大韓病理學會誌 : 第17卷 第4號
K. J. Path., Vol. 17(4) : 412, 1983

Immunohistochemistry에 있어서 Peroxidase-Antiperoxidase 법과 Biotin-Avidin System 법의 비교검토

전남대학교 의과대학 임상병리학교실

정 상 우·신 종 회·최 찬

서 론

Coons 등[1,2]에 의하여 면역형광법이 알려졌고 그 후 면역형광법은 세포내외의 항원성을 갖는 물질을 관찰하는데 광범하게 이용되어 왔다. 그러나 면역형광법에 의한 표본은 영구보존이 불가능하며 주로 신선한 동결절편을 필요로하고 또한 배경이 암시야상태이므로 형광반응을 보이는 물질과 주변과의 관계를 살펴볼 수 없기 때문에 면역형광법은 조직병리영역에서는 부분적으로만 적용될 따름이다[3].

Fluorescein이나 rhodamine과 같은 형광색소외에도 horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, muramidase, 또는 glucose oxidase와 같은 효소를 항체에 표식할 수 있게 됨에 따라 면역효소법이 소개되었으며[4,5] 면역효소법은 통상의 paraffin 절편에서도 적용이 가능하므로 특히 조직병리에서의 적용범위는 점차 확대되고 있다[6]. 표식효소중에서도 horseradish peroxidase는 안정된 화합물이며 표식방법이 용이하고 다양한 발색제를 가지고 있기때문에[7~9] 일찍부터 면역효소법에 사용되었으며 Sternberger 등[10]이 peroxidase antiperoxidase complex(PAP)를 제조하게 되면서부터는 더욱 광범히 이용되어 면역효소법을 흔히 immunoperoxidase법 또는 PAP법이라고 명칭하게 되었다.

PAP법은 면역형광법과는 달리 paraffin 절편에서도 적용이 가능하므로 대조염색까지 하여 H.E소견과 비교할 수 있고 retrograde review가 가능하다는 장점을 가지고 있으나 PAP법이 면역형광법을 완전히 대치하지는 못하고 있다. 그 이유는 고정과 포매과정에서 일부 항원성물질들이 변성되기 때문이기도 하나[11] 어떤 경우에는 항원성 물질의 양이 너무 적어 양성반응이 뚜렷하지 않기 때문이다.[6,12] 따라서 현재로서는 surface immunoglobulin이나 lymphocyte differentiation antigen을 규명하기 위하여서는 면역형광법이 많이 사용되는 추세이다.

최근 PAP법보다 더 높은 예민도를 갖는다는 biotin-avidin system(BAS)법에 의한 immunoperoxidase법이 소개되어[13~16] 저자들은 PAP법과 BAS법의 장단점을 비교하였으며 저자들의 경험과 합께 보고한다.

접 수 : 1983년 12월 8일

재료 및 방법

Immunoglobulin G(IgG), α-fetoprotein(αFP), lysozyme, Herpes simplex virus Type Ⅱ(HSVⅡ) 및 glial fibrillary acidic protein(GFA)을 각각 가지고 있으리라고 생각되는 염증성조직, 간세포암조직, 위선암조직, 자궁경부의 이형성증조직 그리고 성세포종(astrocytoma)조직 3~4례의 paraplast block을 임의로 선정하였다. paraplast조직은 모두 통상의 H·E염색표본제작에 사용된 block들로서 10% buffered neutral formalin에서의 고정시간 24시간이내, paraplast bath 내에서의 침투온도 58~59°C의 조건하에서 자동조직처리기로 제작하였다.

