

TECHNIKA IMMUNOCYTOCHEMICZNA – ZASTOSOWANIE W BADANIACH KOMÓREK UKŁADU ROZRODCZEGO

TECHNIKI IMMUNOHISTOCHEMICZNE W DIAGNOSTYCE ONKOLOGICZNEJ NA PRZYKŁADZIE RAKA SUTKA

1. Wstęp

Immunocytochemia zajmuje się wykrywaniem w komórkach substancji o charakterze antygenowym za pomocą znakowanych przeciwciał. Immunocytochemia należy do grupy metod określanych jako techniki **immunohistochemiczne** w których badanym materiałem obok komórek są tkanki. Badania immunocytochemiczne mogą być prowadzone zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego.

Immunohistochemiczne uwidocznienie antygenu w komórce wymaga otrzymania przeciwciał swoistych dla tego antygeny. Wyizolowany metodami preparatyki biochemicznej antygen służy do immunizacji zwierząt laboratoryjnych, które będą później stanowić źródło swoistych przeciwciał.

W immunocytochemii/immunohistochemii stosowane są przeciwciała poliklonalne oraz monoklonalne. Przeciwciała poliklonalne zostały wyprodukowane przez różne populacje (klony) komórek plazmatycznych, i dlatego reagują one z różnymi determinantami antygenowymi (epitopami) antygeny użytego do immunizacji. Niejednorodność przeciwciał poliklonalnych sprawia, że mogą one wykazywać reakcje krzyżowe tzn. wiązać się z innymi antygenami, posiadającymi fragment cząsteczki o zbliżonej konfiguracji przestrzennej do jednego z epitopów antygeny użytego do immunizacji. Przeciwciała monoklonalne produkowane są przez jeden klon komórek (populację wywodzącą się z jednej komórki macierzystej). Przeciwciała te są całkowicie jednorodne pod względem swoistości wobec jednego epitopu danego antygeny, co minimalizuje możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych.

Stosowane w immunocytochemii przeciwciała mogą być wyznakowane różnymi znacznikami, umożliwiającymi uwidocznienie miejsca wiązania się przeciwciała do znajdującego się w komórce antygeny. Najczęściej obecnie stosowanymi znacznikami są enzymy (peroksydaza chrzanowa, fosfataza zasadowa) oraz szeroka gama fluorochromów (immunofluorescencja).

Metody wykorzystujące enzymy jako znaczniki są często bardziej złożone niż metody immunofluorescencyjne, ponieważ wymagają przeprowadzenia dodatkowej reakcji histochemicznej uwidaczniającej aktywność enzymu, którym wyznakowane było przeciwciała. Końcowa reakcja histochemiczna prowadzi do nagromadzenia znacznych ilości barwnego produktu reakcji, co umożliwia uwidocznienie miejsca wiązania znakowanego przeciwciała nawet przy śladowych ilościach antygeny w komórce. Stąd też metody te charakteryzują się wysoką czułością.

Właściwe przygotowanie materiału ma kluczowe znaczenie dla pomyślnego przebiegu reakcji immunocytochemicznej. Szczególnie istotne jest zastosowanie odpowiednich metod utrwalania, a także (w przypadku immunohistochemii) zatapiania materiału, ponieważ niektóre stosowane substancje mogą zmieniać konformację determinanty antygenowej (np. powodując

denaturację białek lub przyłączanie do cząsteczki antygeny nowych grup chemicznych), uniemożliwiając jego swoiste rozpoznanie przez przeciwciało.

W takich sytuacjach należy przed przeprowadzeniem właściwej reakcji immunohistochemicznej stosować metody tzw. odzyskiwania, przywracające antygenom ich pierwotne cechy, tzw. odsłanianie determinant antygenowych. Najczęściej stosowane w tym celu metody to kontrolowane trawienie skrawków przy użyciu enzymów proteolitycznych (trypsyna, proteinaza K) oraz działanie na skrawki mikrofalami.

Aby ułatwić dostęp przeciwciał do wnętrza komórek i ich wiązanie się z antygenem stosowana jest permeabilizacja błon komórkowych detergentami (np. Triton X100).

Chociaż wiązanie antygen-przeciwciało charakteryzuje się wysoką specyficznością, istnieje możliwość nieswoistych oddziaływań (np. na drodze oddziaływań elektrostatycznych) między badanym materiałem a białkami osocзовymi, w tym również przeciwciałami. Aby zapobiec tym niespecyficznym reakcjom, przed przeprowadzeniem właściwej reakcji immunohistochemicznej, wykonuje się tzw. blokowanie, polegające na inkubacji preparatów z nieaktywną immunologicznie (nie zawierającą swoistych przeciwciał) surowicą innego gatunku zwierzęcia niż to, od którego uzyskano przeciwciała.

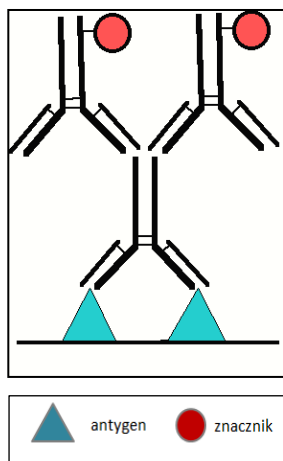
Stosowanie przeciwciał znakowanych enzymami wymaga dodatkowo unieczynnienia tkankowego enzymu o takiej samej aktywności jaką wykazuje enzym znacznikowy. Istnieje bowiem możliwość, że badana tkanka zawiera taki enzym i w reakcji wykrywającej enzym znacznikowy mógłby on powodować pojawienie się zabarwienia w miejscu nie związanym z obecnością antygeny (tzw. reakcja niespecyficzna). Unieczynnienie endogennego enzymu przeprowadza się poprzez inkubację komórek lub tkanki z odpowiednim inhibitorem (w przypadku zastosowania jako znacznika peroksydazy chrzanowej używa się 0,3 – 3% roztworu nadtlenu wodoru, a w przypadku alkalicznej fosfatazy Levamisolu) przed wykonaniem właściwej reakcji immunocytochemicznej.

Inkubację ze znakowanymi przeciwciałami prowadzi się w komorze wilgotnej. Dostępne komercyjnie przeciwciała wymagają z reguły odpowiedniego rozcieńczenia; najczęściej rozpuszcza się je w buforowanej soli fizjologicznej. Rozcieńczenie oraz czas i temperaturę inkubacji (zwykle temperatura pokojowa lub +4°C) należy ustalić doświadczalnie. Dostępne na rynku są również gotowe zestawy wszystkich niezbędnych odczynników do wykonania reakcji immunohistochemicznej tzw. KITY.

Mimo wysokiej specyficzności immunocytochemii/immunohistochemii istnieje możliwość występowania niespecyficzných oddziaływań między badanym materiałem (komórkami, tkanką) a zastosowanym przeciwciałem. Aby wychwycić taką sytuację i uniknąć fałszywie pozytywnych wyników należy wykonać odpowiednie reakcje kontrolne. Do najczęściej stosowanych reakcji kontrolnych należy wykonanie tzw. kontroli negatywnej, polegającej na zastąpieniu inkubacji z przeciwciałem swoistym dla wykrywanego antygeny, inkubacją badanego materiału z immunoglobulinami (lub surowicą) nieimmunizowanego zwierzęcia gatunku, który posłużył do uzyskania przeciwciał lub całkowitym pominięciu przeciwciała pierwszorzędowego (przeciwciała swoistego). Wystąpienie w tym wypadku dodatniej reakcji świadczy o nieswoistym wiązaniu się z tkanką jednego ze składników reakcji. Można dodatkowo wykonać tzw. kontrolę pozytywną polegającą na przeprowadzeniu reakcji na przebadanych wcześniej komórkach lub tkance, w których na pewno jest obecny wykrywany antygen. Jeśli nie uzyskamy dodatniej reakcji, świadczy to o nieaktywnych przeciwciałach lub błędach metodycznych.

Istnieje wiele metod stosowanych w immunocytochemii/immunohistochemii. Ich wybór zależy od badanego materiału, wykrywanego antygeny, wymaganej czułości reakcji, czy czasu przeprowadzania procedury. Poniżej przedstawione są dwie najczęściej obecnie wykorzystywane metody: metoda pośrednia oraz metoda ABC.

