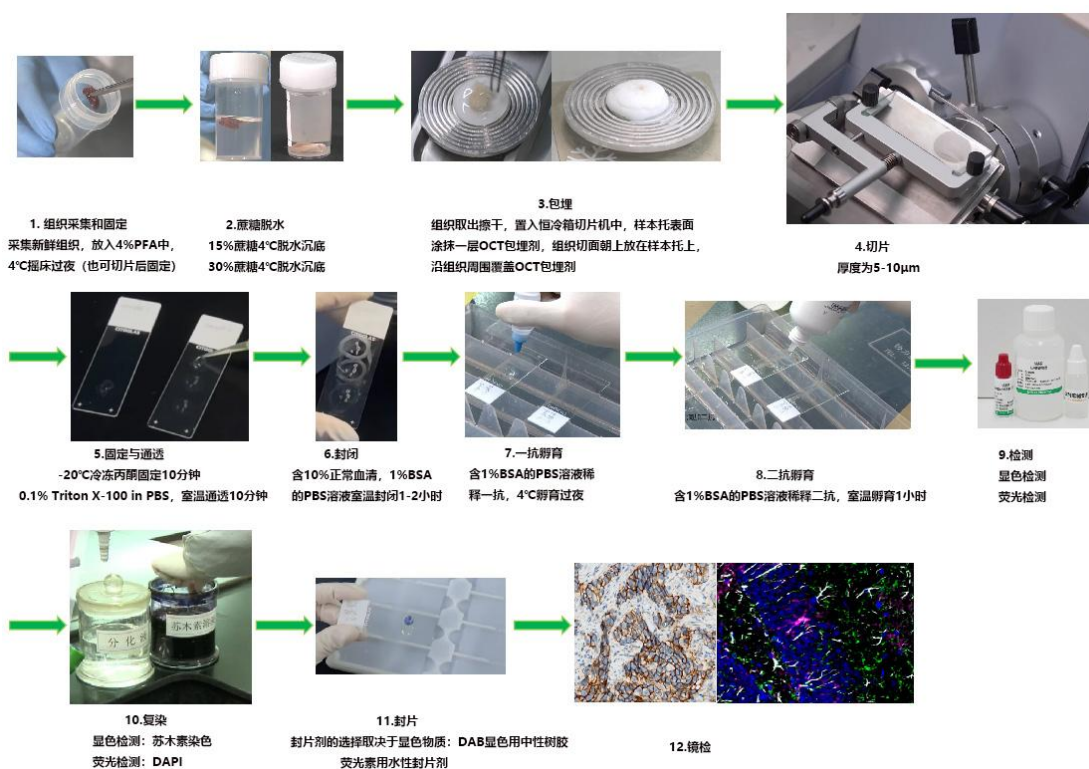


## 免疫组织化学步骤-冰冻切片



## 1. 组织采集、固定与保存

根据冷冻和固定的先后顺序，可以分为冷冻后固定法和冷冻前固定法。为了快速处理临床样本，一般选择冷冻后固定的方法制备样本，这样可以减少固定时间，避免固定时间过长带来的问题。

### 1.1. 冷冻后固定法

冰冻过程容易使组织中的水分形成冰晶，从而影响抗原定位，通常会采用速冻或者蔗糖脱水的方法，防止组织内冰晶形成。



### 1.1.1. 干冰-丙酮（乙醇）速冻法

1. 将 150-200ml 丙酮（无水乙醇）装入小保温杯内，逐渐加入干冰，直至饱和呈粘稠状，再加干冰不再冒泡时，温度可达-70℃。
2. 用一小烧杯内装异戊烷约 50ml，将此烧杯缓慢置入干冰-丙酮（或无水乙醇）饱和液内，至异戊烷温度-70℃时即可使用。
3. 用锋利的刀、剪切取新鲜组织块，大小 1cm×0.8cm×0.5cm 为宜。
4. 将其投入异戊烷内速冻 30-60 秒后取出，置入恒冷箱切片机进行冷冻切片，或置-80℃冰箱内贮存备用。

### 1.1.2. 液氮速冻法

1. 用锋利的刀、剪切取新鲜组织块，大小 1cm×0.8cm×0.5cm 为宜。
2. 将取好的组织块平放于软塑瓶盖或特制小盒内（直径约 2cm）。
3. 如组织块小可适量加冷冻 OCT 包埋剂浸没组织，将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内。
4. 当盒底部接触液氮时即开始气化沸腾，此时小盒保持原位切勿浸入液氮中，大约 10-20 秒组织即迅速冰结成块。
5. 取出冷冻的组织块立即置入恒冷箱切片机进行冷冻切片，或置入-80℃冰箱贮存备用。

