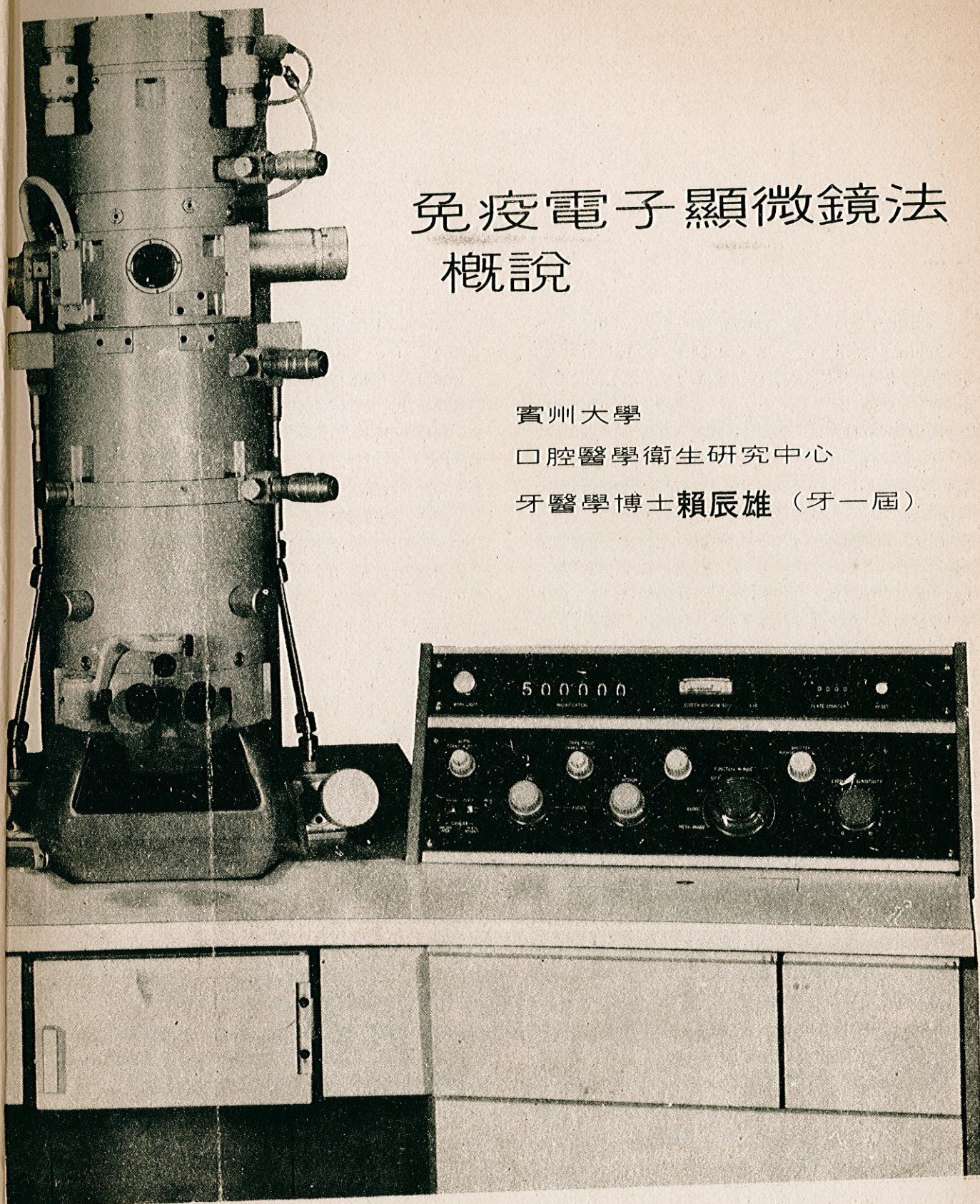


免疫電子顯微鏡法 概說

賓州大學

口腔醫學衛生研究中心

牙醫學博士賴辰雄（牙一屆）



醫學
介紹
期（
術、
將箇

因素，
熱忱
學期
與各
社團
團負
應由
報告
如何
當前
廣泛
負責
案，
成計

我們
學內
容，
新又
美好
會像

有的
內必
才能
能正
則能
真正

乃願

自1942年Coons氏創立免疫螢光抗體法 (Immunofluorescein technique) 之後，免疫反應便能够在螢光顯微鏡下觀察出何者為特異的抗原 (Specific antigen) 或特異的抗體 (Specific antibody)，並且能辨認出組織中，抗原或抗體的存在部位。此法的發現，可以說在免疫學史上畫下新頁，可惜美中不足的是光學顯微鏡的解像能力有限，只能達到細胞大小的程度，抗原或抗體存在於細胞內的那一構造就無法明瞭。剛好在同一時期中，利用電子顯微鏡以研究細胞的超微細構造也有了很大的進展，由於電子顯微鏡之解像能力遠超過於光學顯微鏡。免疫學家們便開始利用電子顯微鏡之超微細解像力，來研究抗原抗體在細胞內的免疫反應。但是由於抗原或抗體分子在電子顯微鏡下，並無高度的電子密度，不易與其他的細胞物質辨別，於是 Singer 氏於 1959 年首先利用具有高電子密度 (high electron density) 的物質——ferritin 來標識抗體，亦即將 ferritin 與抗血清 (antiserum) 精製出的免疫蛋白 (globulin) 行化學反應使其結合 (conjugation)，原以此 ferritin-globulin 結合物與其抗原行免疫性反應，並經過電子顯微鏡標本製作法的操作後，ferritin 在電子顯微鏡下為高電子密度的顆粒像，很容易辨別出，故若有 ferritin 存在的部位，就是抗原抗體反應的部位，也就是抗原存在的部位了。似此藉着可辨的 ferritin 分子來標識出不易辨明的免疫蛋白分子，以了解抗原抗體的反應及其存在部位的方法稱之為 Immuno-ferritin technique，也就是免疫電子顯微鏡法之一，茲將其原理方法概要說明於後。

(一) 原理

Ferritin 是一種含鐵蛋白，存在於動物的脾肝及其他組織中它的構造如圖一所示，為約 55\AA 大小呈不正四角形的四個氫氧化鐵的 micelles 核為中心，外被包着直徑 105 到 120\AA 大小的 Apoferritin 蛋白質外殼所構成。其含鐵量為 ferritin 總分子量的 20~40% 具有高電子密度，故 Singer 氏利用其與抗體蛋白 (antiglobulin) 經 xylylene m-diisocyanate 的媒介而行化應相結合，其結合過程如圖二所述分為兩個步驟。