

免疫组化染色过程中存在的问题、原因分析及对策

shewlyn 及所有参与讨论站友

免疫学技术讨论版

shewlyn:

良好的免疫组化染色切片是正确判断染色结果的基础和前提。由于免疫组化染色过程中存在很多步骤或环节，每一个步骤或环节都可能影响到染色的最终结果，因此，要做好一张高质量的免疫组化切片并不是一件非常容易的事。需要病理技术员和病理医生密切配合、相互协调、共同努力才能保证做出合格的免疫组化切片。虽然免疫组化染色可以存在各种各样的问题，但从染色的结果看，一般可分为两类：无色片（即无阳性信号）和“杂音”染色片（有阳性信号）。

一、无色片

染色结束后，切片中见不到任何阳性信号。这是常规工作中比较常见的现象，出现这种现象，有两种可能：1、真阴性结果：整个染色过程没有出现问题，组织或细胞确实不表达与抗体相关的抗原。2、假阴性结果：即此阴性结果不是真实的反映。假阴性结果又可分为两种情况：（1）、切片中根本就不包含所预期检查的组织或细胞。出现这种情况，要么是病理医生选择错了切片或抗体选错了，要么是技术员选错了蜡块。获得正确的切片进行染色是获得正确结果的前提。由此表明：制作出合格的免疫组化切片不仅仅是技术员的事，病理医生也起着不可缺少的作用。（2）、染色过程中的某一或某些环节出了问题。比如，组织未进行抗原修复，有的组织必须经过抗原修复才能检测抗原表达；或选用了只能用于冰冻组织而不能用于石蜡包埋组织的抗体；或一抗失效，虽然抗体失效在理论上是一个逐渐的过程，但偶尔也遇到突然失效的情况，抗体长期不用和/或已超过有效期是主要的原因。也可见于染色过程中漏掉了某一环节，如忘记加二抗或三抗，或用了两次二抗而缺少了三抗，或配制 DAB 时少了过氧化氢。为了避免这种简单的错误，有一种简单的方法：在三抗孵育结束时，将切片上的三抗甩在一张白纸上，再将配制好的 DAB 滴一滴在白纸的三抗上，观察是否出现棕色。如果出现了，证明三抗和 DAB 的配制过程没有错误。如果这种 DAB 再滴到切片上没有出现任何阳性信号，问题一定是出在三抗以前。如果纸上不出现棕色反应，问题肯定在三抗 DAB 或 DAB 的配制过程。这种简单方法能迅速的帮助我们查找出现问题可能的原因。

解决阴性染色的问题非常简单，就是设立“阳性对照”。如果阳性对照有了表达，说明染色的全过程和所有试剂都没有问题。如果此时测试片仍为阴性，便是真实的阴性，说明组织或细胞没有相应的抗原表达。反之，如果阳性对照没有着色，表明染色过程中某个或某些步骤出了问题或试剂出了问题。应一一寻找原因。阳性对照包括两种，一种称为“自身对照”或“内部对照”，这是指在测试的切片中本身就存在已知的抗原，如正常淋巴结中存在 T 和 B 细胞抗原，CD20 或 CD3 都应该有表达。自身对照是一种比较理想的对照，对照和测试组织或细胞都在同一张切片中，都处于相同的试验条件下，结果更可靠更具有可比性。在选择自身对照片时最好选择既有病变组织同时又有正常组织的部分，这样有利于对比。另一种称为“外部对照”，有时在测试的切片中不存在已知的抗原，如在胃的标本中怀疑是恶性黑色素瘤，需要用 HMB45 或 Mart-1 来检测，在正常的胃组织中本身不存在相关的抗原，如果病变出现阳性反应结果，尚能提示是恶黑，但是如果出现阴性结果，就无法确定是本身组织中

不含黑色素瘤抗原，还是技术问题。因此，应另外设立一个已知的阳性对照。这种在测试组织之外的阳性对照称为“外部对照”。在实际工作中需要设立外部对照的情况很多，如果每一种抗体都要选不同的阳性对照，工作量会很大。为了解决这个问题，目前国内外有单位将多种不同组织集成在一起，制成多组织切片、“腊肠”“春卷”切片、组织芯片等，其连续切片储备待用，需要时取出一张便可作为阳性对照。另外，比较简单的方法，是采用阑尾作为阳性对照，因为与人体其它组织器官比较阑尾包含的组织种类较多，如有上皮、淋巴组织、平滑肌、间质、神经、血管、间皮等。一张阑尾切片可以检测大多数常用的抗体。