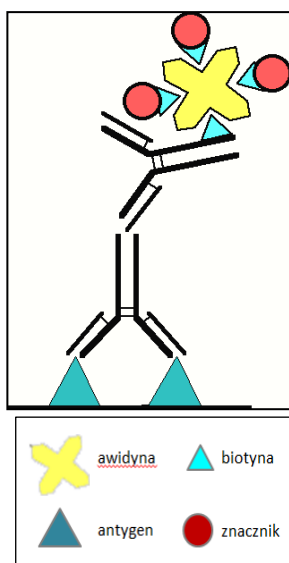
Metoda pośrednia



W metodzie tej odpowiednio przygotowane komórki (lub skrawek tkanki) inkubuje się z nieznakowanym przeciwciałem rozpoznającym badany antygen (tzw. przeciwciałem pierwszorzędowym). Następnie, odpłukuje się nadmiar przeciwciała, które nie związało się z antygenem i przeprowadza się drugą inkubację ze znakowanym tzw. przeciwciałem drugorzędowym czyli przeciwciałem, które rozpoznaje i wiąże się z przeciwciałem pierwszorzędowym. Przeciwciało drugorzędowe musi być skierowane przeciwko immunoglobulinom zwierzęcia od którego pozyskano przeciwciało pierwszorzędowe.

W tej metodzie często wykorzystuje się przeciwciała drugorzędowe znakowane fluorochromami.

Metoda awidyna-biotyna



W tej metodzie wykorzystuje się trwale i specyficzne oddziaływanie pomiędzy glikoproteiną awidyną (lub podobną streptawidyną), a biotyną, niskocząsteczkową witaminą. Jedna cząsteczka awidyny przylacza 4 cząsteczki biotyny. Zwykle biotynę sprzęga się z przeciwciałem drugorzędowym, oraz znakuje się enzymatycznie. W tej sytuacji wiązanie awidyna-biotyna pełni rolę łącznika pomiędzy przeciwciałem a znacznikiem. W najpopularniejszym wariantcie tej metody przeprowadza się następujące etapy: i) inkubacja z nieznakowanym przeciwciałem pierwszorzędowym, ii) inkubacja z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym, iii) inkubacja z kompleksem awidyna – biotynylowana peroksydaza chrzanowa (tzw. ABC), iv) inkubacja z substratem dla peroksydazy (np. diaminobenzydyną).

Metoda ta, mimo że dość czasochłonna jest często stosowana ze względu na bardzo wysoką czułość, a zatem na możliwość wykrywania w komórkach nawet antygenów występujących w śladowych ilościach.

Coraz większą popularność zdobywają też gotowe zestawy odczynników, zawierające przeciwciało drugorzędowe sprzężone z polimerami wyznakowanymi enzymem. Przeprowadzane z ich zastosowaniem reakcje charakteryzują się wysoką czułością oraz zwykle są mniej czasochłonne od standardowych metod.

Technika immunocytochemiczna jest szeroko stosowana w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce medycznej. Dostarcza ona informacji dotyczących obecności antygeny w danym typie komórek i jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji. Pozwala określić zmiany w zawartości czy lokalizacji antygeny w warunkach patologicznych.

Technika immunocytochemiczna – zastosowanie w badaniach komórek układu rozrodczego

Metody immunohistochemiczne/immunocytochemiczne są od wielu lat z powodzeniem stosowane w badaniach nad funkcjonowaniem układu rozrodczego saków. Funkcjonowanie narządów tego układu podlega precyzyjnej regulacji hormonalnej, zarówno przez hormony białkowe (takie jak gonadotropiny), jak i hormony steroidowe (androgeny, estrogeny). Badania w systemie *in vitro* tzn. na żywych komórkach utrzymywanych poza organizmem, pozwalają na poznawanie mechanizmów syntezy tych hormonów oraz ich działania, a także wpływu hormonów i innych czynników na różnorodne procesy zachodzące w tych komórkach. W badaniach tych wykorzystywane są zarówno hodowle komórkowe pierwotne, jak również linie komórkowe komórek somatycznych gonad (komórek Leydiga, Sertoliego, komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego, komórek ciała żółtego) oraz innych narządów układu rozrodczego (prostaty, macicy). Zastosowanie immunocytochemii pozwala na wykazanie obecności, a przede wszystkim subkomórkowej lokalizacji (oraz jej zmian) w hodowanych komórkach enzymów zaangażowanych w syntezę hormonów, receptorów hormonów i wielu innych białek istotnych dla funkcjonowania komórek narządów układu rozrodczego.

Techniki immunohistochemiczne w diagnostyce onkologicznej raka sutka

Pierwszym badaczem, który zasugerował, że rak piersi jest nowotworem hormonozależnym, był Schinzinger w 1889 r. Hipotezę Schinzingera potwierdził w 1896 Beatson, wykonując obustronne usunięcie jajników u kobiety przed menopauzą z nieoperacyjną wznową raka piersi. Po upływie 8 miesięcy od zabiegu autor stwierdził u chorej całkowity zanik tkanki nowotworowej. Zaobserwowany związek między czynnością jajników a przebiegiem raka piersi stanowił punkt wyjścia do dalszych badań, które nabrały tempa po wyizolowaniu estrogenów z płynu pęcherzykowego jajników przez Allena w 1923 r.

Przełom w badaniach nad hormonozależnością nastąpił w latach 60. XX wieku, kiedy opisano mechanizm łączenia się estradiolu ze swoistymi receptorowymi białkami cytoplazmatycznymi. Dalsze badania nad receptorem estrogenowym potwierdziły, że oprócz udziału w fizjologicznych przemianach zachodzących w czasie rozwoju i różnicowania gruczołu piersiowego, pełni on również kluczową rolę w mechanizmie zależności hormonalnej raka piersi.

Estrogeny są steroidami produkowanymi przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych, w mniejszym stopniu przez komórki śródmiaższowe jajnika, a w czasie ciąży przez komórki syncytiotrofoblastu. Znikome ilości tych hormonów uwalniają także komórki podporowe kanalików nasiennych jądra oraz komórki warstwy siateczkowej kory nadnerczy. Ze znanych ponad 30 estrogenów tylko estradiol, estron, estriol i 2- hydroksyestron występują w większych stężeniach, odgrywających rolę czynnościową. Najaktywniejszym estrogenem u kobiet jest 17-betaestradiol a u zwierząt dodatkowo estriol.

Przez wiele lat sądzono, że istnieje tylko jeden receptor, przez który estrogeny mogą oddziaływać na komórki. W 1996 r. w kilku laboratoriach niezależnie odkryto u szczura, myszy, człowieka i bydła domowego drugi receptor swoisty dla estrogenów. Wcześniej poznane i scharakteryzowane białko określano jako receptor estrogenowy alfa (ER alfa), zaś nowe – jako receptor estrogenowy beta (ER beta). Receptory estrogenowe alfa i beta nie są wzajemnymi izoformami, lecz dwoma różnymi białkami kodowanymi przez dwa odrębne geny. Należą one do rodziny receptorów wewnątrzkomórkowych i pełnią

funkcję czynników transkrypcyjnych. Budowa obu receptorów estrogenowych wykazuje cechy wspólne ze wszystkimi receptorami jądrowymi. Oba receptory estrogenowe występują w różnych proporcjach w różnych komórkach.

Gromadzenie się estrogenów w niektórych komórkach zostało po raz pierwszy stwierdzone w 1959 r. przez Glasscocka i współpracowników. Korenman i wsp. w 1969 r. zaobserwowali szczególnie duże nagromadzenie białek wiążących estrogeny w cytozolu komórek guzów nowotworowych piersi w stosunku do niezmienionych komórek tego gruczołu lub jego tkanki tłuszczowej. Receptor estrogenowy alfa występuje najliczniej w macicy, jajniku, gruczole sutkowym, najądrzu, jądrze, sercu, aortalnej, nerce, nadnerczu, przysadce, podwzgórze i wątrobie. Receptor estrogenowy beta występuje w gruczole krokowym (komórkach śródbłonna prostaty), w jajniku (komórki ziarniste pęcherzyków przedowulacyjnych), a także w wielu innych tkankach, np. ośrodkowym układzie nerwowym oraz układach krwionośnym, odpornościowym, moczowo-płciowym, pokarmowym, oddechowym.

W gruczole sutkowym, macicy, jajniku oraz w naczyniach krwionośnych i w ośrodkowym układzie nerwowym stwierdzono współdziałanie obu postaci receptorów.

Dotychczasowa wiedza na temat znaczenia predykcyjnego i rokowniczego w nowotworach receptora ER beta jest ograniczona a wyniki prac są często niejednoznaczne.

Bardzo interesujące wyniki przynoszą badania nad rolą receptorów estrogenowych beta, prowadzone na liniach komórkowych. W linii komórek MCF-7 zawierających tylko receptory estrogenowe alfa (ER alfa+) i niezawierających receptorów estrogenowych beta wykazano, że estradiol nasilał proliferację. W tych samych komórkach po wprowadzeniu ER beta dochodziło zahamowania proliferacji poprzez wstrzymanie transkrypcji genów dla c-myc, cykliny D1 i cykliny A i zwiększenie ekspresji p21 i p27. Wyniki te świadczą o tym, że receptory estrogenowe alfa i beta mogą wywierać przeciwne działanie na proliferację i tworzenie się guzów. Na podstawie wielu badań naukowcy przypuszczają, że obecność receptorów beta w komórkach nowotworowych może okazać się korzystnym czynnikiem rokowniczym.