PAP법 : 약 3μ두께의 조직절편을 xylene과 alcohol을 거쳐 증류수에서 함수시켰고 periodic acid 1% 수용액으로 15분간 처치하여 조직내의 내재성 peroxidase를 억제시켰으며 10 mM phosphate buffered saline, pH 7.6(PBS)으로 washing하였다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여서 normal swine serum(DAKO)-PBS 1 : 20용액중에서 15분간 작용시켰고 blot하였다. IgG, αFP, lysozyme, HSVⅡ 및 GFA에 대한 일차항체는 모두 rabbit antihuman IgG(DAKO)

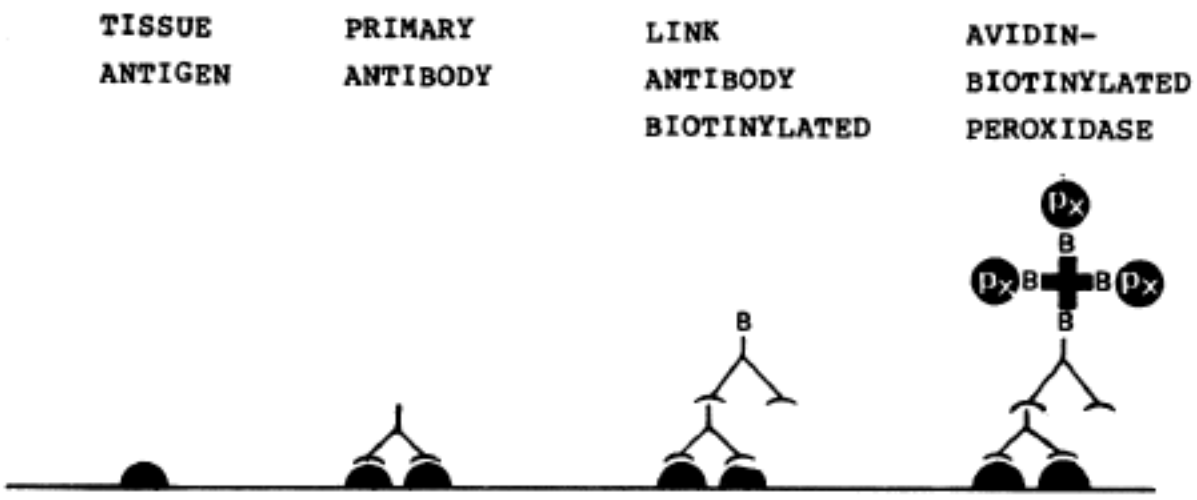

Fig. 1. Immunoperoxidase staining by biotin-avidin system.

로서 PBS로 1 : 125부터 1 : 64,000까지 2배연속 희석하여 각 희석액을 해당되는 조직위에 도포하였고 PBS가 든 humid chamber 내에 16시간 동안 부치한 후 PBS로 washing하였다. 이차항체인 swine antirabbit serum(DAKO)-PBS 1 : 30용액을 30분간 작용시킨 후 PBS로 washing하였고 rabbit PAP(DAKO)-PBS 1 : 200용액으로 30분간 도포후 역시 PBS로 washing하였으며 0.01% H_2O_2~0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)-PBS로 발색시켰다. Hematoxylin 대조염색후 통상의 방법대로 탈수과정을 거쳐 Canada balsam mount후 광학현미경으로 관찰하였다.

BAS법 : 전체적인 과정은 PAP법에서와 동일하였다. 다른 점은 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여 normal rabbit serum(Vector)-PBS 1 : 10용액중에 15분간 작용시켰고 이차항체로는 goat의 biotin-antirabbit antibody(Vector)-PBS 1 : 800용액을 사용하였으며 rabbit PAP 대신에 avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex(ABC, Vector)-PBS 1 : 100용액을 사용한 점이었다(Fig. 1).

PAP법과 BAS법에서 사용된 이차항체와 PAP 및 ABC의 농도는 예비실험에서 checkerboard titration에 의하여 결정하였다.

성 적

갈색으로 나타나는 양성반응이 뚜렷하고 간질에서의 배경염색이 거의 없었던 표본에서의 일차항체 희석배수를 최적역가로 하여 PAP법과 BAS법을 비교하였다.