设立阳性对照是病理医生的任务或责任，而不是技术员的责任。病理医生观察了 HE 切片，了解切片中是否有自身对照，如果没有，就应告诉技术员采用阳性对照。因此，病理医生在免疫组化中的作用是不可忽视的。

抗体未覆盖上测试组织：当多块散开的小组织染色时，可能漏掉某块组织染色。

二、“杂音”染色片

免疫组化除正常的真实的阳性信号外常常会遇到不正常的背景着色，这些非正常的着色称为“杂音”染色。“杂音”染色种类繁多，产生的原因也多种多样，为了便于说明，笔者将其归纳为下面几种。

1、全片着色

全片着色是指整个切片全都染上了颜色，着色的强度可深可浅，总之，分不清那些组织是阳性那些组织是阴性。出现这种现象的原因有：

(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，过期的抗体要麼不显色要麼背景着色。用新买的抗体时最好设立阳性对照和用使用过的抗体作比较。

2、切片边缘着色

切片边缘着色也是一种常见的现象, 这种现象称为边缘效应。产生的原因: (1)、组织边缘与玻片粘贴不牢, 边缘组织松脱漂浮在液体中, 每次清洗不易将组织下面试剂洗净所致。解决办法: 制备优质的胶片 (APES 或多聚赖氨酸), 切出尽量薄的组织切片, 不厚于 4 微米, 组织的前期处理应规范, 尽量避免选用坏死较多的组织。(2)、切片上滴加的试剂未充分覆盖组织, 边缘的试剂容易首先变干, 浓度较中心组织高而致染色深。解决办法: 试剂要充分覆盖组织, 应超出组织边缘 2 mm。用 DAKO 笔画圈时, 为了避免油剂的影响, 画圈应距组织边缘 3-4 mm。

3、“阴阳脸”着色

指组织一半着色一半无着色, 形成交界清晰或不甚清晰的两种染色结果。其成因是试剂仅覆盖了部分组织而不是全部。如加试剂后未让试剂流散开而集中在部分组织上。通常应该在加完试剂后, 仔细看一遍, 是否有的组织未被试剂完全覆盖, 如有这种情况, 建议用牙签而不是用吸头或试剂瓶口将试剂引流开使之将组织全部覆盖。另外, 染片盒不平, 切片倾斜, 虽然开始试剂已全部覆盖了组织, 但后来试剂流向一边, 部分组织未被试剂覆盖。对于这种问题, 只要留心或想到了很容易发现, 也很容易解决。有时, 用 DAKO (或 PAP) 笔在组织周围画圈时, 划线太靠近或画到了组织上, 由于笔油的力学原理, 试剂不能达到靠近划线附近的组织。还有气泡也可引起阴阳分明的着色, 只是不着色区域是圆形, 由于气泡中含气, 试剂被推到周围, 因此, 气泡中心的组织不着色。解决办法是滴加试剂时手法要轻, 有气泡时用牙签捅破。

4、灶片状着色

切片中着色区东一块西一块, 呈灶片状分布, 出现这种问题的原因有:

(1)、裱片时水未排尽, 在局部形成气泡使组织突起, 染色时试剂渗入后不易洗净, 显色过深所致。解决办法是, 漂片盒里的气泡应去尽, 晾片热台不能平放, 应有 45 度左右的斜度, 利于水流走和蒸发。

(2)、坏死组织灶, 组织坏死后细胞破坏、酶的释放、蛋白游离、分解, 复杂的肽链残段 (如 Fc 段) 可能与一抗或/和二抗结合导致最终着色。解决办法是在选择染色切片时应避免选择坏死组织较多的切片。

(3)、制作 APES 胶片时, 胶的浓度太高, 干燥后在玻片上留下白色小点, 显色时白色小点着色。解决办法是按照标准的制备方法进行, 即 5% 盐酸酒精 (5ml 盐酸+95% 酒精 95ml) 浸泡玻片 4 小时、热水冲洗玻片 1 小时、蒸馏水洗玻片 1 分钟、丙酮浸泡玻片 5 秒钟后空气干燥 (室温)、2% APES (2 ml APES+98 ml 丙酮) 浸泡玻片 5 分钟、玻片过一下丙酮 (1-2 秒钟)、玻片过一下蒸馏水 (1-2 秒钟)、37°C 过夜干燥、室温储存备用。如果制片过程中, 因丙酮逐渐挥发而胶变浓时可适当加入一些丙酮。

