

高原鼢鼠睾丸雌激素受体免疫组化染色最适浓度抗体的筛选

包明芳,安康,谭宇尘,姚宝辉,康宇坤,王艳莉,张彩军,苏军虎*

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃农业大学-新西兰梅西大学草地生物多样性研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】筛选高原鼢鼠(*Eospalax baileyi*)睾丸雌激素受体(Estrogen receptor, ER)免疫组化染色的适宜抗体浓度。【方法】研究选取10只成年雄性高原鼢鼠的睾丸,采用免疫组织化学SP法(IHC-SP法)检测雌激素受体 α (ER α)和雌激素受体 β (ER β)在1:150、1:200和1:250稀释浓度下的染色效果。【结果】ER α 抗体稀释浓度1:250的免疫组化平均光密度值显著高于1:150和1:200的抗体稀释浓度免疫组化平均光密度值($P < 0.05$),而ER β 抗体稀释浓度1:200的平均光密度值最高($P < 0.01$),最适浓度结果均表现出阳性细胞染色强度高、背景清晰。【结论】高原鼢鼠睾丸中ER α 和ER β 抗体稀释浓度分别为1:250与1:200的免疫组化染色效果最佳。

关键词:免疫组织化学SP法;抗体浓度;雌激素受体

中图分类号:S812.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)05-0099-05

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2023.05.013



免疫组织化学技术是应用抗原抗体反应,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对它进行定位、定性及相对定量的研究^[1]。自Albert等^[2]提出用荧光染料标记抗体来显示组织成分方法,免疫组化技术在科研工作和临床病理诊断中被广泛应用。从免疫组化的不断发展中发现,影响其染色结果的因素不断增加,如制片质量、染色方法、染色流程、试剂质量、实验室条件等^[3]。同时,随着精准治疗的不断推进,对免疫组化操作规范化、标准化的要求日益严谨^[4]。例如,对不同抗原修复方法在免疫组织化学染色中的应用效果比较表明,采用高压抗原修复对试验结果影响处于最优,而且可根据不同抗原修复

特点选用合适的修复方法^[5]。此外,不同一抗孵育方法对免疫组化染色效果的对比研究发现,不同一抗孵育方法对抗体表达的阳性数量多少及免疫组化染色背景存在影响,根据不同抗原选择相应抗体孵育方法,可提高试验结果的完整性与清晰度^[6]。然而,免疫组化是半定量的,主观的,其结果并不只受抗原修复或抗体孵育的影响,还有其他一系列控制较差的变量,其中包括一抗稀释浓度^[7-8]。一抗稀释浓度的适度性,决定着免疫组化结果的清晰性与正确率。不同的研究在固定剂选择、固定时间、石蜡处理、切片处理以及使用的免疫组化检测系统方面均有不同。一抗稀释浓度在各研究者间是独有的,使得不同实验室之间石蜡切片使用的一抗稀释度存在很大差异^[9-11]。根据各自主观观察来判断抗体浓度稀释比例,或按抗体公司提供的说明书进行抗体稀释,所产生的结果在不同研究中可能有所不同,而且对所表明的问题也有着很大影响^[7,12]。因而需寻找适宜的抗体浓度稀释比例,以达到最佳染色效果和最清晰的背景,这也是后续研究中所面临的实际问题。

雌激素受体(estrogen receptor, ER)是一种特异性

收稿日期:2022-02-20;修回日期:2022-04-10

基金项目:国家自然科学基金(31460566;31760706);陇原青年创新创业人才项目(LYRC2019-05)

作者简介:包明芳(1995-),女,甘肃漳县人,硕士研究生。
E-mail:3234995346@qq.com

*通信作者。E-mail:sujh@gsau.edu.cn

强、亲和力高、结合容量低,并能与雌激素特异性结合的糖蛋白。ER属于一个大的基因家族,即配体激活的核受体家族^[13]。ER首次发现是存在于雌性生殖系统中,后续研究证明它在雄性生殖系统中也有分布,尤其睾丸研究者居多。ER在雄性生殖系统中发挥着不可或缺的作用,尤其对精子的发生与繁殖的影响。研究发现,ER α 敲除小鼠睾丸表现为萎缩且伴有精子数目及生殖力的下降,表明ER α 的存在与精子发生有关^[14]。另有资料表明,ER β 可以通过减弱垂体促性腺激素分泌,间接影响间质细胞睾酮的分泌,并在精细胞发育及调控中起主要作用^[15-16],表明ER β 对繁殖有重要的影响。因此,验证ER在高原鼯鼠睾丸中的分布,可进一步促进对其繁殖策略的研究。