Znana jest rola estrogenów w procesie kancerogenezy. Działanie estrogenów w tym procesie jest związane z ich bezpośrednim wpływem na komórkę docelową i współdziałanie z innymi czynnikami egzogennymi: fizycznymi, chemicznymi i wirusowymi.

Estrogeny zwiększają proliferację komórkową, indukują białka receptorowe i nasilają syntezę DNA zarówno w tkance gruczołowej, jak i podścieliskowej narządu, co pobudza rozwój i wzrost nowotworów. Hormony te działają na komórkę docelową poprzez wiązanie kompleksu steroid – receptor z DNA, co powoduje zmianę transkrypcji genów.

Ekspresja receptorów estrogenowych w rakach sutka u ludzi stanowi ważny czynnik predykcyjny i prognostyczny. W leczeniu raka sutka u ludzi zastosowanie znalazły leki, które hamują syntezę estrogenów (inhibitory aromatazy), leki obniżające poziom estrogenów we krwi (analogi GnRh) oraz leki oddziałujące na same receptory estrogenowe tzw. antyestrogeny (TAMOXIFEN, RALOXIFEN). W większości badań wykazano, że ekspresja receptorów estrogenowych wiąże się z lepszym rokowaniem. O wpływie estrogenów na rozwój nowotworów gruczołu sutkowego świadczy to, że u suk, które zostały poddane wczesnej sterylizacji nowotwory te występują rzadziej.

Badania ekspresji receptorów estrogenowych dowodzą przydatności oznaczania ekspresji receptorów estrogenowych w przewidywaniu rozwoju choroby. Niska ekspresja receptorów estrogenowych wiązała się z częstszym powstawianiem przerzutów i krótszym czasem przeżycia. Wyższą ekspresją receptorów estrogenowych charakteryzowały się nowotwory niezłośliwe. Wykazanie obecności receptorów estrogenowych w raku sutka umożliwia wdrożenie jednej z form hormonoterapii.

2. Opis procedury

TECHNIKA IMMUNOCYTOCHEMICZNA – ZASTOSOWANIE W BADANIACH KOMÓREK UKŁADU ROZRODCZEGO

Ćwiczenie 1. Przeprowadzanie reakcji immunocytochemicznej na hodowanych komórkach Leydiga

Materiał: komórki Leydiga hodowane na szkiełkach nakrywkowych, PBS, aceton, metanol, Triton X100, TBS (pH 7,6), Tween 20, 30% nadtlenek wodoru, surowica, diaminobenzzydina (DAB), żel glicerynowy, przeciwciało pierwszorzędowe, przeciwciało drugorzędowe sprzężone z enzymem.

Wykonanie reakcji immunocytochemicznej

1. Szkiełka z rosnącymi komórkami przenieść do czystych szalek i przepłukać 3 x PBS
2. Utrwalić komórki przez zanurzenie szkiełek w zimnym metanolu na 10 min i acetonie 6 min
3. Przepłukać w PBS (2 x 5 min)
4. Zanurzyć komórki w 0,1% Tritonie X100 w PBS przez 10 min
5. Przepłukać w PBS 2 x 5 min
6. Inkubować komórki w roztworze 3% nadtlenku wodoru w PBS przez 10 min
7. Przepłukać w PBS 2 x 5 min
8. Inkubować komórki w obecności 5% - 10% surowicy (w PBS) pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało drugorzędowe przez 10 min.
9. Delikatnie odsączyć nadmiar surowicy.
10. Komórki inkubować w obecności odpowiednio rozcieńczonego przeciwciała pierwszorzędowego przez 20 h w temp +4°C
11. Przepłukać buforem PBS 3 x 5 min
12. Nałożyć przeciwciało drugorzędowe sprzężone z peroksydazą na 30 – 60 min w temp. pokojowej
13. Przepłukać buforem PBS 3x 5 min
14. Przeprowadzić reakcję barwną: komórki inkubować przez 2 - 7 min w roztworze diaminobenzzydiny.
15. Przepłukać szkiełka wodą bieżącą w celu zakończenia reakcji.
16. Przepłukać szkiełka wodą destylowaną
17. Nakleić szkiełka z wybarwionymi komórkami na szkiełka podstawowe używając żelu glicerynowego.
18. Oglądać preparaty w mikroskopie świetlnym.

Ćwiczenie 2. Obserwacja mikroskopowa i opisywanie preparatów komórek oraz tkanek układu rozrodczego wybarwionych metodami immunohisto/cytochemicznymi na obecność charakterystycznych białek (receptorów hormonalnych, enzymów steroidogennych itp.).

TECHNIKI IMMUNOHISTOCHEMICZNE W DIAGNOSTYCE ONKOLOGICZNEJ NA PRZYKŁADZIE RAKA SUTKA

Ćwiczenie 1. Przeprowadzanie reakcji immunohistochemicznej na skrawkach parafinowych raka sutka oraz podbarwienie preparatów hematosyliną w celu lepszego uwidocznienia struktury i miejsc reakcji (jądra komórkowe).

Odparafinowane skrawki poddawane są następującej procedurze :

A. BLOKOWANIE ENDOGENNEJ PEROKSYDAZY 3% H₂O₂
OKOŁO 5 MINUT

B. PŁUKANIE W BUFORZE TRIS 0.05M pH 7.6

C. SUROWICA BLOKUJĄCA 20% NORMALNA ŚWIŃSKA
OKOŁO 20 MINUT

D. PRZECIWCIAŁO PIERWSZORZĘDOWE MYSIE PRZECIWKO LUDZKIM RECEPTOROM ESTROGENOWYM
OKOŁO 30 MINUT

E. PŁUKANIE W BUFORZE TRIS

F. PRZECIWCIAŁO ŚWIŃSKIE WIĄŻĄCE BIOTYNYLOWANE PRZECIWKO MYSIM OKOŁO 15 MINUT

G. PŁUKANIE W BUFORZE TRIS

H. STREPTAWIDYNA SPRZĘŻONA Z PEROKSYDAZĄ
OKOŁO 10 MINUT

I. PŁUKANIE W BUFORZE TRIS

J. ROZTWÓR CHROMOGENU : KARBAZOL (AEC) lub DWUAMINOBENZYDYNA (DAB) Z NADTLENKIEM WODORU OKOŁO 10 MINUT Z KONTROLĄ POD MIKROSKOPEM

K. PŁUKANIE W H₂O

L. PODBARWIENIE W HEMATOKSYLINIE
OKOŁO 5 MINUT

**Ł. ZAMKNIĘCIE PREPARATU W Glicero-żelu lub Balsamie Kanadyjskim
OKOŁO 5 MINUT**

**M. OGLĄDANIE PREPARATÓW
OKOŁO 10 MINUT**

**RÓWNOLEGLE KONTROLA NEGATYWNA NA JEDNYM PREPARACIE
POLEGAJĄCA NA POMINIĘCIU PUNKTU D (PRZECIWCIAŁO
PIERWSZORZĘDOWE) !!!**

CZAS TRWANIA 130 MINUT + 10 MINUT NA KOMENTARZ= 140 (2.h 20 minut)

Ćwiczenie 2. Obserwacja mikroskopowa reakcji immunohistochemicznej na obecność receptorów estrogenowych alfa w badanym materiale.

3. Wymagania

Po zakończonych ćwiczeniach studenci powinni znać podstawowe techniki immunocytohistochemiczne (bezpośrednie i pośrednie, ich schematy), znać stosowane w nich reakcje kontrolne, znać znaczenie stosowania reakcji na obecność receptorów estrogenowych w diagnostyce onkologicznej oraz przykłady zastosowania immunocytochemii w badaniach naukowych nad funkcjonowaniem układu rozrodczego.