5、间质着色

着色部位主要在间质, 间质着色的原因很多, 如抗体与组织中的蛋白质因蛋白疏水基团相互作用形成非特异性的连接而着色, 加一抗前的血清封闭这一步就是为了避免非特异型的结合。又如血清中的免疫球蛋白常常渗出到组织间质, 很容易与抗体结合, 造成间质着色, 特别是 lambda 和 kappa 染色时。当甲状腺胶质外溢到组织间质时, 做甲状腺球蛋白染色也会出现间质着色。抗体不纯或抗体被污染也可出现间质着色, 我们曾遇到 CD20 抗体不纯, 除了染上 B 细胞外还染上了间质。

6、细胞浆着色

胞浆着色是所有“杂音”染色中最具有欺骗性的着色,着色区局限在细胞内,间质无着色,看上去与真实的免疫反应着色几乎一样,很难区别。胞浆里含有较多的蛋白质,因此,很多非特异性的染色除了见于间质也可以出现在胞浆中。这种原因造成的着色,可以通过血清封闭解决。还有因内源酶造成的着色,如血红蛋白(红细胞)、肌红蛋白(肌细胞)、细胞色素(粒细胞、单核细胞)、过氧化氢酶(肝、肾),这些可用过氧化氢进行封闭。巨噬细胞吞噬各种抗原物质或 Fc 片段而出现胞浆着色,这种着色不易避免,但可以通过形态学辨认出巨噬细胞而引起重视。内源性生物素的着色最具有欺骗性,因为它广泛的存在于组织细胞中,我们研究结果显示:冰冻组织中存在内源性生物素,经福马林固定石蜡包埋后生物素被封闭,加热抗原修复后造成内源性生物素暴露,内源性生物素暴露的强度在不同的组织有所不同,从弱阳性(+)到强阳性(+++),内源性生物素在组织中的分布形式,既有散在分布也有弥漫分布,主要以颗粒状形式存在于胞浆中,内源性生物素广泛存在于上皮源性组织,特别是腺上皮组织,亦存在部分非上皮组织,内源性生物素不仅存在人体组织也存在大鼠组织,内源性生物素暴露的强弱与修复液有关,其强度增加依次为:柠檬酸、EDTA、EGTA,热抗原修复暴露的内源性生物素可被鸡蛋清封闭,非生物素检测系统 Polymer 两步法(EliVision、EnVision)可避免生物素干扰。

7、细胞核着色

不适当的组织处理可以出现细胞核着色,如组织在二甲苯里浸泡时间太长(如从星期五浸泡到下星期一)、缓冲液中浸泡时间太长、组织变干、微波修复液的 pH 值和修复时间不当或修复过程中修复液留下得太少,未没过组织等。解决办法是严格按照操作常规进行工作。

参考文献

- 1、 DAKO, handbook immunohistochemical staining methods. 3rd edition. 2001.
- 2、 周小鸽, 王鹏, 陆鸣等, 加热抗原修复对内源性生物素的影响及其对策。中华病理学杂志. 2002, 31: 504-509.

zzhhaaooou:

免疫细胞化学染色:

细胞甩片用冷丙酮固定,含 3% H₂O₂ 的甲醇室温孵育 30min 灭活内源性过氧化物酶。2% Triton X-100 孵育 10min,以增加膜通透性。5% 山羊血清室温封闭 30min。一抗 1: 100 稀释,4°C 反应过夜。小鼠抗人 cathepsin D 单克隆抗体购自 ZYMED 公司。二抗及显色反应采用 DAKO 公司的 Universal LSAB 试剂盒。用目镜中放置方格测微器观察,在对照组及处理组细胞甩片上分别取 10 个高倍镜视野,记数每个视野中 cathepsin D 阳性细胞数。统计学处理:用统计软件 SPSS10.0 进行方差分析比较,以 P<0.01 为有显著性差异。

zzhhaaooou:

Immunostaining of Cells Adherent to Coverslips

Procedure:

- 1) Immerse 18 mm² glass coverslips in EtOH. In the tissue culture hood, individually pull out and carefully flame to sterilize. Allow to cool then place in 35 mm dishes, or in 6 well plates. Coat overnight (4°C) with 3 ml/dish or well of 40 µg/ml BMS made up in ddH₂O.
- 2) Remove coating solution and block with 1% BSA for 4 hr at 4°C.