目前,对ER定位、定性的研究主要依赖于免疫组织化学技术。鉴于此,本研究使用免疫组化技术研究ER在高原鼯鼠睾丸中的分布。在此研究结果的众多影响因素中,一抗浓度稀释的影响是关键因素之一,寻找适宜的一抗稀释浓度比例,以达到最佳的染色强度和最清晰的背景是本研究所面临的实际问题。又因各类研究中对抗体稀释浓度的关注较少,导致缺少对抗体稀释度的参考。为此,本研究对ER 3种抗体稀释浓度的效果进行对比研究,以期找到免疫组化一抗稀释的最佳浓度,为后续试验的顺利进行及试验结果的正确率提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

雄性成年高原鼯鼠(以体积和重量判断,(200 $\pm$ 50)g为成年高原鼯鼠)捕捉于甘肃省武威市天祝县地区,选取10只作为研究样本,每个样本重复3次。对鼯鼠断颈后解剖,采得睾丸标本,睾丸去除周围脂肪进行称量,用4%多聚甲醛固定保存,用于免疫组织化学观察。

1.2 试验试剂

ER α 兔抗鼠多克隆抗体(bs 0725R)、ER β 兔抗鼠多克隆抗体(bs 0116R)、免疫组化染色试剂盒(SP 0023,由美国ZYMED公司生产)及DAB显色试剂盒(C 0010)均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 切片制备

将4%多聚甲醛固定的睾丸组织流水冲洗24 h,

酒精梯度脱水,石蜡包埋,切片机将石蜡组织进行连续切片(片厚5 μ m),相邻3切片分别用于ER α 和ER β 免疫组织化学SP法染色及阴性对照,60 $^{\circ}$ C烘箱烘烤6 h左右,切片制作完成。

1.4 免疫组织化学SP法检测ER α 和ER β 分布

将制作好的切片经脱蜡、水化、PBS冲洗、微波抗原修复(pH值=6.0的柠檬酸钠缓冲液)、3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性,加入一抗,一抗分别用按1:150、1:200和1:250比例稀释的ER α 与ER β 两种多克隆抗体,阴性对照组(CK)用normal IgG来代替一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜14 h,之后加入羊抗兔IgG多克隆抗体37 $^{\circ}$ C孵育20 min,清洗3 min,进行DAB显色、苏木精复染、脱水透明、中性树胶封片,最后显微镜下观察及拍照。

1.5 图像分析和数据处理

光镜下观察免疫组织化学切片,随机选取5个不同位置的视野,在Olympus BX61显微镜(400 $\times$)下观察并拍照,比例尺为50 μ m,用IP图像处理技术计算平均光密度MOD(累计光密度(IOD)与有效测量区面积之比),用SPSS 23.0软件进行单因素方差分析,结果用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度梯度高原鼯鼠睾丸组织中ER的染色结果

ER α 与ER β 阳性定位于细胞核,为棕黄色着色。不同抗体浓度的切片最终染色效果差异显著:ER α ,1:250染色效果较1:150及1:200好,着色较深,效果显著(图1-A,B和C);但ER β 与ER α 不同,其染色效果1:200较1:150和1:250好,着色较深,效果显著(图1-E,F和G);对照组均呈阴性(图1-D和H)。

2.2 不同浓度梯度高原鼯鼠睾丸组织中ER的平均光密度值比较

抗体稀释浓度比为1:250的ER α 免疫阳性细胞平均光密度值最高(0.117 3 $\pm$ 0.010 3),与1:150(0.080 7 $\pm$ 0.004 1)差异显著($P<0.05$),1:200(0.059 1 $\pm$ 0.005 9)差异极显著($P<0.01$),1:150与1:200差异不显著。ER β 免疫阳性细胞平均光密度值与ER α 不同,抗体稀释浓度比在1:200光密度值最高(0.172 9 $\pm$ 0.003 8),与1:150(0.078 7 $\pm$ 0.013 8)、