第一個步驟是將 ferritin 的氨基酸基 (amino acid group) 與 m-xylylene diisocyanate (以後簡稱 XC) 或 toluene (以後簡稱 TC) 的 isocyanate 基 (-NCO) 行 ureido linkage，隨後第二步驟再將精製的抗體或抗原蛋白與 XC 或 TC 的另一端未結合的 isocyanate 基再行同樣的 ureido linkage 而連結成 ferritin-

antibody (Antigen)

(二) Ferritin 的精製法

以前利用於實驗的 Ferritin 是根據 Granick 氏的方法將新鮮的馬脾臟除去淋巴節，切細加水並磨碎後加溫至 75°C 再冷卻至 50°C 以下，行遠心分離使 ferritin 以外的蛋白質沈澱，而與含有 ferritin 的上清液 (supernatant) 分開，然後加以同量之飽和 ammonium sulfate 於上清液中混合充分後放置一夜，則 ferritin 沈澱於下，經遠心分離除去上清液，將該沈澱物溶解於蒸餾水後再行遠心分離，除去不純的沈澱物後，ferritin 存於上清液中。以上為沈澱步驟，接着是結晶化步驟，其操作過程為將上述最後的上清液加入其三分之一量的 20% Cadmium Sulfate 溶液放置二夜，此時 ferritin 被初次結晶化，經遠心分離後將此沈澱的 ferritin 粗結晶，溶解於少量的 2% Ammonium sulfate，再行遠心分離以除去不純的沈澱物，然後再度加入三分之一量的 20% Cadmium sulfate 於該上清液中如上述地行同樣的結晶化步驟反覆三至七次，直至在光學顯微鏡下檢查，確定該最後沈澱物中均為如圖三所示的純粹 ferritin 結晶為止。以後續接再沈澱步驟，亦即將該最後一次的純結晶沈澱物溶解於 2% Ammonium sulfate 溶液，加上等量之飽和 ammonium sulfate 溶液再照上述同樣的再沈澱步驟反覆行二次，然後將最後一次所得之沈澱物懸浮 (suspend) 於少量之蒸餾水中 (盡可能少量，不必至完全溶解) 隨着將該少量 ferritin 液透析於 14°C 至 16°C 的流水中一夜，再另透析於 0.05 M, PH 7.5 的磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 中約一夜 (直至透析液無 NH_4 存在為止)，最後經過 100000 g 2 小時的超高速遠心分離，除去上面 3/4 或 4/5 部份的上清液，再加入微量之磷酸緩衝液以溶解該沈澱物，所得之液即為高濃度，純精製無形的 ferritin 液，經過過濾消毒後即可存放於 4°C 以供隨時實驗所需。目前市面上已有粗製及精製的 ferritin 液供銷，無須再自己花時間精製了。