3) Isolate cells and plate at 6×10^5 cells/ml (3 ml/well). Allow cells to adhere for 1 hr in incubator. Gently pull off media containing non-adherent cells and wash once with media. Pull off media and add 4% formaldehyde (25 ml of 16% ampule stock made up to 100 ml in PBS) to dishes or wells. Fix for 30 min at room temperature.

4) Remove coverslips. Those for immunostaining are placed vertically in two ceramic coverslip holders. The remainder can be stored at -70°C .

5) Coverslips in ceramic holders are washed two times in PBS. For washes and incubations, use a 250 ml beaker and a 100 ml volume of wash or reagent. Permeabilize by immersion in PBS-Tween ('PBS-T'; PBS containing 0.1% Tween 20) for 15 min at room temperature. Wash four times over 5 min with PBS.

6) Block by immersion in PBS containing 1% BSA for 60 min at room temperature. Immerse one group of coverslips in preimmune sera and the other in immune sera diluted in PBS/1% BSA. Cover and incubate overnight at 4°C .

7) The next day, wash five times over 40 min in PBS. At this time, can immerse in Pierce 'peroxidase suppressor' for 30 min at room temperature, then wash several times in PBS. Immerse in secondary peroxidase-labeled antibody diluted 1/1,000 in PBS containing 1% normal goat serum. Incubate for 60 min at room temp. Wash five times over 40 min in PBS.

5) Place coverslips flat on Parafilm and add Pierce 'metal enhanced DAB' diluted 1/10 in peroxide buffer. Allow reaction to go for 5 - 15 min, then replace in ceramic holders to wash two times in water. Dehydrate in 80%, 90% and 2x 100% EtOH, then immerse in xylene (in chemical hood; all 1 min each). Place cover slip cell layer down on a glass slide containing a drop of mounting medium and examine in the light microscope.

Reagent:

1. PBS-T (1000 ml)

NaCl 8 gm

KH_2PO_4 0.2 gm

Na_2HPO_4 1.15 gm

KCl 0.2 gm

Tween 20 1 ml

Thimerosal 0.1 gm

zzhhaaooou:

Immunostaining of individual cytokine-producing cells smeared on slides

Suitable for use on single-cell suspensions from peripheral blood, lymphoid tissue or cultured cell-lines.

Sample Preparation and Fixation

1. Harvest cells and wash twice in V-bottomed tubes with cold Wash Buffer by centrifugation ($400 \times g$ for 5 minutes) to remove extracellular proteins, including cytokines.
2. Resuspend to $1-5 \times 10^6$ cells/mL in Wash Buffer.
3. Transfer 10-15 of the cell suspension to each reaction field on the adhesion slide.
4. Allow the cells to adhere electrostatically in a monolayer for 10 minutes at room temperature in the humidified chamber to prevent the cells from drying out.
5. Add 50 of ice-cold Fixation Buffer to each field to fix the cells.

6. Incubate for 20 minutes at 4.
7. Wash three times with Wash Buffer to remove free formaldehyde.
8. Add 25 of 2% fetal bovine serum in Wash Buffer to block unbound surface area on the slide.
9. Incubate for 10 minutes at 37.
 - a. Wash slides three times in Wash Buffer-Saponin. The slides are now ready for staining.
 - b. Alternatively, wash the slides in Wash Buffer and allow the slides to dry. Dried slides can be stored at -20 several months before being stained. Prior to staining the slides should be washed in Wash Buffer-Saponin.

Antibody Incubation

All antibody incubations and washes are performed in Wash Buffer-Saponin to keep the cells permeable for antibodies to penetrate the cell membranes.