IgG는 많은 수의 형질세포의 세포질에서 강한 양성반응을 보였고 음성반응을 보이는 형질세포와는 뚜렷이 구분되었으며 최적 희석배수는 표본에 따라 1희석배수 정도의 차이는 있었으나 대체적으로 PAP법에서는 1 : 4,000, BAS법에서는 1 : 32,000이었다. 간세포암조직에서 αFP의 최적희석배수는 PAP법에서 1 : 250, BAS법에서 1 : 2,000이었고 위선암조직중 일부 암세포와 주위 비종양성 조직내 Paneth 세포 및 간질의 대식세포에서 양성으로 관찰되는 lysozyme도 PAP법으로 1 : 250, BAS법으로는 1 : 2,000의 최적희석배수를 보였다. 자궁경부의 이형성세포에서 HSV Ⅱ의 양성반응은 한 표본에서만 관찰되었는데 최적희석배수는 PAP법에서 1 : 250 BAS법으로는 1 : 1,000이었고 성세포종 종양세포의 세포질에서 관찰되는 GFA는 PAP법과 BAS법으로 각각 1 : 250과 1 : 2,000의 최적희석배수를 보였다. 그러나 최적표본인 경우에도 PAP법에서의 배경염색이 BAS법에서의 배경염색보다는 좀더 강하였다.

고 찰

염색의 제반조건이 엄격하게 규정된 상태에서 배경염색이 없는 높은 특이도(specificity)의 표본을 얻기 위하여서는 일차 항체의 희석배수를 높여 주어야 하나 희석배수를 높임으로서 양성반응도는 저하되며[6] 따라서 높은 예민도(sensitivity)를 갖는 방법이 요구된다. 이 실험에서 같은 조건하에서 PAP법과 BAS법에 사용된 일차항체의 희석배수는 조직에 따라 4~16배정도 BAS법에서 높았으며 그 결과 BAS법에서의 배경염색이 더 약하였고 보다 좋은 염색결과를 얻는 것으로 생각되었다. Hsu 등[13]은 BAS법이 PAP법보다 25~40배 높은 예민도를 갖는 것으로 보고하여 저자들의 성

적과는 정도의 차이를 보였으나 이는 사용한 일차항체의 종류가 다르고, 최적 표본을 판정하는 방법이 주관적이며, 조직에 따라서 최적희석배수가 다르기 때문이라고 볼 수 있었다.

BAS법이 PAP법보다 높은 예민도를 갖는 것은 BAS법에 이용되는 biotin과 avidin 사이의 결합능(해리상수 10^{-5}M)이 PAP법에서 이용되는 항원과 항체 사이의 결합능(해리상수 10^{-10}~$^{-12}$M) 보다 $10^{3\sim5}$배 강하며[13,14], ABC의 격자구조내에는 많은 수의 peroxidase 분자가 들어있으나[13~15] PAP 내에는 peroxidase 3분자만이 들어있기 때문이라고[7] 설명되고 있다.

침투 및 포매에 사용하는 제제에 따라 예민도는 영향을 받는다고 보고되어 있으며 paraffin이 가장 좋고 paraplast, paraplast plus, paraplast-pekolite의 순서로서 paraplast를 사용할 경우는 toluene으로 탈 paraplast시키는 것이 권장되고 있으나[17] 저자들의 경험으로는 PAP법이나 BAS법에서 모두 paaaffin과 paraplast에 따른 차이를 인정하기 어려웠다. 침투 및 포매제로서 paraplast를 사용하는 조직실에서 immunoperoxidase 염색을 위해 별도로 paraffin bath를 준비하거나 paraffin으로 대치시킬 필요는 없으리라고 생각한다.

조직내의 내재성 peroxidase를 억제시키기 위하여 항원 항체반응에 영향을 미치지 않으면서 억제효과가 큰 H_2O_2-methanol액이 흔히 사용되고 있으나[18] 1% periodic acid 수용액이 보다 효과적이라는 경험적 사실[19]로 저자들은 periodic acid를 사용하고 있다. 양자를 비교하지는 않았으나 저자들의 조직표본내 적혈구나 과립구의 peroxidase 활성을 볼 수 없어 periodic acid의 억제효과도 좋은 것으로 판찰되었다.

PAP법이나 BAS법에서 사용되는 항체는 이온결합[20]등 비특이적 결합에 의하여 조직, 특히 collagen과 reticulin에 결합함으로서 배경염색의 중요한 원인이 되므로 배경염색을 억제시키기 위하여서는 neutral serum이나 neutral immunoglobulin으로 전처치하거나[3,7,21,22] 항체를 PBS대신에 neutral serum으로 희석하며[7,23] 또는 비특이적 결합에 항체의 Fc fraction이 관여한다고 생각되면 Fab fraction만을 사용한다.[7,9,24] 다른 또 하나의 방법은 항체의 희석배수를 높여주는 것이다[6]. 전자는 기술적으로 어렵고 따라서 희석배수를 높여야 되는데 PAP법에 비하여 BAS법에서는 항체의 희석배수가 높으므로 배경염색이나 비특이적 항체에 의한 위양성반응을 크게 줄일 수 있다.