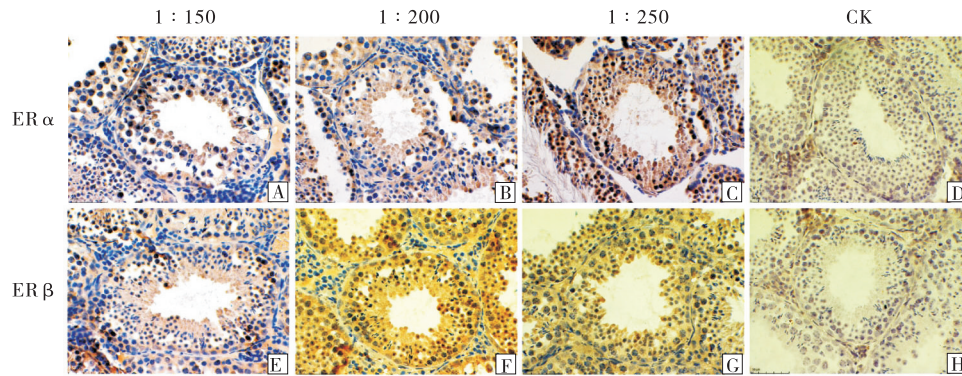


图 1 不同抗体稀释浓度下高原鼯鼠睾丸中ERα与ERβ的染色效果(400×)

Fig. 1 Staining effect of ERα and ERβ in testicle of plateau zokor under different antibody concentration (400×)

注:A、B、C和D为ERα免疫组化染色;E、F、G和H为ERβ免疫组化染色;CK 阴性对照。A和E 1:150,B和F 1:200,C和G 1:250

1:250(0.1047 ± 0.0064)差异极显著($P < 0.01$),1:150与1:250差异不显著(图2)。

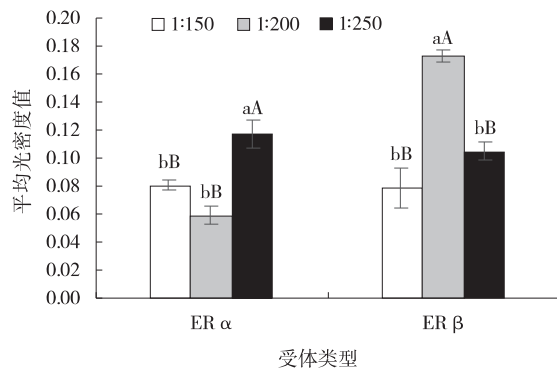


图 2 不同浓度梯度高原鼯鼠睾丸组织中ER的平均光密度值

Fig. 2 Average optical density of ER in testicular tissue of plateau zokor with different concentration gradient

注:误差条件表示独立实验的平均值±标准误,“*”表示差异的显著性,* $P < 0.05$,差异显著;** $P < 0.01$,差异极显著; $n=6$

2.3 不同浓度梯度高原鼯鼠睾丸组织中ER的阳性数量

1:150组:ERα和ERβ均有阳性表达,但阳性数量少。1:200组:ERα和ERβ均有阳性表达,但表达结果不同,ERα阳性数量少,ERβ阳性数量多。1:250组:ERα和ERβ均有阳性表达,表达结果不同,ERα阳性数量多,ERβ阳性数量少。CK组均无阳性数量的表达(表1)。

3 讨论

免疫组织化学染色主要利用抗原抗体的特异性原理,通过一系列化学反应对抗体进行显色,从而对抗原进行有效研究。免疫组织化学技术可将抗原的

表 1 不同浓度梯度高原鼯鼠睾丸组织中ER的阳性数量

Table 1 Number of ER positive in testicular tissue of plateau zokor with different concentration gradients

抗体	阳性数量			
	1:150	1:200	1:250	CK
ERα	+	+	++	—
ERβ	+	++	+	—

注:— 无阳性;+ 弱阳性;++ 阳性

形态特点、功能等变化结合起来,精确反映亚细胞结构水平^[17]。免疫组化染色结果的好坏受很多方面的因素影响,要有好的染色质量,免疫组织化学的切片质量不得不引起重视。免疫组织化学的切片质量对免疫组织化学结果的判断有一定的影响,例如,组织标本的固定、切片的处理及切片染色等全过程都有可能改变试验结果^[9]。但是,免疫组化进行过程中,研究者会忽略抗体稀释浓度,因此免疫组化的切片质量达不到最好状态,导致结果出现偏差。抗体的加入是免疫组化操作技术中的关键步骤之一,通过适量抗体稀释浓度比例的确定,提高免疫组化染色结果的阳性表达率。抗体稀释浓度是否合理,直接影响与抗原的结合,也影响试验结果的清晰度与准确性^[18-19]。该步骤既能减少后续试验进程的时间,又可提高抗原检出率。同样,李飞虹等^[20]在研究生应用免疫组化技术的质控与标准化中提到,在每次使用新的浓缩型抗体之前应做预试验,以确定最佳浓度,即确定合适的稀释度,从而得到最强的特异性染色和最弱的背景染色。

