免疫组化实验

**实验原理：**应用免疫学基本原理——抗原抗体反应，即抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使酶标记的抗体与显色剂进行显色反应，生成有色的不溶性产物，来确定组织细胞内抗原（多肽和蛋白质），对其进行定位、定性及相对定量。

**实验目的：**通过染色结果强弱，对所研究蛋白在组织水平的表达进行判断比较。（干净的背景会使结果判断的更加准确）。

**在实验室实验时遇到的难题：**染色强度不够，背景较深，染色对比不够明显。

**实验效果不好的可能原因：**一抗效果不够好，脱蜡水化后有机溶剂冲洗的不够干净，抗原修复的程度不够，二抗效果不够好，DAB染色时间过久。

**修改后的protocol：**

1. 烘片：IHC白片，60度或70度烘箱，烘片40min。
2. 脱蜡：二甲苯分别浸泡两次，10min/次。（脱蜡时间可以适当延长，不需严格遵守10min时间，脱蜡脱得越干净越好）
3. 水化：依次放入100%酒精，95%酒精，80%酒精，各2min。
4. 自来水冲洗：水化后在自来水流水下冲洗。（水流不能太急，务必将有机溶剂完全冲洗干净，否则会影响后续实验效果）
5. 抗原修复：将片子浸没在抗原修复液中，高压锅20min，高温修复。

\*\*实验室中可用小电饭锅或者微波炉替代，若在微波炉中操作，要保证液体在咕噜噜冒泡煮沸状态下煮20min，不然可能抗原修复力度不够。

\*\*关于抗原修复液的选择：选用酸性柠檬酸缓冲液或碱性EDTA，最好根据抗体购买时说明书上推荐使用的缓冲液。

1. 冷却：浸泡在修复液中冷却，时间充裕可放在室温下慢慢冷却；也可直接在室温冷却10min后，用自来水流水冲洗冷却，但不可直接在自来水下冲洗冷却。
2. 封闭：3% H2O2中浸泡10min，去除内源性的过氧化氢酶。
3. 冲洗：清水冲洗，PBST清洗两次，摇床上3min/次。（摇床可以清洗的更干净）
4. 封闭：封闭液（3% FBS或3% BSA或10%山羊血清）室温下封闭1h。
5. 冲洗：PBST清洗三次，摇床上3min/次。
6. 抗体孵育：一抗，按照稀释比稀释，37度烘箱湿盒中孵育1h（最好不要超过1h，不然背景会很强），PBST摇床清洗3次，3min/次。二抗，按照稀释比稀释，37度烘箱湿盒中孵育30min。PBST摇床清洗3次，3min/次。

（如果可以，买抗体稀释液，成分更稳定）

1. 显色：1XDAB显色，仔细观察，棕色显现后立马用自来水终止反应。（若第一次显色强度不够，可以再次显色）
2. 苏木精复染：苏木精染色1min，自来水冲洗，显微镜下观察，若不够可重复苏木精染色。（苏木精没染好可以将苏木精洗去，再染，清洗配方没记得，后续再补充）
3. 脱水：依次放入80%酒精，95%酒精，100%酒精，各2min。
4. 封片：60度烘箱中烘干片子，中性树脂封片，完全晾干后，显微镜下观察，拍照。

**注意点：**

* 本实验室所用切片一般是石蜡切片。
* 烘片：使蜡片水分蒸发，石蜡软化，组织切片牢固贴在玻片上；烘片至跟烘片前透明度有差异。
* 抗原修复时，使片子始终浸没在修复液中，液体不能干。
* 一抗孵育在37度培养箱，湿盒放置1h，省时间和结合效果好，不要超过1h，容易过染。
* 二抗使用：两个二抗放大信号或一个二抗；若抗体信号强，可不用放大信号，尽量增大信噪比。
* 10XDAB在常温溶解，尽可能现用现配，放于4度储存时间久了效果不佳。
* 复水和脱水时所用的梯度酒精不可混用，要区分开。
* 加抗体和显色液时，都要将片子甩干，在半干半湿的状态下再加，不然容易造成溶液的二次稀释。
* 整个操作过程中在显色之前，**一定不能干片**。

**试剂配制：**

3% H2O2：用甲醇或ddH2O稀释。

抗原修复液：1xPBS稀释配置。

1xPBST：1xPBS中1:1000加入吐温。

1xDAB：10xDAB室温溶解，PBS稀释成1XDAB，1:1000加入30% H2O2