

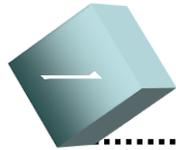
形态学系列讲座之二

# 免疫荧光组化技术

腧穴结构研究室-科研设备管理平台

崔晶晶

# 主要内容



概念及适用范围.....●



技术流程.....●



本研究室具体染色案例.....●



注意问题.....●

## 一. 概念及适用范围

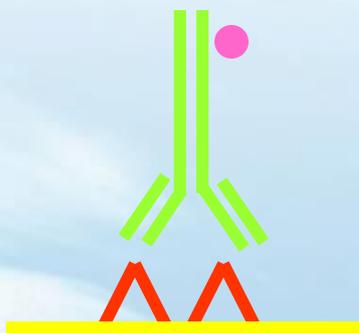
**免疫组化技术：**免疫组织化学技术是用**标记**的特异性**抗体**对组织内**抗原**的分布进行组织和细胞原位检测。

**适用范围：**凡是组织细胞内具有**抗原性**的物质，如**肽类、激素、神经递质、细胞因子、受体、表面抗原**等均可用免疫组织化学方法显示。

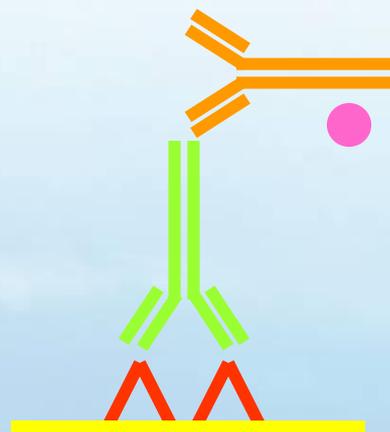
# 免疫组化的技术分类

根据Ag—Ab结合方式

1. 直接法：标记物直接标记在一抗上（ phalloidin ）
2. **间接法**：标记物标记在二抗上

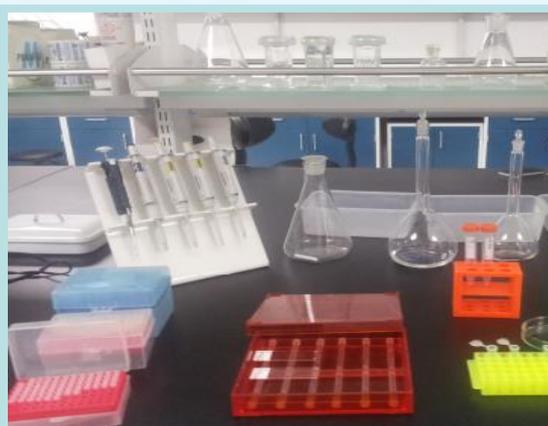


直接法



间接法

## 二. 技术流程



麻醉 → 灌流 → 固定 → 取材 → 后固定 → 脱水 → 切片 → 染色 → 观察

## 二. 技术流程

### 灌流固定取材

#### 固定目的

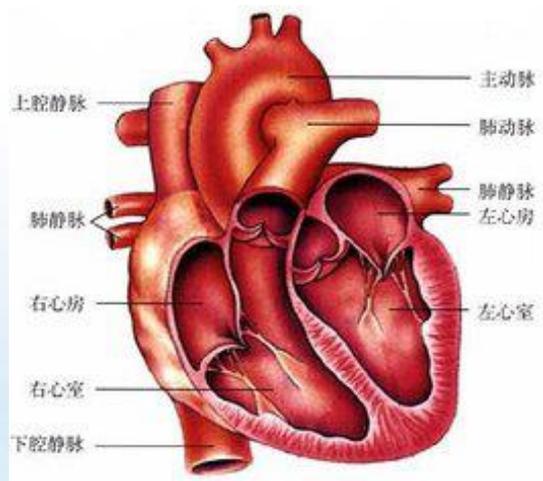
1. 防止组织细胞**自溶**和腐败，以保持组织细胞的**固有形态**。
2. 使组织中的各种物质沉淀和凝固起来而产生不同的**折射率**，造成光学上的差异，以便**染色后易于鉴别和观察**。
3. 经过固定的组织能**对染料产生不同的亲和力**而着色清晰，便于辨认。
4. 固定剂兼有**硬化**作用，增加组织硬度，**便于制片**。

