

一种酚氧化酶原组织定位的胶体金标记免疫电镜方法^{*}

冯从经^{**} 吕文静

(扬州大学园艺与植物保护学院植物保护系 扬州 225009)

A method for tissue localization of prophenoloxidase based on colloidal gold labeled immunoelectron microscopy. FENG Cong-Jing^{**}, LV Wen-Jing (Department of Plant Protection, College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract A modified immunogold-labeling technique based on Epon 812 embedding specimen was used to localize prophenoloxidase (PPO) in the midgut and integument tissue from the 5th instar larvae of *Ostrinia furnacalis* Guenée. The mouse anti-*O. furnacalis* PPO serum prepared in our laboratory was used as primary antibody and colloidal gold labeled goat anti-mouse IgG as the secondary antibody. Bis (acetato) dioxouranium and lead citrate were used in the staining system. Both the labeling specific and resolution of electron microscopy were improved.

Key words *Ostrinia furnacalis*, prophenoloxidase, colloidal gold, immunoelectron microscopy

摘 要 以亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 5 龄幼虫的中肠和体壁组织为材料,采用 Epon 812 常规包埋方法,以作者实验室制备的酚氧化酶原多克隆抗体为一抗、胶体金标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,采用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色体系,建立一种胶体金标记的特异性强且超微结构保存较好的亚洲玉米螟幼虫体内中酚氧化酶原免疫电镜定位方法。

关键词 亚洲玉米螟, 酚氧化酶原, 胶体金, 免疫电镜

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是节肢动物先天性免疫系统最重要的酶之一^[1],通常以其酶原酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)形式存在,经过丝氨酸蛋白酶有限的蛋白水解作用而激活为 PO^[2]。PO 参与了昆虫其它许多重要生理过程,如表皮硬化、卵壳鞣化、伤口愈合和对病原微生物和寄生物的包裹作用等^[3],最近 Tsao 等还认为 PPO 与白腹丛蚊 *Armigeres subalbatus* 的形态发生有关^[4]。

目前,已经在虾、蟹等节肢动物的不同组织^[5]和多种昆虫的血细胞及血清中检测到 PO 活性^[2]。在冈比亚安蚊 *Anopheles gambiae* 中肠组织^[6]和外寄生蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒液^[7]中也发现 PO 活性。然而有关 PPO 的产生、转运机制及其表达的动态变化尚存在争论^[8,9]。

Feng 等^[9]和 Charalambidis 等^[10]分别采用

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 和地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 血细胞中的 PPO 和 PO 进行了定位研究,但对其它组织中进行 PPO 定位检测时,免疫荧光标记的组织化学方法分辨率显得不足,难以得到理想结果。免疫电镜技术(immunoelectron microscopy, IEM)是在免疫组织化学技术的基础上发展起来的在超微结构水平上定位、定性及半定量抗原的技术方法。胶体金是目前应用最广的免疫电镜标记物,用于细胞表面和细胞内多种抗原的精确定

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(30571248),“973”计划(2006CB102002),扬州大学科技创新培育基金(2008CXJ028)。

^{**} E-mail: fengcj@yzu.edu.cn

收稿日期:2009-06-02, 修回日期:2009-06-23

位。作者从我国主要粮食害虫亚洲玉米螟幼虫血清中纯化得到 PPO,制备了 PPO 的多克隆抗体,采用改良的胶体金标记法进行亚洲玉米螟幼虫体内 PPO 免疫电镜组织定位研究,为明确 PPO 在昆虫体内的合成转运机制研究提供了重要依据,该方法也可为其他昆虫体内酶的组织或细胞定位研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

亚洲玉米螟幼虫在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度 $>80\%$ 和光周期 L:D = 14 h:10 h 的温室条件下按周大荣等^[11]方法,采用半人工饲料进行饲养;PPO 抗血清制备按冯从经等^[12]方法,通过免疫 Balb/c 小鼠制得;10 nm 金标羊抗鼠 IgG 购自上海史瑞可生物技术公司。其它所用试剂为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 取样与固定 参照夏快飞等^[13]的方法略有修改。取解剖好的亚洲玉米螟 5 龄幼虫中肠和体壁组织放入 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 充分洗涤,再用双蒸水充分洗涤。将组织投入固定液 (0.01 mol/L PBS, 4% 多聚甲醛, 0.05% 戊二醛, pH 7.2, 现配现用) 中 4°C 下固定过夜。