### 1.1.3. 蔗糖脱水法

1. 用锋利的刀、剪切取新鲜组织块，大小 1cm×0.8cm×0.5cm 为宜。
2. 将组织块用 pbs 缓冲液冲洗 3 次，每次 5 分钟。
3. 用滤纸吸干表面水分，将组织放于 10 倍体积的 15%蔗糖溶液中，于 4℃冰箱中脱水沉底后。转入 10 倍体积的 30%蔗糖溶液中，4℃冰箱脱水沉底。
4. 将脱水完成的组织取出，稍吸干表面水分，将目的部位组织修平整。
5. 将组织置入恒冷箱切片机进行冷冻切片。

## 1.2. 冷冻前固定

### 1.2.1. 浸泡式冷冻前固定

1. 用锋利的刀、剪切取新鲜组织块，组织离体后到固定不超过 30 分钟。
2. 将组织块放入 10 倍体积 4%多聚甲醛（PFA）固定液中，4℃摇床过夜。
3. 将组织从固定液中取出，用 pbs 缓冲液冲洗 3 次，每次 5 分钟。
4. 用滤纸吸干表面水分，将组织放于 10 倍体积的 15%蔗糖溶液中，于 4℃冰箱中脱水沉底后。转入 10 倍体积的 30%蔗糖溶液中，4℃冰箱脱水沉底。
5. 将脱水完成的组织取出，稍吸干表面水分，将目的部位组织修平整。
6. 将组织置入恒冷箱切片机进行冷冻切片。



### 1.2.2. 灌注式冷冻前固定

1. 小鼠称重后经腹腔注射戊巴比妥钠（40mg/kg）进行麻醉，麻醉后开胸暴露心脏，经左心室先快速灌注 0.9%生理盐水约 50ml，至流出液体变清亮。
2. 换 4%多聚甲醛继续灌注约 100ml 至组织变硬。
3. 剥离脑组织，置入 10 倍体积 4%多聚甲醛，4℃摇床过夜，约 12-24 小时。
4. 将脑组织从固定液中取出，放于 10 倍体积的 30%蔗糖溶液中，于 4℃冰箱中脱水沉底。成年鼠脑通常需要 2 天，幼年不带颅骨的鼠脑通常需要 1 天，带颅骨的则需要更久。
5. 取出脱水后的脑样品，用 0.9%生理盐水清洗 3 次，每次 5 分钟。
6. 用吸水纸吸干，将组织置入恒冷箱切片机进行冷冻切片。

## 2. 包埋

1. 将储存在-80℃的组织 and 固定脱水后的组织，转移到恒冷箱切片机，温度平衡 15 分钟。
2. 开启恒冷箱切片机快速制冷，将样品托放速冻台，涂一层 OCT 包埋剂，覆盖样品托凹槽，用冷冻锤轻轻压平。
3. 将组织修平整，切面朝上放于样品托上，再用 OCT 包埋剂沿着组织周围覆盖，包埋剂的量以不流出样品托为准。
4. 包埋时尽量不要有气泡，若出现气泡，可以把它移到边缘。包埋时要涂抹均匀，确定好组织的包埋方向，例如管腔、皮肤、囊壁等要竖立包埋。
5. 将样本托置于速冻台上速冻包埋，OCT 变白变硬后，即可进行切片。

## 3. 切片

1. 将样品托固定在冰冻切片机的夹头上，调整位置，先进行粗修，切出组织最大切面。再进行细修，修切平整。
2. 打开防卷板，使其位置恰好与切片刀的刀刃平行，并略突出于刀刃。
3. 转动切片机转轮切片，切片厚度 5-10μm。
4. 切片会在防卷板下方形成一张完整平坦无褶皱的薄片，如有褶皱，用毛笔轻轻展平切片。
5. 用带正电荷的载玻片平稳地轻压组织切片，使其平整地吸附到载玻片上（载玻片要保存在室温条件下）。
6. 切好后若不立即染色就-80℃保存备用。



## 4. 固定与通透

固定是保持抗原细胞和亚细胞结构固定不变，同时又能使抗体进入到细胞和亚细胞的所有部位。通透仅用于抗体需进入细胞内检测蛋白时，包括细胞内蛋白和抗原表位位于胞内区的跨膜蛋白检测。固定和通透方法的选择取决于抗原表位和抗体本身的灵敏性，有时需要优化。

### 4.1. 固定步骤（冷冻前固定的组织可跳过此步）

1. 固定前，将切片放置在工作台上风干几分钟（这样可以增加切片的粘附作用）。
2. -20℃预冷固定剂（丙酮、甲醇或乙醇）30 分钟，中性福尔马林和 4%多聚甲醛无需预冷，首选丙酮。
3. 组织切片晾干后，参照说明书，按照以下步骤使用最佳的固定剂固定。
  - （1）玻片上滴加 10%中性福尔马林或 4%多聚甲醛（PFA），室温固定 10 分钟，风干玻片。
  - （2）玻片上滴加冷冻丙酮，室温固定 10 分钟，风干玻片。
  - （3）玻片上滴加冷冻甲醇，室温固定 10 分钟，风干玻片。
4. 用洗涤缓冲液 PBS 冲洗切片 3 次，每次 5 分钟。

