

А.В. Гиляров, О.В. Кирик и Д.Э. Коржевский

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ АНТИГЕНОВ ПРИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы
(руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург)

В иммуноморфологических исследованиях нередко возникает необходимость одновременного выявления нескольких антигенов в пределах одного гистологического препарата. Однако применение двойного маркирования на практике зачастую ограничено методическими сложностями. Цель настоящей работы состояла в воспроизведении различных приемов, рекомендованных при проведении двойной иммуногистохимической реакции на одном срезе и в оценке их преимуществ и недостатков. Исследованы 6 методических подходов к выявлению нескольких антигенов. Показано, что наиболее широкие возможности для анализа представляют флуоресцентные методики детекции, наиболее удобным является использование готовых стандартизированных реагентов, а самой дешевой — двухцветная реакция с хромогеном на основе диаминобензидина.

Ключевые слова: иммуногистохимия, антигены, сочетанная локализация, конфокальная микроскопия.

В иммуноморфологических исследованиях нередко возникает необходимость одновременного выявления нескольких антигенов в пределах одного гистологического препарата. Двойная (иногда тройная и более) метка используется для одновременного выявления различных популяций клеток [7, 10], при определении клеток, находящихся в различных функциональных состояниях [16], при установлении сочетанной локализации нескольких антигенов [9] и в других случаях, когда постановка реакций на соседних срезах не позволяет получить ответ на поставленные исследователем вопросы.

Ряд технических приемов для решения задачи одновременного выявления двух антигенов были разработаны довольно давно [11, 12]. Тем не менее, в научных исследованиях и в морфологической диагностике такие методы применяются редко, что связано и с большой трудоемкостью этих методов, и с малой доступностью (из-за высокой стоимости) соответствующих стандартизированных сывороток. Кроме того, не вполне понятно, насколько удобны и эффективны в практическом применении предлагаемые различными производителями оптимизированные наборы реагентов, предназначенные для двойного маркирования антигенов.

Цель настоящей работы состояла в использовании различных приемов, рекомендованных при проведении двойной иммуногистохимической реакции на одном срезе и в оценке преимуществ

и недостатков различных способов выявления нескольких антигенов на одном препарате.

Исследование проведено на головном мозгу половозрелых лабораторных крыс-самцов ($n=10$) и эмбрионах крысы ($n=5$) [6]. При содержании животных и их умерщвлении руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [3] и заливали в парафин по общепринятой методике.

В срезах головного мозга толщиной 5 и 7 мкм выявляли ядерные (NeuN, PCNA) и цитоплазматические (нестин, виментин, глиальный фибриллярный кислый белок — GFAP, даблкортин — DCX) антигены. Информация об использованных реагентах приведена в таблице. Контроль специфичности иммуноцитохимической реакции проводили с учетом общепринятых рекомендаций. В качестве дополнительного контроля при проведении двойного иммуномаркирования использовали разделное выявление исследованных антигенов в соответствии с ранее опубликованными протоколами [1, 2, 4–6].

Для конфокальной микроскопии использовали вторичные антитела, конъюгированные с тетраметилроданимиотиоцианатом (TRITC), биотином, стрептавидин, конъюгированный с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), набор флуоресцентных красителей «Zenon», конъюгированных с моно-

Использованные реагенты

Реагенты	Описание	Производитель
Первичные антитела	Мышиные моноклональные (клон А60) к NeuN (MAB 377); разведение 1:350, 1:400	Chemicon, США
	Мышиные моноклональные (клон Rat-401) к нестину (#556309); разведение 1:400	BD Pharmingen, США
	Мышиные моноклональные (клон PC10) к PCNA; разведение производителя	Dako, Дания
	Мышиные моноклональные (клон V9) к виментину (M0725); разведение 1:100, 1:200	Dako, Дания
	Кроличьи поликлональные к GFAP (N1506); разведение производителя	Dako, Дания
	Кроличьи поликлональные к DCX (ab18723); разведение 1:500	AbCam, Великобритания
Вторичные реагенты	Набор EnVision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001)	Dako, Дания
	Набор LSAB2 System-HRP (K0679)	Dako, Дания
	Набор LSAB+ System-AP (K0678)	Dako, Дания
	Набор MACH2 Double Stain Kit #1 (MRCT523G)	BioCare, США
	Кроличьи антимышиные антитела, меченные TRITC (R0270)	Dako, Дания
	Свиньи антикроличьи антитела, меченные TRITC (R0156)	Dako, Дания
	Козьи антимышиные антитела, меченные биотином (B-6398)	Sigma, США
	Набор Zenon Tricolor Mouse IgG ₁ Labeling Kit#1 (Z25060)	Molecular Probes, США
Стрептавидин, меченный FITC (F0422)	Dako, Дания	
Хромогены и прочие реагенты	Хромоген 3'3'-диаминобензидин (DAB+) (K3468)	Dako, Дания
	Хромоген «Fuchsin+» (в наборе K0678)	Dako, Дания
	Денатурирующий набор (DNS001H)	BioCare, США
	Флюоресцентный краситель NeuroTrace – deep red (N21483)	Molecular Probes, США
	Трис-солевой буфер (S3001)	Dako, Дания
	Мышиная сыворотка (X0910)	Dako, Дания
	Хлорид никеля	Вектон, Россия
	Фосфатно-солевой буфер (PBS) таблетированный (0,01 М; pH 7,4)	Биолот, Россия

