason. 1974. The immunohistological detection of intracellular immunoglobulin in formalin-paraffin sections from multiple myeloma and related conditions using the immunoperoxidase technique. *Clin. exp. Immunol.* 18 : 417-429 。
13. Weir, E.E., T.G. II. Pretlow, A. Pitts, E.E. Willisons. 1974. Destruction of endogenous peroxidase activity in order to locate cellular antigens by peroxidase labelled antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 22 : 51-54 。
14. Wilson, M.B. and P.K. Nakane. 1978. *Immunofluorescence and Related staining techniques*. p. 215-224. Elsevier /North-Holland Biomedical Press.

## Detection of Intracellular Immunoglobulin in Formalin-paraffin Sections of the Bovine Spleen Using the Immunoperoxidase Technique.

Andrew C.Y. Fei, W.M. Chang, Y.H. Yang, S.Y. Chiu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

A direct immunoperoxidase technique for the identification of immunoglobulin-containing cells in the section of bovine spleen is described. This is applicable to formalin fixed, paraffin-embedded material. It is based on an immunohistochemical method using peroxidase-labelled antibodies.

Rabbits were immunized by purified bovine IgG2. The IgG2 fraction of rabbit anti-bovine IgG2 antiserum was conjugated with horseradish peroxidase. The presence of immunoglobulin-containing cells in bovine spleen sections was revealed by staining the tissue-bound peroxidase-labelled antibody with diaminobenzidine, then briefly counterstained with hematoxylin.

The endogenous Peroxidase was satisfactorily inhibited by treating the dewaxed section with a fresh 0.5% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for twenty minutes.

The structure of immunoglobulin-containing cells in bovine spleen sections is clear, preparations are permanent, and retrospective studies of stored paraffin-embedded tissue are possible.