(三) 抗體蛋白之精製法

欲求抗體 (antibody) 與 ferritin 結合成功，且仍能發揮其特異性反應能力者，最好使用高價 (high titer) 特異性抗體蛋白，為此須將實驗動物體中所得之抗血清 (antiserum) 精製成抗體蛋白 (antiglobulin) 精製之目的在於除去抗血清中非必要之其他成份以獲得 Ig G (7S) 及 Ig M (19S) 等主要抗體蛋白。其精製有 (1) Ammonium sulfa-

te 沈澱法, (2) Sodium Sulfate 沈澱法, (3) 酒精分畫法及 (4) Chromatography 分離法等等。筆者普通使用第 (1) 及 (4) 兩法的連合, 結果獲得極純的 IgG 及 IgM。

(四) 連鎖劑 (Coupling Agent)

如前原理一項中已述的 xylylene m-diisocyanate (XC) 及 toluene-2, 4-diisocyanate (TC) 等是利用其具有兩個 -NCO 基, 可以使其各與 ferritin 及抗體蛋白的 amino acid 基相連結, 而成爲 ferritin-XC (或 TC)-antibody 結合物, 故稱 XC 或 TC 爲連鎖劑, 像這樣的連結反應稱之爲 conjugation。用 XC 或 TC 行連結反應須分兩個步驟完成, 故稱爲二段法 (Two-step process)。另外有 Sri Ram 氏所述的是以 P, P'-difluoro-m, m'-dinitro diphenyl sulphone (簡稱 FNPS) 爲連鎖劑, 因其連結反應在一步驟中完成故稱之爲一段法 (single-step process)。

(五) Conjugation 的操作法

未 conjugation 之前, 須先測定精製後的 ferritin 液與抗體蛋白兩者的濃度, 知道兩者的濃度後, 第一步先將 ferritin 液與 PH9.5 的 0.3M 之 borate buffer 混合使其成爲每 cc 的 0.1 M borate buffer 中含有 20 到 25mg 濃度的 ferritin, 再於冰浴中 (0°C) 滴入連鎖劑 XC (每 100 mg 的 ferritin 須滴入 0.12ml 的 XC) 爲使其充分連結, 將其置於冰浴中, 以磁性攪拌器 (magnetic stirrer) 攪拌 45 分鐘, 然後於 4°C 行 30 分鐘的 1500g 遠心分離, 再將其上清液小心吸取移入另一冰浴中放置一小時, 俾使其完全反應成爲 ferritin-xylylene-NCO 以備與第二步的抗體蛋白相連結。第二步是將抗體蛋白與反應完成的 ferritin-xylylene-NCO 液, 以 1 比 4 的濃度比相混合, 然後加入新鮮的 0.3M-borate buffer 使其全部混合液仍然成爲 0.1 M 的 borate buffer, 將此混合液在 4°C 中行 48 小時的輕微攪拌, 然後在 4°C 透析於 0.1M 的 ammonium carbonate) 液中一夜, 另再透析於 PH7.5 的 0.05M phosphate buffer 中一夜便接着第 (六) 項的超高速遠心分離。

(六) 超高速遠心分離 (Ultracentrifugation)

經上述 conjugation 步驟後, 該混合液中包含有已連結成之 ferritin-antibody, 未連結之抗體及未連結之 ferritin。爲了避免未連結的抗體蛋白於以後的免疫反應中與抗原反應而影響 ferritin 標識的抗體蛋白與抗原的反應, 必