#### 固定液的选择

目前无一种固定液适用于所有的抗原，从组织细微结构的保存，稳定、简便和廉价综合评估上，多聚**甲醛**最优。

## 二. 技术流程

### 灌流固定取材



**快速**暴露心脏

经心脏灌流

快速置换血液 3 min

含4%多聚甲醛的0.1MPB

剧烈收缩后调慢速度

固定后半小时即可取材

新鲜标本的固定：离体后30 min内固定，固定时间不要超过24 h，以免抗原被封闭，影响结果的表达

## 二. 技术流程

### 后固定及脱水



后固定：含4%多聚甲醛的0.1M PB  
2-4 h

脱水：含25%蔗糖的0.1M PB  
4 °C 待组织完全下沉

#### 注意

不同组织脱水时间不同（2 d）

皮肤组织要浸泡完全，可通过摇晃使组织与蔗糖充分接触

如果脱水效果不好可考虑梯度脱水

## 二. 技术流程

### 切片



推拉式冰冻切片机

大组织，厚切片

切片时要缓慢匀速

漂浮染色



恒冷箱切片机

小组织，薄切片

贴片时要快速，防止卷片

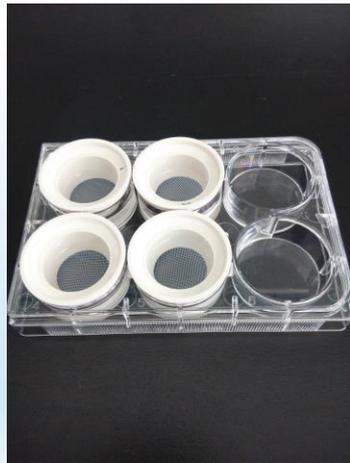
贴片染色

做好分组

## 二. 技术流程

### 染色方式

#### 漂浮染色



染色效果好  
背景干净  
抗体用量大  
后期需要裱贴

#### 贴片染色

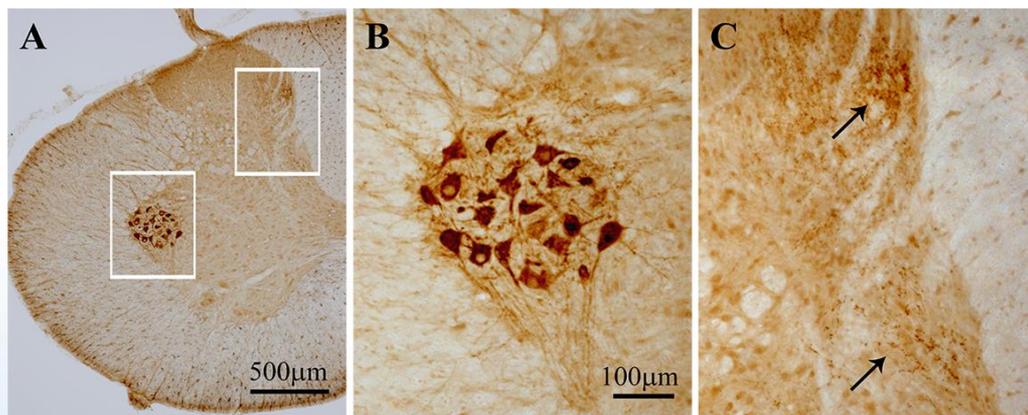


抗体用量小  
组间同步性好  
容易有荧光颗粒

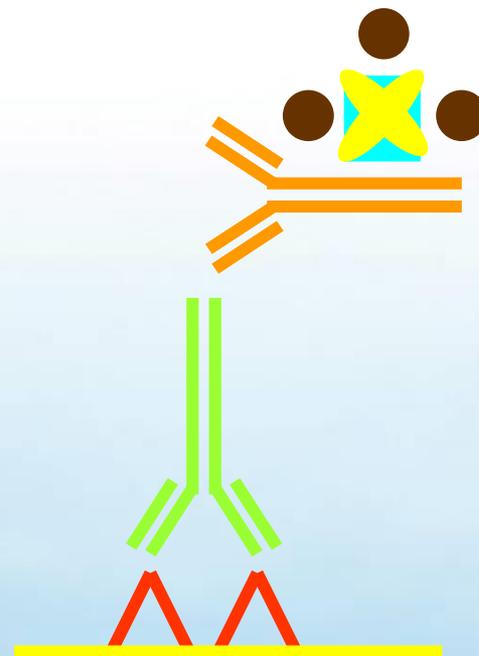
# 常用免疫组化方法

1. 免疫酶技术（酶标抗体法、桥法、**PAD**法、**ABC**法）
2. 免疫荧光技术（免疫荧光法）
3. 免疫金属技术（免疫铁蛋白法、免疫金染色法）

# 免疫酶技术



1. 封闭: 3%的正常兔血清
2. 一抗: goat anti CTB
3. 二抗: biotinylated rabbit anti goat IgG
4. ABC 液: avidin-biotin-peroxidase complex
5. DAB显色 (适用于永久标本)



