

免疫组化操作流程

Step1. 烤片

烤片的目的是将带有蜡的组织切片牢固地黏在载玻片上, 以免染色过程中切片脱落。切片在 56~60°C 的恒温箱中至少放置 1 小时才能达到此目的, 通常为 2~6 小时, 肉眼观察组织表面的蜡融化彻底即可。由于高温干燥可加速组织中抗原的氧化, 因此高温烤片对抗原有破坏作用, 可能导致阳性降低, 染色定位错误。

Step2. 脱蜡和水化

分别在二甲苯 I、II 中浸泡 15~30 分钟, 以脱掉组织中的蜡。但是, 进入组织中的二甲苯不能与水溶性染色液相溶, 故需进一步通过下行梯度乙醇把组织中的二甲苯逐步替代出来。切片在 100% 乙醇 I、II 中分别浸泡 5 分钟, 95%、90%、80% 和 70% 乙醇中分别浸泡 2 分钟, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 分钟, 置蒸馏水中待用。

Step3. 抗原修复

推荐使用柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复法, 适合于大量中性福尔马林固定、石蜡包埋组织切片的抗原修复, 其效果优于微波修复法和直接煮沸修复法, 使得免疫组化结果更加可靠。

方法: 取一定量 pH=6.0 柠檬酸盐缓冲液(800-1500ml)于压力锅中, 大火加热直至沸腾; 将脱蜡水化后的组织切片置于不锈钢或耐高温塑料切片架上, 放入已沸腾的缓冲液中。盖上锅盖, 扣上压力阀, 继续加热至喷汽, 从喷汽开始计时, 3-4 分钟后, 压力锅离开热源, 冷却至室温, 取出玻片, 先用蒸馏水冲洗两次, 之后用 PBS(pH=7.2-7.4)冲洗两次, 每次 3 分钟(2×3')。

Step4. 细胞膜打孔

切片置于 0.1%~0.3% TritonX-100 中，室温浸泡 25 分钟，PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。

TritonX-100 为去污剂，其脂溶性可使细胞膜穿孔，增加细胞膜对抗体的渗透性。检测细胞膜抗原时可免去此步骤。

Step5. 灭活内源性酶及封闭内源性生物素

切片浸泡在 3% 的 H₂O₂ 中 20 分钟，PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。在一些细胞中存在过氧化物酶和过氧化氢酶等，最常见的是红细胞（血红蛋白），另外还有横纹肌细胞（肌球蛋白）、粒细胞和单核细胞（细胞色素）、肝细胞和肾细胞（过氧化氢酶）等，内源性 H₂O₂ 酶会导致底物 H₂O₂ 分解，DAB 沉淀。

注：3% H₂O₂ 要现用现配，洗 H₂O₂ 时用的 PBS 要与洗其它用的 PBS 分开。用甲醇配置过氧化氢比双蒸水或 PBS 可能好在保护抗原和固定组织作用，过氧化氢孵育时间过长易引起脱片。

Step6. 非免疫血清封闭

抗体能被组织切片中富有电荷的胶原和结缔组织成分吸附。从而导致背景着色，为了防止这种现象发生，最好在特异性抗体处理切片之前，选择与二抗种属相同的非免疫血清封闭电荷，阻止一抗与之结合，抑制非特异性背景着色。常用方法是用 2%~10% 羊血清或 2%~5% 牛血清白蛋白在室温下作用 10~30 分钟。但应注意此种结合不牢固，所以最好不要冲洗，倾去余液直接加一抗。

Step7. 一抗孵育

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic applications.
For other terms and conditions please refer to www.affbiotech.com

滴加特异性一抗于切片上, 4°C 孵育过夜(冰箱拿出后可 37°C 复温 45 分钟), 也可在 37°C 孵育 1~2 小时。之后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 分钟。稀释特异性抗体常用含 1%~3% 非免疫血清的 PBS, 需现配现用, 稀释后的一抗存放时间不可超过三天。不同组织中目的蛋白含量有差异, 因此抗体稀释比应参考抗体说明书推荐浓度做梯度稀释, 确定最适浓度。

注: 不要干片, 试剂要充分覆盖组织, 应超出边缘 2mm, 用 PAP Pen 时要超出 3-4mm。

Step8. 二抗孵育

滴加稀释度合适酶标二抗于切片上, 室温孵育 30-60min, 继而 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟。二抗有抗鼠、抗兔和抗羊等之分, 特异性要与一抗匹配, 否则, 一抗和二抗连接有误可导致假阴性染色结果。例如, 兔抗鼠或人的一抗需与抗兔的二抗匹配, 小鼠抗大鼠或人的一抗需与抗小鼠的二抗匹配。

注: 如二抗为生物素标记, 还需要滴加链酶亲和素-HRP。

Step9. 显色

显色是免疫组化染色的最后关键步骤, 一般过氧化物酶的检测系统选用 DAB 或 AEC 显色。前者显色为棕色, 后者为红色。要得到最佳的显色效果, 必须在镜下严格控制, 以检出物达到最强显色效果而背景无色为终止点。根据经验, DAB 在配制后最长放置时间是 30 分钟以内, 过时则不能使用, DAB 滴加到组织切片时作用时间最长不宜超过 10 分钟(最好在 5 分钟内), 否则不管有无阳性结果均应终止反应。对一些富含内源性酶的组织用 DAB 显色时极易出现背景色, 应尽早于镜下控制, 以达到最佳分辨效果。DAB 有致癌作用, 故操作时应戴手套, 尽量避免与皮肤接触, 用后及时洗手, 接触 DAB 的实验用品最好经洗液浸泡 24 小时后方能再次使用。AEC 显色系统的弊端是易溶于有机溶剂, 所以封片时应以水性封片

剂为主，故染色切片不能长期保存。免疫酶染色时，酶底物浓度的增加或孵育时间延长，均可增强染色强度。过氧化物酶显色时，H₂O₂ 浓度较大使显色反应过快而致背景加深，且过量 H₂O₂ 能抑制酶的活性，故 H₂O₂ 浓度要适中。

如果上述步骤使用链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物，则需选用 NBT/BCIP 作为显色系统。阳性结果为蓝黑色。显色后蒸馏水或自来水冲洗。采用碱性磷酸酶作为标记物底物时，染色过程中的缓冲液用 0.02mol/LTBS(pH 8.2)较好。

Step10. 苏木精复染细胞核

为使组织切片清晰的显示组织结构，便于准确定位，常对切片进行复染。最常使用的细胞核染料为苏木精，也可根据情况使用甲基绿和核快红。染色约 10 秒，镜下控制着色程度，效果好时自来水冲洗返蓝。

Step11. 封片

如果选用 DAB 显色，则切片经过梯度乙醇脱水(80% 乙醇 2 分钟，95%乙醇 2 分钟)，乙醇 I 和 100% I 乙醇 II 各 5 分钟，二甲苯 I 和 II 各透明 5 分钟，最后中性树脂封固;如果选用 AEC 显色，则切片不能经乙醇脱水，冲洗后拭干直接用水性封片剂封片。