валентным Fab-фрагментом (см. таблицу). Ядра докрашивали флюоресцентным красителем Neuro Trace. Полученные препараты исследовали при помощи конфокальных микроскопов Leica TCS SL, Leica TCS SPE (Leica, Германия) и LSM 510 Meta (Zeiss, Германия). Флюоресценцию индуцировали лазерами с длиной волны 488, 543, 563 и 633 нм.

Были использованы следующие протоколы.

Протокол 1. Выявление двух антигенов первичными антителами различной видовой принадлежности с последовательным использованием двух вторичных антител и различных ферментных меток.

После инкубации в смеси первичных мышинных моноклональных и кроличьих поликлональных антител обработку вторичными реагентами проводили в два этапа: 1) срезы обрабатывали вторичными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HPR) (набор

EnVision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse). Реакцию визуализировали с помощью хромогена 3'3'-диаминобензидина (DAB+); 2) на срезы наносили вторые вторичные (антикроличьи) антитела, конъюгированные с биотином. После этого срезы инкубировали с реагентом Streptavidin-AP из набора LSAB+. Продукт реакции (щелочную фосфатазу — AP) визуализировали с помощью хромогена «Fuchsin+» (см. таблицу).

Протокол 2. Выявление двух антигенов первичными антителами различной видовой принадлежности с одновременным использованием двух вторичных антител, конъюгированных с различными ферментными метками.

После инкубации в смеси первичных мышинных моноклональных и кроличьих поликлональных антител срезы обрабатывали реагентом MACH2 Double Stain Kit#1, который содержит смесь вторичных козьих антимышиных антител, конъюги-

рованных с AP, и козьих антикроличьих антител, конъюгированных с HRP. Результат реакции визуализировали последовательно с помощью хромогенов «DAB+» и «Fuchsin+».

Протокол 3. Последовательное выявление двух антигенов первичными антителами одинаковой видовой принадлежности с химическим и термическим удалением иммуноглобулинов и использованием вторичных антител, конъюгированных с различными ферментными метками (двойное мечение с элюированием [8]).

Первоначально срезы инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами, затем обрабатывали с помощью реагента «EnVision+ / HRP» и визуализировали реакцию при помощи хромогена «DAB+». Затем срезы обрабатывали в денатурирующем растворе (см. таблицу) с целью удаления из среза иммунного комплекса, образовавшегося в ходе реакции с первичными и вторичными антителами. На следующем этапе срезы инкубировали со вторыми первичными мышинными моноклональными антителами, которые затем визуализировали с помощью вторичных антимышиных антител, связанных с биотином, стрептавидина, меченного AP, и хромогена «Fuchsin+».

В другом варианте протокола вместо химического удаления иммунного комплекса денатурирующим раствором использовали термическую денатурацию [12]. Для этого проводили инкубацию препаратов в цитратном буфере (pH 6,0) в пароварке (температура раствора — 95–99 °C).

Протокол 4. Последовательное выявление двух антигенов первичными антителами одинаковой видовой принадлежности без удаления иммуноглобулинов с использованием вторичных антител, конъюгированных только с пероксидазой (двойное мечение без элюирования [8]).