# 免疫荧光技术

1. 封闭：3%的正常动物血清（与二抗来源的动物种属必须一致！），  
室温，30min

2. 一抗，4 °C，过夜或者室温，2 h

0.1M PB 清洗三次，每次5 min（漂染）

3. 二抗（结合荧光素），室温，1 h

0.1M PB 清洗三次，每次5 min

**缓冲液：**含0.5% Triton X-100的0.1M PB（Ph值7.4）

（Triton X-100作用：溶解脂质，以增加抗体对细胞膜的通透性）

**漂片：** 0.02M PB

### 三. 本研究室具体染色案例

#### 单染

抗体一定要匹配

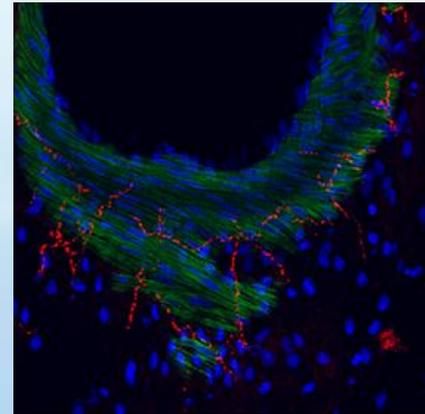
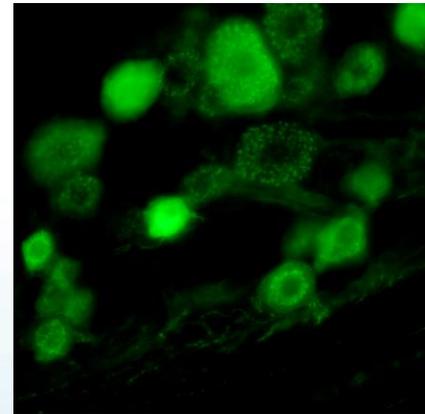
例如：

检测目标：CGRP

一抗：**mouse** anti CGRP

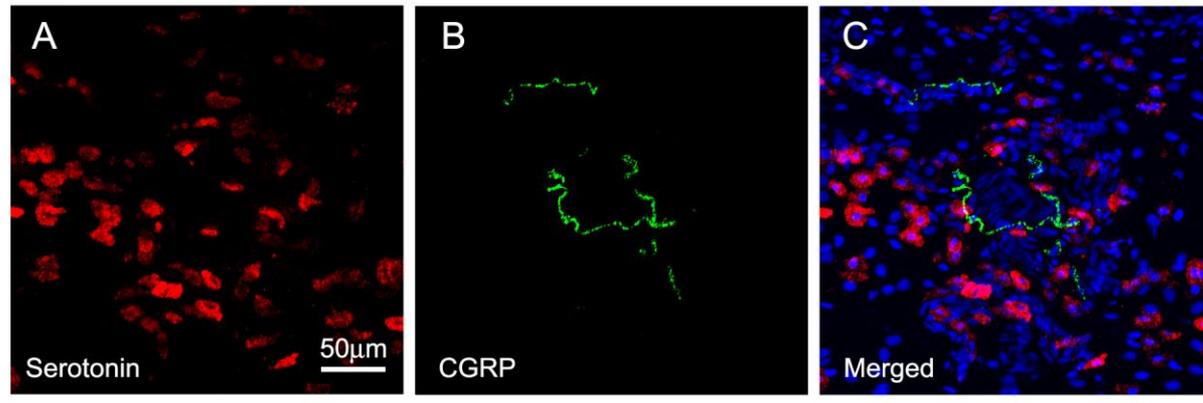
二抗：**goat** anti **mouse** 488/594

封闭血清：normal **goat** serum



### 三. 本研究室具体染色案例

#### 双染或多重荧光染色



封闭血清: normal **goat** serum

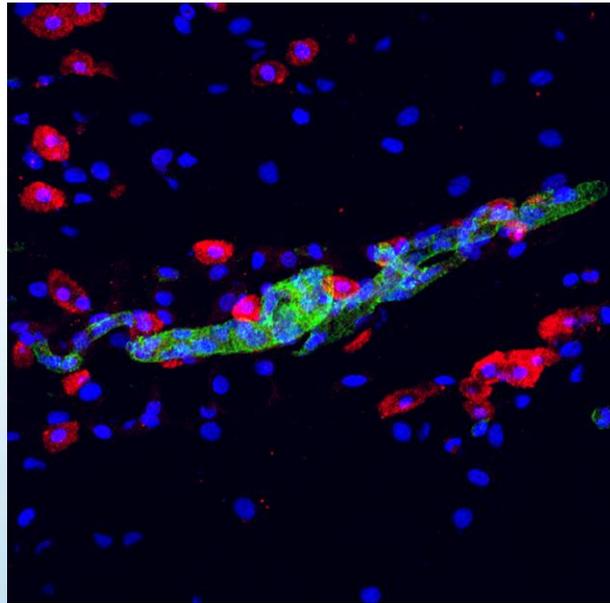
一抗: **rabbit** anti serotonin  
**mouse** anti CGRP

