

免疫组化（Immunohistochemistry）实验指南

- 免疫组化的定义和分类
- 几种常见免疫组化方法简介
- 免疫组化的实验步骤剖析
 - ◆ 酶免疫组化主要步骤剖析
 - ◆ 免疫荧光方法中主要步骤剖析
- 免疫组化常见问题解答

免疫组化的定义和分类

1、定义

用标记的特异性抗体对组织切片或细胞标本中某些化学成分的分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究的技术称为免疫组织化学 (IHC) 或者免疫细胞化学 (ICC)。免疫组化具有特异性强、灵敏度高、定位准确等特点。

2、分类

- 1) 按标记物质的种类, 如荧光染料、放射性同位素、酶 (主要有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)、铁蛋白、胶体金等, 可分为免疫荧光法、放射免疫法、免疫酶标法和免疫金银法等。
- 2) 按染色步骤可分为直接法 (又称一步法) 和间接法 (二步、三步或多步法)。与直接法相比, 间接法的灵敏度提高了许多。
- 3) 按结合方式可分为抗原-抗体结合, 如过氧化物酶-抗过氧化物酶 (PAP) 法; 亲和连接, 如卵白素-生物素-过氧化物酶复合物 (ABC) 法、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结 (SP) 法等, 其中 SP 法是比较常用的方法; 聚合物链接, 如即用型二步法, 此方法尤其适合于内源性生物素含量高的组织抗原检测。

几种常见免疫组化方法简介

1、免疫荧光方法

是最早建立的免疫组织化学技术。它利用抗原抗体特异性结合的原理, 先将已知抗体标上荧光素, 以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原, 在荧光显微镜下观察。当抗原抗体复合物中的荧光素受激发光的照射后即会发出一定波长的荧光, 从而可确定组织中某种抗原的定位, 进而还可进行定量分析。由于免疫荧光技术特异性强、灵敏度高、快速简便, 所以在临床病理诊断、检验中应用较广。

2、免疫酶标方法

免疫酶标方法是继免疫荧光后, 于 60 年代发展起来的技术。基本原理是先以酶标记的抗体与组织或细胞作用, 然后加入酶的底物, 生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒, 通过光镜或电镜, 对细胞表面和细胞内的各种抗原成分进行定位研究。免疫酶标技术是目前最常用的技术。

本方法与免疫荧光技术相比的主要优点是: 定位准确, 对比度好, 染色标本可长期保存, 适合于光、电镜研究等。

免疫酶标方法的发展非常迅速, 已经衍生出了多种标记方法, 且随着方法的不断改进和创新, 其特异性和灵敏度都在不断提高, 使用也越来越方便。目前在病理诊断中广为使用的有 ABC 法、SP 三步法、即用型二步法检测系统等。

3、免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是以胶体金这样一种特殊的金属颗粒作为标记物。胶体金是指金的水溶胶，它能迅速而稳定地吸附蛋白，对蛋白的生物学活性则没有明显的影响。因此，用胶体金标记一抗、二抗或其他能特异性结合免疫球蛋白的分子(如葡萄球菌 A 蛋白)等作为探针，就能对组织或细胞内的抗原进行定性、定位，甚至定量研究。由于胶体金有不同大小的颗粒，且胶体金的电子密度高，所以免疫胶体金技术特别适合于免疫电镜的单标记或多标记定位研究。由于胶体金本身呈淡至深红色，因此也适合进行光镜观察。如应用银加强的免疫金银法则更便于光镜观察。

免疫组化的实验步骤剖析

酶免疫组化主要步骤剖析

1) 标本固定: 固定的目的是①防止标本从玻片上脱落; ②除去妨碍抗原-抗体结合的种类, 使抗原抗体结合物易于获得良好的染色结果; ③固定的标本易于保存。固定剂的选择一般用 4%多聚甲醛, 但睾丸组织、眼组织可能要选用 Bouin's 液或 mDF 液效果较好。