4. Literatura

1. Badowska-Kozakiewicz A.M., Malicka E. Ocena immunohistochemiczna ekspresji receptorów estrogenowych w nowotworach gruczołu sutkowego suk. Życie Weterynaryjne 2009.
2. Boenisch Th. HandBook Immunohistochemical staining Methods 3rd Editon DAKO North America , Carpinteria, CA, USA 2007.
3. Litwin JA, Gajda M. Podstawy technik mikroskopowych. Podręcznik dla studentów i lekarzy, Wydawnictwo WUJ, Kraków 2011.
4. Piekarski J. Receptory estrogenowe i progesteronowi w raku piersi-współczesny stan wiedzy. Współczesna Onkologia ,Vol.9,9 (371-379), 2005.
5. Słomczyńska M., Bilińska B. Zastosowanie techniki immunocytochemicznej. [w:] Techniki badań fizjologicznych, [red.] Lityńska A., Lewandowski M.H., Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1998

RIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE

26

STAINING METHODS

THOMAS BOENISCH

■ This chapter will briefly review some of the older methods and draw attention to aspects that were not given their deserved dues in the two previous editions of the Handbook. This will be followed by a more detailed description of several newer working procedures, including their advantages and disadvantages. Because of the ever-increasing repertoire of immunohisto(cyto)chemical methodology to choose from, the individual investigator will have to make a careful selection based primarily on the type of specimen to be investigated, the available primary antibody, the degree of sensitivity and the processing time required as well as the cost of the reagents.

Although published more than ten years ago, today the *Special Report* by Nadji and Ganjei¹ on the use of immunochemical staining methods in diagnostic cytology is considered a landmark review on this topic. Among the subjects covered were important technical aspects, the evaluation of the staining results and their specific diagnostic applications. The preparation of cell block specimens including their immunocytochemical staining has been covered also by others.²

Another subject not dealt with in our last edition was the influence that decalcification of bone biopsies may have on the immunoreactivity of several antigens. For important contributions on this topic, read the publications by Mullink et al³ and Mukai et al.⁴

Regarding primary antibodies of the monoclonal type, some attention should be directed to the type of diluent buffer used. Rather than extrapolate from many years of experience in the use of homogeneous polyclonal antibodies,⁵ diluents to be used for monoclonal antibodies of widely different characteristics should be selected more carefully.^{2,6} For example, 0.02M phosphate buffered saline (PBS) was highly recommended⁶ and is still widely used as a diluent for primary antibodies, including those of the monoclonal type. However, two recent systematic studies showed that this diluent buffer decreased the sensitivity of the immune reaction between most of the tissue antigens investigated and their monoclonal antibodies.^{7,8} This study also confirmed that addition of 0.15M Na⁺ ions to Tris diluent buffers could negatively affect the performance of monoclonal antibodies when compared to Tris buffers without this ion.^{7,8}

When alkaline phosphatase serves as an enzyme label in a procedure, avoid using phosphate buffers as they inhibit the activity of the enzyme. Sodium azide, an antibacterial agent present in many commercially prepared buffers, can prevent binding of the peroxidase enzyme to its substrate and inhibit color development. Its use in wash and diluent buffers should be avoided.

DIRECT METHOD

■ In this oldest technique, an enzyme-labelled primary antibody reacts with the antigen in the tissue (Figure 6). Subsequent use of substrate-chromogen concludes the reaction sequence. Because this method utilized only one antibody, it could be completed quickly, and nonspecific reactions were limited. However, since staining involves only one labelled antibody, little signal amplification was achieved and the method is no longer sufficiently sensitive for today's demands.



Figure 6: Direct method: Enzyme-labelled **primary** antibody reacts with tissue antigen.

TWO-STEP INDIRECT METHOD

■ In this method, an unconjugated primary antibody first binds to the antigen. An enzyme-labelled secondary antibody directed against the primary antibody (now the antigen) is then applied (Figure 7), followed by the substrate-chromogen solution. If the primary antibody is made in rabbit or mouse, the secondary antibody must be directed against rabbit or mouse immunoglobulins, respectively.

This method is more versatile than the direct method because a variety of primary antibodies from the same species can be used with the same conjugated secondary antibody. The procedure is also more sensitive than the direct method as several secondary antibodies are likely to react with a number of different epitopes of the primary antibody thus amplifying the signal as more enzyme molecules are attached per each target site.



Figure 7: Two-step indirect method: Enzyme-labelled **secondary** antibody reacts with **primary** antibody bound to tissue antigen.

Undesired reactions may occur if the secondary antibody cross-reacts with immunoglobulins of the tissue specimen. This cross-reactivity however is now routinely eliminated by using preabsorbed secondary antiserum, i.e., antiserum that has been absorbed with immunoglobulins from the species under investigation.

Probably one of the oldest uses of this technique was for the detection of autoimmune antibodies (e.g., antinuclear antibodies) in human serum. In this case, the patient's serum served as the source of the primary antibody and was applied onto tissue specimens containing the nuclear antigen, to be followed by an enzyme-linked secondary antibody to human immunoglobulin. If the patient's serum contained antibodies to this antigen, the enzyme-linked secondary antibody would react with the patient's antibody and thereby indicate a positive result.

THREE-STEP INDIRECT METHOD

■ In the three-step indirect method, a second enzyme-conjugated antibody is added to the previously described indirect technique. The two enzyme-conjugated secondary antibodies are applied sequentially (Figure 8). For example, if the secondary antibody was made in goat, the third antibody must be specific for goat immunoglobulin. Both, the secondary and tertiary antibodies must be conjugated to the same enzyme.

The addition of a third layer of antibody serves to further amplify the signal, since more antibodies are capable of binding to the previously bound secondary reagent. This procedure is particularly helpful when staining antigens with a limited number of epitopes.

The three-step indirect method provides a simple way to further increase the staining intensities compared to the two previous techniques.



Figure 8: Three-step indirect method: Enzyme-labelled tertiary antibody reacts with enzyme-labelled secondary antibody.

SOLUBLE ENZYME IMMUNE COMPLEX TECHNIQUES

■ These techniques, sometimes also called unlabelled antibody methods, utilize a preformed soluble enzyme-anti-enzyme immune complex. To obtain this soluble complex, excess enzyme is added to its antibody and any precipitate is removed.

The staining sequence of this technique consists of the use of an unconjugated primary antibody, a secondary antibody, the soluble enzyme-anti-enzyme complex and substrate solution. The primary antibody and the antibody of the enzyme immune complex must be made in the same species. The secondary antibody must be directed against immunoglobulins of the species producing both the primary antibody and the enzyme immune complex. The secondary antibody is added in excess so that one of its two Fab sites binds to the primary antibody leaving the other site available for binding the antibody of the enzyme immune complex.

Soluble enzyme-anti-enzyme immune complex techniques were named after the particular enzyme immune complex they used. For example, the PAP method utilized a peroxidase-antiperoxidase complex, APAAP used an alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase complex. The PAP complex consists of three molecules of peroxidase and two antibodies and the APAAP complex has two molecules of alkaline phosphatase and one antibody (Figure 9).



Figure 9: The APAAP immune complex reacts with secondary antibody. Primary antibody and the antibody of the immune complex must be made in the same species.

These methods were more sensitive than those described previously. The technique made use of the affinity of antibody for antigen (enzyme) to form a stable immune complex as opposed to the harsher chemical conjugation process. The greater degree of sensitivity compared to the previously described methods was mainly attributed to the greater number of enzyme molecules localized per antigenic site.

For many years, the PAP and APAAP procedures represented the most sensitive and reliable and hence most popular techniques in many pathology laboratories. However, today these techniques are only rarely used.

(STREPT)AVIDIN-BIOTIN TECHNOLOGIES

■ Most of the immunochemical staining methods in use today are based on the high affinity ($K = 10^{-15}M$) that (strept)avidin (*Streptomyces avidinii*) and avidin (chicken egg) have for biotin. Both possess four binding sites for biotin, but due to the molecular orientation of the binding sites, fewer than four molecules of biotin will actually bind. Because avidin is a glycoprotein and has an isoelectric point (pI) of 10, it has a propensity to non-specifically bind to lectin-like and negatively charged tissue components at physiological pH. It has been largely replaced today by streptavidin (also see Background chapter).

The inherent amplification of sensitivity made the avidin- and streptavidin-biotin methods more desirable than the previously described PAP and APAAP methods. The basic sequence of reagent application consists of primary antibody, biotinylated secondary antibody, followed either by the preformed (strept)avidin-biotin-enzyme complex of the avidin-biotin complex (ABC) technique (Figure 10) or by the enzyme-labelled streptavidin (Figure 11). Both conclude with the substrate solution. Horseradish peroxidase and alkaline phosphatase are the most commonly used enzyme labels. While the authors of the ABC method¹¹ reported this procedure to have a greater sensitivity than the PAP method, Giorno¹² subsequently found the sensitivity of a labelled avidin-biotin (LAB) method to be approximately four- to eight-fold greater than the ABC method. In both methods, the avidin has now been largely replaced by the use of streptavidin leading to the labelled streptavidin-biotin (LSAB) method and a modified ABC procedure, respectively.

Several modifications of these technologies have either increased the sensitivity or contributed to facilitating the staining process. These will be discussed later in this chapter.