二抗: **goat** anti **rabbit 594**  
**goat** anti **mouse 488**

**注意动物种属关系**

### 三. 本研究室具体染色案例

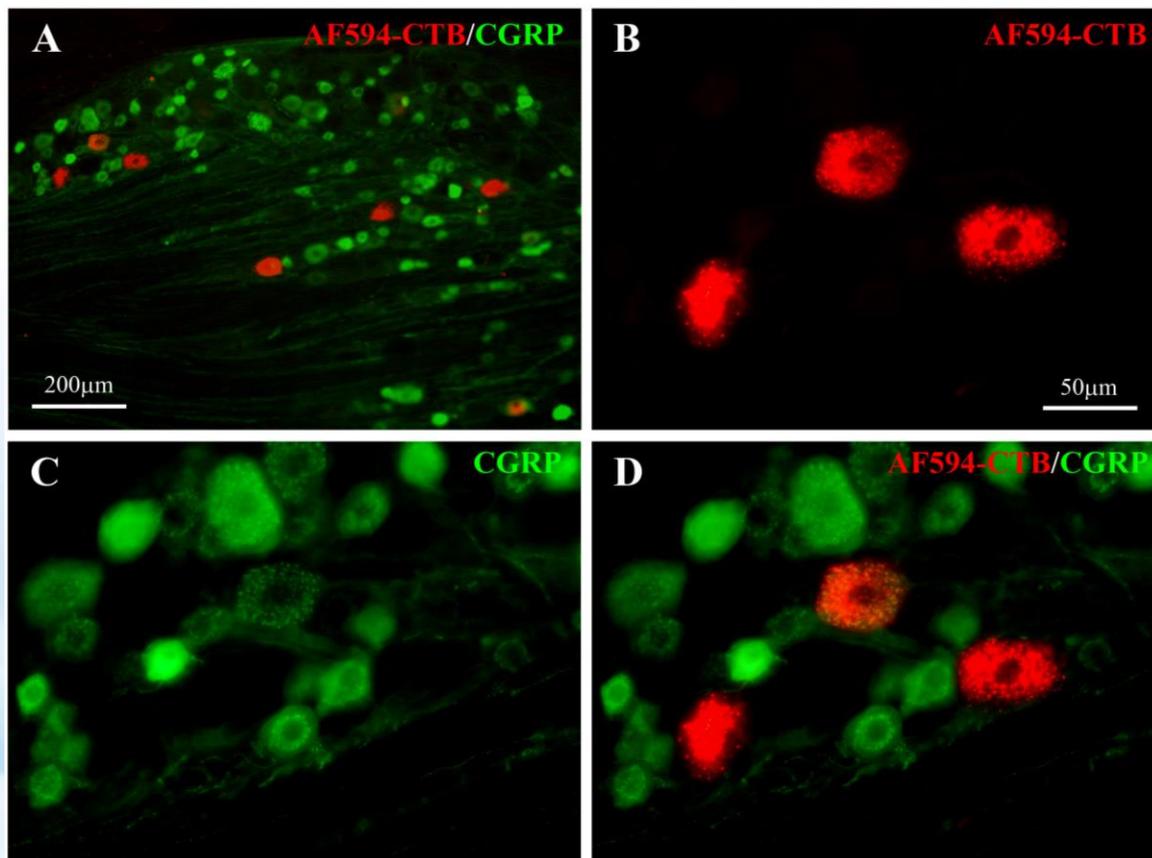
复染



DAPI: 细胞核

phalloidin : F-actin

### 三. 本研究室具体染色案例



示踪技术与免疫荧光组化技术相结合

## 四. 注意问题

### 抗体的浓度

一抗：单克隆：1: 1000 多克隆：1: 500 1: 1000

二抗：1: 500

通过预实验寻找第一抗体的最佳稀释度，抗体浓度并非越高越好

每批实验应用同一浓度的一抗、二抗，孵育时间和温度

# 四. 注意问题

## 抗体说明书

### Anti-CGRP antibody [4901] (ab81887)

<b>Product Name</b>	Anti-CGRP antibody [4901]
<b>Product type</b>	Primary antibodies
<b>Description</b>	<u>Mouse monoclonal [4901]</u> to CGRP
<b>Immunogen</b>	Rat alpha-CGRP
<b>Reacts with</b>	<u>Hu, Ms, Rat</u>
<b>Predicted to react</b> ( <a href="#">species key</a> )	Mamm (Due to sequence homology)
<b>Specificity</b>	ab81887 is specific for Calcitonin Gene Related Peptide. It also recognizes rat beta CGRP compared to rat alpha CGRP).
<b>Tested applications</b> ( <a href="#">see key</a> )	<u>ICC/IF, IHC-Fr, Neut</u>