本试验结果显示,高原鼯鼠睾丸中的ERα与ERβ的抗体稀释浓度不同,ERα抗体稀释浓度1:250的免

疫组化染色效果优于抗体稀释浓度 1:150 和 1:200 的免疫组化染色效果,ER β 抗体稀释浓度 1:200 的免疫组化染色效果优于抗体稀释浓度 1:150 和 1:250 的免疫组化染色效果,最适浓度结果均表现出灰度值大、无背景着色、染色清晰且着色均匀。最适浓度的检测,可提高免疫组化反应阳性表达率,更好表达试验结果。同许多研究相似,找到最适抗体稀释浓度,来提高试验结果准确度,浓度过高或过低均会导致假阳性反应的出现,影响试验效果。例如,张丽娜等^[7]在对抗原修复液 pH 值和抗体浓度对免疫组织化学技术检测 PD-L2 染色结果的影响中发现,1:400 是此试验的最佳浓度,所得切片结果清晰,既提高了免疫组织化学反应阳性表达率,也对试验结果进行了更好的呈现。柯晨等^[21]在检测鸭甲型肝炎病毒 3 型的免疫组织化学方法的建立和应用研究中表示抗体过剩会引起非特异性凝集,易造成假阳性反应。抗体不足亦是如此^[22]。稀释度不当也会出现假阴性结果,抗原丰富的组织尤其明显^[23]。周小鸽^[24]研究表明,对于抗体的使用不论是浓缩型还是即用型都要进行工作浓度个体化测试,找到适合自己科室的最佳工作浓度,而不仅是单纯按照说明书进行染色。因此为了获得最佳染色,要进行预试验来确保特异性一抗稀释度适中,从而得到最佳结果。

抗原抗体反应中,反应物的浓度密切影响着抗原抗体复合物的生成量。但这方面的关注点并未引起科研人员的重视,因此前人在研究中对此涉及比较少,导致这方面的参考点比较少。我们关注了它的重要性,设计了本试验,从而得出高原鼯鼠睾丸组织中 ER 在免疫组化中抗体稀释度的最理想方案。但本研究只探讨了之后试验所需的条件,并未对其他抗体稀释浓度进行逐一研究。本研究可为后续研究提供参考,也对后续相关研究做铺垫。

4 结论

不同稀释浓度抗体对高原鼯鼠睾丸中 ER 免疫组化染色结果有显著影响。平均光密度值和阳性数量在 ER α 1:250,ER β 1:200 的抗体浓度中最佳。本试验为后续高原鼯鼠的繁殖研究中睾丸组织的免疫组织化学染色提供了参考。

参考文献:

- [1] 钟乐. 免疫组化反应过程优化及自动化实现[D]. 福州: 福州大学,2018.
- [2] Coons A H. Fluorescent antibodies as histochemical tools [J]. Federation Proceedings,1951,10(2):558—559.
- [3] 黄柳明. 免疫组化质控中病理医技员的沟通与交流[J]. 中国现代医生,2009,47(23):121—132.
- [4] 廖德贵,赖妙玲,唐甜,等. 免疫组化抗体的选择与优化对报告结果的影响[J]. 热带医学杂志,2016,16(9):1126—1128.
- [5] 刘小燕,杨鉴,陈莹,等. 不同的抗原修复液和修复方法对免疫组化染色结果的影响[J]. 广东医学院学报,2013,31(5):530—531.
- [6] 兰森,李艳红,朱少君,等. 不同一抗孵育方法对免疫组化染色效果的对比研究[J]. 2011,40(10):1291—1292.
- [7] 张丽娜,李水仙,闫惠卿,等. 抗原修复液 pH 值和抗体浓度对免疫组织化学技术检测 PD-L2 染色结果的影响[J]. 长治医学院学报,2017,31(1):26—28.
- [8] McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp R L, *et al.* Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis[J]. Journal of the National Cancer Institute,2005,97(24):1808—1815.
- [9] 余鑫鑫,陈阳,阎红琳,等. 不同 ALK 一抗稀释度在 Ventana 免疫组化平台染色效果的比较[J]. 诊断病理学杂志,2020,27(7):521—522.
- [10] Parker R L, Huntsman D G, Lesack D W, *et al.* Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray [J]. Am J ClinPathol, 2002,117(5):723—728.
- [11] Wasielewski V R, Mengel M, Wiese B, *et al.* Tissue array technology for testing interlaboratory and interobserver reproducibility of immunohistochemical estrogen receptor analysis in a large multicenter trial[J]. Am J ClinPathol, 2002,118(5):675—682.
- [12] 周航波,马恒辉,周晓军. 应用高温高压抗原修复提高第一抗体稀释度[J]. 临床与实验病理学杂志,2009,25(6):670—671.
- [13] 蒋春霞,潘连军. 雌激素受体在雄性生殖系统中的分布及其对雄性生殖的作用[J]. 中华男科学杂志,2007,13(6):550—552.
- [14] 王强,钱文溢,刘景丽,等. ER α 基因敲除小鼠的繁育及子代小鼠基因型的鉴定[J]. 中国实验动物学报,2011,