須將未連結的抗體蛋白由此混合液中除去, 其方法爲將該液於 4°C 行 1000000g 四個半小時的超高速遠心分離, 去掉上清液, 將沈澱物以 0.05M PH7.5 的 phosphate buffer 溶液溶解之, 再行同樣的遠心分離共三次, 然後將最後一次所得的沈澱物, 以極小量的緩衝液解之並經濾過消毒即可存於 4°C 以備隨時實驗之用。

(七) 免疫反應能力的測驗

經上述各步驟製成的 ferritin-antibody 有時會消失其特異性的免疫反應能力, 故使用於進一步實驗之前, 最好先以免疫電移法 (Immunoelectrophoresis) 測驗其與抗原之反應能力, 此法因須很大篇幅, 筆者擬另撰文詳述, 故於此從略以筆者之經驗雖然免疫電移反應爲陰性者, 在免疫電子顯鏡法的反應下, 仍可獲得陽性的結果, 由此可知後法之敏感性較前法爲高, 故不可以因前法反應陰性, 就以爲 conjugation 失敗而放棄後法的實驗。

(八) Ferritin-Antibody 之電子顯微鏡法

抗體蛋白經上述各步驟與 ferritin 連結成 ferritin-antibody 後即可進入電子顯微鏡法的實驗, 此法分直接與間接兩法, 茲爲容易說明起見, 僅就筆者過去的實驗例中抽出一例說明如下:

(A) 直接法 (或稱單層法 single-layer technique)

Streptococcus sanguis M-5 株 (以下簡稱 M-5) 係由口腔內齒垢分離培養出的重要鏈球菌之一株, 將其好氣培養於 Brain Heart Infusion broth (Difco) 18 小時後, 製成懸液免疫原, 注射於實驗兔的耳靜脈後, 所得之血清即爲抗血清 (antiserum) 供實驗群用, 未注射前之血清爲正常血清 (normal serum) 供對照群用。將兩者按照第二項所述之方法與 ferritin 行連結反應, 而得 ferritin labeled rabbit anti-M-5 globulin (fer-Anti-M5), 將此溶液與生理食鹽水洗淨過的 M-5 菌體適量混合, 於室溫中反應 20 分鐘後再度洗淨, 隨後經過一般的電子顯微鏡的標本製作法如固定、脫水、包埋、硬化、超薄切片及電子染色等手續後, 就可在電子顯微鏡下觀察其結果, 所得如圖 (四) 所示菌壁 (cell wall) 外圍附着顯著的 ferritin 顆粒, 亦即顯示出 M-5 菌與其 ferritin 標識的抗體蛋白起特異的陽性反應。在其對照實驗中, 以正常兔血清蛋白用同法與 ferritin 連結成 ferritin-normal serum globulin, 再以此與 M-5 菌行反應所得結果如圖 (五) 所示, 並無 ferritin 顆

粒附着於菌壁，也就是證明在正常兔血清中沒有對M-5菌抗體的存在，故為陰性反應。在另一對照實驗中，用他種細菌，如 *Streptococcus mutans* 與 Fer-Anti-M5 行同樣的反應，其結果如圖（六）所示，亦無 ferritin 顆粒之附着，為陰性反應，也就是表示該 *mutans* 鏈球菌體中，不含有與 *sanguis* M-5 鏈球菌共同的抗原，故不能與 M-5 的抗體蛋白起反應。

（B）間接法（或稱二層法 two-layer technique）

如圖（七）所示直接法只行一次反應，而間接法需行二次反應。第一次先與未標識的特異性兔抗M-5菌血清（Rabbit anti-M5 serum）與M-5菌反應，經過洗淨多餘的反應未抗血清後，再與 ferritin 標識的羊抗兔血清蛋白（ferritin labeled goat anti-rabbit globulin）行第二次反應。假若第一次的反應結果陽性，則兔抗菌血清將附着菌於壁周圍不會被洗掉，因而第二次反應時的 ferritin 標識的羊抗兔血清蛋白，得與兔抗菌血清起陽性反應，結果可見 ferritin 顆粒附着兔抗菌血清層上或外圍，如圖（八）所示，注意將此圖與圖四詳細觀察比較，此圖中的菌壁與 ferritin 層中間多了一層中等電子密度的物質，此仍為第一次反應後，兔抗菌血清與菌體表面抗原（surface antigen）反應結果所產生的抗原抗體複合物（antigen-antibody complex）。反之若第一次反應為陰性時，所有兔抗菌血清，均被隨後的洗淨過程沖洗掉，則第二次的 ferritin 標識羊抗兔血清蛋白自然地無法與該菌體起間接反應附着上菌體外圍，亦即為陰性了。