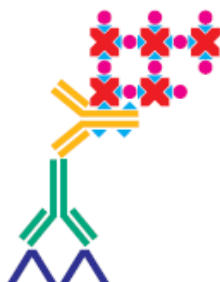


Figure 10: In the ABC technology, the avidin- or streptavidin-biotin-enzyme complex reacts with the biotinylated secondary antibody.



Figure 11: In the LAB or LSAB technology, the enzyme-labelled (strept)avidin reacts with the biotinylated secondary antibody.

■ **GENERAL ABC PROCEDURE** Formation of the ABC complex requires that the solutions of the (strept)avidin and biotinylated enzyme are mixed in an optimal ratio and be prepared at least 30 minutes before use. All incubations are carried out at room temperature.

1. Incubate tissue 30 minutes with normal swine (rabbit) serum.
2. Tap off serum and wipe away excess. DO NOT RINSE. Incubate 30 minutes with each of the following 3 reagents; rinse with and place 3–5 minutes in wash buffer after each step.
3. Primary antibody.
4. Biotinylated secondary antibody.
5. (Strept)avidin-biotin complex (prepared at least 30 minutes before use).
6. Incubate with substrate until desired staining intensity has developed.
7. Rinse with distilled water, counterstain and coverslip.

ABC PROCEDURE UTILIZING CATALYZED SIGNAL AMPLIFICATION (CSA)

■ Catalyzed signal amplification (CSA) uses an amplification reagent subsequent to the use of the streptavidin-biotin-peroxidase complex of the ABC protocol. The amplification reagent contains a phenolic substrate (biotinyl-tyramide) that is catalyzed by the bound peroxidase to form insoluble biotinylated phenols.^{13–15} The deposited biotins are then reacted with streptavidin-labelled peroxidase, thereby resulting in the deposition of additional enzyme molecules (Figure 12). Sanno et al¹⁶ reported staining for pituitary hormones by CSA with a sensitivity estimated to be 100 fold greater than that of the standard ABC method. In a comparison with the LSAB method, over 40 primary antibodies were found to react positively by the CSA system at dilutions from 20 to

200 times greater.¹² Furthermore, the CSA system was shown to be sensitive enough to detect many antigens of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue previously considered unreactive in this medium. In combination with thermally induced antigen retrieval (see Antigen Retrieval chapter), CSA has vastly expanded the horizons of immunohistochemistry.

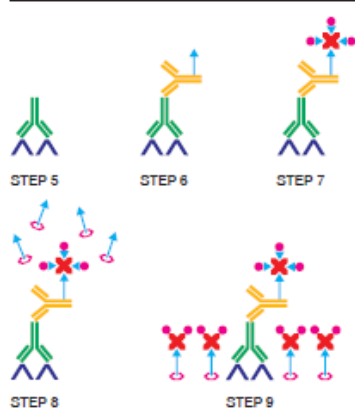


Figure 12: In the CSA technology, the primary antibody (step 5) is followed by a biotinylated secondary antibody (step 6), the streptavidin-biotin complex (step 7), the amplification reagent (step 8), and concludes with the streptavidin-enzyme complex (step 9).

■ GENERAL CSA PROCEDURE FOR USE WITH MONOCLONAL MOUSE PRIMARY ANTIBODIES.

1. Incubate tissue 5 minutes with peroxidase blocking reagent (optional).
2. Rinse with and place 3–5 minutes in buffer.
3. Incubate 5 minutes with a protein-blocking reagent to reduce background.
4. Tap off excess protein block. DO NOT RINSE.
Incubate 15 minutes with each of the following 5 reagents, repeat Step 2 after each:
5. Primary mouse antibody (or negative control reagent).
6. Biotinylated rabbit anti-mouse link antibody.
7. Streptavidin-biotin complex.
8. Amplification reagent.
9. Streptavidin-peroxidase complex.
10. Incubate 5 minutes with substrate-chromogen solution.
11. Rinse with distilled water.
12. Counterstain with hematoxylin (optional) and coverslip.

LSAB TECHNOLOGIES

■ The LSAB reagents are applied in the sequence of primary rabbit (mouse) antibody, biotinylated anti-rabbit (anti-mouse) immunoglobulins and streptavidin-enzyme conjugate (Figure 13). The color reaction is then developed with the appropriate substrate/chromogen. Although relatively short incubations of 10 minutes are generally recommended for routine applications, a substantial increase in sensitivity can be obtained by incubations with these reagents (especially primary antibody) for 30 minutes.

Except for the use of appropriately diluted enzyme-labelled streptavidin, the same protocol should be followed as for the ABC procedure. It should be noted that the biotinylated antibody and the enzyme-labelled streptavidin can be pre-mixed and applied as a complex, thereby shortening this procedure by one step.



Figure 13: The three steps of the LSAB technology consist of the primary antibody (step 3), biotinylated link antibody (step 4) and enzyme-labelled streptavidin (step 5).

■ GENERAL LSAB PROCEDURE (HRP) FOR USE WITH MONOCLONAL MOUSE PRIMARY ANTIBODY

1. Incubate 5 minutes with peroxidase blocking reagent (optional).
2. Rinse with and place 3–5 minutes in wash buffer.
Incubate 10 minutes with each of the following 4 reagents; repeat Step 2 after each:
3. Primary antibody (or negative control reagent).
4. Biotinylated link antibody.
5. Streptavidin-HRP.
6. Substrate-chromogen solution.
7. Counterstain with hematoxylin (optional) and coverslip.

CHAIN POLYMER-CONJUGATED TECHNOLOGY

■ This technology (DAKO EPOS™ and DAKO EnVision Systems) is protected by patents both in the USA as well as in Europe and utilizes an enzyme-labelled inert "spine" molecule of dextran (Figure 14). In addition to an average of 70 molecules of enzyme, 10 molecules of antibody can be attached to the spine molecule. In the EPOS System (Enhanced Polymer One-step Method) it is the primary

antibody that is conjugated to the enzyme-labelled dextran, thus staining is reduced to one immunochemical step. Conjugation of the secondary antibody instead results in the EnVision System in which staining is performed first by incubation with the primary antibody followed by the polymer. Conjugation of both anti-rabbit and -mouse secondary antibodies renders the system useful for both poly- and monoclonal primary antibodies, respectively. Because these systems avoid the use of (strept)avidin and biotin, nonspecific staining as a result of endogenous biotin is eliminated.

As mentioned, the chief advantage gained by the EPOS and EnVision technologies was the reduced number of incubation steps of the staining protocol normally required. Using the EPOS system, Chilosi et al.¹⁸ reported rapid staining completed in a single step and within 10 minutes. On the other hand, prolonging the incubation times with the primary antibody and the labelled polymer of the EnVision system can also result in antibody dilutions several-fold higher than those used in the standard ABC or LSAB protocols.

To what extent, if any, the molecular size of the polymer conjugate may constitute an impediment to unobstructed penetration of tissue sections has not been established.¹⁹

■ GENERAL EPOS PROCEDURE (PEROXIDASE)

1. Quench for endogenous peroxidase activity (optional).
2. Rinse with and place 3–5 minutes in wash buffer.
3. Incubate 10–60 minutes with EPOS conjugate.
4. Repeat Step 2.
5. Incubate 5–15 minutes with substrate-chromogen.
6. Counterstain (optional) and coverslip.

■ GENERAL ENVISION PROCEDURE (PEROXIDASE)

1. Incubate 5 minutes with peroxidase blocking reagent (optional).
2. Rinse with and incubate 3–5 minutes in wash buffer.
3. Incubate with primary antibody for 10* minutes.
4. Repeat Step 2.
5. Incubate for 5–10 minutes in polymer solution.
6. Repeat Step 2 twice.
7. Incubate 5–10 minutes in substrate-chromogen.
8. Repeat Step 2.
9. Counterstain and coverslip.

Incubations of 30 minutes are used in the EnVision+ system and help to increase sensitivity.

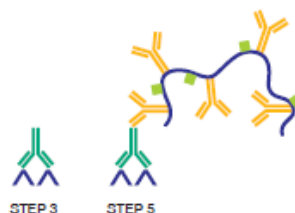


Figure 14: In the two-step EnVision System, the primary antibody (step 3) is followed by a spine molecule (step 5) which contains an average of 10 molecules of secondary antibody and 70 molecules of enzyme. (Peroxidase block and wash steps omitted.)

ENVISION PROCEDURES FOR THE SIMULTANEOUS STAINING OF SEVERAL TISSUE MARKERS

■ Procedures for the simultaneous staining of two or more tissue antigens have frequently suffered from limitations which rendered their use impractical. The chain-polymer based technology of the EnVision system however has been utilized successfully for this application.²⁰ Figure 15 illustrates the system in which peroxidase- and alkaline phosphatase-labelled polymers are conjugated with secondary antibodies against rabbit or mouse. An elution step prior to the use of additional primary antibodies serves to remove previously bound primary and link antibodies leaving only the deposit of chromogen from the previous steps,²¹ thus eliminating any potential for cross-reactivity.

