

В.В.Гусельникова, Д.Э.Коржевский

СПОСОБ УСИЛЕНИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АМПЛИФИКАЦИИ ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы
(зав. — проф. РАН Д.Э.Коржевский), отдел общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной
медицины», Санкт-Петербург

Цель работы состояла в разработке простого и эффективного способа конвертации иммунопероксидазной реакции в иммунофлюоресцентную. Показано, что использование конъюгированных с флюорохромом антител к пероксидазе хрена позволяет существенно повысить интенсивность иммунофлюоресцентной реакции по сравнению с непрямой методом Кунса, что подтверждается данными количественной оценки интенсивности флюоресценции. Разработанный метод конвертации не требует введения в протокол множества дополнительных этапов и замены используемых реактивов, обеспечивая тем самым легкий переход от отработанной иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной.

Ключевые слова: *иммунопероксидазная реакция, иммунофлюоресценция, конвертация, амплификация*

Постановка иммуноцитохимических реакций для флюоресцентной визуализации изучаемых маркеров имеет особенности по сравнению с распространенными иммуногистохимическими методами (с ферментной меткой), применяемыми для обычной световой микроскопии. Главная из этих особенностей — малая чувствительность реакций иммунофлюоресценции по сравнению с широко применяемыми в гистологической практике авидин-биотиновыми полимерными и мультимерными системами амплификации иммунопероксидазной реакции [3]. Данная особенность обуславливает основные трудности, с которыми исследователи сталкиваются, пытаясь, в соответствии с поставленными задачами, осуществить переход от иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной. Так, если при постановке иммуноцитохимической реакции с использованием пероксидазной метки и одного из стандартных иммуногистохимических наборов получают препараты хорошего качества с отчетливо различимыми иммунопозитивными структурами, а при использовании с этими же первичными антителами соответствующих вторичных антител, связанных с флюорохромом, флюоресцентная метка не выявляется, то наиболее вероятной причиной неудачи является низкая чувствительность иммунофлюоресцентной реакции. Повысить чувствительность реакции при подготовке препаратов для флюоресцентной и конфокальной микроскопии можно разными способами. Например, в некоторых случаях положительный эффект дает проведение пролонгированного теплового демаскирования антигена, однако введение в протокол данной процедуры требует наличия специальных буферных растворов, что значительно увеличивает общее время обработки препаратов и, кроме того, может отрицательно сказаться на качестве препаратов, приводя к отклеиванию срезов от предметных стекол и изменяя свойства тканей в отношении восприятия гематоксилина, который используется для их докрашивания. В случае высокой концентрации изучаемого

антигена в клетке хороших результатов позволяет добиться увеличение продолжительности инкубации срезов с первичными антителами до нескольких суток [3]. Повысить чувствительность иммунофлюоресцентной реакции можно также с помощью метода стрептавидиновой амплификации с применением конъюгатов стрептавидина с флюорохромом. Однако по чувствительности реакции данный метод уступает аналогичному методу авидин-биотиновой амплификации, применяемому в комбинации с пероксидазной меткой для световой микроскопии. Кроме того, использование стрептавидина, конъюгированного с флюорохромом, приводит к увеличению числа этапов обработки препаратов и требует введения дополнительного этапа блокировки эндогенных локусов связывания авидина и биотина [4].

Наиболее эффективным способом, применяемым для перехода от иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной, является использование тирамидной амплификации пероксидазной реакции [13]. Данный метод позволяет значительно повысить чувствительность реакции, однако имеет существенный недостаток, который состоит в перифокальной диффузии комплекса тирамид—флюорохром от места локализации антигена. Такой недостаток существенно ограничивает применение данного метода, который может быть использован только в случае изучения сравнительно далеко отстоящих друг от друга дискретных структур [4]. В связи с этим существует необходимость в разработке более простого методологического подхода, который, с одной стороны, мог бы быть применен для конвертации иммунопероксидазной реакции в иммунофлюоресцентную без смещения метки от места локализации антигена, а с другой стороны позволял бы существенно амплифицировать сигнал и повысить интенсивность иммунофлюоресцентной реакции, обеспечив легкий переход от отработанной иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной.

Сведения об авторах:

Гусельникова Валерия Владимировна (e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru),

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

Целью данной работы стала разработка простого и надежного способа конвертации иммунопероксидазной реакции в иммунофлюоресцентную, позволяющего добиться результатов, сопоставимых по качеству выявляемости антигена с результатами, получаемыми при постановке иммунопероксидазной реакции, и при этом не требующего введения в протокол большого количества дополнительных этапов и замены используемых реактивов.