Detection using Biotin-labeled antibodies

1. Incubate in Endogenous Peroxidase Blocking Buffer for 30 minutes at room temperature in the dark to block endogenous peroxidase activity in the cells (this step can be omitted if cells are to be stained by fluorochromes or non-peroxidase based enzymatic methods).
2. Block endogenous biotin activity with the Avidin/Biotin blocking kit in a two step procedure for 30 minutes in the presence of saponin, described in steps 3-5.
3. Incubate each cell spot on slides with Avidin for 15 minutes supplemented with saponin (0.1% w/v).
4. Wash each cell spot on slides twice in Wash Buffer-Saponin.
5. Incubate in Biotin for 15 minutes supplemented with saponin (0.1% w/v).
6. Wash each cell spot on slides twice in Wash Buffer-Saponin.
7. Incubate each cell spot on slides for 30 minutes at room temperature with 15 unlabeled or biotinylated cytokine-specific antibodies (0.5-5 /mL) diluted in Wash Buffer-Saponin.
8. Wash slides three times in Wash Buffer-Saponin. Note: If using R&D Systems biotinylated antibody skip steps 9 and 10 and continue.
9. Incubate each cell spot on slides for 30 minutes at room temperature with 15 of a biotinylated secondary antibody (either biotin-donkey anti-goat IgG Fab2 diluted 1:700; or biotin-goat anti mouse IgG1 or IgG2A or IgG2B diluted 1:500) in Wash Buffer-Saponin.
10. Wash slides three times in Wash Buffer-Saponin.

Cytokine-specific staining based on either biotinylated primary antibodies or unlabeled primary antibodies along with biotinylated secondary antibodies can then be developed by techniques based on immunofluorescence or immunoenzymatic methods.

Immunoenzymatic Technique

1. Prepare Vectastain Elite ABC-peroxidase reagent according to manufacturers' instructions and supplement with saponin (0.1% w/v), 30 minutes prior to step 2.
2. Incubate for 30 minutes with Vectastain Elite ABC-peroxidase at room temperature in the dark.
3. Wash slides three times with distilled water prior to substrate incubation.
4. Prepare the substrate according to the the protocol given by the manufacturer without any supplementation of saponin.
5. Incubate for approximately 8 minutes (monitor in the microscope) at room temperature in the

dark. A brown color reaction with distinct morphology is developed with DAB in the peroxidase system.

6. Stop the development of the color reaction by repeated washes in distilled water.

7. Counterstain, if desired, with hematoxylin for 1-5 seconds. Slides are then air dried and coverslipped with Immunohistochemistry Mounting Medium. Slides that need to be kept for long periods in optimal shape should be dehydrated in ethanol and mounted in special mounting medium.

zzhhaaouuu:

Frequently Asked Questions

Question 1

Question: Are background signals caused by the developing substrate?Test: Incubate with substrate alone.Cause of Background: Endogenous enzyme (peroxidase/alkaline phosphatase) activity in sampleRemedy: Block with Endogenous Peroxidase Blocking Buffer (with Levamisol in the alkaline phosphate system).

Question 2

Question: Are background signals caused by endogenous biotin activity in the sample?Test: (Block if necessary as in Question 1) Incubate with Vectastain ABC (or ExtraAvidin HRP/AP) and incubate with substrate.Cause of background: Endogenous biotin activity.Remedy: Block with Endogenous Biotin/Avidin Blocking-Buffer.

Question 3

Question: Does the secondary biotinylated antibody cause background signals?Test: (Block if necessary as in Question 1 and/or Question 2). Incubate with the following three steps: secondary antibody; Vectastain ABC-kit (or ExtrAvidin HRP/AP); and substrate.Cause of background: Fc-receptor binding of secondary antibody used at too high concentration.Remedy: Block with species matched serum to secondary antibody or try to dilute the secondary antibody.

Question 4

Question: Does the primary cytokine specific antibody generate background signals?Test: (Block if necessary as in Question 1 and/or Question 2). Use secondary antibody at optimal concentration. Incubate with the following: primary antibody; secondary antibody; Vectastain ABC (or ExtrAvidin HRP/AP); and with substrate.Cause of background: Cytokine-detection antibody used at too high concentration or unsuitable for immunostaining.Remedy: Titrate antibody or try another cytokine detecting antibody.

Question 5

Question: Is the cytokine staining specific?Test: Incubate cytokine-detecting antibody with target cytokine overnight and finally add 0.1 (saponin prior to staining as in Question 4.Cause of Background: Cytokine-detecting antibody used at too high concentration or unsuitable for immunostaining.Remedy: Titrate antibody or try another cytokine detecting antibody.

Contents

Technical Hints

Permeabilization: It is crucial that saponin is present during all antibody incubations and washes to make the staining procedure successful. For detection of intracellular cytokines, the

cytokine-specific antibodies must penetrate through the cell surface membrane, the cytosol, the membranes of the endoplasmic reticulum and the Golgi organelle. The detergent, saponin has been shown to intercalate in the membranes to replace cholesterol and to permeabilize cells in a reversible way, maintaining much of the morphology of the membrane structure of the cell.