■ GENERAL DOUBLESTAIN PROCEDURE

1. Quench for endogenous peroxidase activity (optional).
2. Rinse and incubate for 3–5 minutes in wash buffer.
Incubate for 10* minutes with each reagent in Steps 3, 4, 8 and 9; repeat Step 2 after each:
3. First primary antibody.
4. First link antibody/peroxidase-conjugated polymer.
5. Incubate 5–10 minutes with first substrate-chromogen.
6. Rinse with distilled water.
7. Incubate in doublestain block reagent for 3 minutes.
8. Second primary antibody.
9. Second link antibody/alkaline phosphatase-conjugated polymer.
10. Incubate 5–10 minutes with second substrate-chromogen.
11. Rinse with distilled water.
12. Counterstain (optional) and coverslip.

Incubations of 30 minutes are used in the EnVision+ system and help to increase sensitivity.

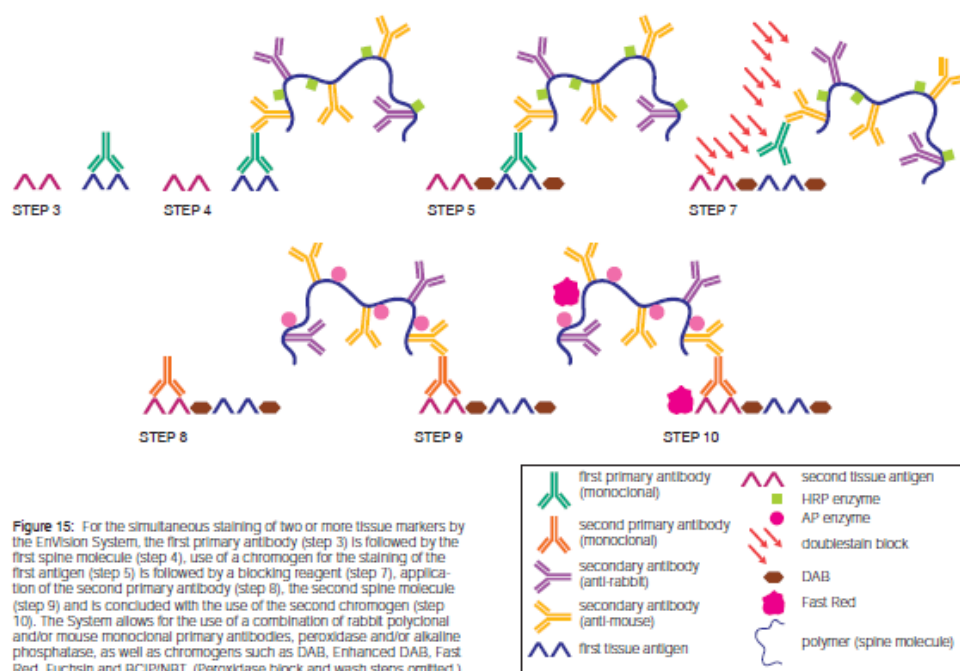


Figure 15: For the simultaneous staining of two or more tissue markers by the EnVision System, the first primary antibody (step 3) is followed by the first spine molecule (step 4), use of a chromogen for the staining of the first antigen (step 5) is followed by a blocking reagent (step 7), application of the second primary antibody (step 8), the second spine molecule (step 9) and is concluded with the use of the second chromogen (step 10). The System allows for the use of a combination of rabbit polyclonal and/or mouse monoclonal primary antibodies, peroxidase and/or alkaline phosphatase, as well as chromogens such as DAB, Enhanced DAB, Fast Red, Fuchsin and BCIP/NBT. (Peroxidase block and wash steps omitted.)

QUICK STAINING METHODS

■ Situations may arise when rapid histopathological evaluation becomes either necessary or desirable, as for example, during surgery. Traditionally, such evaluation was based almost entirely on morphological parameters following routine hematoxylin and eosin staining. The development of high-quality primary antibodies and more sensitive staining techniques, has made it possible to also obtain rapid immunochemical parameters to complement morphology.

Careful selection of methodology (e.g., EPOS), including primary antibody and antibody diluent (pH, ions), have significantly contributed to successful rapid staining with minimal background interference.^{7,18,27} However, rapid staining protocols do not lend themselves to the processing of many tissue sections at one time.

REFERENCES

- Nadji M and Garjel P. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:470-475.
- Leung SW and Bedard YC. *Modern Pathol* 1993; 6:630-632.
- Mullink H et al. *J Histochem Cytochem* 1985; 33:1103-1109.
- Mukai K et al. *Am J Surg Pathol* 1986; 10(6):413-419.
- Misteln C. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986; 107, 1-12.
- Larsson L-I. In: Larsson L-I. *Immunocytochemistry: Theory and practice*. Boca Raton: CRC Press 1988:147-170.
- Boenisch T. *Appl Immunohistochem* 1999; 7(4):300-306.
- Reimer HM and Wick MR. In: Wick MR, Siegal GP, eds. *Monoclonal antibodies in diagnostic immunohistochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1988:1-30.
- Boenisch T. *Appl Immunohistochem* 2001; 9(2):176-179.
- Van Oss CJ and Absalom DR. In: Atassi MZ et al (eds). *Molecular Immunology*. New York: Marcel Dekker, 1984:337-360.
- Hsu S-M et al. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-580.
- Giorno R. *Diagnostic Immunol* 1984; 2:161-166.
- Gross AJ and Sizer IW. *J Biol Chem* 1959; 161:161-164.
- Bobrow et al. *J Immunol Meth* 1989; 125:279-285.
- Bobrow et al. *J Immunol Meth* 1992; 150:145-149.
- Sanno et al. *Am J Clin Path* 1996; 106:16-21.
- Key ME and Phillips T. *DAKO Research Connection*, Vol. 2, #1, 1997.
- Chilos M et al. *Biotech Histochem* 1994; 69:235-239.
- Chan JK. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17(3):170-177.
- Spezialletti R et al. Presented at the U.S. & Canada Ac Pathol 1997, Orlando, FL.
- Allen MH et al. *Am J Dermatopathol* 1991; 13(3): 221-227.
- Tacha DE and McKinney LA. *J Histotech* 1992; 15:127-132.

BASIC ENZYMOLOGY

THOMAS BOENISCH

■ Immunoenzymatic staining methods utilize enzyme-substrate reactions to convert colorless chromogens into colored end products. Of the enzymes used in these applications, only horseradish peroxidase and calf intestine alkaline phosphatase will be considered in some detail. Because of its low sensitivity, glucose oxidase (*Aspergillus niger*) is only rarely used today.

This chapter will also discuss the various chromogens and substrates that can be used in conjunction with peroxidase and phosphatase, along with suggested procedures for the preparation of some substrate solutions.

ENZYMES

■ Enzymes are proteinaceous catalysts peculiar to living matter. Hundreds have been obtained in purified and crystalline form. Their catalytic efficiency is extremely high—one mole of a pure enzyme may catalyze the transformation of as many as 10,000 to 1,000,000 moles of substrate per minute. While some enzymes are highly specific for only one substrate, others can attack many related substrates. A very broad classification of enzymes would include hydrolytic enzymes (esterases, proteases), phosphorylases, oxidoreductive enzymes (dehydrogenases, oxidases, peroxidases), transferring enzymes, decarboxylases and others.

Enzymatic activity is dependent upon several variables, such as enzyme and substrate concentrations, pH, salt concentration of the buffer milieu, temperature and light. Many enzymes also possess non-proteinaceous chemical portions termed prosthetic groups. Typical prosthetic groups are the iron-protoporphyrin of peroxidase, and biotin of CO₂ transferases. In addition, many enzymes require the presence of metal ions such as Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ and Zn⁺⁺, which function as electrophilic (electron-attracting) agents.

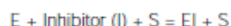
The general formula, which describes the reactions of an enzyme with its substrate, may be written as follows:

1. Enzyme (E) + Substrate (S) = ES complex
2. ES → E + Products (P)

Thus, before formation of the product, a transient enzyme-substrate complex is formed at the "active site" (prosthetic group) of the enzyme.

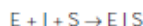
Substances that interfere with the specific binding of the substrate to the prosthetic group are specific inhibitors and differ significantly from agents which cause nonspecific

denaturation of enzyme (or any protein). Two basic types of inhibition are recognized, competitive inhibition and non-competitive inhibition. Competitive inhibition is the result of a reversible formation of an enzyme-inhibitor complex (EI):



The formation of the complex EI can be reversed by a change in the concentration of either the substrate or the inhibitor, unless the affinity of I for E is greater than of S for E. The action of carbon monoxide or azides on the heavy metals of respiratory enzymes is a typical example of competitive inhibition.

