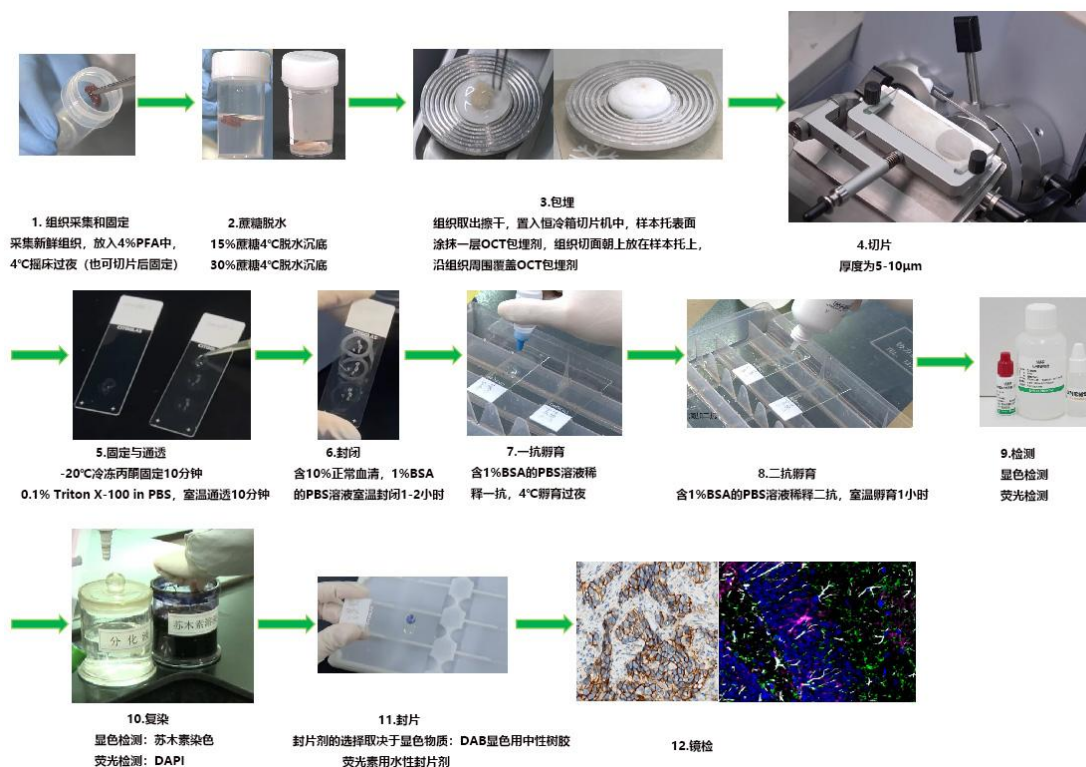


免疫组织化学步骤-冰冻切片



目录

1. 组织采集、固定与保存	3
1.1. 冷冻后固定法	3
1.1.1. 干冰-丙酮（乙醇）速冻法	3
1.1.2. 液氮速冻法	3
1.1.3. 蔗糖脱水法	4
1.2. 冷冻前固定	4
1.2.1. 浸泡式冷冻前固定	4
1.2.2. 灌注式冷冻前固定	4
2. 包埋	5
2.1. 包埋步骤	5
2.2. 冷冻温度	5
3. 切片	5
3.1. 冰冻切片步骤	5
3.2. 注意事项	6



3.3. 常见问题及解决方法	6
4. 固定与通透	7
4.1. 固定步骤（冷冻前固定的组织可跳过此步）	7
4.2. 通透步骤	7
5. 封闭	8
6. 一抗孵育	8
7. 二抗孵育	8
8. 染色步骤	8
9. 复染	9
9.1. 酶显色染色复染步骤	9
9.2. 荧光染色复染步骤	9
10. 免疫组化常见问题解析	9

冰冻切片是免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法，最突出的优点是能够完好的保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性，以及抗原的免疫活性，尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。

	石蜡切片	冰冻切片
应用对象	广泛应用于常规制片	临床上的快速病理诊断
切片机	石蜡切片机	冷冻切片机
保存条件	室温	-80℃或-190℃
切片厚度	3-5μm	5-10μm
优点	1. 室温下即可储存多年 2. 组织结构保存良好，组织结构清晰，能够用于回顾性研究 3. 能切连续薄片 4. 抗原定位准确	1. 操作简单快速 2. 较好地保存各种酶、抗原的活性 3. 较好地保留脂肪、类脂的结构
缺点	1. 操作繁复 2. 抗原活性损失	1. 不能连续切片，且切片较厚，增加了产生较低分辨率和较差图像的可能 2. 储存和操作都在严格的低温环境，且储存时间短 3. 组织中水分易形成冰晶，影响抗原定位
改善方法	抗原修复：柠檬酸盐缓冲液或 Tris-EDTA 缓冲液高温煮 10-30 分钟，可以有效去除醛类固定剂导致的蛋白之间的交联，充分暴露石	冰冻前擦干水分，使用液氮速冻