<b>Application notes</b> ( <a href="#">see key</a> )	<b><u>Recommended dilutions</u></b> ICC/IF: 1/50 - 1/100. IHC-Fr: Use at an assay dependent dilution. (PubMed: 20472035) Neut: Use at an assay dependent dilution.
---	---

### References for Anti-CGRP antibody [4901] (ab81887)



**This product has been used in:**

Eftekhari S *et al.* Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human tr  
IHC-Fr; Human, Rat. PubMed: 20472035

## 四. 注意问题

### 抗体的购买

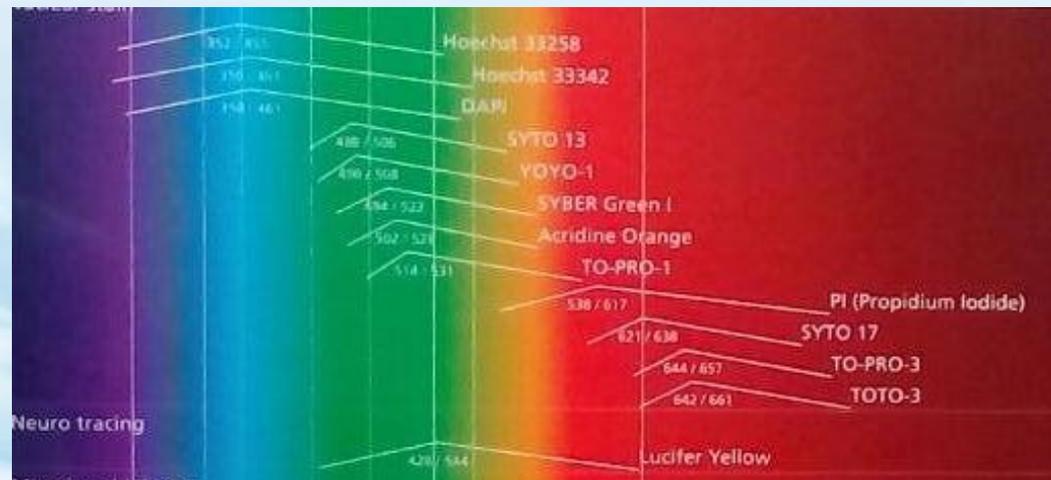
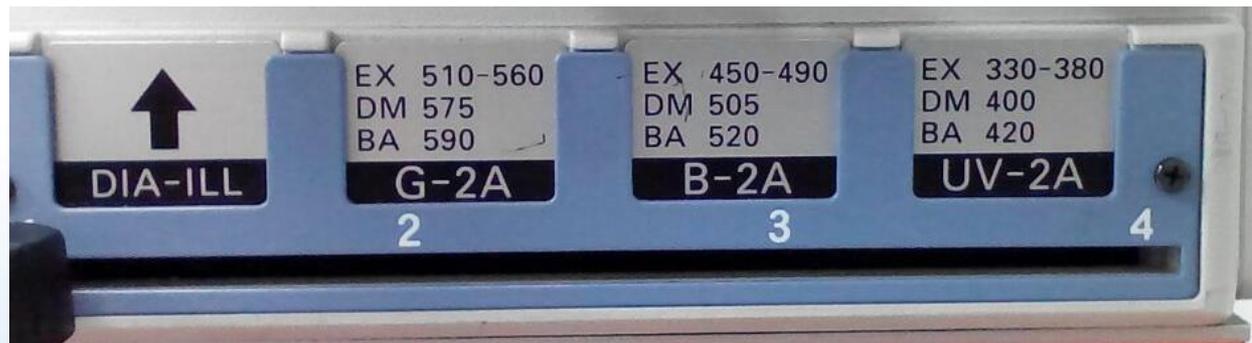
查阅相关文献，根据文献提供的信息，确定所需试剂的型号  
选择相关公司购置特异性抗体

### 购置抗体的注意事项

- (1) **种属**：单克隆抗体，多克隆抗体
- (2) **能否用于免疫荧光/组化实验**
- (3) **Reacts with**: rat、 human、 mouse
- (3) 稀释度
- (4) 特异性，交叉反应
- (5) 用何种组织前处理形式
- (6) 包装单位，价格