間接法雖然在操作過程上較直接法多一次反應，時間上較不經濟，但它只須製作一種標識抗體，就可以鑑定各種不同的抗原，而直接法則對於各種不同的抗原，均須製作該各種不同的標識抗體，對於實際上的應用而言，間接法較直接法方便多了。

（九）結語

免疫電子顯微鏡法自1959年創始迄今，雖然僅短短的十餘年，但對於近代的醫學，生物學的研究居功甚偉，尤其對於細菌以及細胞抗原的存在部位的確定，細胞內濾過性病毒的增殖的鑑別，毒素侵入細胞內的作用機序等的研究已有很多的貢獻，然而學問是無底洞，越加發掘發現越多，這方法的發展，與更實際的應用仍有待於後人的努力去充實它。

此文因筆者剛參加全世界牙科醫學研究會議回來，又續

接着準備參加全美國微生物學會總會，為了不負杏園社之期待，仍僥倖中寫成故無法就全部的免疫電子顯微鏡法詳細述說。除本文的 ferritin 標識抗體法外，其他尚有酵素標識抗體法，水銀標識抗體法，重金屬標識抗體法，碘素標識抗體法及 Uranium 間接標識法等等，其中尤以酵素標識抗體法，為今日免疫學上，無論對於微生物學，病理學，組織學，細胞學以及組織化學等的研究都是非常重要，此法的介紹只好留待下回補繳了。

附註： A° （angstrom之簡略為電顯之長度單位） $= \frac{1}{10}$ millicmicron（mu） $= \frac{1}{10,000}$ micron（u） $= \frac{1}{10,000,000}$ millimeter（mm）換言之1mm = 10,000,000 A°

附圖說明：

圖一：ferritin的分子構造。

圖二：ferritin 與血清蛋白連結反應的二步驟過程圖連鎖為 XC。

圖三：精製過程中的馬牌鐵ferritin結晶像放大280倍。

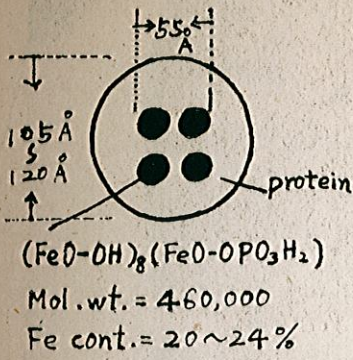
圖四：*Streptococcus sanguis* M-5菌與其 ferritin 標識的特異性抗體蛋白（fer-antim5 globulin）反應結果 ferritin 顆粒附着於菌體周圍所呈的陽性反應像。放大八萬六千倍。N = 核，IM = 內層菌膜，OM = 外層菌膜，CW = 菌壁，Fer = ferritin 顆粒，SA = 菌體表面抗原成分。

圖五：*Streptococcus sanguis* M-5 菌與 ferritin 標識的正常兔血清蛋白反應結果，無 ferritin 顆粒之附着，為陰性反應，放大86000倍