Материалом для исследования служили образцы головного мозга половозрелых крыс-самцов линии Вистар ($n = 5$) и образцы миокарда желудочков сердца ($n = 4$) людей (мужчин и женщин) в возрасте от 23 до 93 лет, умерших от различных заболеваний, из архива отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Института экспериментальной медицины». Образцы головного мозга были фиксированы в цинк-этанол-формальдегиде [5], образцы миокарда — в 10% растворе формалина. После фиксации и стандартной гистологической проводки образцы были залиты в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Menzel, Германия). После депарафинирования, регидратации и промывки в дистиллированной воде срезы подвергали обработке согласно протоколам, разработанным ранее для конкретных первичных антител. В представленной работе нами были использованы 2 варианта первичных антител к двум разным маркерам — триптазе тучных клеток (ТК) и нейрональному ядерному антигену NeuN. Выбор данных маркеров был обусловлен несколькими причинами, главная из которых — их высокая специфичность для конкретных клеточных типов и, как следствие, широкое использование соответствующих антител в практике научных и клинико-диагностических исследований [8, 10, 11]. Так, триптаза является специфической сериновой протеазой, содержащейся в гранулах ТК человека, и применяется в качестве основного маркера для их идентификации [12]. Белок NeuN локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства нейронов ЦНС млекопитающих, но не обнаруживается в глиоцитах, что обуславливает широкое использование NeuN в качестве универсального нейрон-специфического маркера [9]. Другой причиной, повлиявшей на выбор маркеров для данного исследования, стало наличие хорошо отработанных протоколов для первичных антител к триптазе и NeuN, позволяющих получать препараты высокого качества при постановке иммуногистохимической реакции для световой микроскопии [1, 2, 6, 7]. Согласно данным протоколам, в случае использования антител к NeuN (мышинные моноклональные — клон A60) (Chemicon, США; разведение 1:400) и антител к триптазе ТК человека (мышинные моноклональные — клон AA1), разведение производителя (Dako, Дания) срезы инкубируют с первичными антителами во влажной камере в течение 60 мин при температуре 40 °C без предварительного проведения теплового демаскирования антигена. В качестве вторичных реагентов в обоих случаях используют набор EnVision+System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания) или MACH2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (Biocare medical, США), которые представляют собой вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции применяют 3'-диаминобензидин (Dako, Дания).

В ходе решения задачи, связанной с переходом от иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной, нами предварительно был проведен анализ всех возможных вариантов манипуляций, позволяющих в случае использования флюоресцентной микроскопии получить результаты, сопоставимые по качеству окраски с результатами, получаемыми

при постановке иммунопероксидазной реакции. В результате данного анализа для проверки был выбран наиболее простой подход, который в случае успеха позволил бы осуществить эффективный переход от иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной при минимальной замене используемых реагентов. Данный подход основан на применении антител против пероксидазы хрена (HRP), конъюгированных с флюорохромом. Такие антитела должны быть использованы после обработки срезов вторичными антителами, конъюгированными с HRP, и логично предположить, что данный способ может быть более эффективен для решения проблемы амплификации сигнала иммунопероксидазной реакции по сравнению с непрямым методом Кунса, когда флюорохром конъюгирован непосредственно с вторичными антителами.

В ходе отработки протоколов для флюоресцентной микроскопии нами были внесены изменения в процедуру обработки препаратов первичными антителами к NeuN: дополнительно был введен этап непродолжительного (25 мин) теплового демаскирования антигена в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания), а также увеличено время инкубации срезов с первичными антителами (при уменьшении температуры инкубации). В результате для постановки реакции иммунофлюоресценции в случае использования антител к NeuN срезы инкубировали с первичными антителами во влажной камере в течение 72 ч при температуре 27 °C после предварительного проведения теплового демаскирования антигена. Режим обработки срезов в случае использования первичных антител к триптазе ТК не был изменен по сравнению с соответствующим протоколом (подробнее [1]), используемым для проведения иммунопероксидазной реакции.