## 四. 注意问题

### 二抗的选择



# 四. 注意问题

## 二抗的选择

Cat. no.	Product Name
A11045	Alexa Fluor <sup>®</sup> 350 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21049	Alexa Fluor <sup>®</sup> 350 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A31553	Alexa Fluor <sup>®</sup> 405 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11063	Alexa Fluor <sup>®</sup> 430 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11017	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11001	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11029	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A31555	Alexa Fluor <sup>®</sup> 514 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11002	Alexa Fluor <sup>®</sup> 532 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11018	Alexa Fluor <sup>®</sup> 546 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11003	Alexa Fluor <sup>®</sup> 546 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11030	Alexa Fluor <sup>®</sup> 546 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A21425	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21422	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21424	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A11019	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11004	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11031	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A11020	Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11005	Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A11032	Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A20980	Alexa Fluor <sup>®</sup> 610-R-phycoerythrin goat anti-mouse IgG (H+L) *1 mg/mL* .....
A21053	Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21050	Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21052	Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A31574	Alexa Fluor <sup>®</sup> 635 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A31575	Alexa Fluor <sup>®</sup> 635 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross-adsorbed* *2 mg/mL* ..
A21237	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....
A21235	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg/mL*.....

## 四. 注意问题

### 观察



正置荧光显微镜

可观察普通染色和荧光  
可采集高品质的荧光影像

观察时间每次以1~2 h为宜

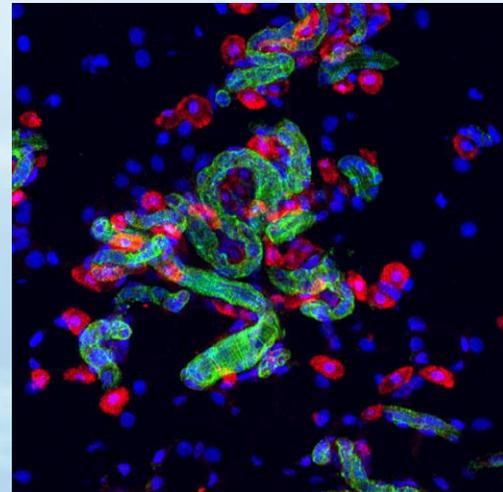
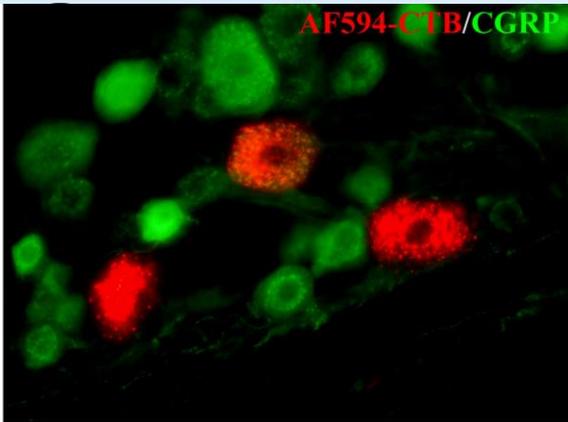