На первом этапе препарат обрабатывали первичными моноклональными мышинными антителами к первому исследуемому антигену. Затем обрабатывали препарат вторичными антителами, связанными с пероксидазой (реагент EnVision+ / HRP). В качестве хромогена для выявления пероксидазы применяли раствор DAB+, в который был добавлен 0,3% NiCl₂. На втором этапе, без всякого предварительного блокирования, препарат обрабатывали первичными мышинными моноклональными антителами ко второму исследуемому антигену. В качестве вторых вторичных антител использовали реагент EnVision+ / HRP, как и на первом этапе обработки препарата. Выявление второго иммунного комплекса проводили с помощью DAB+ без добавления в раствор хлорида никеля.

Протокол 5. Флюоресцентное выявление двух антигенов первичными антителами различной видовой принадлежности с одновременным использованием двух вторичных антител, конъюгированных с различными не ферментными метками.

После инкубации в смеси первичных мышинных моноклональных и кроличьих поликлональных антител обработку препаратов вторичными реагентами проводили в два этапа: 1) срезы обрабатывали смесью вторичных свиных антикроличьих антител, конъюгированных с TRITC, и козьих антимышиных антител, связанных с биотином (см. таблицу); 2) проводили инкубацию срезов в растворе стрептавидина, конъюгированного с флюоресцентной меткой FITC. Затем ядра клеток докрашивали красителем Neuge Trace.

Протокол 6. Флюоресцентное выявление двух антигенов первичными антителами одинаковой видовой принадлежности с использованием меченого диссоциированного Fab-фрагмента.

На первом этапе препарат обрабатывали первичными моноклональными мышинными антителами к первому исследуемому антигену, затем — вторичными антимышиными антителами, мечеными TRITC. На втором этапе на препараты наносили активный иммунный комплекс, представляющий собой продукт реакции первичных мышинных антител ко второму исследуемому антигену с Fab-фрагментом, несущим флюоресцентную метку (Alexa Fluor 488). Этот комплекс был приготовлен в соответствии с указаниями производителя к набору «Zenon». Перед нанесением комплекса препараты обрабатывали 5% мышинной сывороткой для предотвращения неспецифического связывания первых вторичных антимышиных антител со вторыми первичными антителами.

В результате постановки иммуноцитохимических реакций, согласно всем приведенным протоколам, получены удовлетворительные результаты выявления специфических антигенов используемыми антителами. Распределение окрашенного продукта реакции в каждом случае соответствовало общим представлениям о локализации структур, которые должны его содержать (внутренний положительный контроль).

Препараты, окрашенные согласно протоколу 1, имеют четкое распределение сигнала, без перекрестной реакции и неспецифического окрашивания (фона). Однако протокол окраски длительный и трудоемкий (около 4 ч, при условии обработки срезов в первичных антителах в течение 60 мин), требует особого подбора реагентов

для исключения возможности перекрестной реакции, что существенно усложняет исследование.

Использование готовой смеси вторичных антител (протокол 2) [15] значительно упрощает и ускоряет исследование (до 3 ч). Результат окраски представлен на рисунке, а.

Химическую денатурацию (протокол 3) также можно успешно применять для получения двойной хромогенной метки даже при использовании антител, полученных от одного вида животных. Однако при недостаточной экспозиции в денатурирующем растворе, оптимум которой невозможно заранее точно определить, перекрестная реакция все-таки возникает. Это не затрудняет анализ в том случае, если антигены не колокализированы и используются контрастные хромогены, такие как диаминобензидин и фуксин (при этом диаминобензидин, как более интенсивный и устойчивый хромоген, следует использовать первым для обеспечения наилучшей маскировки перекрестной реакции вторых вторичных антител). По результатам обработки термическая денатурация [12] не отличается от химической, хотя является более трудоемкой и может нарушить целостность срезов. Как и в случае с химической денатурацией приходится учитывать то, что недостаточная экспозиция в цитратном буфере может приводить к перекрестной реакции, а слишком продолжительная — к ослаблению сигнала и нарушению целостности срезов. Следует отметить, что общая продолжительность проведения иммуноцитохимических реакций при использовании денатурирующих растворов довольно большая (около 5 ч).