Fixation: A solution of phosphate-buffered formaldehyde has been found to preserve cell morphology as well as surface and intracellular antigenicity with minuscule cell aggregation and cell loss. Only fixed cells will stand the effects of detergent treatment.

Controls: Evidence for specificity of the cytokine staining should be based on parallel studies of isotype controls, staining with the secondary antibodies alone and an abolishment of immunoreactivity by preabsorption of the cytokine-specific antibody with the corresponding cytokine protein.

Stimulation of PBMNC for cytokine production: The strongest and most diversified cytokine production is seen after PMA-ionomycin activation of Ficoll separated PBMNC. Both monocytes and lymphocytes will be activated. The cells are co-cultivated with PMA (1 ng/mL), ionomycin (500 nM/mL) and harvested after 4 hours. After 4 hours, one can expect to see IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-3, for various periods. If cells are harvested after 3 hours, one can find monokines such as IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-6, IL-8, MIP-1a, MIP-1b, and TNF-a. However, cytokines produced by lymphocytes, IL-12 or substantial IL-10 production is not found in the cultures.

Contents

人中龙凤:

lhylucky wrote:

请教高手: 我现在做免疫细胞染色, 本来应该有核着色, 但染色后呈空泡状核, 如何处理能提高一抗对核膜的穿透能力? 谢谢!

对抗原表达于胞浆或胞核的可以使用 TritonX-100 来破膜, 其原理在于可以脱去细胞膜中最主要的脂质成分, 但是时间要控制好。关于 TritonX-100 使用的具体时间我做没有用过, 这里只是作为你的参考: 1% TritonX-100 4 度过夜或 0.5% TritonX-100 37 度孵育 20 分钟! 祝你好运!

danghongc:

我刚做完免疫组化染色, 结果还可以, 在之前我也出现过类似各位学姐学哥的问题, 但经过改良有所改进, 不知对大家有无帮助, 我简单说下吧:

- 1、组织一定要处理好, 比如我是做的冰冻切片, 切片之前的固定很重要, 我第一次没成功就因为没固定, 结果组织结构十分模糊, 什么都分不出来;
- 2、标本的保存, 不同组织不同技术方法要求有不同的保存方法; 譬如冰冻切片应保存在-70 度左右
- 3、选择合适的一抗和二抗, 在抗体到手时一定要看清离岸时间, 保存条件
- 4、冻切片不可太厚, 根据我的体会是神经组织, 一般 5um 足够, 太厚可能会影响结果, 也容易掉片;
- 5、一定在切片后用冷丙酮固定一下;
- 4、每一步务要 PBS 充分冲洗;

gwmao163:

对于免疫组化,我个人有几点体会:

1. 抗体的选择,不知道各位有没有这体会,国内的几家试剂公司的试剂质量相差很大,要知道抗体对于免疫组化来说,是最重要的,没有好的抗体空谈试验条件也是白搭,我个人应用的结论是:博士德的虽然价格低廉,但是试剂不稳定,时好时坏,不同的出厂时间效果差距都很大。迈新的试剂,效果一般,价格也差不多,中山的试剂质量相对好些,稍微贵一点,上海长岛和北京定国的质量也差不多,但是他们主要是代理国外的试剂,等待时间长,价格高,当然好的试剂还是国外的试剂公司的产品,这一方面我深有体会,国内精美生物代理的比较多,作出的图片效果的确好,但是试剂贵,想一想目前的研究生课题就那么点经费,尤其是硕士,过千美金的试剂是不敢想的呀。
2. 试验条件的摸索:首先是片子的厚度,片子的厚薄随组织要求不一样,如脑组织的就不能太薄,尤其是观察神经原时,但是太厚容易脱片,肾病的一般 2—3 微米,肿瘤的也不要超过 5 微米,其次是片子的处理,国内的脱片处理一般用多聚赖氨酸等粘片剂,我个人当时为了省经费,采用的是自制的防脱剂,很简单鸡蛋清,打碎,知道波棒提起时,一滴滴的滴下,要求就是把纤维蛋白原打断,均匀图片,凉干, -20 度保存。基本上不掉片。我应用过很多次,效果很不错。另外血清封闭液也可以用蛋青稀释液代替;染色观察我最喜欢苏木素复染, DAB 显色,这是我个人认为的最佳搭配。
3. 在一次结果成功前,往往要作多次,试验就是这样,一开始怎么这么难,后来随便你怎么作都有结果,呵呵,就是这样。所以不要一两次不成功就大叫;往往最常见的试验结果是无阳性,呵呵,这是你要从一抗的浓度考虑,浓度是否不够,国内试剂提供的参考步骤浓度那是真的仅供参考,很多试剂他们都说从 1: 200 开始,有一家试剂公司的试剂最后我调到 1: 40 才有阳性结果,(公司名我就不说了),所以我建议一开始最好作三个一抗浓度的,一边探索最适宜的一抗浓度。
4. 对于背景显色太深,我决的要作一下几个处理:一抗浓度是否过高,是否存在洗片不干净的因素,2 抗等是否未洗净,显色时间是否太久,导致非特异性阳性结果,最好作个阴性对照。显色太深我就不说了。