1.2.2 脱水与包埋 0.01 mol/L PBST (0.01 mol/L PBS, pH 7.2; 0.1 mol/L NaCl; 0.02% Tween-20) 洗涤样品标本 3 次,每次 15 min,充分洗涤后 4°C 下系列乙醇脱水 (30% 乙醇 45 min; 50% 乙醇 15 min; 70% 乙醇 15 min; 80% 乙醇 15 min; 90% 乙醇 15 min; 95% 乙醇 15 min; 100% 乙醇 15 min),然后将组织浸入 100% 丙酮 30 min。再将组织浸于丙酮:Epon 812 (1:1) 混合液中 1 h,丙酮:Epon 812 (1:2) 混合液中 2 h,纯包埋剂 Epon 812 中 2 h。将组织放入包埋板,置恒温箱 37°C 24 h, 60°C 72 h。

1.2.3 切片与饰刻 从包埋板上取下组织,修成 2 mm^3 组织块,在超薄切片机上 (徕卡,德国) 进行超薄切片后,覆在 200 目镍网上。参地应用于细胞内各种生物大分子的定性、定位

照吴洪娟等^[14]的方法,将覆有切片的镍网浸于蒸馏水中 5 min。吸干水分后将切片朝下于 10% 的 H_2O_2 中蚀刻 5 min,再吸干 H_2O_2 ,在 PBST 中洗涤 3 次。

1.2.4 胶体金标记 用封阻液 (PBST, 0.2 mmol/L 甘氨酸, 1% 牛血清白蛋白, pH 7.2) 室温封阻切片 30 min。PBST 洗涤 3 次,加含 1% 牛血清白蛋白的 PBST (pH 7.2) 稀释抗血清 (1:50),于 37°C 温育 2 h。PBST 洗涤 3 次,用封阻液室温封阻 30 min。PBST 洗涤后,加入含 1% 牛血清白蛋白的 PBST (pH 7.2) 稀释后的 10 nm 金标羊抗鼠 IgG (1:20) 适量,于 37°C 温育 1 h。双蒸水充分洗涤,自然干燥。

1.2.5 染色与电镜拍照 切片经 2% 的醋酸双氧铀室温避光染色 60 min,再用 10% 柠檬酸铅室温避光染色 10 min。双蒸水充分洗涤,充分干燥后采用 Tecnai 12 透射电子显微镜观察并拍照。对照组包埋前处理步骤及包埋步骤与处理组相同,修块并做超薄切片后,覆在铜网上直接经 2% 的醋酸双氧铀室温避光染色 40 min, 10% 柠檬酸铅室温避光染色 20 min,再用双蒸水充分洗涤、干燥,采用 Tecnai 12 透射电子显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

检测结果显示,在亚洲玉米螟 5 龄幼虫的中肠细胞内存在胶体金标记颗粒,胞质内可见致密的质地均匀、大小一致、圆形黑色金颗粒,多散布在胞质中,有些呈团状或点状分布 (图 1A)。在阴性对照的中肠组织切片中,则没有发现胶体金颗粒沉积 (图 1B)。同样,在幼虫体壁组织中均可见电子密度高而清晰的圆形金颗粒,聚集的胶体金颗粒清晰可见,背景清洁,无非特异性散在颗粒,呈小团状或点状分布在体壁细胞内 (图 1C),而在阴性对照的体壁组织切片中没有发现胶体金颗粒 (图 1D)。