激光共聚焦显微镜

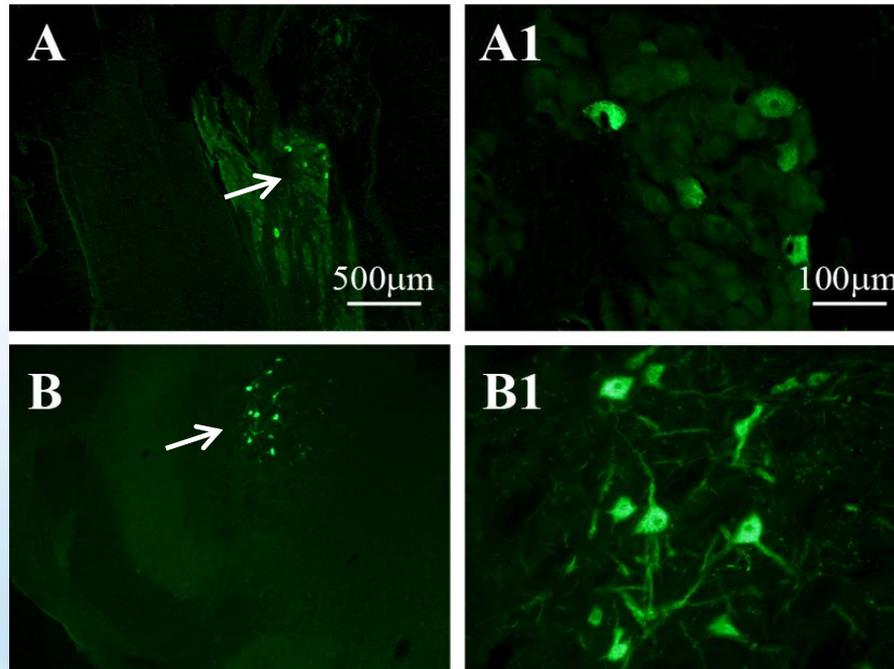
可同时观察多重荧光  
可拍摄三维图像

两次启动时间最好间隔半小时以上

## 四. 注意问题



## 四. 注意问题



从低倍到高倍观察和拍摄

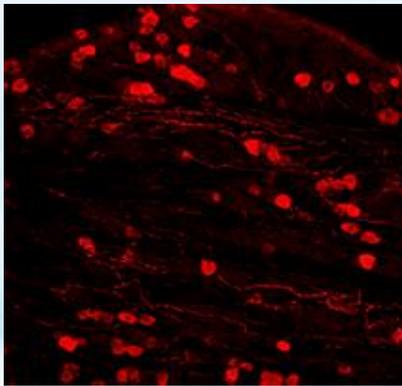
用荧光观察或照相时要关闭明场电源

放大倍数：目镜 \* 物镜

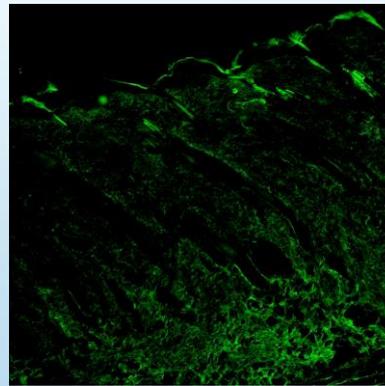
## 四. 注意问题

### 特异性染色判定标准:

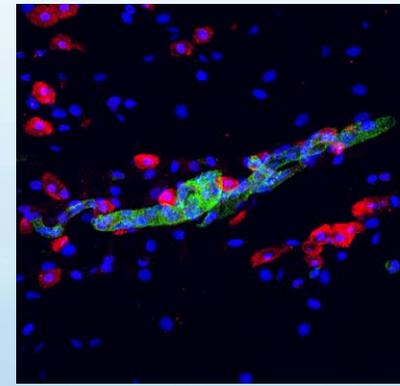
1. 抗原定位，胞浆、胞核、胞膜、间质具有结构性。  
(非特异性~细胞与组织无区别)
2. 染色强度不同：颜色深浅不一  
(非特异性染色弥散性均匀)



