

实验步骤: 免疫组织化学染色 (IHC)

材料/试剂/缓冲液

1. 组织切片
2. 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF)
3. 一抗
4. HRP标记二抗
5. ABC试剂(VECTASTAIN Elite ABC kit)
6. 二甲苯(xylene)
7. 100 % 乙醇
8. 95 % 乙醇
9. 石蜡
10. 3 % 过氧化氢 (H₂O₂)
11. 磷酸盐缓冲液 (PBS)
12. 抗原修复溶液: 例如: 柠檬酸钠溶液 (10 mM Sodium Citrate, 0.05 % Tween 20, pH 6.0)或(Cell Marque Trilogy 920P-06, EDTA-based, pH 8.0)
13. 高压锅(Cuisinart Electric Pressure Cooker #EPC-1200)
14. 封闭液: 5-10 % 正常动物血清 (normal animal serum)
15. DAB
16. 苏木精染液 (hematoxylin): GTX73341
17. 封片液 (GTX30922)

方法

A. 组织固定

1. 收集组织, 用PBS润洗去除血液.
2. 将组织切成约3毫米的薄小块 (因为NBF的扩散速率慢)
3. 将组织放入至少20倍体积的10 % NBF固定液中
4. 按照需要的时间孵育(大部分的应用固定18-24小时较适合)
5. 用PBS润洗组织后, 浸泡于75% 乙醇, 暂存于4°C

B. 组织处理

1. 固定后, 以PBS润洗组织, 直到完全去除固定液
2. 将组织依序浸泡于以下浓度乙醇中进行脱水
 - 50 % 乙醇, 50 分钟
 - 75 % 乙醇, 50 分钟
 - 90 % 乙醇, 50 分钟

B. 组织处理

95 % 乙醇, 90 分钟

100 % 乙醇, 50 分钟, 重复此步骤一次

100 % 乙醇, 90 分钟

3. 依下列顺序将乙醇置换为二甲苯

乙醇:二甲苯 (1: 1): 50分钟

二甲苯 (1: 1): 50分钟, 重复此步骤一次

4. 依下列顺序将二甲苯置换为石蜡(可用酒精灯加热至58°C, 保持石蜡为液态)

二甲苯:石蜡 (1: 1): 60分钟

石蜡, 120分钟, 重复此步骤一次

C. 组织包埋

1. 注入少量熔化的石蜡于包埋模型中
2. 用热镊子取出已浸透石蜡的组织块投入熔蜡中(将切面朝下)
3. 将包埋模型移至低温处, 石蜡凝固为薄层即可将组织保持在适当位置
4. 再次注入熔化的石蜡于包埋模型中, 确定有足够的石蜡覆盖塑胶包埋盒的表面
5. 静置30分钟待石蜡凝固

D. 组织切片

1. 将蜡块的切面朝下, 置于冰块或冷板上10-30分钟
2. 将新的刀片装入切片机(每把刀片约可切10个蜡块, 若切片出现问题可更换刀片)
3. 将蜡块固定于切片机的夹座, 调整蜡块切面与切片刀面至适当的角度
4. 设定切片机转动手轮至可切10微米切片先进行修整切面, 直到切片运作平顺后, 将设定改为4微米
5. 将切片从刀口向上挑起, 然后铺于45-55°C的温水表面, 再将漂浮于水面上的切片捞于干净的载玻片上
6. 将含有石蜡组织的载玻片平放于60°C的烘烤箱3-5小时, 使组织贴附于载玻片上

E. 免疫组化染色(IHC)

a. 脱蜡 & 脱水

1. 将4微米厚度的石蜡组织切片置于加温块上, 在60°C的烘箱中放90分钟
2. 依下列顺序润洗切片(如使用Trilogy™三合一前处理液, 此步骤可略过)
 - 二甲苯: 5分钟, 重复此步骤一次
 - 100 % 乙醇: 5分钟, 重复此步骤一次
 - 95 % 乙醇: 5分钟
 - 75 % 乙醇: 5分钟
 - 50 % 乙醇: 5分钟
 - 去离子水

b. 抗原修复(热诱导抗原表位修复)

1. 在耐高温染色缸中倒满适当的抗原修复溶液, 并向压力锅(或蔬菜蒸笼)中倒入足量的去离子水
2. 将玻片放进沸腾的抗原修复溶液中, 并设定压力锅时间为15分钟(蔬菜蒸笼设定30分钟)
3. 将装有玻片的染色架移至室温的PBS染色缸中
4. 此时玻片可进行封闭反应和一抗孵育步骤

c. 免疫组化染色

1. 以PBS润洗3分钟,然后再换到另一缸润洗3分钟,总共两次
2. 如果是使用HRP检测系统,可以先用3% H₂O₂孵育30分钟,以阻断内源性过氧化物酶
3. 用PBS润洗3分钟,然后再换到另一缸润洗3分钟,总共两次
4. 于每片玻片加入封闭液,在室温下反应30分钟进行封闭
5. 将玻片上的封闭液倒掉,每片加入适当稀释的一抗,在4°C孵育过夜
6. 隔日,将玻片上的一抗倒掉,用PBS润洗三次,每次5分钟
7. 加入二抗,于室温下反应30分钟
8. 根据制造商的说明书配制ABC试剂,置于冰上备用
9. 将玻片上的二抗倒掉,用PBS润洗三次,每次5分钟
10. 每片玻片加入ABC溶液,室温下反应30分钟
11. 将玻片上的ABC溶液倒掉,用PBS润洗三次,每次5分钟
12. 每片玻片加入DAB溶液,于室温下呈色0~3分钟,用肉眼判定颜色深浅
13. 一旦标的组织已呈色至适当的深浅,则将玻片上的DAB溶液倒掉,用去离子水润洗以停止反应
14. 加入苏木精染液进行对比染色(约30秒~3分钟)
15. 以去离子水润洗切片3分钟,重复此步骤一次
16. 依序进行脱水
 - 75%乙醇: 3分钟
 - 95%乙醇: 3分钟
 - 100%乙醇: 5分钟
 - 二甲苯
17. 滴上封片溶液,盖上盖玻片



GeneTex 简介

ABOUT

GeneTex 背景

1997年GeneTex由一群科学家成立于美国德克萨斯州,为抗体制造商,成立宗旨“专注生物相关试剂生产,加速科学研究与发展,在每一个产品里你将看到我们对质量的要求与坚持”。

成立之初,科学家致力于寻找引发癌症的分子新靶点,并开发抗体供科研使用。之后, GeneTex专注抗体开发,网罗世界各地人才,至今已开发出50,000个产品,产品线横跨癌症、病毒、遗传学、神经学、免疫学、细胞分子传递、干细胞研究、斑马鱼等多个领域,并提供完善的定制抗体制备服务。

GeneTex 承诺

在我们制造产品时,坚持我们的理念与方法,通过研究、开发与严格的测试提供最可信的试剂给研究人员,并驱动生命科学的发展。我们将持续开发多元的抗体产品,提供科学家探索有限生物医药知识所使用。

GeneTex 联系

任何跟产品相关的问题,我们技术与销售团队将竭诚为您服务; GeneTex支持中英文等多种语言并建构全球经销商网络,任何问题,您可以使用习惯的语言与我们联络。