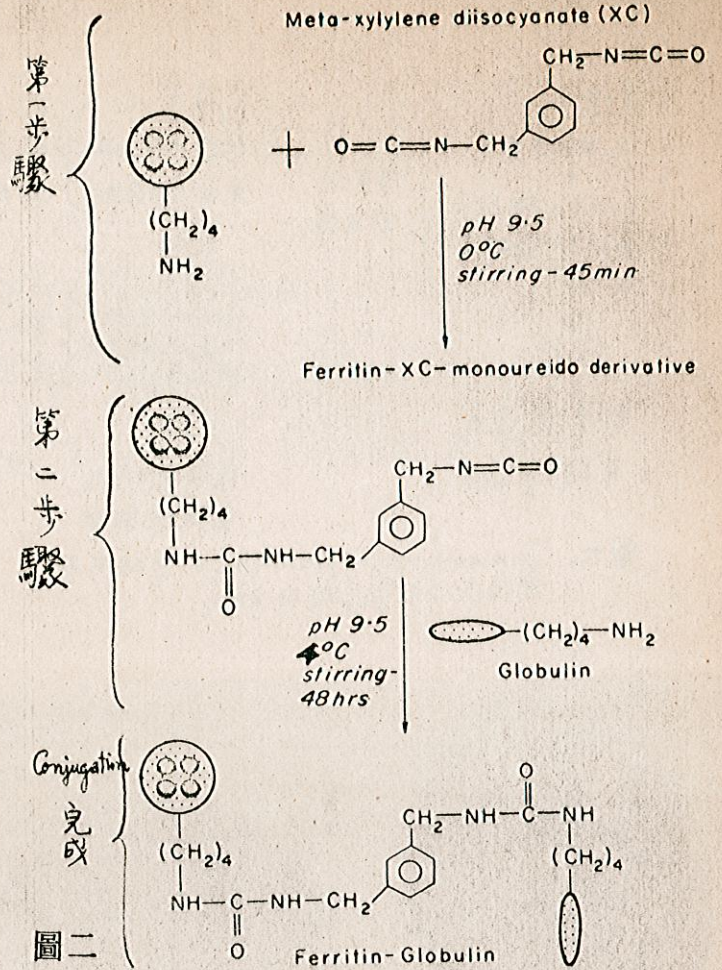
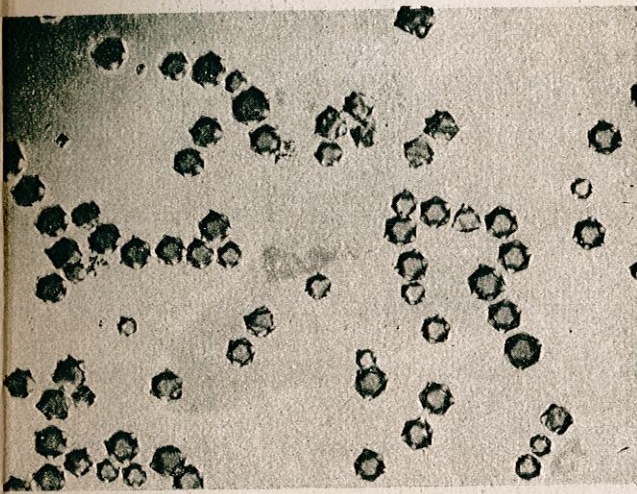
圖六：*Streptococcus mutans* LM7 菌與 ferritin 標識的異種抗體蛋白（fer-anti-M5 globulin）反應結果無 ferritin 顆粒之附着，為陰性反應，放大86000倍。

圖七：Immunoferritin technique 的直接法與間接法的簡單過程比較圖表。

圖八：*Streptococcus sanguis* M-5 血先與兔抗 M-5 菌血清反應，再次與 ferritin 標識的抗兔血清蛋白的羊血清蛋白（fer-anti-rabbit-globulin goat globulin）行間接反應，其結果菌壁（CW）外圍先被一層抗原與抗體的複合體（ant ab）覆蓋着，ferritin（fer）再附着於其外圍或上面，Rib = ribosomes放大86,000倍。