In noncompetitive inhibition, the inhibition depends solely on the concentration of the inhibitor and generally, is not reversible. Noncompetitive inhibition may or may not involve the prosthetic group of the enzyme and manifests itself by slowing down or halting the velocity of the enzyme's reaction upon the substrate.



Selecting the enzyme most suitable for a particular immunohistochemical application depends on a number of criteria:

- The enzyme should be available in highly purified form and be relatively inexpensive.
- Conjugation (covalent binding to antibody or avidin, for example) or noncovalent binding should not abolish enzyme activity, although it may diminish it.
- The bound enzyme should be stable in solution.
- Endogenous enzyme activity should interfere only minimally with specific antigen-related staining.
- The products of the enzymic reactions should be readily detectable and stable.

Horseradish peroxidase and calf intestine alkaline phosphatase meet most of these criteria and the following will list their properties in more detail.

■ **HORSERADISH PEROXIDASE (HRP):** This enzyme (molecular weight 40 kD) is isolated from the root of the horseradish plant. HRP has an iron-containing heme group (hematin) as its active site and in solution is colored brown. The hematin of HRP first forms a complex with hydrogen peroxide and then causes it to decompose resulting in water and atomic oxygen. HRP oxidizes several substances, two of which are polyphenols and nitrates. Like many other enzymes, HRP and some HRP-like activities can be inhibited by excess substrate. The complex formed between

HRP and excess hydrogen peroxide is catalytically inactive and in the absence of an electron donor (e.g. chromogenic substance), is reversibly inhibited. It is the excess hydrogen peroxide and the absence of an electron donor that brings about quenching of endogenous HRP activities. Cyanide and azide are two other strong (reversible) inhibitors of HRP.

HRP can be attached to other proteins either covalently or noncovalently. The covalent binding of HRP to other proteins can be performed using either one-step or two-step procedures involving glutaraldehyde. The chemical 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrophenyl sulfone (FNPS) is less commonly used for this purpose. In all cases, the epsilonamino groups of lysine and N-terminal amino groups of both proteins are involved in this reaction. The two-step conjugation procedure is preferred because, relative to the antibody molecule, the HRP molecule has few reactive groups. As a consequence, adding glutaraldehyde to a solution containing an admixture of HRP and antibody will result in more antibody molecules being conjugated to each other than to the enzyme. In the two-step procedure, HRP reacts with the bifunctional reagents first. In the second stage, only activated HRP is admixed with the antibody resulting in much more efficient labelling and no polymerization.

HRP is also conjugated to (strept)avidin using the two-step glutaraldehyde procedure. This form is used in the LAB and LSAB procedures for example. Conjugation with biotin also involves two steps, as biotin must first be derivatized to the biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester or to biotin hydrazide before it can be reacted with the epsilonamino groups of the enzyme.

Noncovalent binding of HRP to antibody (also known as unlabelled antibody binding) is described in great detail by Sternberger.¹ Instead of the use of bifunctional reagents, IgG-class antibodies to HRP are used to form a soluble semicyclic immune complex consisting of two antibody and three enzyme molecules. The molecular weight of the peroxidase-antiperoxidase or PAP complex is 400–430 kD.

■ **CALF INTESTINE ALKALINE PHOSPHATASE (AP):** Calf intestine alkaline phosphatase (molecular weight 100 kD) removes (by hydrolysis) and transfers phosphate groups from organic esters by breaking the P-O bond; an intermediate enzyme-substrate bond is briefly formed. The chief metal activators for AP are Mg^{++} , Mn^{++} and Ca^{++} .

AP had not been used extensively in immunohistochemistry until publication of the unlabelled alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase (APAAP) procedure.^{2,3} The soluble immune complexes utilized in this procedure have molecular weights of approximately 560 kD. The major advantage of the APAAP procedure compared to the PAP technique is the lack of interference posed by endogenous peroxidase activity. Because of the potential distraction of endogenous peroxidase activity on PAP staining, the

APAAP technique is recommended for use on blood and bone marrow smears. Endogenous alkaline phosphatase activity from bone, kidney, liver and some white cells can be inhibited by the addition of 1 mM levamisole to the substrate solution,⁴ although 5 mM has been found to be more effective.⁵ Intestinal alkaline phosphatases are not adequately inhibited by levamisole.

SUBSTRATES AND CHROMOGENS

■ **PEROXIDASE** As described above, HRP activity in the presence of an electron donor first results in the formation of an enzyme-substrate complex, and then in the oxidation of the electron donor. The electron donor provides the "driving" force in the continuing catalysis of H_2O_2 , while its absence effectively stops the reaction.

There are several electron donors that when oxidized, become colored products and are therefore called chromogens. This, and the property of becoming insoluble upon oxidation, make such electron donors useful in immunohistochemistry.

3,3'-DIAMINOBENZIDINE (DAB) produces a brown end product which is highly insoluble in alcohol and other organic solvents. Oxidation of DAB also causes polymerization, resulting in the ability to react with osmium tetroxide, and thus increasing its staining intensity and electron density. Of the several metals and methods used to intensify the optical density of polymerized DAB, gold chloride in combination with silver sulfide appears to be the most successful.⁶

3-AMINO-9-ETHYL CARBAZOLE (AEC), upon oxidation, forms a rose-red end product which is alcohol soluble. Therefore, specimens processed with AEC must not be immersed in alcohol or alcoholic solutions (e.g., Harris' hematoxylin). Instead, an aqueous counterstain and mounting medium should be used. AEC is unfortunately susceptible to further oxidation and, when exposed to excessive light, will fade in intensity. Storage in the dark is therefore recommended.

4-CHLORO-1-NAPHTHOL (CN) precipitates as a blue end product. Because CN is soluble in alcohol and other organic solvents, the specimen must not be dehydrated, exposed to alcoholic counterstains, or coverslipped with mounting media containing organic solvents. Unlike DAB, CN tends to diffuse from the site of precipitation.

p-PHENYLENEDIAMINE DIHYDROCHLORIDE/pyrocatechol (Hanker-Yates reagent) gives a blue-black reaction product which is insoluble in alcohol and other organic solvents. Like polymerized DAB, this reaction product can be osmicated. Varying results have been achieved with Hanker-Yates reagent in immunoperoxidase techniques.

■ **ALKALINE PHOSPHATASE** In the immunoalkaline phosphatase staining method, the enzyme hydrolyzes naphthol phosphate esters (substrate) to phenolic compounds and phosphates. The phenols couple to colorless diazonium salts (chromogen) to produce insoluble, colored azo dyes. Several different combinations of substrates and chromogens have been used successfully.

NAPHTHOL AS-MX PHOSPHATE can be used in its acid form or as the sodium salt. The chromogens Fast Red TR and Fast Blue BB produce a bright red or blue end product, respectively. Both are soluble in alcoholic and other organic solvents, so aqueous mounting media must be used. Fast Red TR is preferred when staining cell smears.

NEW FUCHSIN also gives a red end product. Unlike Fast Red TR and Fast Blue BB, the color produced by New Fuchsin is insoluble in alcohol and other organic solvents, allowing for the specimens to be dehydrated before coverslipping. The staining intensity obtained by use of New Fuchsin is greater than that obtained with Fast Red TR or Fast Blue BB.

OTHER SUBSTRATES AND CHROMOGENS Additional substrates include naphthol AS-BI phosphate, naphthol AS-TR phosphate and 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate (BCIP). Other possible chromogens include Fast Red LB, Fast Garnet GBC, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) and iodinitrotetrazolium Violet (INT).

Detailed descriptions and information for the preparation of the most commonly used substrate-chromogen mixtures for HRP¹ and AP⁸ as well as their appropriate use and advantages or disadvantages are available.^{9,12}

SUGGESTED PROCEDURES FOR SUBSTRATE-CHROMOGEN REAGENTS

■ PEROXIDASE

AEC SUBSTRATE SOLUTION (recommended for cell smears)

1. Dissolve 4 mg AEC in 1 mL N,N-dimethylformamide.
2. Add 14 mL 0.1 M acetate buffer, pH 5.2 and 0.15 mL 3% hydrogen peroxide.
3. Mix, and filter if precipitate forms.
4. Add solution to tissue and incubate for 5–15 minutes at room temperature.
5. Rinse with distilled water.
6. Counterstain and coverslip with aqueous-based medium.