После завершения времени инкубации срезов с первичными антителами и промывки в фосфатно-солевом буфере на препараты наносили вторичные антитела. При этом для каждого из использованных первичных антител параллельно ставили две реакции с разными вторичными антителами с целью сравнить интенсивность иммунофлюоресцентной реакции, получаемой в случае использования непрямого метода Кунса, с одной стороны, и метода с применением антител к HRP — с другой. Первый вариант использования вторичных антител состоял в обработке срезов кроличьими антимышиными антителами, конъюгированными с тетраметилродаминизоционатом (TRITC — разведение 1:20, Dako, Дания) в течение 90 мин при температуре 27 °C с последующей промывкой в дистиллированной воде и заключением в среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). Второй вариант заключался в том, что после отмывки срезов от первичных антител на них наносили необходимое количество реагента MACH2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (Biocare medical, США) и инкубировали во влажной камере в течение 40 мин при температуре 27 °C. После окончания времени инкубации и промывки срезов в фосфатно-солевом буфере на них наносили козы антитела против HRP, конъюгированные с флюорохромом Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Goat anti-horseradish Peroxidase, Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1:100) и оставляли при температуре 27 °C на 30 мин. Далее срезы промывали в дистиллированной воде и заключали в среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания).

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Leica DM2500 (Германия), оснащенного системой фильтров флюоресценции от 340 до 560 нм. Использовали возбуждающий фильтр BP = 515–560 нм (третий — «N2,1») и объективы N PLAN 40×/0,65 и N PLAN 63×/0,80. Фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры Leica DFC420 (Германия) при одинаковых условиях освеще-

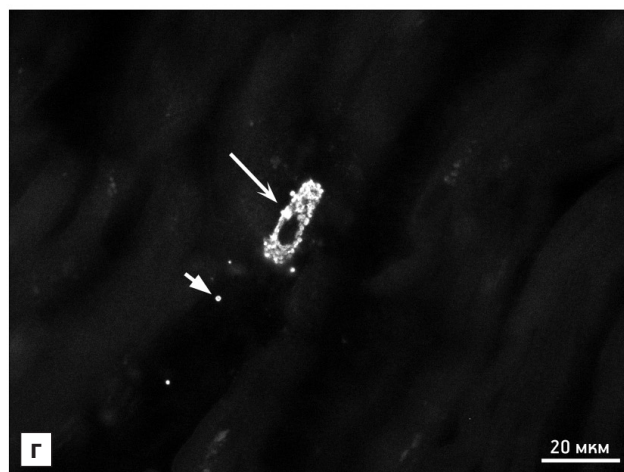
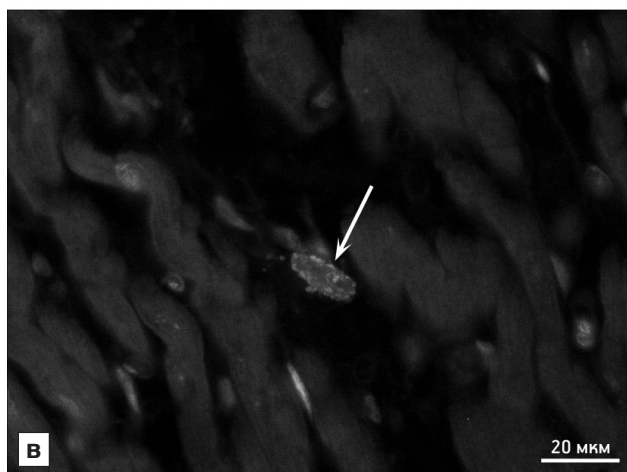
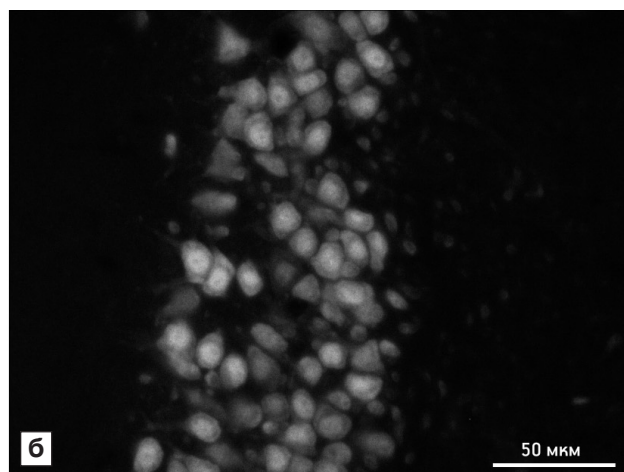
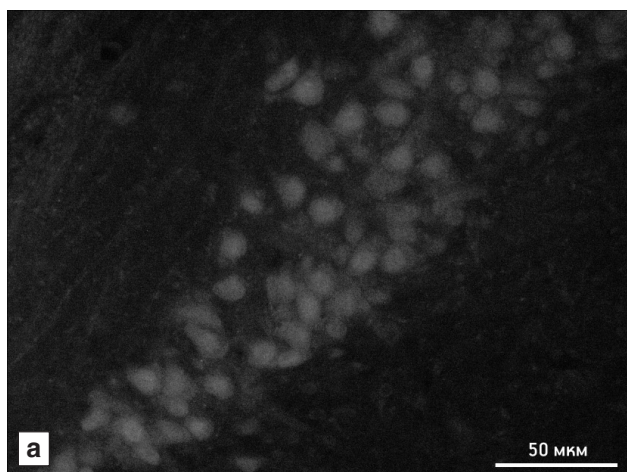
щения и настройках камеры. Обработку полученных изображений проводили, используя компьютерную программу Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems, Швейцария/Германия). Интенсивность флюоресценции (ИФ) в красном канале измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, США). Сравнение ИФ проводили в максимально ярких точках каждой микрофотографии. Величину ИФ, соответствующую яркости пикселя цифрового изображения, выражали в условных единицах (усл.ед.).

