

将组织包埋在石蜡中进行免疫组织化学

介绍

免疫组织化学 (IHC) 是在组织形态学背景下监测蛋白质表达和定位的常用技术。它使用抗体来检测和分析蛋白质表达, 同时保持天然组织的组成, 细胞特征和结构。化学固定将细胞内和细胞间的分子相互作用锁定在适当的位置。组织样品可以包埋在石蜡中或冷冻, 然后切成薄片并固定在载玻片上进行分析。组织的收集, 保存和固定可能会因样品或感兴趣的目标而有很大差异。IHC 通过特异性抗体结合来鉴定生物样品中蛋白质表达的存在和模式。抗体与其表位之间发生的精确结合可以检测蛋白质中靶向特定区域, 结构域或切割产物的高特异性氨基酸序列。抗体还可以检测蛋白质上的特定翻译后修饰 (PTM) 。

应用

IHC 用于疾病诊断, 生物学研究和药物开发。例如, 使用特定的肿瘤标记物, 医生使用 IHC 来诊断肿瘤是良性还是恶性, 确定其阶段和等级, 并确定转移的细胞类型和起源, 以便找到原发肿瘤的部位。使用 IHC 作为主要工具或确证程序, 可以诊断出多种其他非肿瘤性疾病和病症。在研究背景下, IHC 可以单独使用, 也可以与其他分析技术结合使用, 以研究例如正常组织和器官的发育, 病理过程, 伤口愈合, 细胞死亡和修复以及许多其他领域。

样品制备

- 1.将石蜡浸润的组织放在带有少量液体石蜡的模具中。短暂冷却以固定组织。将纸盒的底部放在模具顶部。装满液体石蜡, 然后冷却。
- 2.在切片机上切成薄片, 然后在水浴中漂浮切片。
- 3.将切片安装在带电的载玻片上并干燥过夜。(带电的幻灯片可帮助该部分粘附到板上。)

脱蜡/再水化

注：要进行抗体染色，必须从样品中除去石蜡，并且必须将水化。过度干燥会导致不一致的染色。

- 1 除石蜡，将切片分别放在新鲜的二甲苯容器中 3 分钟。
- 2 开始再水化过程，请将切片放在两个 100%乙醇的容器中，每次 3 分钟。
- 3 在两个装有 95%乙醇的容器中孵育切片，每次 1 分钟。
- 4 将切片放在 70%的乙醇中 1 分钟。
- 5 完成再水化过程，请在 dH₂O 中将切片洗两次，每次 5 分钟。

抗原提取

注意：请参阅产品数据表以获取有关抗体特异性方案。过热或过热可能导致不一致的染色。

柠檬酸盐缓冲液：

在 1X 柠檬酸盐溶液中加热载玻片直至开始沸腾；然后在亚沸点温度（95°C-98°C）下持续 20 分钟。在工作台上冷却幻灯片 20 分钟。

EDTA：

将载玻片在 1mM EDTA（pH 8.0）中煮沸；然后在低于沸点的温度下加热 15 分钟。（无需冷却。）

TE：

将玻片在 10mM Tris / 1mM EDTA（pH 9.0）中煮沸；保持沸腾温度 18 分钟。在室温下冷却 30 分钟。

染色

- 1 用 dH₂O 清洗切片 3 次，每次 5 分钟

- 2 将切片在 3%过氧化氢中孵育 10 分钟。（注意：此步骤对于淬灭内源性过氧化物酶活性很重要，这将有助于减少高背景染色）
- 3 在 dH₂O 中清洗两次，每次 5 分钟。
- 4 为防止非特异性结合，请在室温下用首选的封闭溶液封闭每个切片 30 分钟。（使用相同物种的血清作为二抗的来源。）
- 5 除去封闭溶液，并以建议的稀释度添加一抗，以建议的稀释度添加到每个部分。
- 6 在 4°C 下孵育过夜。（应按照建议进行潜伏期。）
- 7 除去抗体溶液，并用洗涤缓冲液洗涤切片 3 次，每次 5 分钟。
- 8 在室温下用结合有 HRP 的二抗覆盖切片 60 分钟。
- 9 用清洗缓冲液清洗切片三遍，每次 5 分钟。
- 10 用即用的 Stayright Purple 解决方案覆盖部分。在室温下孵育 5-15 分钟。（应为每个应用程序确定最佳开发时间。）
- 11 将切片浸入 dH₂O，用 dH₂O 洗涤 5-10 分钟。
- 12 如果需要，对部分进行复染。
- 13 复染后，用 dH₂O 洗涤两次，每次 5 分钟。

脱水

- 1 将切片放在 70%乙醇中 2 分钟。
- 2 将切片放在两个 95%乙醇的容器中，每次 1 分钟。
- 3 将切片放在两个 100%乙醇容器中，每个容器 1 分钟。
- 4 将切片放在两次二甲苯洗涤中，每次 1 分钟。
- 5 用盖玻片和有机永久性水性固定剂固定部分，注意避免导致气泡。

6 显微镜下观察。