2) 脱水、石蜡包埋和制片: 脱水用梯度乙醇(由低到高)充分脱水、对组织要完全浸蜡、切片时刀片要干净和锋利。否则, 容易裂片和脱片等。

3) 脱蜡和水化: 这是为了后面的抗体等试剂能够充分与组织中抗原等结合反应。脱蜡可以先 60 度 20min, 然后立即二甲苯 1-3 分别 10min(这个时间是由二甲苯新鲜程度和室温等综合决定的), 但当天制好的切片一般先 60 度 3-4h。水化用梯度乙醇(由高到低)。若脱蜡和水化不全易出现局灶性反应和浸洗不全, 而产生非特异性背景着色。

4) 抗原修复: 由于组织中部分抗原在甲醛或多聚甲醛固定过程中, 发生了蛋白之间交联及醛基的封闭作用, 从而失去抗原性; 通过抗原修复, 使得细胞内抗原决定簇重新暴露, 提高抗原检测率。常用的修复方法从强到弱一般分为三种, 高压修复、微波修复、胰酶修复。修复液也分为若干种(具体的可以查阅相关资料, 大量的: 中性的、高 pH 的等)。一般用微波修复中火 6min*4 次, 效果不错。注意微波修复后自然冷却 30min 左右(只要你觉得修复液的温度达室温即可)。

5) 细胞通透: 目的是使抗体能够充分地进入胞内进行结合反应。一般用 Triton X-100、蛋白酶 k 等通透液。如 Triton X-100 可以溶解细胞膜、细胞核膜、细胞器膜上的脂质而使抗体及大分子结构的物质进入胞浆和胞核内, 故在细胞免疫组化时尤为推荐使用, 这样抗体就能顺利进入胞内与相应抗原结合。在免疫组织化学(>10um 厚切片) 和免疫细胞化学中一般用 Triton X-100 作为细胞通透剂, 在膜上打孔。同时也是一种去污剂, 一般在 PBS 中加入后终浓度是 0.05%即可, 而前者终浓度是 0.5%-1%。石蜡切片 4um 左右可以不通透, 因为细胞已经被切开了。

6) 灭活内源性过氧化物酶和生物素: 在传统的 ABC 法和 SP 法中, 免疫组化反应结果容易受到内源性过氧化物酶和生物素的干扰, 必须用过氧化氢和卵白素等进行灭活。灭活内源性 POD 一般用 3%过氧化氢灭活, 时间 10min 左右, 而 0.3%过氧化氢则可以适当延长封闭时间, 一般 10~30min; 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; 现用现配, 配好后 4 度避光保存。不过, 现在已有“第二代即用型免疫组化试剂盒”避免内源性生物素的干扰, 推荐使用。

7) 血清封闭: 组织切片上有剩余的位点可以与一抗非特异性结合, 造成后续结果的假阳性; 封闭血清一般是和二抗同来源的, 血清中动物自身的抗体, 预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合; 也可以用小牛血清、BSA、羊血清等, 但不能与一抗来源一致。一般室温 10-30min。但也要防止封闭过度

8) 一抗和二抗浓度和孵育时间: 一抗孵育条件在免疫组化反应中很重要, 包括孵育时间、温度和抗体浓度。一抗孵育温度有几种: 4 度、室温、37 度, 其中 4 度效果最佳; 孵育时间: 这与温度、抗体浓度有关, 一般 37 度 1-2h, 4 度过夜 (从冰箱拿出后 37 度复温 45min)。具体条件还要摸索。二抗孵育条件: 二抗一般室温或 37 度 30min-1h, 具体时间需要摸索, 而浓度一般有工作液, 若是浓缩液还要摸索浓度。但在免疫组化中我们一般先把二抗浓度和孵育时间先定下, 然后去摸索一抗浓度和孵育时间。建议一抗反应在 4 度最佳, 反应温和, 但时间最好超过 16~24h。

9) 抗体稀释液: 其实许多实验室抗体稀释液就用一般 PBS 即可, 但专用的抗体稀释液中除 PBS 成份外, 还加了叠氮化钠防腐剂、BSA 稳定剂等组份, 对抗体的多次回收利用较好。。

10) 切片清洗 (浸洗、冲洗和漂洗): 为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色, 所以适当地加强清洗 (延长时间和增多次数) 尤为重要, 我一般在一抗孵育前的清洗是 3min*3 次, 而一抗孵育后的清洗均为 5 次*5min。注意: ①单独冲洗, 防止交叉反应造成污染。②温柔冲洗, 防止切片的脱落, 一般用浸洗方式; ③冲洗的时间要足够, 才能彻底洗去结合的物质。④PBS 的 PH 和离子强度的使用和要求 (建议 PH 7.4-7.6, 浓度是 0.01M; 中性及弱碱性条件有利于免疫复合物的形成, 而酸性条件则有利于分解; 低离子强度有利于免疫复合物的形成, 而高离子强度则有利于分解)。

11) DAB 显色: 背景的深浅和特异性染色的深浅均可以由 DAB 孵育条件决定。DAB 显色时间不是固定的, 主要由显微镜下控制显色时间, 到出现特异性染色较强而本底着色较浅时即可冲洗; DAB 显色时间很短 (如几秒或几十秒) 就出现很深的棕褐色, 这很可能说明你的抗体浓度过高或抗体孵育时间过长, 需要下调抗体浓度或缩短你的抗体孵育时间; 此外, 若很短时间就出现背景很深, 还有可能你前面的封闭非特异性蛋白不全, 需要延长封闭时间; DAB 显色时间很长 (如超过十几分钟) 才出现阳性染色, 一方面可能说明你的抗体浓度过低或孵育时间过短 (最好一抗 4 度过夜); 另一方面就是封闭时间过长。

12) 复染: 目的是形成细胞轮廓, 从而更好地对目标蛋白进行定位, 经常用苏木素复染 (胞核染料)。注意苏木素复染时间要看当时的室温、溶液的新旧、目标抗原的定位等情况, 一般数秒-数分钟, 胞浆蛋白可以适当时间长一点, 而胞核蛋白则要短。不过这个如果染色不理想可以补救的。方法是: 染色深则分化时间稍长些即可; 染色浅则再置于苏木素中染色即可。片子复染完后流水振洗, 然后置于盐酸酒精中数秒 (一定动作要快) 后拿出流水振洗, 再放入氨水中返蓝即可。

13) 封片: 为了长期保存, 我们一般用中性树胶等封片, 避免产生气泡, 方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液, 然后一手拿住盖片某一拐角, 而另一手拿对面的那个拐角, 接近封片液近端的拐角先降低, 直至接触到液体时为止; 当发现液体接触面在不断弥散时, 则可以缓慢降低另一拐角, 这样一般不会产生气泡。

免疫荧光方法中主要步骤

1) 冰冻切片制备: 建议用新鲜组织, 否则组织细胞内部结构破坏, 易使抗原弥散。选用干净锋利的刀片、组织一定要冷冻适度等, 防止裂片和脱片。

2) 组织切片固定: 切好片风干后立即用冰丙酮等固定液进行固定 5-10min, 尤其要较长时间保存的白片, 一定要及时固定和适当保存。

3) 血清封闭: 为防止内源性非特异性蛋白抗原的结合, 需要在一抗孵育前先用血清 (与二抗来源一致) 封闭, 减弱背景着色。血清封闭的时间是可以调整的, 一般 10-30min。

4) 一抗孵育条件: 在免疫组化反应中最重要, 包括孵育时间和抗体浓度。一抗孵育温度有几种: 4 度、室温、37 度, 其中 4 度效果最佳; 孵育时间: 这与温度、抗体浓度有关, 一般 37 度 1-2h, 4 度过夜 (从冰箱拿出后 37 度复温 45min)。具体条件还要摸索。

5) 二抗孵育条件: 一般室温或 37 度 30min-1h, 具体时间需要摸索, 而浓度一般有工作液, 若是浓缩液还要摸索浓度, 一定要避光反应。但在免疫荧光中我们一般先把二抗浓度和孵育时间先定下, 然后去摸索一抗浓度和孵育时间。最后, 荧光素标记的二抗随着保存时间的延长, 可能会有大量的游离荧光素残留, 需要注意配制时小包装和并进行适当的离心。

6) 复染: 目的是形成细胞轮廓, 从而更好地对目标蛋白进行定位。一般常用 DAPI 复染。

7) 封片: 为了长期保存, 我们一般用缓冲甘油等封片, 此外还有专门的抗荧光淬灭封片液。避免产生气泡, 方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液, 然后一手拿住盖片某一拐角, 而另一手拿对面的那个拐角, 接近封片液近端的拐角先降低, 直至接触到液体时为止; 当发现液体接触面在不断弥散时, 则可以缓慢降低另一拐角, 这样一般不会产生气泡。

8) 切片清洗: 为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色, 所以适当地加强清洗 (延长时间和增多次数) 尤为重要, 一般在一抗孵育前的清洗是 3min*3 次, 而一抗孵育后的清洗均为 5 次*5min。

注意:

(1) 单独冲洗, 防止交叉反应造成污染。

(2) 温柔冲洗, 防止切片的脱落。我喜欢用浸洗方式;

(3) 冲洗的时间要足够, 才能彻底洗去结合的物质。

(4) PBS 的 PH 和离子强度的使用和要求 (建议 PH 在 7.4-7.6, 浓度是 0.01M; 中性及弱碱性条件有利于免疫复合物的形成, 而酸性条件则有利于分解; 低离子强度有利于免疫复合物的形成, 而高离子强度则有利于分解)

9) 拍照: 有条件的话最好立即拍照, 若不能及时拍照, 也要封好片和用指甲油封固, 保持避光和湿度。使用荧光显微镜注意严格按照荧光显微镜出厂说明书要求进行操作, 不要随意改变程序; 应在暗室中进行检查; 防止紫外线对眼睛的伤害, 在调整光源时应戴上防护眼镜; 检查时间每次以 1~2h 为宜, 超过 90min, 超高压汞灯发光强度逐渐下降, 荧光减弱; 标本受紫外线照射 3~5min 后, 荧光也明显减弱或褪色; 激发光长时间的照射, 会发生荧光的衰减和淬灭现象; 所以最多不得超过 2~3h; 荧光显微镜光源寿命有限, 标本应集中检查, 以节省时间, 保护光源。天热时, 应加电扇散热降温, 新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再启用时, 须待灯光充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源。关闭汞灯至少在开启 15-30 分钟后; 标本染色后立即观察, 因时间久了荧光会

逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃ 保存, 可延缓荧光减弱时间, 防止封裱剂蒸发; 使用的玻片等载体, 都必须厚度均匀, 无明显的自发荧光, 如果使用油镜, 还必须保证镜油为无荧光镜油; 电源最好装稳压器, 否则电压不稳不仅会降低汞灯的寿命, 也会影响镜检的效果。

免疫组化常见问题解答

1) 产生组织切片非特异性染色的原因有哪些? 如何解决?

- 1、 抗体孵育时间过长、抗体浓度高易增加背景着色。这可通过缩短一抗/二抗孵育时间、稀释抗体来控制。这是最重要的一条。
- 2、 一抗用多克隆抗体易出现非特异性着色, 建议试用单克隆抗体看看。
- 3、 内源性过氧化物酶和生物素在肝脏、肾脏等组织含量很高(含血细胞多的组织), 需要通过延长灭活时间和增加灭活剂浓度来降低背景染色;
- 4、 非特异性组分与抗体结合, 这需要通过延长二抗来源的动物免疫血清封闭时间和适当增加浓度来加强封闭效果;
- 5、 DAB 孵育时间过长或浓度过高;
- 6、 PBS 冲洗不充分, 残留抗体结果增强着色, 在一抗/二抗/SP 孵育后的浸洗尤为重要;
- 7、 标本染色过程中经常出现干片, 这容易增强非特异性着色。

2) 免疫组化染色呈阴性结果的原因有哪些?

- 1、 抗体浓度和质量问题以及抗体来源选择错误。不是抗体浓度越高就越易出现阳性结果, 抗原抗体反应有前带和后带效应, 必须摸索最佳浓度。
- 2、 抗原修复不全, 对于甲醛固定的组织必须用充分抗原修复来打开抗原表位, 以利于与抗体结合; 建议微波修复用高火 4 次*6min 试试。有人做过实验, 这是最佳的时间和次数。若不行, 还可高压修复。
- 3、 组织切片本身这种抗原含量低。
- 4、 血清封闭时间过长。
- 5、 DAB 孵育时间过短。
- 6、 细胞通透不全, 抗体未能充分进入胞内参与反应。
- 7、 开始做免疫组化, 建议一定要首先做个阳性对照片, 排除抗体等问题。

3) 石蜡切片和冰冻切片的比较?

- 1、 要求做冰冻切片的不一定能做石蜡切片。因为做石蜡切片时要高温烤片, 可能会破坏组织的抗原性, 如果组织的抗原性较稳定, 则可作石蜡切片; 但是要求做石蜡切片的, 可作冰冻切片。

2、冰冻切片的优点是能够较好的保存组织的抗原免疫活性，做免疫组化时不需抗原修复这一步。缺点是细胞内易形成冰晶而破坏细胞结构，可能会使抗原弥散；切片厚度较石蜡的厚，做的片子没石蜡的漂亮。当你买一抗时，目录上都写着做什么样的切片，如果它写着只能做冰冻，就不能做石蜡，如写着两者都可，那就都能做。

3、石蜡切片的优点可以保持组织细胞的形态结构，且容易存放在室温，而冰冻切片比较麻烦，一定要存在-80度的低温冰箱中，尤其是用来做原位杂交的切片，为了防止 RNA 降解，保存一贯很重要。由于石蜡切片可以切到 4 微米左右，所以原位杂交探针容易渗透到组织中去，容易成功，而且得到的颜色/形态都较冰冻切片好。

4) 如何选择一抗?

1、单克隆和多克隆抗体的选择。由一种克隆产生的特异性抗体叫做单克隆抗体。单克隆抗体能目标明确地与单一的特异抗原决定簇结合，就像导弹精确地命中目标一样。另一方面，即使是同一个抗原决定簇，在机体内也可以由好几种克隆来产生抗体，形成好几种单克隆抗体混合物，称为多克隆抗体。在抗原抗体反应中，一般单克隆抗体特异性强，但亲和力相对小，检测抗原灵敏度相对就低；而多克隆抗体特异性稍弱，但抗体的亲和力强，灵敏度高，但易出现非特异性染色（可以通过封闭等避免）。

2、应用范围的选择。有的一抗只能用于 Western blotting，或免疫组化、免疫荧光、免疫沉淀等；甚至标明石蜡切片或冰冻切片。

3、种属反应性的选择（species reactivity）。这一点很重要，表明这种抗体可能存在种属差异，且这种抗体适合检测哪种种属动物体内的抗原。

4、种属来源，一般兔来源的多是多克隆抗体；而小鼠来源的多是单克隆抗体，但也有另外。根据此来源来选择相应的二抗。

5、生产厂家的选择。

5) 在什么情况下使用 TritonX-100?

1、Triton X-100 化学名称为聚乙二醇辛基苯基醚，是一种去污剂。在免疫组织化学(>10um 厚切片) 和免疫细胞化学中一般用 Triton X-100 作为细胞通透剂，在膜上打孔。

2、其作用原理：Triton X-100 可以溶解细胞膜、细胞核膜、细胞器膜上的脂质而使抗体及大分子结构的物质进入胞浆和胞核内，故在细胞免疫组化时尤为推荐使用，这样抗体就能顺利进入胞内与相应抗原结合。

3、Triton X-100 既是一种表面活性剂，也有抗氧化作用。

6) 封闭血清的选择原则是什么?

1、膜上或切片上有剩余的位点可以非特异性吸附抗体，造成后续结果的假阳性。

2、封闭血清一般是和二抗同一来源的,血清中动物自身的抗体,预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合,否则在后面的步骤中如果和二抗发生结合,会造成背景。

3、也可以用小牛血清、BSA、羊血清等,但不能与一抗来源一致。

7) 抗体孵育条件的比较?

1、一抗孵育温度有几种:4度、室温、37度,其中4度效果最佳;孵育时间:这与温度、抗体浓度有关,一般37度1-2h,4度过夜(从冰箱拿出后37度复温45min)。

2、二抗一般室温或37度30min-1h,具体时间需要摸索。

8) 一抗4度孵育后为什么要进行37度复温?

1、一方面,防止切片从4度直接放入PBS易脱片;

2、另一方面,使抗原抗体结合更稳定。一般不需要,但对表达较弱的抗原可能有用,4度和37度时分子运动方式不同,前者分子碰撞几率和运动速度小于后者,后者结合更快,但敏感性也提高了并易造成非特异染色。

9) DAB显色时间如何把握?

1、DAB显色时间不是固定的,主要由显微镜下控制显色时间,到出现浅棕色本底时即可冲洗;

2、DAB显色时间很短(如几秒或几十秒)就出现很深的棕褐色,这很可能说明你的抗体浓度过高或抗体孵育时间过长,需要下调抗体浓度或缩短你的抗体孵育时间;

3、此外,若很短时间就出现背景很深,还有可能你前面的封闭非特异性蛋白不全,需要延长封闭时间;

4、DAB显色时间很长(如超过十几分钟)才出现阳性染色,一方面可能说明你的抗体浓度过低或孵育时间过短(最好一抗4度过夜);另一方面就是封闭时间过长。

10) 免疫组化结果如何分析?

1、阳性着色细胞计数法。在40×光镜下,随机选择不重叠的10个视野,人工或机器计数阳性着色细胞,每组3~6张不同动物组织切片,然后进行组间比较即可。

2、灰密度分析法。通过在不同组别和不同动物组织切片上选择相同区域、相同条件下用image j进行灰密度分析,然后进行统计分析即可。

3、评分法。通过在光学显微镜下对组织切片分别按染色程度(0~3分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)、阳性范围进行评分(1~4分为0~25%、26~50%、51~75%、76~100%),最终可以分数相加,再进行比较。

对于以上这几种方法,各有利弊,请细心选择。要想得到正确结果的前提是你要做出着色均匀、背景很浅的高质量切片。

11) 在什么情况下进行组织抗原修复, 抗原修复的条件是什么?

- 1、由于组织中部分抗原在甲醛或多聚甲醛固定过程中, 发生了蛋白之间交联及醛基的封闭作用, 从而失去抗原性。通过抗原修复, 使得细胞内抗原决定簇重新暴露, 提高抗原检测率。
- 2、修复方法从强到弱一般分为三种, 高压修复、微波修复、胰酶修复。修复液也分为若干种 (具体的可以查阅相关资料, 大量的: 中性的、高 pH 的等)。
- 3、微波修复, 一般用 6min*4 次, 效果不错。

12) 内源性过氧化物酶的灭活时间和浓度是什么?

- 1、一般 3%过氧化氢灭活时间短点, 可以 10min 左右; 而 0.3%过氧化氢则可以适当延长封闭时间, 一般 10~30min。
- 2、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。
- 3、现用现配, 配好后 4 度避光保存。

13) 如何才能充分脱蜡?

- 1、蜡不溶于水, 如果脱蜡不干净, 少许蜡存留于切片上, 将会引起染色不均匀、阳性物时隐时现、真假难辨、背景染色增加等。为了解决上述的问题, 切片在染色前必须彻底脱蜡, 目前用于脱蜡的试剂主要是二甲苯, 因它脱蜡力强, 脱蜡时间较短;
 - 2、脱蜡的时间要根据季节, 室温和试剂的新鲜程度是在不同。如果在夏天, 室温较高, 脱蜡试剂也新鲜, 则脱蜡时间不需很多, 3-5 分钟就已足够。如果在冬天, 室温较低, 脱蜡试剂也较陈旧, 则脱蜡时间需要延长, 10-20 分钟或更长。
 - 3、当天切的切片, 烧烤 2 小时后进行染色, 切片带有温度进行脱蜡这将可加速脱蜡的过程, 如果预先切好烤好的切片, 在染色前, 还必须对切片进行加温 10-20 分钟, 然后再行脱蜡, 这样脱蜡速度加快, 效果更佳更好。
- 总之, 操作时应根据不同的季节, 不同的室温, 不同的试剂来决定, 脱蜡的时间, 原则上是要彻底、干净、完全地脱去切片上的蜡。

14) 如何最大限度地降低组织非特异性染色?

- 1、缩短一抗/二抗孵育时间、稀释抗体来控制。这是最重要的一条。
- 2、一抗用多克隆抗体易出现非特异性着色, 建议试用单克隆抗体看看。
- 3、内源性过氧化物酶和生物素在肝脏、肾脏等组织含量很高 (含血细胞多的组织), 需要通过延长灭活时间和增加灭活剂浓度来降低背景染色;

- 4、非特异性组分与抗体结合,这需要通过延长二抗来源的动物免疫血清封闭时间和适当增加浓度来加强封闭效果;
- 5、缩短 DAB 孵育时间或降低 DAB 浓度/过氧化氢浓度等;
- 6、适当增加 PBS 冲洗次数和浸洗时间,在一抗、二抗或 SP 孵育之后的浸洗尤为重要;
- 7、防止标本染色过程中出现干片,这容易增强非特异性着色。

15) 背景染色较深的原因有哪些?

- 1、抗体浓度过高:一抗浓度过高是常见的原因之一。解决办法是,每次使用新抗体前应当对其工作浓度进行测试,使每一抗体个体化,找到适合自己实验室的理想工作浓度,即使是即用型的抗体也应如此,不能只简单的按说明书书进行染色。
- 2、抗体孵育时间过长或温度较高:解决办法是,严格执行操作规程,最好随身佩带报时表或报时钟,及时提醒,避免因遗忘而造成时间延长。现在流行的二步法(Polymer)敏感性很高,要求一抗孵育的时间不是传统的 1 小时,而是 30 分钟,因此,要根据染色结果进行调整。
- 3、DAB 变质和显色时间太长:DAB 最好现用现配,如有沉渣应进行过滤后再用。配制好的 DAB 不应存放时间太长,因为在没有酶的情况下,过氧化氢也会游离出氧原子与 DAB 产生反应而降低 DAB 的效力,未用完的 DAB 存放在冰箱里几天后再用这种似乎节约的办法是不可取的。DAB 的显色最好在显微镜下监控,达到理想的染色程度时立即终止反应。不过当染色片太多时或用染色机时,这样做似乎不现实,但至少应对一些新的或少用的抗体显色时进行监控,避免显色时间过长。
- 4、组织变干:修复液溢出后未及时补充液体、染色切片太多、动作太慢、忘记滴液、滴液流失等都是造成组织变干的原因。解决的办法是操作要认真仔细,采用 DAKO 笔或 PAP Pen 在组织周围画圈,可以有效的避免液体流失,也能提高操作速度。
- 5、切片在缓冲液或修复液中浸泡时间太长(大于 24 小时):原因上不清楚,但现象存在。有的实验室喜欢前一天将切片脱蜡至修复,第二天加抗体进行免疫组化染色,如果将装有切片和修复液的容器放在 4℃ 冰箱过夜,对结果无明显影响,如果放在室温,特别是炎热的夏天,会出现背景着色,因此,不可存放时间太长。
- 6、一抗变质、质量差的多克隆抗体:注意抗体的有效期,过期的抗体要么不显色要么背景着色。用新买抗体时最好设立阳性对照和用使用过的抗体作比较。