	蜡切片样本中的抗原表位	
操作时间	24 小时	20 分钟

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°C 。
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°C 时即可使用。
3. 用锋利的刀、剪切取新鲜组织块，大小 $1\text{cm} \times 0.8\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 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°C 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 $1\text{cm} \times 0.8\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 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°C 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 $1\text{cm} \times 0.8\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 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°C 冰箱中脱水沉底后。转入 10 倍体积的 30%蔗糖溶液中， 4°C 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°C 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°C 冰箱中脱水沉底后。转入 10 倍体积的 30%蔗糖溶液中， 4°C 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°C 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°C 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

2.1. 包埋步骤

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。

2.2. 冷冻温度

包埋切片时，冷冻温度和时间是冰冻切片的关键步骤，要根据组织的类型和大小来调节。冰冻温度过低，会造成组织过硬，切片碎裂；温度过高会造成组织硬度不够，难以切片。

组织类型	冰冻温度
乳腺、卵巢	-20℃~25℃
胃、肠、子宫	-20℃~22℃
甲状腺、脾脏、肾脏和肌肉组织	-10℃~20℃
脑、肝、淋巴结	-10℃~15℃
脂肪组织	-25℃
大量脂肪的组织	-23℃

3. 切片

3.1. 冰冻切片步骤

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 5-10 μ m。
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。

3.2. 注意事项

1. 取材：组织尽可能新鲜干燥，速冻愈快愈好，包埋前尽量吸干组织水分，最大程度减少冰晶
2. 包埋：若为一般的组织，组织面上的包埋剂发白后即可切片。甲状腺、脑、淋巴结、卵巢肿瘤等，组织面的包埋剂呈半透明时，即将样品托从冷冻台上取下，将样品托夹在切片机的夹头上，待其继续冷冻。若组织块中脂肪组织较多，打开冷冻机速冻，压防卷板厚切。
3. 包埋环节注意不要产生气泡，包埋后把组织修平整，不平整可能导致贴片时产生褶皱。用于黏附组织片的载玻片，应放在常温的地方，这样可以保持冰冻组织切片和载玻片有一定的温差，利于切片的粘附。组织切片接触到的标本袋、切片刀、载玻片等都要保持干净。
4. 纤维及结缔丰富的组织，应顺着纤维纹理切片，否则容易崩裂。较硬较脆的组织尽量切的薄一些，脂肪含量多的组织要切的厚一些。

3.3. 常见问题及解决方法

常见问题	原因	解决方法
切片软化	1. 样本冷冻不足 2. 防卷板冷冻不足，使切片升温	1.选择较低的温度 2.等待切片机或防卷板达到冷冻箱温度
切片不平整	1. 样品冷冻不足 2. 样品面积过大 3. 防卷板位置或角度不正确 4. 切片刀变钝	1. 选择较低的温度 2. 粗修样品的切面，提高切片厚度 3. 调整防卷板 4. 使用切片刀的其他部位或更换刀片
切片厚薄不均	刀片变钝或切片角度不合适	更换刀片或调节合适切片间隙角
切片表面出现横纹	切片速度或角度不合适	将切片速度放慢或微调切片角度
切片碎裂	样品冷冻过度	选择较高的温度
防卷板粘连标本	1. 防卷板温度过高或位置不当 2. 防卷板边角有油脂 3. 防卷板未正确固定 4. 切片刀生锈 5. 防卷板带静电	1. 冷却防卷板或重新正确放置 2. 消除防卷板上的油脂 3. 正确固定 4. 除锈 5. 裸手拿钥匙触碰防卷板



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 步骤： 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 步骤： 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

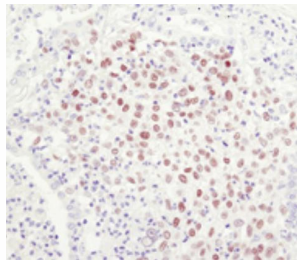
9.1. 酶显色染色复染步骤

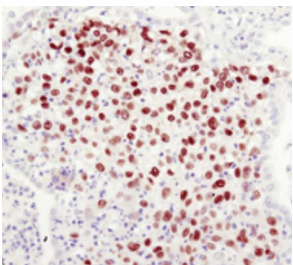
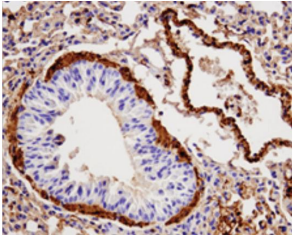
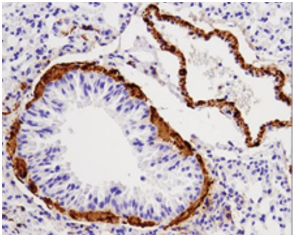
1. 甩干、擦净，将切片置于苏木素染色液中，室温孵育 2-5 分钟，用去离子水将其从切片上清洗干净。
2. 将切片置于分化液 1-2 秒，用去离子水清洗切片 2 分钟。
3. 将切片置于返蓝液中 2-5 分钟，至样本呈蓝色。如果染色过浅可重复染色，如果染色过深可使用盐酸进行分化。
4. 取出切片，在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。
5. 脱水：切片依次置于 70% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。然后将切片分别置于二甲苯 I、二甲苯 II 中各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
6. 从二甲苯中取出切片，室温晾干后，用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