BAS법이 갖는 또다른 장점은 경제성이다. Immunohistochemistry에 BAS법을 이용하며는 PAP법을 이용할 때 보다도 경비를 95% 절감할 수 있다고 보고되어 있다[13].

BAS법의 단점으로서는 biotin이 vitamin으로서 포유동물의 간세포와 신뇨세관세포, 지방세포 및 유선등에 분포되어 있으므로[26~28] 이들 조직을 대상으로 BAS법을 적용시킬 때에는 ABC가 조직에 들어있는 biotin과 반응하여(endogenous avidin binding activity, EABA) 위양성반응을 일으킬 수 있다는 점이다. 그러나 EABA에 의한 위양성반응은 약하며 전체세포에 미만성으로 출현하기 때문에 일단 위양성반응임이 쉽게 식별되며 결과해석에 큰 장애가 되지 않는다. 또한 avidin과 결합할 수 있는 biotin의 결합수는 하나뿐이므로[29,30] EABA는 Wood와 Warnke[31]의 방법대로 avidin과 biotin의 전처치를 통하여 block시킬 수 있다.

BAS법은 고유한 장점과 함께 단점을 가지고 있으나 높은 sensitivity와 specificity 때문에 면역효소법 외에도 면역형광법[32] 또는 면역전자현미경적 방법[33]에도 점차 많이 이용되고 있으며 그 적용범위는 더욱 확대될 것으로 생각한다.

결 론

Immunoperoxidase 염색에서 통상적으로 사용하는 PAP법과 새로 소개된 BAS법의 예민도와 특이도를 비교하였고 BAS법의 장점과 단점을 고찰하였다. 염증성조직, 간세포암조직, 위선암조직, 자궁경부의 이형성증조직 및 성세포종 3~4예의 외과병리조직을 각각 IgG, αFP, lysozyme, HSV Ⅱ와 GFA의 일차항체를 이용하여 PAP법과 BAS법으로 염색한 결과 BAS법에서 양성반응이 더 뚜렷하였고 배경염색도 경미하였다. 각 방법에서 최적의 염색상을 얻을 수 있는 일차항체의 희석배수는 BAS법에서 4~16배 더 높았으며 이는 BAS법에 이용되는 biotin과 avidin 사이의 결합력이 강하고 ABC 격자구조내에 많은 수의 peroxidase 분자가 들어있기 때문이라고 생각되었다. 내재성 peroxidase의 활성은 periodic acid 1% 수용액 처치로 억제시킬 수 있었다.

BAS법을 사용할 때 단점으로 지적될 수 있는 EA

BA는 avidin과 biotin의 전처치로 억제시킬 수 있으므로 immunohistochemistry에 있어서 BAS법은 광범하게 이용될 것으로 기대되었다.