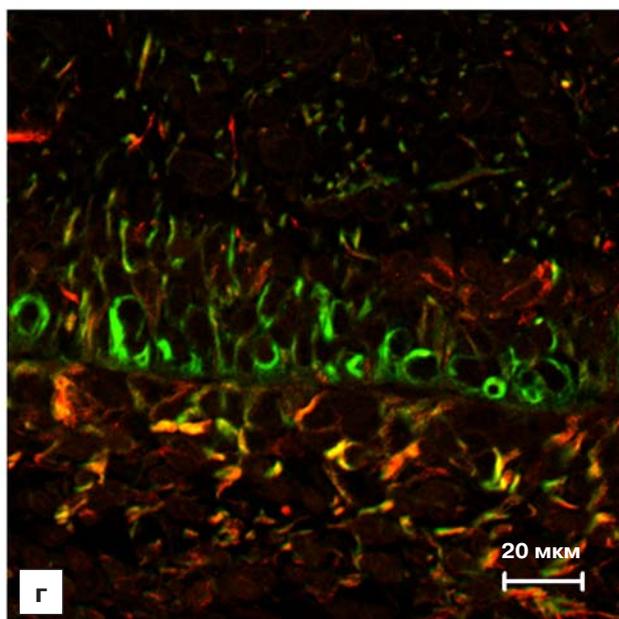
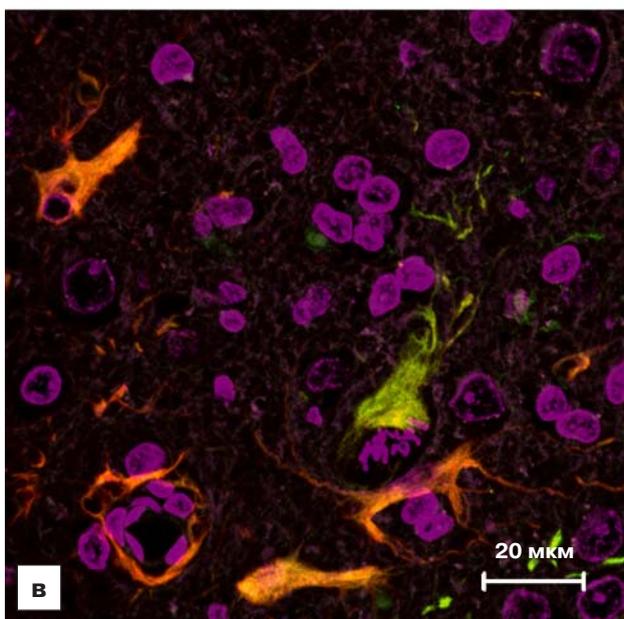
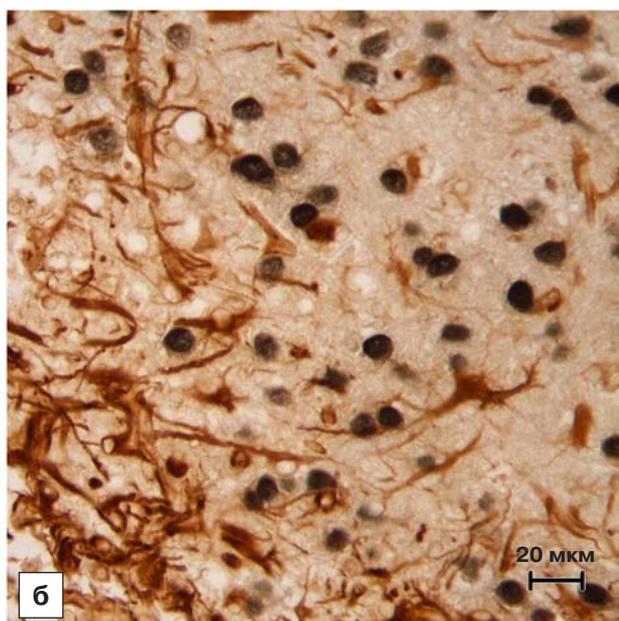
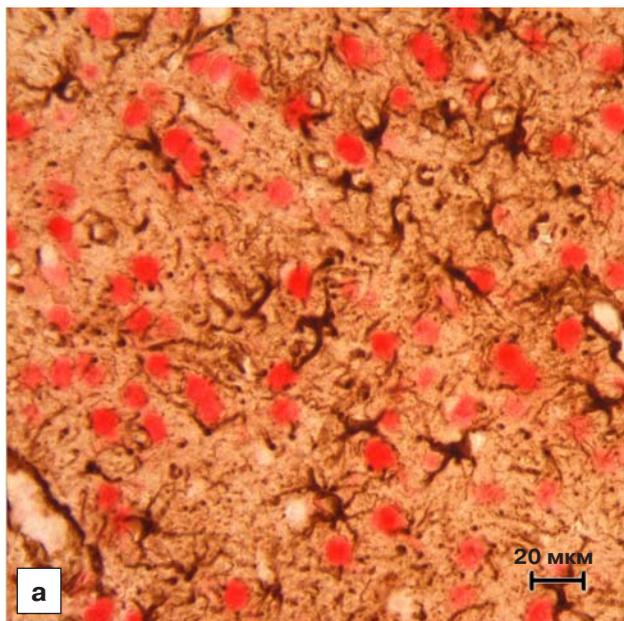
Неожиданно очень хороший результат получается при использовании двойного мечения без элюирования [8, 11] и солей никеля для тонирования бензидина (протокол 4, см. рисунок, б). При выявлении двух антигенов по этому протоколу всегда имеет место перекрестная реакция между вторыми вторичными антителами и первыми первичными. Однако оптически более плотный хромоген (диаминобензидин с добавлением NiCl_2) маскирует продукт этой реакции. Преимуществом этого метода является возможность использования одной и той же системы детекции для обоих антигенов, что существенно снижает стоимость исследования. Для перехода к одновременному выявлению двух антигенов от отдельного (на соседних срезах) исследователю дополнительно необходим лишь раствор хлорида никеля (или кобальта, который дает сходные результаты [11]). Недостаток этого метода — неустойчивость тонированного солями металлов продукта реакции к изменениям pH раствора, что ограничивает спектр

красителей, которые можно использовать для докрашивания срезов.

Применение флюоресцентного выявления антигенов с последующей конфокальной микроскопией при использовании антител от различных животных (протокол 5) — это самый совершенный, но при этом самый трудоемкий процесс выявления двух, трех и более антигенов. При правильно подобранных условиях сканирования сигнал четко локализуется в пределах отдельных оптических срезов, что дает возможность для определения сочетанной локализации антигенов (см. рисунок, в). Ограничением для широкого использования данного подхода являются необходимость подбора большого числа дорогостоящих реагентов, сложность отработки методики, а также наличие специального оборудования (конфокального микроскопа) и соответствующей квалификации у исследователя.

При невозможности подобрать первичные антитела от различных неблизкородственных видов животных перекрестную реакцию можно заблокировать с помощью диссоциированного Fab-фрагмента [13]. Существуют разные способы его использования [14, 17]. В настоящем исследовании (протокол 6) в качестве первичных антител ко второму выявляемому антигену был использован заранее приготовленный иммунный комплекс немеченых первичных антител с конъюгированным с флюорохромом Fab-фрагментом (из набора «Zenon») (см. рисунок, г). Трудность в использовании Fab-фрагмента при создании активного иммунного комплекса заключается в том, что необходимо точно знать концентрацию используемых для реакции иммуноглобулинов и их изотип, тогда как многие производители не предоставляют такой информации. Недостатком этой методики, помимо высокой стоимости реагентов и трудоемкости (постановка реакции занимает около 5 ч), является слабая степень амплификации сигнала. Поэтому такую реакцию следует проводить только при достаточно высокой концентрации антигена в исследуемой ткани.

Таким образом, наиболее широкие возможности для анализа представляют флюоресцентные методики детекции первичных антител, являющихся иммуноглобулинами различной видовой принадлежности. Однако процесс подготовки препарата для конфокальной микроскопии довольно длительный и дорогостоящий, кроме того, анализ препаратов требует специальных навыков у исследователя и долгосрочное хранение препаратов невозможно. Поэтому использование конфокальной микроскопии может быть рекомендовано преимущественно для решения специальных задач



Выявление двух антигенов на одном препарате.

а — кора головного мозга крысы, хромогенная визуализация продуктов иммунной реакции — реагент MACH 2 (протокол 2), в красный цвет окрашены ядра нейронов (иммуноцитохимическая реакция на ядерный белок нервных клеток NeuN), в коричневый — астроциты (иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок GFAP); б — кора головного мозга крысы, хромогенная визуализация продуктов иммунной реакции (протокол 4), в серо-черный цвет окрашены ядра нейронов (иммуноцитохимическая реакция на ядерный белок нервных клеток NeuN), в коричневый — белок промежуточных филаментов — виментин в цитоплазме астро- и эндотелиоцитов (иммуноцитохимическая реакция на виментин); в — кора головного мозга крысы, флюоресцентная визуализация продуктов иммунной реакции (протокол 5), зеленый сигнал — белок промежуточных филаментов нестин (иммуноцитохимическая реакция на нестин), красный сигнал — глиальный фибриллярный кислый белок — GFAP (иммуноцитохимическая реакция на GFAP), фиолетовый сигнал — ядра клеток, окрашенные флюоресцентным красителем Neuro Trace, желтый цвет — сочетанная локализация двух выявленных антигенов; г — субвентрикулярная зона конечного мозга крысы, флюоресцентная визуализация продуктов иммунной реакции (протокол 6), зеленый сигнал — виментин — иммунопозитивные клетки (иммуноцитохимическая реакция на виментин), красный сигнал — нестин иммунопозитивные клетки (иммуноцитохимическая реакция на нестин), желтый сигнал — сочетанная локализация двух выявленных антигенов.

(сочетанная локализация антигенов, трехмерная реконструкция и т.п.), которые другим способом решить невозможно. Для ежедневной исследо-

вательской работы наиболее удобным (с учетом быстроты получения результатов и их качества) является использование готовых стандартизиро-

ванных реагентов (аналогичных набору МАСН₂). Самым дешевым и простым способом является использование двухцветной реакции с хромогеном на основе диаминобензидина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
2. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крысы. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 77–79.
3. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
4. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Кирик О.В. и Отеллин В.А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
5. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
6. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В. и Отеллин В.А. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления дабл-кортина. Морфология, 2008, т. 133, вып. 4, с. 7–10.
7. Кривова Ю.С. Барабанов В.М., Савельева Е.С. и Савельев С.В. Нейроэндокринные комплексы в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coepus*) (иммуногистохимическое исследование). Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 59–62.
8. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника: Руководство. М., Медицина, 1996.
9. Abramova M., Calas A., Thibault J. and Ugrumov M. Tyrosine hydroxylase in vasopressinergic axons of the pituitary posterior lobe of rats under salt-loading as a manifestation of neurochemical plasticity. *Neural. Plasticity*, 2000, v. 7, № 3, p. 179–191.
10. Fountaine T.J., Wincovitch S.M., Geho D.H. et al. Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots. *Mod. Pathol.*, 2006, v. 19, p. 1181–1191.
11. Hsu S.-M. and Soban E. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, v. 30, № 10, p. 1079–1082.
12. Lan H.Y., Mu W., Nikolic-Paterson D.J. and Atkins R.C. A novel, simple, reliable and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 1995, v. 43, № 1, p. 97–102.
13. Mokry J., Ehrmann J., Karbanova J. et al. Newly formed blood vessels in neural and non-neural tissues express intermediate filament nestin. *Suppl. Folia Medica Cassoviensia. 5th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology. Stara Lesna, Slovak Republic, 2005*, p. 75.
14. Negoescu A., Labat-Moleur F., Lorimier P. et al. F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence. *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, v. 42, № 3, p. 433–437.
15. Qi W., Chu J., Zhou D. and Tacha D. Characterization and application of the newly developed rabbit monoclonal antibody to cytokeratin 7 (CK7) for immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. molec. morphol.*, 2009, v. 17, № 3, p. 233–238.
16. Soriano E. and Del Rio J.A. Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 1991, v. 39, № 3, p. 255–263.
17. Wessel G.M. and McClay D.R. Two embryonic, tissue-specific molecules identified by a double-label immunofluorescence technique for monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 1986, v. 34, № 6, p. 703–706.

Поступила в редакцию 07.05.10

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODOLOGICAL APPROACHES APPLIED FOR THE SIMULTANEOUS DEMONSTRATION OF SEVERAL ANTIGENS IN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES

A.V. Giliarov, O.V. Kirik and D.E. Korzhevskiy

In immunomorphological studies, it is often necessary to visualize several antigens simultaneously within the same histological sections. However in practice, the application of double staining is limited due to methodological complexity. The aim of the current study was to reproduce different methods recommended for multiple immunohistochemical staining of one section and to estimate their advantages and drawbacks. Six different methodological approaches for detection of several antigens in one slide were examined. It was found that the method providing the widest resources for analysis was the fluorescent detection, the most convenient was the application of ready-to-use standardized reagents, and the cheapest method was two-color reaction with DAB-type chromogen.

Key words: *immunohistochemistry, antigens, colocalization, confocal microscopy*

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