Сопоставление результатов, полученных при использовании разных вариантов обработки препаратов, показало, что ИФ, наблюдаемая при использовании антител к HRP, значительно превышает ИФ аналогичных структур, наблюдаемую при использовании вторичных антител, конъюгированных с TRITC. Так, при анализе препаратов мозга крысы, обработанных антителами к NeuN (рисунки а, б), было показано, что в случае использования (в качестве вторичных) антител, конъюгированных с TRITC, наблюдается очень низкая ИФ ядер и перинуклеарной цитоплазмы нейронов — 36 и 25 (усл.ед.) соответственно (см. рисунок, а). Границы ядер ней-

ронов при этом часто выглядели нечеткими, вследствие чего не всегда удавалось определить форму ядра. Несмотря на то, что ядро и перинуклеарная цитоплазма различались по ИФ, визуально разделить эти 2 клеточных компартмента часто не представлялось возможным вследствие низкого общего уровня флюоресценции (см. рисунок, а).

В случае применения метода конвертации с использованием антител к HRP (см. рисунок, б) полученная ИФ ядер нейронов гиппокампа (150 усл.ед.) была более чем в 4 раза выше значений, отмеченных при использовании непрямого метода Кунса. В данном случае при анализе нейронов СА3 поля гиппокампа границы ядер были четко различимы, а в ядрах некоторых нейронов контурировалось место локализации ядрышка (темный участок). Перинуклеарное пространство характеризовалось меньшей ИФ, чем ядро, однако в целом этот показатель в данном случае был также довольно высок (107 усл.ед.), что позволило визуально разделить 2 структурных компартмента нейрона — ядро и перинуклеарную цитоплазму (см. рисунок, б).

Аналогичные результаты были получены при использовании антител к триптазе ТК (см. рисунок, в, г). Анализ пре-



Применение разных способов обработки препаратов для проведения иммунофлюоресцентной реакции на NeuN и триптазу тучных клеток.

а, б — поле СА3 гиппокампа мозга крысы, иммуноцитохимическая реакция на нейрональный ядерный маркер NeuN. Объектив N PLAN 40×/0,65; в, г — миокард желудочка сердца человека, иммуноцитохимическая реакция на триптазу тучных клеток человека. Объектив N PLAN 63×/0,80; а, в — результат использования в качестве вторичных реагентов антител, конъюгированных с тетраметилродаминизоционатом; б, г — результат использования антител к пероксидазе хрена, конъюгированных с флюорохромом Су3. Длинная стрелка — триптаза-иммунопозитивная тучная клетка; короткая стрелка — триптаза-иммунопозитивная гранула, расположенная вне цитоплазмы тучной клетки

паратом миокарда человека показал, что при использовании вторичных антител, конъюгированных с TRITC, ИФ ТК была низкой (39 усл.ед.) и практически не отличалась от интенсивности фоновой флюоресценции мышечной ткани (см. рисунок, в). Это сильно усложняло идентификацию ТК, которые в данном случае могли быть обнаружены только при использовании большого увеличения микроскопа (объектив не менее 63). При этом идентифицировать удавалось только те ТК, которые располагались в крупных межмышечных прослойках соединительной ткани или вокруг кровеносных сосудов, в то время как ТК в тонких межмышечных прослойках были практически неразличимы из-за сильной фоновой флюоресценции окружающей мышечной ткани и коллагеновых волокон. Границы гранул, расположенных в цитоплазме ТК, не определялись, вследствие чего их цитоплазма выглядела однородной. Гранулы, находящиеся за пределами ТК, удавалось идентифицировать крайне редко также вследствие низкой интенсивности их флюоресценции (см. рисунок, в).