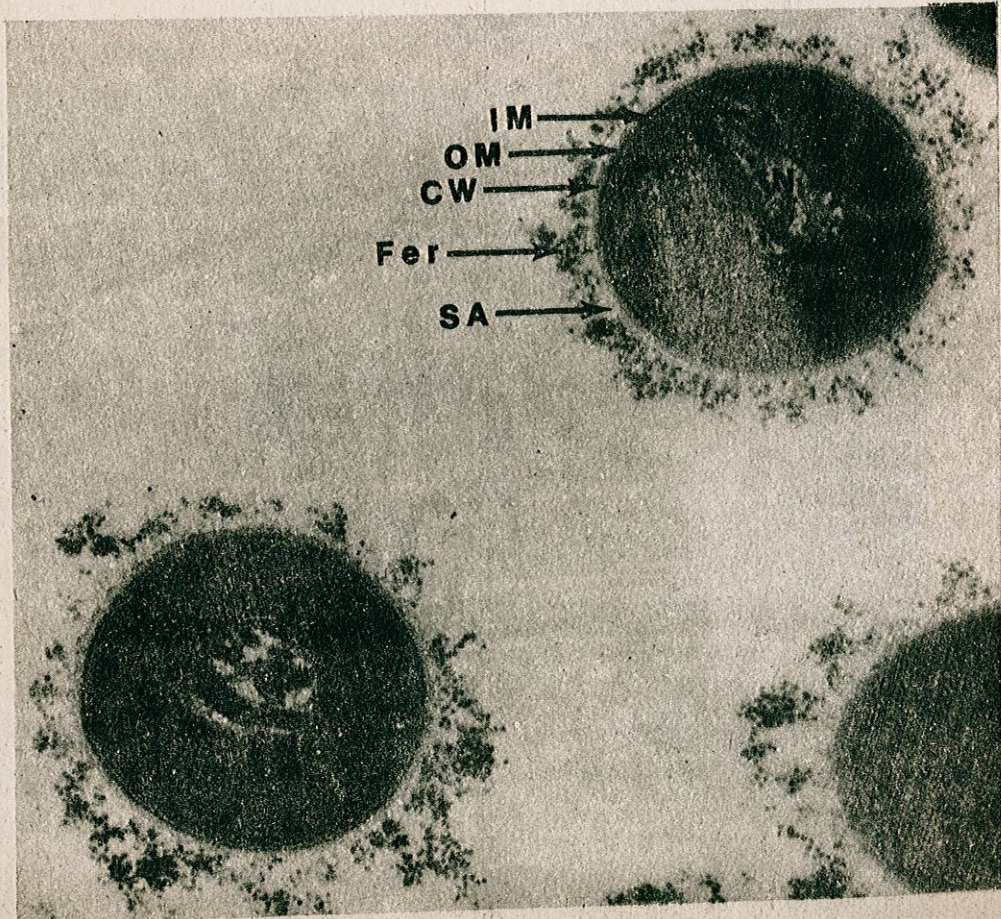
圖一 ferritin 的分子構造



圖二

←圖三

↓圖四



菌社之期
 去詳細述
 標識體
 標識抗體
 組織學
 去的介紹

$\frac{1}{10}$ mil-
 $\frac{1000}{100}$

圖連鎖為

音。
 ritin 標
 1) 反應
 易性反應
 莫, OM
 粒, SA

標識的
 附着,

n 標識
 反應結
 大86000

接法的

M-5 菌
 蛋白的
 t glo-
 圍先被
 erritin
 mes放

直接法

洗淨 M-5 菌體
+
ferritin 標識的
兔抗 M-5 菌血清
蛋白

僅有一次的反應

↓
洗淨

↓
電顯標本製作

↓
電顯鏡觀察

間接法

洗淨 M-5 菌體
+
兔抗 M-5 菌血清

} 第一次反應

↓
洗淨

+
ferritin 標識的
抗兔血清蛋白的
羊血清蛋白

} 第二次反應

↓
洗淨

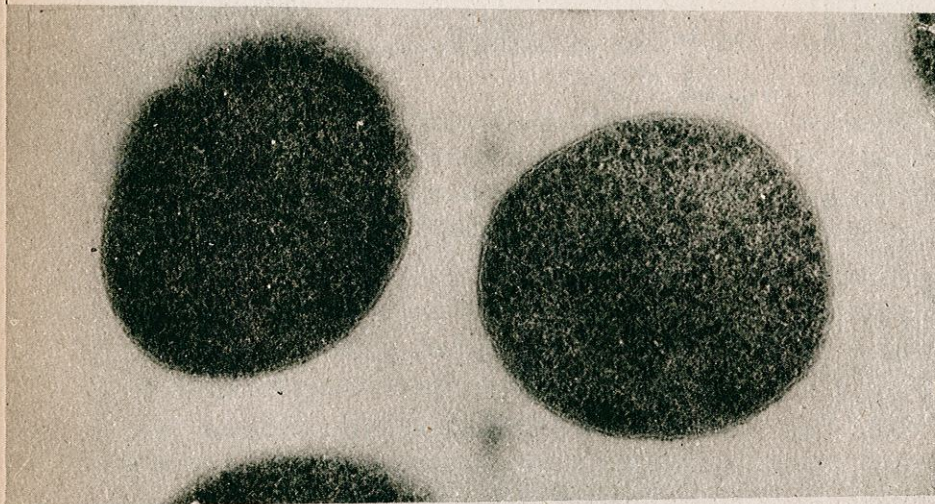
↓
電顯標本製作

↓
電顯鏡觀察

圖七. Immuno-ferritin technique 的直接法與間接法的簡單過程比較。



↑ 圖六



← 圖五

圖八 ↓