3 讨论

胶体金免疫电镜技术自产生以来已被广泛及抗原特异性等方面的研究。通过不断改进,

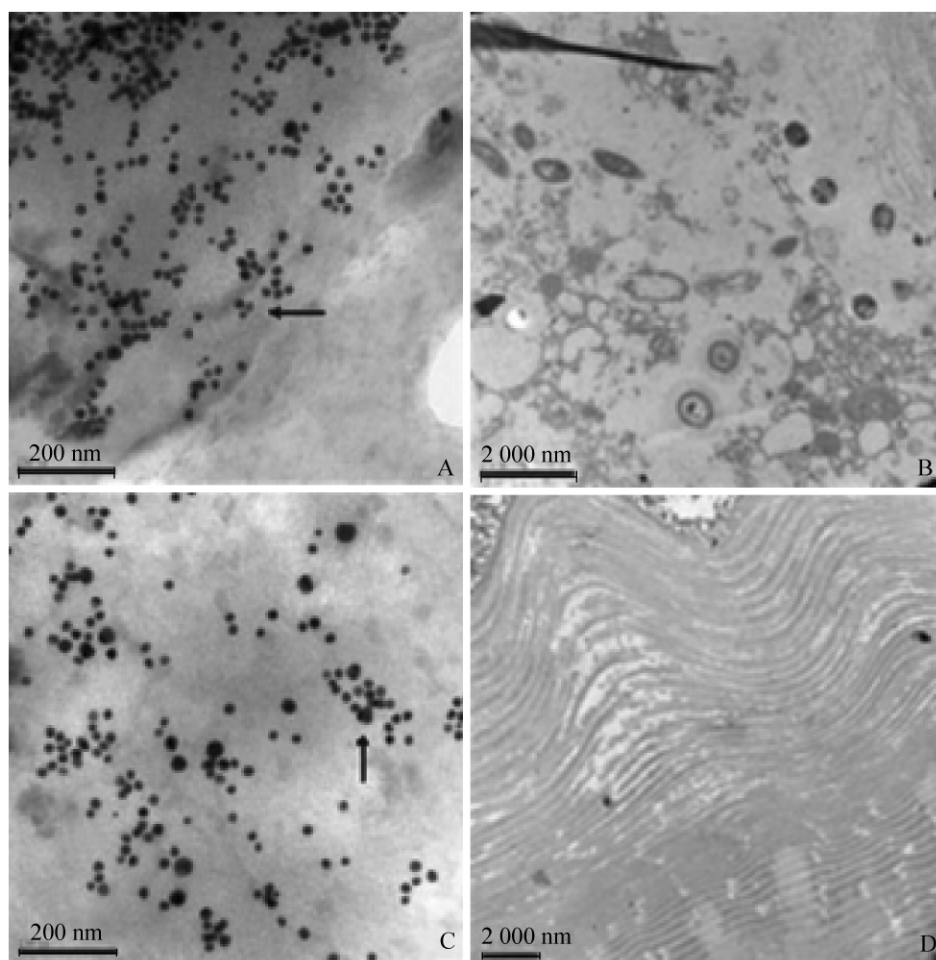


图1 亚洲玉米螟5龄幼虫中肠和体壁组织中PPO胶体金标记的免疫电镜检测

A. 中肠组织中胶体金标记的PPO分布(97 000×),箭头所示为组织中PPO被标记的胶体金颗粒(下同) B. 中肠组织的阴性对照(9 700×) C. 体壁组织中胶体金标记的PPO分布(97 000×) D. 体壁组织的阴性对照(9 700×)

作者采用包埋后染色的胶体金免疫电镜技术很好地标记细胞中各部分PPO抗原,其阳性结果可靠,重复性高。作者在固定样品标本时,采用4%多聚甲醛加0.05%的戊二醛固定新鲜样本,取得良好效果。标本固定于4%多聚甲醛加0.05%戊二醛溶液中,既不破坏组织的超微结构,又可保持组织的抗原性。标本固定后必须彻底洗净,因标本经醛类固定剂固定后一般都有残留的自由醛基,这种自由醛基较为活泼,可与各种抗体的 ϵ -氨基结合,导致难以清除的非特异性染色,因而标本固定后必须彻底清洗干净。通常采用0.01 mol/L pH 7.2~7.4的PBS清洗12 h以上,有时为了缩短清洗时

间,可用甘氨酸、赖氨酸、氯化铵或硼氢化钠等试剂对自由醛基进行阻断。另外,在系列体积分数的乙醇脱水时,如样品标本需过夜,则必须停留在70%的乙醇中次日方可继续实验。

作者采用最常用的电镜包埋剂Epon 812,它要求标本在包埋前必须彻底脱水,一般还需要在60℃聚合,因此,对抗原性往往有较大的破坏。为了减少对组织抗原性的破坏,以获得很强的阳性染色结果,刘津平等^[15]应用低温包埋剂透明合成树脂及水溶性包埋剂(乙二醇甲酯),这种方法有利于组织抗原性的保存,但是需要特殊的冷冻切片或冷冻置换装置,费用高,难度大,而且组织超微结构保存欠佳、反差弱。

冰晶的大量出现使超微结构的识别无法进行,有时为了避免冰晶的出现,只能使用非常烦琐的振动切片机切片^[16]。

采用 10% H_2O_2 来蚀刻超薄切片,目的是使组织细胞内的抗原从包埋剂中裸露出来,但蚀刻包埋剂时无法使组织细胞内抗原和超微结构不受 H_2O_2 损伤,尤其是当细胞内的待测抗原量少时,会造成胶体金标记不佳或标记失败。李少玲等利用过碘酸代替 H_2O_2 蚀刻超薄切片,对人肺癌细胞和小鼠子宫内膜细胞内的 4 种抗原进行 5 nm 胶体金标记试验,成功率和反复性良好^[17]。过碘酸与 H_2O_2 的区别在于产生氧化作用时 H_2O_2 不但氧化组织结构固有的醛基,而且对作用后新形成的醛基有继续氧化作用,过碘酸则对新形成的醛基不再氧化。为了增强电子密度,一般都会在锇酸处理后用铀-铅染色,作者考虑到样品标本中 PPO 阳性产物可能非常弱,使用了醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,可能引起整个超微结构下背景的颜色加重,会影响免疫阳性反应的正确判断。另外,如果细胞中抗原成分较少时,可以采用银加强试剂盒(HQ Silver Kit)^[15],银离子可与重金属表面发生吸附,使金颗粒直径逐渐增至 10~30 nm,足以在电镜下清晰分辨。