### 4.2. 通透步骤

|     | 溶剂                           | 备注                                                                                                                             |
|-----|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 溶剂  | 丙酮                           | 丙酮固定时，丙酮有通透作用，不需要进一步通透                                                                                                         |
|     | 甲醇                           | 甲醇固定时，甲醇有通透作用，可以不需要进一步通透。但一些抗原表位对甲醇非常敏感，能破坏抗原表位结构，此时如需通透，可用丙酮代替甲醇进行。                                                           |
|     | 多聚甲醛                         | 多聚甲醛固定超过 10-15 分钟会造成蛋白交联，此时需要抗原修复。如需通透，可选择丙酮或甲醇进行通透                                                                            |
| 洗涤剂 | Triton X-100 或 NP-40         | 能溶解部分核膜，非常适合于核抗原染色<br><b>步骤：</b> 在玻片上滴加 0.1% Triton X-100 in PBS，室温通透 10 分钟。                                                   |
|     | Tween 20、皂苷、毛地黄皂苷和 leucoperm | 较温和的细胞膜溶剂，会使细胞膜产生足够大的孔，促使抗体进入细胞内而不用溶解胞膜。适合于胞浆内抗原和表位在胞浆的表面抗原以及可溶的核抗原染色<br><b>步骤：</b> 在玻片上滴加 0.2% Tween 20 in PBS，室温通透 10-30 分钟。 |
|     |                              |                                                                                                                                |



## 5. 封闭

1. 先用免疫组化笔在切片上画圈，不要碰到或太靠近组织。
2. 用洗涤缓冲液 PBS 冲洗切片 3 次，每次 5 分钟。画圈后及时冲洗，避免干片。
3. 甩干，滴加 3 % 过氧化氢，室温孵育 10 分钟（荧光检测可跳过此步）。
4. 用洗涤缓冲液 PBS 溶液冲洗 3 次，每次 5 分钟。。
5. 在每个切片上滴加 100–400  $\mu$ l 封闭液（含 10%正常血清及 1%BSA 的 PBS 溶液），室温封闭 1-2 小时。如果用荧光抗体检测，封闭液可换成含 10%正常血清+1%BSA+0.3M 甘氨酸的 PBS 溶液。
6. 甩干，除去切片上的液体（请勿冲洗），然后使用纸巾擦拭玻片周围（注意不要干片）。

## 6. 一抗孵育

1. 进行初次实验时，根据抗体说明书选择合适的抗体稀释比，用适当的抗体稀释液（用含 1% BSA 的 PBS 溶液稀释）稀释一抗。
2. 取 100-400  $\mu$ l 稀释好的一抗，均匀滴加在封闭好的切片上，放入湿盒，室温孵育 1 小时或 4℃孵育过夜。

## 7. 二抗孵育

1. 根据抗体说明书选择合适的稀释比，用适当的抗体稀释液（用含 1% BSA 的 PBS 溶液稀释）稀释 HRP 二抗。
2. 取出切片，将切片放入洗涤缓冲液 PBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。
3. 甩干、擦净，取 100-400  $\mu$ l 稀释好的二抗，均匀滴加在切片上，放入湿盒，室温孵育 1 小时（荧光二抗需避光）。

## 8. 染色步骤

1. 将切片在洗涤缓冲液 PBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。（如荧光检测，需避光，即可进行核复染）
2. 甩干，配制 DAB 染色工作液，A 液和 B 液按 20: 1 体积比混匀。滴加 50-100 $\mu$ l 完全覆盖切片组织（根据组织大小调整用量），孵育 3-10 分钟，显色时间不固定。
3. 镜下观察，控制显色时间，观察到出现特异性染色，即可用去离子水冲洗，终止显色。



## 9. 复染

### 9.1. 酶显色染色复染步骤

1. 甩干、擦净，将切片置于苏木素染色液中，室温孵育 2-5 分钟，用去离子水将其从切片上清洗干净。
2. 将切片置于分化液 1-2 秒，用去离子水清洗切片 2 分钟。
3. 将切片置于返蓝液中 2-5 分钟，至样本呈蓝色。如果染色过浅可重复染色，如果染色过深可使用盐酸进行分化。
4. 取出切片，在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。
5. 脱水：切片依次置于 70% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。然后将切片分别置于二甲苯 I、二甲苯 II 中各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
6. 从二甲苯中取出切片，室温晾干后，用中性树胶封片，显微镜下镜检。

### 9.2. 荧光染色复染步骤

1. 在切片上滴加 50-100 $\mu$ l 的 DAPI-PBS，放于湿盒中室温孵育 5-10 分钟（避光）。
2. 将切片在 PBS 中漂洗 2 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡（避光）。
3. 向盖玻片上滴加一滴水性封片剂，确定样品在盖玻片和载玻片之间。
4. 用指甲油密封盖玻片防止变干，并移至荧光显微镜下观察。