10. 免疫组化常见问题解析

结果	原因	解析
无信号或信号弱 	检测组织中不存在目的蛋白	设置文献中或抗体供应商推荐的阳性对照
	组织中目标蛋白丰度不够	采用信号放大步骤，将信号最大化
	蛋白位于核内，切片太厚，抗体不能进入细胞核	封闭前增加通透步骤，在玻片上滴加 0.1% Triton X-100 in PBS，室温通透 10 分钟。
	醛类固定，改变了抗体识别的表位	进行抗原修复，缩短切片固定时间
	脱蜡不充分	延长切片的脱蜡时间，使用新配制的二甲苯

	一抗和二抗不兼容	使用正确的二抗
	一抗/二抗失效，信号放大试剂盒失去活性	设置阳性对照，以确保一抗/二抗和检测试剂的有效性
	二抗未避光（荧光检测时）	始终保证二抗处于避光状态，如避光保存和避光孵育
	透化作用破坏了膜蛋白（跨膜蛋白检测时）	使用温和的表面活性剂，如在玻片上滴加 0.2% Tween 20 in PBS，室温通透 10-30 分钟
	抗原修复操作不当或遗漏	参照抗体说明书进行正确的抗原修复操作
	抗体浓度低，孵育时间短	提高抗体浓度， 4℃ 孵育过夜
	PBS 缓冲液被细菌污染	使用新配制的无菌 PBS
高背景或非特异染色  	荧光检测时，福尔马林或多聚甲醛固定剂，引起自发荧光	福尔马林/PFA 通常自发绿色光谱，尝试使用红色光谱或红外范围的荧光基团
	没有封闭内源性酶活性	对 AP 使用左旋咪唑（ 2mM ） 对过氧化物酶使用 3% H₂O₂ 对生物素，使用 Avidin 生物素阻断试剂
	没有对非特异性结合进行封闭或封闭不充分	延长封闭时间，推荐使用二抗宿主的 10% 血清的 1% BSA in PBS 溶液进行封闭
	一抗/二抗浓度过高	测试抗体的最佳浓度，梯度稀释抗体， 4℃ 孵育
	孵育温度过高	4℃ 孵育切片
	二抗存在非特异性结合	使用不加一抗的二抗对照
	洗涤不充分	用 PBS 或 TBS 充分洗涤组织，添加表面活性剂，如 0.1% Triton ，增加洗涤时间
	底物过多	稀释底物，或缩短底物孵育时间
	切片变干（观察切片，如果边缘比中心背景高，可能是切片已经变干）	保持切片湿润，避免变干，使用湿盒孵育切片
非特异性染色	固定延迟导致抗原弥散	组织取样后立即完成固定
	切片变干	保持切片湿润，避免变干，使用湿盒孵育切片
	脱蜡不充分	延长切片的脱蜡时间，使用新配制的二甲苯
	抗体宿主种属和染色组织种属一样	更换其他宿主的抗体，或用 F（ab）片段二抗封闭，或用直标

		一抗
	没有封闭内源性酶活性	对 AP 使用左旋咪唑（2mM） 对过氧化物酶使用 3%H ₂ O ₂ 对生物素，使用 Avidin 生物素阻断试剂
	一抗/二抗浓度过高	降低抗体浓度或缩短孵育时间
	一抗可能结合其他抗原的表位	使用特异性更高的单克隆抗体
组织形态不清晰或受损	组织自溶	选择新鲜组织，缩短组织采取和固定之间的时间
	组织未充分固定	1. 延长固定时间 2. 提高固定剂与组织比例 3. 切割更小块的组织，浸泡固定
	组织切片从载玻片上脱落（冰冻切片更常见）	延长固定时间 尝试更换固定剂 使用新鲜制备的载玻片 贴片时，组织切片和载玻片保持温度差 固定前风干切片几分钟
	组织切片撕裂或折叠，或切片下方可见气泡	使用锋利的刀片重新切片或调整切片速度，研究不受影响的组织区域
	冷冻切片产生冰晶	尝试石蜡包埋，重新切片 组织进行速冻或蔗糖脱水
	切片变干	保持切片湿润，避免变干，使用湿盒孵育切片
	抗原修复方法可能过于苛刻	尝试优化抗原修复条件