作者采用胶体金标记免疫电镜技术对 PPO 在亚洲玉米螟幼虫体壁和中肠中的定位研究取得较满意结果,但是以金颗粒作为特异细胞成分的标记物,由于其本身的性质决定了该技术存在着一些不足之处:(1)在操作过程中要求清洁程度高;(2)胶体溶液的稳定性较差,胶体金溶液存放时间相对较短,保存时间半年到 1 年。包埋后染色的胶体金免疫电镜技术的成功与否往往不是单一的因素决定的。因此,试验的每一个步骤都必须注意,才能保证试验成功。在整个操作步骤中有许多细节值得注意:(1)在胶体金标记技术上,清洗是关键因素,所用器皿必须清洗干净且专用,所用的水必须纯净、无污染,所用溶液都必须新鲜配置。组织及切片的清洗一定要干净,以减少样品的非特异性吸附。(2)采用 10% 柠檬酸铅染色时,一定要

避光染色且在超薄切片周围撒少许 NaOH,并且不要对着切片呼吸,否则会影响染色的效果。染色后的洗涤也须充分,否则会影响拍照效果。(3)样品标本组织块大小应控制在 2~3 mm³,以保证充分固定;(4)所使用的清洗液的 pH 值一定要精确;(5)一般在检测某种新的抗原时,须通过方阵滴定来确定一抗及金标抗体的稀释度^[18]。(6)切片孵育过程需在湿盒内进行,使载网保持湿润。

致 谢 扬州大学测试中心陈永芳老师、生物科学与技术学院韦存虚博士为本研究提供帮助,一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Cerenius L., Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 2004, **198**: 116 ~ 126.
- 2 Ashid M. The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res. Immunol.*, 1990, **141**: 908 ~ 910.
- 3 Christensen B. M., Li J., Chen C. C., et al. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 2005, **21**: 192 ~ 199.
- 4 Tsao L. Y., Lin U. S., Christensen B. M., et al. *Armigeres subalbatus* prophenoloxidase III: cloning, characterization and potential role in morphogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**: 96 ~ 104.
- 5 Wang Y. C., Chang P. S., Chen H. Y. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2006, **20**: 414 ~ 418.
- 6 Paskewitz S. M., Brown M. R., Collins F. H., et al. Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*. *J. Parasitol.*, 1989, **75**: 594 ~ 600.
- 7 Abt M., Rivers D. B. Characterization of phenoloxidase activity in venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis*. *J. Inverteb. Pathol.*, 2007, **94**(2): 108 ~ 118.
- 8 Sidjanski S., Mathews G. V., Vanderberg J. P. Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J. Parasitol.*, 1997, **83**: 686 ~ 691.
- 9 Feng C. J., Fu W. J. Tissue distribution and purification of prophenoloxidase in larvae of Asian Corn Borer, *Ostrinia*

- furnacalis* Guenée. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2004, **36**: 360 ~ 364.
- 10 Charalambidis N. D., Foukas L. C., Zervas C. G., *et al.* Hemocyte surface phenoloxidase (PO) and immune response to lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, **26**(8~9): 867 ~ 874.
- 11 周大荣, 剧正理, 刘宝兰, 等. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报, 1980, **7**(2): 113 ~ 122.
- 12 冯从经, 董长生, 吕文静, 等. 亚洲玉米螟幼虫血淋巴中酚氧化酶原的多克隆抗体制备及免疫学特性分析. 植物保护学报, 2009, **36**(2): 157 ~ 162.
- 13 夏快飞, 徐信兰, 叶秀麟, 等. 一种可用于分析水稻花药中钙调素蛋白分布的胶体金免疫电镜标记技术. 广西植物, 2006, **26**(1): 85 ~ 87.
- 14 吴洪娟, 王尊哲, 周力. 免疫电镜胶体金标记技术应用中关键环节的处理. 潍坊医学院学报, 2003, **25**(4): 261 ~ 262.
- 15 刘津平, 贾轶, 刘莹莹, 等. 包埋前 ABC 法和纳米金银加强法双重标记技术在免疫电镜中的应用. 中国神经科学杂志, 2002, **18**(4): 728 ~ 731.
- 16 赖红, 高杰, 金大成, 等. 冰冻切片进行免疫电镜的新尝试. 解剖学报, 2003, **34**(4): 440.
- 17 李少玲, 张向红, 郝晶, 等. 改良的免疫电镜胶体金技术. 山东医科大学学报, 2000, **38**(2): 24.
- 18 陆珍凤, 周晓军, 石群立, 等. 免疫电镜染色技术中存在的问题及对策. 2004, **11**(4): 278 ~ 279.