xml638:

我想向大家求教一个关于免疫细胞化学的问题:是不是免疫细胞化学不需要后面的脱水步骤,需要二甲苯透明吗?我得细胞酒精脱水之后,细胞缩小很厉害,二甲苯透明,树胶封片,老出现气泡或水泡,一层雾蒙蒙的感觉,不知道怎么回事,向大家请教。

hxweihg1980:

后边酒精梯度还是要过的,也需要二甲苯透明.你做的是组织还是细胞甩片.细胞缩小是不是与你固定的条件有关.至于封片后的气泡可能是你没有封好.

weekend:

酒精梯度脱水和二甲苯的时间都不能长,我一般 30 秒到一分钟。也曾经有过不脱水,自然晾干后树胶封片,镜下形态观察略有影响,看你实验要求。有气泡雾蒙蒙可能是酒精脱水不完全, 100% 乙醇过两次,用的多的话要勤换。

xuemmm:

免疫细胞化学染色步骤不需要向组织切片那样首先脱蜡至水,免疫细胞化学染色后脱水、透明和封片都是必要的步骤。封片胶太稠,封片时容易出现气泡。脱水不彻底,透明不充分,封片胶不干净(灰尘,少量水分)或盖玻片不清洁都引起雾蒙蒙的。酒精梯度脱水和

二甲苯透明时间按常规要求处理不会有问题。

acomer:

大家好。我想做细胞爬片的免疫组化，但是最近爬片做的很不爽，能不能直接把细胞接种到培养板上，然后固定染色呢？有没有谁做过？

Rosalie:

我的经验是,你在制备单细胞悬液后直接做爬片

- 1 应该将盖玻片进行防脱处理(可以用多聚赖氨酸,也可用 APES)
- 2 在六孔板上预置盖玻片,注意一定要无菌操作
- 3 接种时先行细胞活力检测(也可不做啦)和细胞记数,以便于达到最适宜的细胞密度,这只很重要的,否则细胞出来的照片很不好,并且也不适宜细胞生长和贴壁
- 4 让细胞长 2 天,爬牢了再行固定,(不要太快就做,我以前也是太着急,其实慢功出细活的)希望对你的实验有帮助

wjzsx:

我现在也做细胞爬片的免疫组化，遇到了很多问题，梯度酒精脱水 75%、85%、99% 是否合适？等 75% 酒精风干了再用 85% 的酒精吗？每一种浓度固定几分钟？二甲苯透明怎样操作，作用几分钟？有一回我在 9 孔板里做组化，二甲苯透明后，爬片周围和板底粘连，不易拿出。封片总是掌握不好，以至于我现在根本不敢封片，只先照相。还有的问题就是被着色的爬片细胞脱片的程度轻，不着色的细胞爬片脱片严重，细胞所省无几！我遇到这种情况很多次！谁能帮我解释一下，除了爬片前先处理爬片增加黏附性外，没处理过的爬片有什么补救措施吗？

Rosalie:

在我的试验中未处理盖玻片，因为细胞贴的比较牢，我是听师兄说要处理片子的，因为他的细胞不容易贴壁。首先，盖玻片要清洗干净，象洗玻璃器皿一样要泡酸啊等等，然后，APES 配好后涂于盖玻片上，注意这一步也不要污染了（至少轻微的）。最后，高压灭菌即可我想进行防脱处理后在一定程度上会对细胞生长有影响（比如容易死亡等），但我们要在细胞状态还好时即进行固定研究，这是针对一些好养的细胞而言；若你的试验要求细胞传代或存活时间长或是细胞比较娇贵，建议就不要处理盖玻片了，过犹不及嘛！

希望有帮助，互相讨论学习啦。