- 19(2):100—103.
- [15] Couse J F, Hewitt S C, Bunch D O, *et al.* Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors α and β [J]. *Science*, 1999, 286(5448):2328—2331.
- [16] Csaba G, Inczeffi-Gonda A. Imprinting of thymic glucocorticoid receptor and uterine estrogen receptor by a synthetic steroid hormone at different times after birth[J]. *Gen Pharmac*, 1998, 30(5):685—687.
- [17] 熊正文. 免疫组织化学技术中抗原修复的研究进展[J]. *中华病理学杂志*, 1997, 30(5):124—125.
- [18] Jackson P, Gandy M. Quality assurance in immunocytochemistry[M]//*Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Essential Methods*, Second Edition. London: Simon Renshaw, 2017:123—155.
- [19] Barnes D M, Millis R R, Beex L V, *et al.* Increased use of immunocytochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(11):1677—1682.
- [20] 李飞虹, 高崑. 研究生应用免疫组化技术的质控与标准化[J]. *广东医学院学报*, 2008, 26(2):218—220.
- [21] 柯晨, 程安春, 汪铭书, 等. 检测鸭甲型肝炎病毒 3 型的免疫组织化学方法的建立和应用[J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(10):1013—1020.
- [22] Bancroft J D, Gamble M. 组织学技术的理论与实践[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2010:375—405.
- [23] Bigbee J W, Kosek J C, Eng L F. Effects of primary antiserum dilution on staining of 'antigenrich' tissues with the peroxidase antiperoxidase technique[J]. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1977, 25(6):443—447.
- [24] 周小鸽. 免疫组化染色过程中存在的问题及对策[J]. *诊断病理学杂志*, 2004, 11(4):211—213.

Effects of different concentrations of antibody on immunohistochemical staining of estrogen receptor in testicle of plateau zokor

BAO Ming-fang, AN Kang, TAN Yu-chen, WANG Yan-li, YAO Bao-hui, KANG Yu-kun, ZHANG Cai-jun, SU Jun-hu*

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Gansu Agricultural University-Massey University Research Centre for Grassland Biodiversity, Lanzhou 730070, China)

Abstract:【Objective】This research aimed to determine the appropriate antibody concentration for immunohistochemical staining of estrogen receptor (ER) in testes of plateau zokor (*Eospalax baileyi*). 【Method】We selected the testes of 10 adult male plateau zokors were selected to detect the staining effect of estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor β (ER β) at three different dilution concentrations: 1:150, 1:200, and 1:250 using the immunohistochemical SP method (IHC SP method). 【Result】The mean immunohistochemical optical density of ER α antibody diluted at 1:250 was significantly higher than that of antibody diluted at 1:150 and 1:200 ($P < 0.05$). In contrast, the immunohistochemical mean optical density of ER β antibody diluted at 1:200 was the highest ($P < 0.01$). At the optimal dilution concentration, positive cells exhibited intense staining with a clear background. 【Conclusion】For the testes of plateau zokors, the ideal antibody concentrations for ER α and ER β were found to be 1:250 and 1:200, respectively, as these concentrations yielded the best immunohistochemical staining effects.

Key words: immunohistochemical technique(IHC-SP method); antibody concentration; estrogen receptor