В случае применения метода конвертации с использованием антител к HRP удалось получить высокую ИФ гранул ТК (159 усл.ед.) при практически полном отсутствии флюоресценции мышечной ткани (см. рисунок, г). Это позволило легко идентифицировать ТК уже при малом увеличении микроскопа. При большом увеличении (объективы 40, 63) в цитоплазме ТК были видны границы триптаза-иммунопозитивных гранул, несмотря на плотное их расположение. Хорошо выявлялись гранулы, лежащие за пределами ТК (см. рисунок, г, короткая стрелка).

Таким образом, в результате данной работы был разработан простой и надежный способ конвертации иммунопероксидазной реакции в иммунофлюоресцентную, основанный на использовании антител к HRP, конъюгированных с флуорохромом. Данный метод позволяет легко перейти от иммунопероксидазной реакции к иммунофлюоресцентной посредством введения одного дополнительного этапа на конечной стадии обработки препаратов и при этом обеспечивает получение результатов, сопоставимых по качеству выявляемости антигена с результатами, получаемыми при постановке иммунопероксидажной реакции. ИФ в данном случае значительно превосходит получаемую при использовании непрямого метода Кунса. В отличие от метода тирамидной амплификации предложенный способ конвертации иммунопероксидажной реакции позволяет избежать смещения (диффузии) метки от места локализации антигена и благодаря этому может быть использован для идентификации близко расположенных относительно друг друга малых структур (например цитоплазматических гранул). Описанный способ конвертации требует минимальной замены реагентов и может быть использован без внесения существенных изменений в протокол, разработанный для постановки иммунопероксидажной реакции.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусельникова В.В., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф. и др. Гистохимическая и иммуногистохимическая идентификация тучных клеток миокарда человека // *Морфология*. 2015. Т. 147, вып.2. С. 80–86.
2. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Карпенко М.Н. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство). СПб.: СпецЛит, 2012.
3. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство) / Под ред. Д.Э. Коржевского. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2014.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Молекулярная морфология. Методы флюоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. СПб.: СпецЛит, 2014.
5. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // *Морфология*. 2013. Т. 143, вып.2. С. 81–85.
6. Сухорукова Е.Г. Ядерный белок NeuN в нейронах черного вещества головного мозга человека // *Морфология*. 2013. Т. 143, вып.2. С. 78–80.
7. Сухорукова Е.Г., Кирик О.В., Зеленкова Н.М., Коржевский Д.Э. Нейрональный ядерный антиген NeuN — показатель сохранности нервной ткани и пригодности ее для иммуногистохимического исследования // *Мед. академ. журн*. 2015. Т. 15, № 1. С. 63–67.
8. Alekseeva O.S., Gusel'nikova V.V., Beznin G.V., Korzhevskii D.E. Prospects of the nuclear protein NeuN application as an index of functional state of the vertebrate nerve cells // *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol*. 2015. Vol. 51, № 5. P. 313–323.
9. Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN As a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker // *Acta Naturae*. 2015. Vol. 7, № 2. P. 42–47.
10. Ibaraki T., Muramatsu M., Takai S. et al. The relationship of tryptase- and chymase-positive mast cells to angiogenesis in stage I non-small cell lung cancer // *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2005. Vol. 28, № 4. P. 617–621.
11. Ranieri G., Ammendola M., Patruno R. et al. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients // *Int. J. Oncol*. 2009. Vol. 35, № 1. P. 115–120.
12. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine // *Mol. Immunol*. 2015. Vol. 63, № 1. P. 18–24.
13. Wang G., Achim C.L., Hamilton R.L. et al. Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy // *Methods*. 1999. Vol. 18, № 4. P. 459–464.

A METHOD FOR THE ENHANCEMENT OF IMMUOFLUORESCENCE USING THE AMPLIFICATION OF AN IMMUNO-PEROXIDASE REACTION

V.V. Gusel'nikova, D.E. Korzhevskiy

The study was aimed to develop a simple and efficient method to convert immunoperoxidase reaction into immunofluorescent one. The study showed that the use of fluorochrome-conjugated antibodies against horse radish peroxidase significantly enhanced the intensity of immunofluorescent reaction as compared to Coons' indirect method, which was confirmed by the data of quantitative evaluation of fluorescence intensity. The developed method of conversion does not require an introduction into the protocol of a variety of additional steps or replacement of the reagents used, thus providing an easy transition from the immunoperoxidase reaction to the immunofluorescent one.

Key words: immunoperoxidase reaction, immunofluorescence, conversion, amplification

Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg