

免疫组化 (IHC) 实验操作流程

免疫组织化学: 免疫组织化学染色是检测组织中特定抗原的重要工具。为了执行标准染色程序, 必须将组织切片脱蜡, 然后在应用一抗之前重新水化。然后使用酶联二抗, 并且在添加酶特异性底物后可以观察到特异性染色。有时, 当观察到弱染色或未观察到染色时, 可能需要通过酶消化“揭开”抗原。

以下程序描述了过氧化物酶或碱性磷酸酶缀合物在福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片的免疫组织化学标记中的应用。

免疫组化 (IHC) 实验操作流程:

1. 载玻片准备
2. 一抗反应
3. 二抗反应
4. 准备底物
5. 显色
6. 复染

1. 载玻片准备

脱蜡和复水

- (1) 将载玻片放入 56-60°C 烤箱中 15 分钟。(注意: 烤箱温度不得超过 60°C)。
- (2) 将载玻片转移到二甲苯槽中, 并更换两次二甲苯, 在每个二甲苯中脱蜡 5 分钟。
- (3) 甩掉多余的液体, 并在两次更换的新鲜无水乙醇中重新水化载玻片, 每个 3 分钟。
- (4) 甩掉多余的液体, 并将载玻片放入新鲜的 90% 乙醇中 3 分钟。
- (5) 甩掉多余的液体, 并将载玻片放入新鲜的 80% 乙醇中 3 分钟。
- (6) 用轻轻流动的自来水冲洗载玻片 30 秒(避免直接冲洗, 否则可能会冲掉或松动切片)。
- (7) 放入 PBS 槽中进一步复水(室温 30 分钟)

抗原修复:

酶修复:

应用含 0.1% 胰蛋白酶的 PBS 溶液或含其他蛋白酶的 PBS 溶液在 37°C 处理载玻片 2-30 分钟(延长孵育时间也可以增强特异性染色)。之后在 PBS 中冲洗 10 分钟。

热诱导表位修复 (HIER)

- (1) 用去离子水清洗载玻片, 并将其放入含有柠檬酸盐缓冲溶液的耐微波塑料染色瓶中。确保载玻片完全被溶液覆盖。
- (2) 在高功率(约 700 瓦)运行微波炉 5 分钟修复抗原。期间确保载玻片被修复液覆盖, 并添加新鲜溶液重复微波处理。
- (3) 此过程可重复 2-3 次。
- (4) 在室温下缓慢冷却至少 20 分钟。然后进行下一步操作。

阻断内源性过氧化物酶

注意: 仅在使用过氧化物酶偶联的二抗或 ExtrAvidin-过氧化物酶时才执行此步骤。

- (1) 将载玻片放在平整表面上。并注意避免载玻片相互接触和避免切片变干。
- (2) 添加足够的 3% 过氧化氢以覆盖整个切片。
- (3) 在室温下孵育 5 分钟。
- (4) 用 PBS 冲洗掉切片上的 3% 过氧化氢。
- (5) 将载玻片放入 PBS 槽中洗涤 2 分钟。

2. 一抗反应

注意: A. 用 5% BSA 预孵育样品 10 分钟。在添加一抗之前, 这一步反应可能会降低背景染色。同时为了在动物组织中获得最佳结果, 通常使用来自与二抗宿主相同种属的 5-10% 正常血清预孵育。

B. 应在使用前确定每种一抗的最佳稀释和孵育时间。

- (1) 切片稍甩干后, 小心地擦拭切片周围的水迹。
- (2) 用稀释剂将一抗或阴性对照试剂稀释至最佳稀释度。可单独使用稀释剂作为阴性对照。还应添加阳性对照载玻片(已知含有所研究抗原的组织)。
- (3) 滴加 100 μ l 一抗溶液于载玻片上覆盖组织切片。
- (4) 将每个载玻片向两个不同的方向倾斜, 使液体均匀地分布在切片上。
- (5) 在 37°C 的加湿室中孵育至少 60 分钟。对于低密度抗原, 建议延长孵育时间。
- (6) 用 PBS 轻轻冲洗掉切片上的一抗溶液。
- (7) 将载玻片放入 PBS 槽中洗涤 5 分钟。

3. 二抗反应

方案 1 - 生物素/ExtraAvidin 检测

- (1) 切片稍甩干后, 小心地擦拭切片周围的水迹。
- (2) 用稀释液将生物素化二抗稀释至最佳浓度。
- (3) 滴加 100 μ l 二抗溶液于载玻片上覆盖组织切片。
- (4) 将每个载玻片向两个不同的方向倾斜, 使液体均匀地分布在切片上。
- (5) 室温下, 在加湿室中孵育至少 20 分钟。
- (6) 用 PBS 轻轻冲洗掉切片上的二抗溶液。
- (7) 将载玻片放入 PBS 槽中洗涤 5 分钟。

外源性抗生物素反应

- (1) 切片稍甩干后, 小心地擦拭切片周围的水迹。
- (2) 用稀释剂将过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的外源性抗生物素蛋白稀释至其最佳浓度。
- (3) 滴加 100 μ l 酶标抗生物素溶液于载玻片上覆盖组织切片。
- (4) 将每张幻灯片向两个不同的方向倾斜, 使液体均匀地分布在切片上。
- (5) 室温下, 在加湿室中孵育至少 20 分钟。
- (6) 用 PBS 轻轻冲洗掉切片上的酶标抗生物素溶液。
- (7) 将载玻片放入 PBS 槽中洗涤 5 分钟。

方案 2 - 酶标二抗检测

- (1) 切片稍甩干后, 小心地擦拭切片周围的水迹。
- (2) 用稀释剂将过氧化物酶或碱性磷酸酶偶联二抗稀释至最佳浓度。
- (3) 滴加 100 μ l 酶标二抗溶液于载玻片上覆盖组织切片。
- (4) 将每张幻灯片向两个不同的方向倾斜, 使液体均匀地分布在切片上。
- (5) 在室温下或 37°C 的加湿室中孵育 30 分钟。
- (6) 用 PBS 轻轻冲洗掉切片上的酶标二抗溶液。
- (7) 将载玻片放入 PBS 槽中洗涤 5 分钟。

4. 准备底物

建议在最终清洗步骤期间制备底物混合物。

5. 显色

- (1) 切片稍甩干后, 小心地擦拭切片周围的水迹。
- (2) 使用足量的新鲜制备的底物混合物覆盖组织切片。
- (3) 孵育 5-10 分钟或者用显微镜观察到所需的颜色反应, 同时在阴性对照中出现背景染色之前, 用洗瓶中的蒸馏水轻轻冲洗, 终止反应。

6. 复染

注意: 使用 AEC 底物时, 请勿使用含酒精的溶液进行复染 (例如: Harris 苏木精、酸性酒精), 因为该方法形成的 AEC 染料可溶于有机溶剂。载玻片不得脱水、返回甲苯 (或二甲苯) 或用含甲苯的封固剂封固。

- (1) 使用足量的 Mayer 苏木精覆盖切片或将载玻片放入 Mayer 苏木精中。
- (2) 孵育 0.5-5 分钟, 具体取决于所用苏木精的强度。
- (3) 用洗瓶中的蒸馏水轻轻冲洗载玻片。
- (4) 用自来水轻轻冲洗载玻片 5 分钟 (避免直接冲洗, 否则可能会冲掉或松动切片)。
- (5) 使用水性封固剂 (例如甘油明胶) 封固切片。盖玻片可以用透明指甲油密封。