DAB SUBSTRATE SOLUTION

1. Dissolve 6 mg DAB in 10 mL 0.05 M Tris buffer, pH 7.6.
2. Add 0.1 mL 3% hydrogen peroxide. Mix, and filter if precipitate forms.
3. Add solution to tissue and incubate for 3–10 minutes at room temperature.
4. Rinse with distilled water.
5. Counterstain and coverslip with either organic- or aqueous-based medium.

■ ALKALINE PHOSPHATASE

FAST RED SUBSTRATE SOLUTION (recommended for cell smears)

1. Dissolve 2 mg naphthol AS-MX phosphate, free acid (Sigma N 4875) in 0.2 mL N,N-dimethylformamide in a glass tube.
2. Add 9.8 mL 0.1 M Tris buffer, pH 8.2.
3. Add 0.01 mL of 1 M levamisole (Sigma L 9756) to block endogenous alkaline phosphatase. (Solution can be stored at 4°C for several weeks, or longer at -20°C.)
4. Immediately before staining, dissolve 10 mg Fast Red TR salt (Sigma F 1500) in above solution and filter onto slides.
5. Incubate for 10–20 minutes at room temperature.
6. Rinse with distilled water.
7. Counterstain and coverslip with aqueous-based medium.

NEW FUCHSIN SUBSTRATE SOLUTION (recommended for tissue sections)

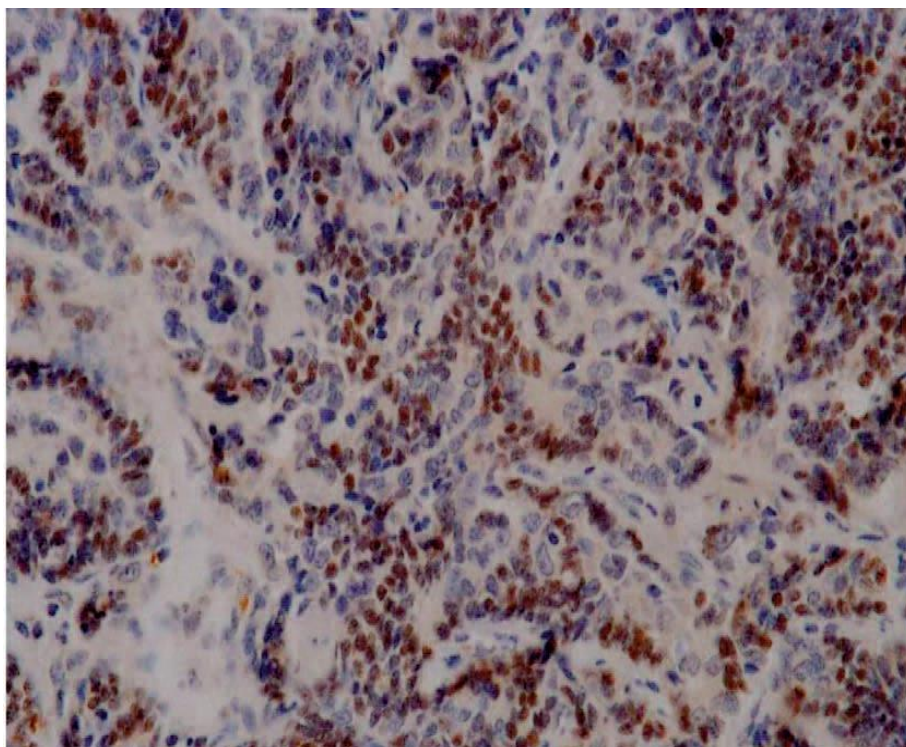
1. Solution A: Mix 18 mL of 0.2 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (Merck 801464) with 50 mL 0.05 M Tris buffer, pH 9.7 and 600 mg sodium chloride. Add 28 mg levamisole (Sigma L 9756).
2. Solution B: Dissolve 35 mg naphthol AS-BI phosphate (Sigma N 2250) in 0.42 mL N,N-dimethylformamide.
3. Solution C: Under fume hood, mix 0.14 mL 5% New Fuchsin (Sigma N 0638, 5 g in 100 mL 2 N HCl) with 0.35 mL of freshly prepared 4% sodium nitrite (Sigma S 2252, 40 mg in 1 mL distilled water). Stir for 60 sec.
4. Mix Solutions A and B, then add Solution C; adjust to pH 8.7 with HCl. Mix well and filter onto slides.
5. Incubate for 10–20 minutes at room temperature.
6. Rinse with distilled water.
7. Counterstain and coverslip with either organic- or aqueous-based medium.

NEW FUCHSIN SUBSTRATE SOLUTION (alternative procedure)

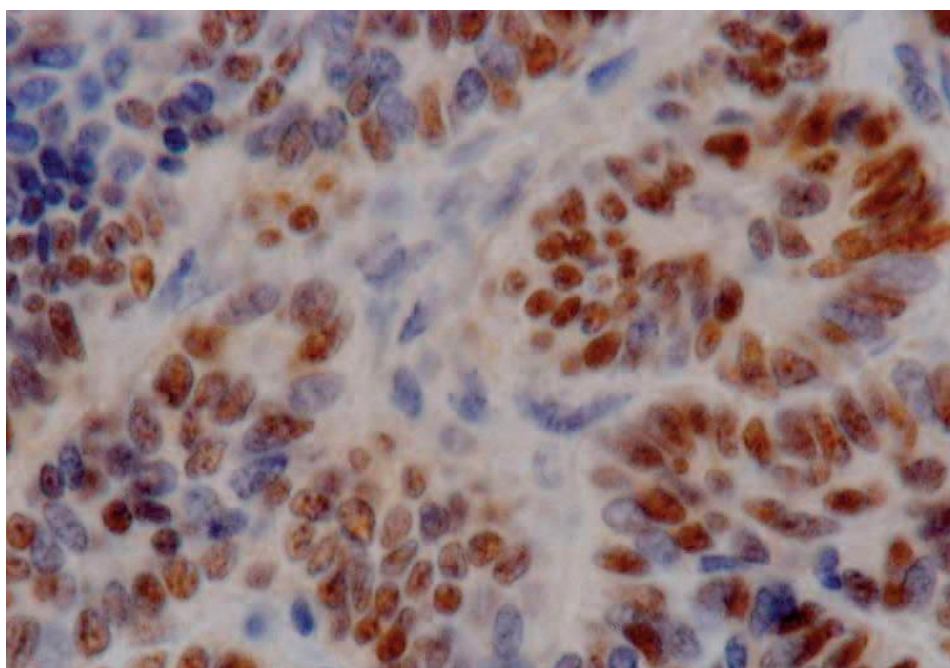
1. Solution A: In fume hood add 0.2 mL of 5% New Fuchsin (Merck 4041, in 2 N HCl) to 0.5 mL of fresh 4% sodium nitrite. Agitate for 30-60 sec. Add 100 mL of 0.05 M Tris buffer, pH 8.7, and 100 μ L of 1 M levamisole to block endogenous alkaline phosphatase.
2. Solution B: Dissolve 50 mg naphthol AS-BI phosphate (Sigma N 2250) in 0.6 mL N,N- dimethylformamide.
3. Add Solution B to Solution A and mix well. Filter directly onto slides.
4. Incubate for 10–20 minutes at room temperature.
5. Rinse with distilled water.
6. Counterstain and coverslip with either organic- or aqueous-based medium.

REFERENCES

1. Sternberger LA. Immunocytochemistry (2nd ed). New York: Wiley, 1979.
2. Mason DY et al. J Cancer Res Clin Oncol 1981;101:13-22.
3. Cordell JL et al. J Histochem Cytochem 1984;32:219-229.
4. Ponder BA and Wilkinson MM J. Histochem Cytochem 1981;29:981-984.
5. Gown AM In DeLellis RA (ed) Advances in Immunohistochemistry. New York: Raven Press, 1988, pp 31-45.
6. Newman GR et al. J Microscopy 1983;132:RP1-2.
7. DAKO Specifications No. K0597, K0598, K0599, K0624, K0698.
8. DAKO Specifications No. K3461, K3465, K3467.
9. Newman GR et al. J Microscopy 1983; 132: RP1-2.
10. Clark CA et al. J. J Histochem Cytochem 1982; 30:27-34.
11. Gay et al. J Histochem Cytochem 1984; 32:447-451.
12. Bondi A et al. Histochemistry 1982; 76:153-158.



ADENOCARCINOMA (OBRAZ EKSPRESJI RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH ALFA+) IHC KIT LSAB firmy DAKO Z WYKORZYSTANIEM DAB-u. BRUNATNE MIEJSCA REAKCJI W OBREBIE JĄDER KOMÓRKOWYCH



ADENOCARCINOMA (OBRAZ EKSPRESJI RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH ALFA+) IHC KIT LSAB DAKO JAK WYŻEJ