

石蜡切片免疫组化染色步骤

1、载玻片的处理：

抗原修复过程中，由于高温、高压、辐射等诸多因素的影响，极易造成脱片。为保证试验的正常进行，可选用我公司提供的 ZLI-9001 APES、ZLI-9003 Histogrip™ 或 ZLI-9005 Poly-L-Lysine 等几种试剂，对已清洗的载玻片进行处理。具体方法如下：

1.1 APES: 现用现配。将洗净的玻璃片放入以 1:50 比例丙酮稀释的 APES 中，停留 20~30 秒钟，取出稍停片刻，再入纯丙酮溶液或蒸馏水中涮去未结合的 APES，置通风橱中晾干即可。用此载玻片捞片时应注意组织要一步到位，并尽量减少气泡的存在，以免影响染色结果。

1.2 Histogrip™: 将洗净的玻璃片放入以 1:50 比例丙酮稀释的 Histogrip 液中，停留 1~2 分钟，然后用双蒸水快速清洗三次，室温干燥或 60℃ 烤箱烘烤一小时，装盒备用。

1.3 Poly-L-Lysine: 将洗净、干燥的载玻片放入以 1:10 比例去离子水稀释的多聚赖氨酸溶液中，浸泡 5 分钟，60℃ 烤箱烘烤一小时或室温过夜干燥。装盒备用。试验中使用的器具均为非玻璃制品。

2、常用酶消化：

2.1 胰蛋白酶: 一般使用浓度为 0.05%~0.1%，消化时间为 37℃、10~40 分钟，主要用于细胞内抗原的显示。

2.2 胃蛋白酶: 一般使用浓度为 0.4%，消化时间为 37℃、30~180 分钟，主要用于细胞间质抗原的显示，如：Laminin（层粘蛋白），Collagen IV（IV 型胶原）等。

2.3 皂素 (Saponin): 一般使用浓度为 2~10μg/ml 的 saponin 溶液，消化时间为室温孵育 30 分钟。

3、抗原热修复：

可根据实验室的具体条件，选用微波炉抗原修复、高压锅抗原修复或水浴高温抗原修复。抗原热修复可选用各种缓冲液，如 TBS、PBS、重金属盐溶液等，但实验证明，以 0.01M 枸橼酸盐缓冲液（pH6.0）效果最好。请选用我公司提供的 ZLI-9064 枸橼酸盐缓冲液（粉剂）配制，取该粉剂一包溶于 1000ml 的蒸馏水中，混匀，其 pH 值在 6.0 ± 0.1 ，如因蒸馏水本身造成的 pH 值偏差，请自行调整。

3.1 石蜡切片微波炉抗原修复操作方法：切片脱蜡至水后，3% H_2O_2 处理 10 分钟，蒸馏水洗 2 分钟×3。将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液（工作液）的容器中，置微波炉内加热使容器内液体温度保持在 92℃~98℃ 之间并持续 10~15 分钟（注意：无论是使用医用或家用微波炉，请根据具体机型酌情设置条件，务必满足以上步骤中对温度和时间的要求）。取出容器，室温冷却 10~20 分钟（注意：不可将切片从缓冲液中取出冷却，以便使蛋白能够恢复原有的空间构型）。PBS 洗，下接免疫组化染色步骤。

3.2 石蜡切片高压抗原修复操作方法：切片脱蜡至水。将 1500ml~3000ml 的枸橼酸盐缓冲液（工作液）注入不锈钢压力锅中加热至沸腾。切片置

于金属架上，放入锅内，使切片位于液面以下，盖锅压阀。当压力锅开始慢慢喷气时（约加热 5~6 分钟后），计时 1~2 分钟，然后将压力锅端离热源，冷水冲至室温后，取下气阀，打开锅盖，取出切片，蒸馏水洗后，PBS 洗 2 分钟×3，下接免疫组化染色步骤。

3.3 石蜡切片电炉煮沸抗原修复操作方

法：切片脱蜡至水后，放入盛有枸橼酸盐缓冲液（工作液）的容器中，并将此容器置于盛有一定数量自来水的大器皿中，电炉上加热煮沸，从小容器的温度到达 92℃~98℃起开始计时 15~20 分钟，然后端离电炉，室温冷却 20~30 分钟，蒸馏水冲洗，PBS 洗，下接免疫组化染色步骤。

4、免疫组化染色步骤：

（以美国 ZYMED 公司 SP 试剂盒为例）

石蜡切片脱蜡至水。

3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 分钟，以消除内源性过氧化物酶的活性。

蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，(如需采用抗原修复，可在此步后进行)。

5~10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭，室温孵育 10 分钟。倾去血清，勿洗，滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液，37℃ 孵育 1~2 小时或 4℃ 过夜。

PBS 冲洗，5 分钟×3 次。

滴加适当比例稀释的生物素标记二抗 (1% BSA-PBS 稀释)，37℃ 孵育 10~30 分钟；或滴加第二代生物素标记二抗工作液，37℃ 或室温孵育 10~30 分钟。

PBS 冲洗，5 分钟×3 次。

滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素 (PBS 稀释)，37℃ 孵育 10~30 分钟；或第二代辣根酶标记链霉卵白素工作液，37℃ 或室温孵育 10~30 分钟。

PBS 冲洗，5 分钟×3 次。

显色剂显色 (DAB 或 AEC)。

自来水充分冲洗，复染，封片。

冰冻切片免疫组化染色步骤

冰冻切片 4~8μm，室温放置 30 分钟后，入 4℃ 丙酮固定 10 分钟，PBS 洗，5 分钟×3。用 3% 过氧化氢孵育 5~10 分钟，消除内源性过氧化物酶的活性。

PBS 洗，5 分钟×2。

下接免疫组化染色操作步骤。

几种溶液的配制方法

1、PBS：

取 ZLI-9061 PBS 溶于 1000ml 的蒸馏水中，混匀，测 pH 值应在 7.2~7.4 之

间, 若偏离此范围, 请用 0.1N 的 HCL 或 NaOH 调整。

2、TBS:

2.1 Tris 缓冲液配方: (0.5 M pH7.6)

Tris (三羟甲基氨基甲烷)	60.57g
1N HCL	约 420ml
双蒸水	加至 1000ml

Tris 缓冲液配制方法:

先以少量双蒸水 (300~500ml) 溶解 Tris, 加入 HCl 后, 用 HCl (1N) 或 NaOH (1N) 将 pH 调至 7.6, 最后双蒸水加至 1000ml。此液为储备液, 4°C 冰箱中保存。

2.2 TBS 配方:

Tris-HCl 缓冲液 (0.5M pH7.6)	100ml
NaCl	8.5~9g (0.15mol/L)
双蒸水	加至 1000ml

TBS 配制方法:

先以少量双蒸水溶解 NaCl, 再加入 Tris-HCl 缓冲液, 最后加双蒸水至 1000ml, 充分摇匀。

3、枸橼酸盐缓冲液 (Citrate buffer):

3.1 储存液:

- 0.1M 枸橼酸溶液: 称取 21.01g 枸橼酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 溶于 1000ml 蒸馏水中。
- 0.1M 枸橼酸钠溶液: 称取 29.41g 枸橼酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 溶于 1000ml 蒸馏水中。

3.2 工作液:

取 9ml A 液和 41ml B 液加入 450ml 蒸馏水中, 溶液 pH 值应为 6.0 ± 0.1

4、胰酶 (Trypsin):

4.1 ZLI-9011 胰蛋白酶消化液:

常用浓度为 0.125%, 即使用前将一滴试剂 1 胰酶溶液和三滴试剂 2 胰酶稀释液均匀混合 (1:3 稀释), 则可直接滴加使用。胰酶的最终浓度可以根据使用者的要求进行调整, 浓度范围可以从 0.05% (1:10 稀释) 至 0.25% (1:1 稀释)。

4.2 ZLI-9010 胰蛋白酶:

取 0.05g 或 0.1g 胰蛋白酶加入到 100ml 0.05% 或 0.1% pH7.8 的无水氯化钙水溶液中, 溶解即可。

5、胃酶 (Pepsin):

4% 胃蛋白酶, 用 0.1mol/L HCL 配制。

(我公司备有 ZLI-9013 胃蛋白酶消化工作液, 不需稀释直接滴加使用, 欢迎选购)

6、DAB:

6.1 ZLI-9032/9033 DAB Kit:

使用前只需将试剂盒提供的 A、B、C 三种试剂各一滴加至 1ml 双蒸水中，即可获得 1ml DAB 工作液，简单易用。

6.1 ZLI-9030 DAB:

6mg DAB 溶于 10ml TBS (0.05M pH7.6)，再加入 0.1ml 浓度为 3% 的 H_2O_2 ，过滤掉沉淀物，即可。

7、AEC:

4mg AEC 溶于 1ml 二甲基甲酰胺中，加入 14ml 浓度为 0.1M 的醋酸缓冲液 (pH5.2)，然后加入 0.15ml 3% H_2O_2 ，过滤掉沉淀物。

8、RIPA:

1×PBS, 1% NP 40, 0.5 sodium deoxycholate, 0.1% SDS (此液体可长期保存)。以下抑制剂以储存液方式保存，临用前加入 RIPA 中。

8.1 10mg/ml PMSF 异丙醇溶液 (用量为 10 μ l/ml)

8.2 Aprotinin (Sigma 产品, 用量为 30 μ l/ml)

8.3 1000mM sodium orthovanadate 冷冻液
(用量为 10 μ l/ml)

9、Blotto A:

常规使用 1×PBS, 5% milk, 0.05% Tween 20。

10、Blotto B:

与 Phosphotyrosine 抗体共用, 1×PBS, 1% milk, 0.05% Tween 20。部分实验中 milk 可完全去除，但可能引起背景增高。

免疫组化常见问题的处理

当免疫组化染色没有出现预期结果时，应系统地查找原因，而每一次只能排除一种可能的原因。

对照/标本无染色

- ① 确认是否忽略了应该加的某种试剂，包括一抗、二抗、三抗及底物等。
- ② 确认所有的试剂是否按正确的顺序加入，是否孵育了足够的时间。
- ③ 对照抗体的标签确认是否使用了正确的抗体，以及所用的检测系统是否和一抗匹配，这一点是非常重要的。比如，如果一抗是兔来源的抗体，二抗一定要用抗兔的二抗来匹配；或一抗是小鼠的 IgM 一抗，二抗必须是山羊/兔抗小鼠的 IgM (不是 IgG) 二抗。
- ④ 检查抗体所使用的稀释度及稀释溶液。
- ⑤ 检查抗体的有效期和保存条件，尤其是标记了酶或荧光素的抗体，现在大多数试剂公司的抗体均要求在 4~8 $^{\circ}$ C 条件下保存，应避免反复冻融，试剂保存时一定要避免与挥发性有机溶剂同放一室，以免降低抗体的效价。

- ⑥ 检查标本的储存条件，最好用已知阳性的标本来同时做阳性对照。
- ⑦ 检查色原/底物溶液，最简单的检测方法是将一滴标记有酶的抗体加入到制备好的底物溶液中，如果底物发生预期的颜色变化，则可排除底物的因素。需要注意的是，有些底物在制成工作液后应在一定时间内用完，否则会失效。
- ⑧ 检查冲洗液是否和反应试剂匹配，溶液的 pH 值很重要，与过氧化物酶底物匹配的溶液中不应含有叠氮钠。
- ⑨ 检查复染剂和封片剂是否和所使用的色原匹配。

弱阳性

如果阴性对照没有染色而阳性对照标本弱阳性，除了考虑上述因素外，还应考虑：

- ① 标本的固定方式，不当的固定方式或固定时温度过高，都会影响到所检测的抗原的数量和质量。
- ② 不适当的抗原修复方式，由于石蜡切片在制作的过程中固定剂对抗原的封闭作用，必须用抗原热修复或酶消化或两种同时使用的抗原双暴露法，至于使用哪一种方法，应参照生产厂家的说明，同时结合标本的具体情况而定。
- ③ 抗体的稀释度是否过高或者孵育的温度/时间是否正确。一般试剂生产厂家都会对试剂给出一定的使用范围，但是由于使用者的标本来自各种组织，处理过程也不尽相同，所以应参照使用范围，对所使用的一抗进行梯度测试，找出最佳的使用浓度。
- ④ 切片上遗留了过多的冲洗液，当抗体加至切片上时，等于人为地对抗体进行了进一步的稀释。
- ⑤ 孵育时切片是否放置水平，否则会导致抗体流失。

如果阴性对照没有反应，阳性对照反应良好，而标本弱阳性，则可能是由于阳性对照不是同一种组织、或固定方式不同等原因所致。

非特异性染色

- ① 是否有效地去除了内源性酶和生物素。应注意的是，并不是每一种组织均需要进行此步骤，但对于内源性酶或生物素丰富的组织，如肝脏、肾脏等，需考虑此原因。处理的方法为：

灭活碱性磷酸酶：最常用的方法是将左旋咪唑（24mg/ml）加入底物液中，并保持 pH 值在 7.6~8.2，即能除去大部分内源性碱性磷酸酶，对于仍能干扰染色的酸性磷酸酶，可用 50mmol/L 的酒石酸抑制。

饱和处理内源性生物素：消除内源性生物素的方法是事先滴加亲和素，以饱和内源性生物素，使之不再有剩余的结合位点。具体方法是在 ABC 法或 SP 法染色前将切片浸于 25ug/ml 亲和素溶液中处理 15 分钟，PBS 清洗 15 分钟后即可染色。

- ② 是否选择使用了正确的封闭血清。电荷吸附所造成的非特异性背景染色消除方法是以二抗动物的非免疫血清，用 PBS 稀释为 3%-10% 溶液孵育切片，

以封闭吸附位点。有时其它无关蛋白,如牛血清白蛋白也常应用。另外,取材时避开出血、坏死区亦极重要。最近有些国内的实验室应用 5% 脱脂奶粉替代血清进行抗原封闭,效果也不错。

- ③ 所选择的抗体是否符合试验要求。因抗原不纯、标本片中含有与靶抗原相似的抗原决定簇等原因造成的非特异性染色只能通过采用高纯度、高效价的抗体、或针对更具特异性抗原决定簇的单克隆抗体来解决。
- ④ 一抗的使用浓度是否过高。
- ⑤ 清洗是否充分。应严格操作规程。因在缓冲液中含有一定量的盐,这亦有利于减低背景着色,通常 0.05mol/l Tris—HCl, 0.15mol/l NaCl 已适用于多数染色方法,溶液内加入吐温 20,效果更佳。特殊标记时,试剂公司一般都提供缓冲液的配方。
- ⑥ DBA 的使用是否正确。DAB 的孵育时间和配制方式可以产生某些背景颜色,使用浓缩型 DAB 试剂盒时,请严格按照说明书标明的滴加顺序操作,注意校正蒸馏水的 pH 值,以确保实验结果的正确性;粉剂 DAB 溶解时,常有一些不溶性颗粒,这些颗粒须经过滤除去,否则可能沉积于切片组织上,产生斑点状着色。另外,DAB 保存不妥产生氧化物亦可沉积于切片上,因此需将 DAB 保存于避光干燥处,现用现配,临用前加 H₂O₂。孵育时间过长也会造成背景染色。
- ⑦ 标本染色过程中是否曾经干涸,否则会造成边缘部的非特异性染色。
- ⑧ 检查二抗与标本的内源性组织蛋白是否有交叉反应。

和光纯药 (WAKO) 官方授权代理机构“西宝生物”

更多 wako 产品 推荐,请访问西宝生物网:

http://www.cxbio.com/news/news_search.asp?type=新品推荐

WAKO 电子版产品英文目录及 SeeBio 最新目录,请访问网站:

<http://www.cxbio.com>

此外,我们诚邀代理商加盟 WAKO 产品合作,互惠互利,共图发展!

若您有任何其他问题,请勿吝垂询!谢谢!

祝:好!

张广华

上海西宝生物科技有限公司

地址:上海浦东华夏东路 1866 号 607#

邮编:201200

电话:021-50922171,50922172,50922173-118

传真:021-50922173-119

E-mail:sales@cxbio.com

<http://www.seebio.cn>

<http://www.cxbio.com>——西宝生物网

西宝生物作为一家面向生命科学领域,一直致力于为广大科研和工业用户提供高品质实验室试剂和生产原料的专业进出口公司。

目前主要从事以下产品的进出口和销售:分子生物学试剂、生化试剂、免疫试剂、诊断试剂、医药原料及中间体、食品添加剂、精细化学品、实验室耗材、仪器设备等产品。