REFERENCES

1) Coones AH, Creech HJ, Jones RN: *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Pro Soc Exp Biol 47:200, 1941*
2) Coones AH, Kaplan MH: *Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 91:1, 1950*
3) Taylor CR: *Hodgkin's Disease and the Lymphomas. Annual Research Review Eden Press Montreal(Canada), 1976*
4) Nakane PK, Pierce BG Jr: *Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 14:929, 1966*
5) Avrameas S, Uriel J: *Méhtode de Marquage d'antigénes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. C R Acad Sci 262:2543, 1966*
6) Taylor CR: *Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. Arch Pathol Lab Med 102:113, 1978*
7) Sternberger LA: *Immunocytochemistry Prentice-Hall Inc N J, 1974*
8) Avrameas S: *Studies on antibody formation with enzyme markers. Ann N Y Acad Sci 254: 175, 1975*
9) Kraehenbul JP, Jamieson JD: *Localization of intracellular antigens by immunoelectron microscopy. Int Rev Exp Pathol 1:51, 1974*
10) Sternberger LA, Hardy PH, Jr, Cuculis JJ, Meyer HG: *The unlabeled antibody-enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex(horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 18:315, 1970*
11) Warnke R: *Alteration of immunoglobulin-bearing lymphoma cells by fixation. J Histochem Cytochem 27:1195, 1979*
12) Fallini B, Taylor CR: *New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med 107:105, 1983*
13) Hsu SM, Raine L, Fanger H: *A comparative study of the PAP method and avidin-biotin-complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am J Clin Pathol 75:734, 1981*
14) Hsu SM, Raine L, Fanger H: *The uses of avidin-biodin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeced antibody(PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29:577, 1981*
15) Hsu SM, Raine L: *Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 29:1349, 1981*
16) Childs(Moriarty) G, Unabia G: *Application of the avidin biotin-peroxidase complex(ABC) mathod to the light microscopic localization of pituitary hormones. J Histochem Cytochem 30: 713, 1982*
17) Maual of Immunoperoxidase Staining Kit. Immunok Inc, *1982*
18) Streefkerk JG: *Inhibition of erythrocyte pscudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. J Histochem Cytochem 20:829, 1972*
19) Gangi M: *Personal communication, 1982*
20) Boenisch T(ed): *Reference Guide series 1, PAP/Immunoperoxidase. DAKO Corp Santa Barbara 1980, p.14*
21) Taylor CR: *The nature of Reed-Sternberg cells and other malignant cells. Lancet 2:802, 1974*
22) Taylor CR: *An immunohistological study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease. Europ J Cancer 12:61, 1976*
23) Moriarty GC: *Adenohypophysis: Ultrastructural cytochemistry. A review. J Histochem Cytochem 21:855, 1973*
24) Nakane PK: *Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. Ann N Y Acad Sci*

254:203, 1975

25) Preu'homme JL, Labaume S: *Immunofluorescent staining of human lymphocytes for the detection of surface immunoglobulins. Ann N Y Acad Sci 254:254, 1975*

26) Dakshinamurti K, Mistry SD: *Tissue and intracellular distribution of biotin-$C^{14}OOH$ in rats and chicks. J Biol Chem 238:294, 1963*

27) Moss J, Lane MD: *The biotin-dependent enzymes. Adv Enzymol 35:321, 1971*

28) Wood HJ, Borden R: *Biotin enzymes. Annu Rev Biochem 46:385, 1977*

29) Moss J, Lane MD: *The biotin-dependent eneymes. Adv Enzymol 35:321, 1971*

30) Green NM: *Avidin. Adv Protein Chem 29:85, 1975*

31) Wood GS, Warnke R: *Suppresion of endogenous avidin binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. J Histochem Cytochem 29:1196, 1981*

32) Heggeness MH, Ash JF: *Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. J Cell Biol 73:783, 1977*

33) Heitzmann H, Richards FM: *Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membrane in electron microscopy. Proc Nat Acad Sci USA 71:3537, 1974*

=Abstract=

Comparision of Biotin-Avidin System Method with Peroxidase-Antiperoxidase Method in Immunohistochemistry

Sang Woo Juhng, M.D., **Jong Hee Shin**, M.D. and **Chan Choi**, M.D.

Department of Clinical Pathology, Chonnam University Medical School

Newly introduced BAS method in immunoperoxidase staining was compared with PAP method and the advantages and disadvantages of BAS method were discussed. Various dilutions of primary antisera of IgG, αFP, lysozyme, HSV II and GFA were applied to the surgical biopsy specimens of inflammatory reaction, hepatocellular carcinoma, gastric adenocarcinoma, cervical dysplasia and astrocytoma, respectively, and each specimen was stained with PAP or BAS method.

The ratio of specific staining-background staining was higher in BAS method, where dilutions of the primary antisera were 4~16 times those applied in PAP method. The high dilution titers in BAS method was thought to be due to strong binding activity between biotin and avidin, and also due to lattice-like structure of ABC containing many peroxidase molecules.

The main disadvantage of BAS method is endogenous avidin binding activity which can be overcome by pretreatment with avidin and biotin.