特异性染色



非特异性染色



DAPI 复染

掌握丰富的背景知识有利于正确判读染色的结果

## 四. 注意问题

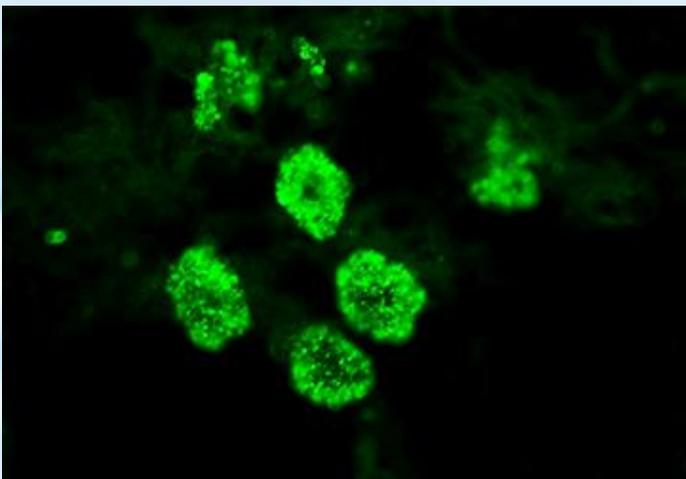
### 动物抓取和麻醉



轻柔抓取

灌流前深度麻醉

避免多次麻醉



皮肤组织中生物活性细胞

正常对照

## 四. 注意问题

### 脱片问题

载玻片粘附性不佳

切片太小或者卷片后粘贴不牢

清洗不当

### 假阴性结果

**一抗、二抗不匹配**

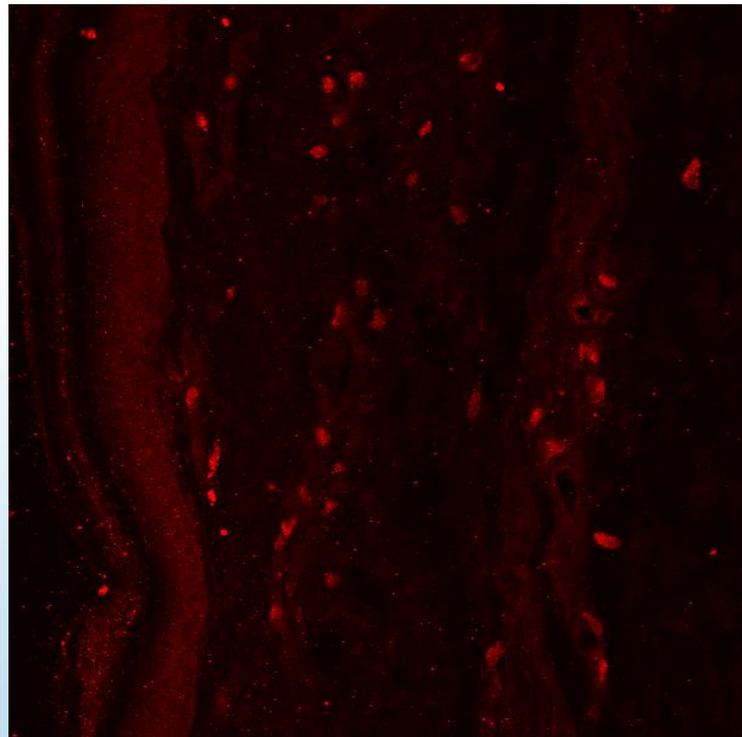
漏加一种抗体

抗体失效（**应标记抗体开封时间**）

未观察到

## 四. 注意问题

出现垃圾



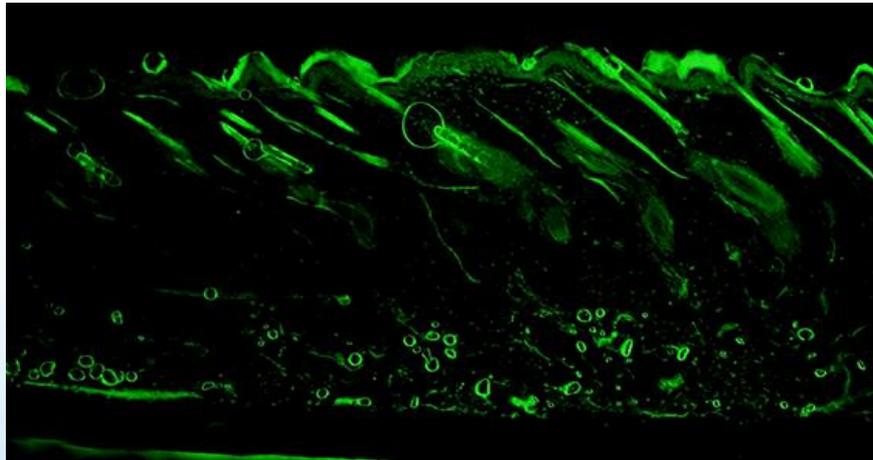
常见原因:

抗体清洗不干净 (贴片染色易出现)

组织灌流固定不佳

## 四. 注意问题

### 出现气泡



常见原因:

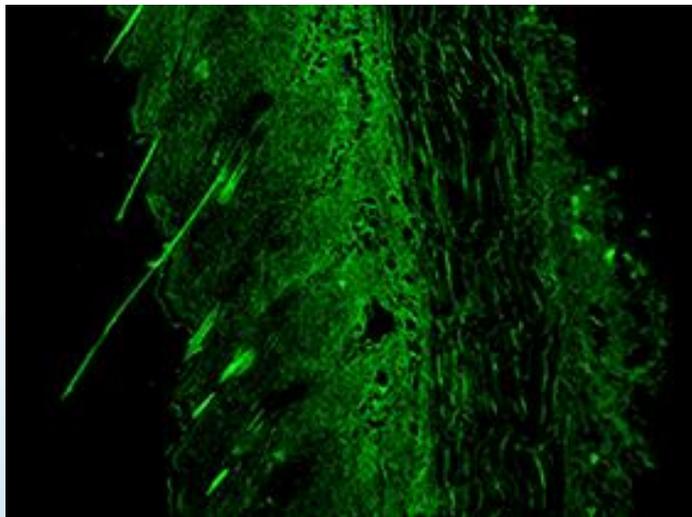
组织过干

甘油中有气泡

盖盖玻片的速度过快

## 四. 注意问题

### 背景过高



#### 常见原因:

固定不良

封闭不佳

抗体浓度过高，主要是一抗浓度过高

抗体孵育时间过长、或者温度过高

组织变干 染色切片太多、动作慢、 抗体流失等都可造成组织变干

## 四. 注意问题

### 自发荧光

#### 常见原因:

组织灌流固定不佳

后固定时间过长, 甲醛诱发

组织标本过干

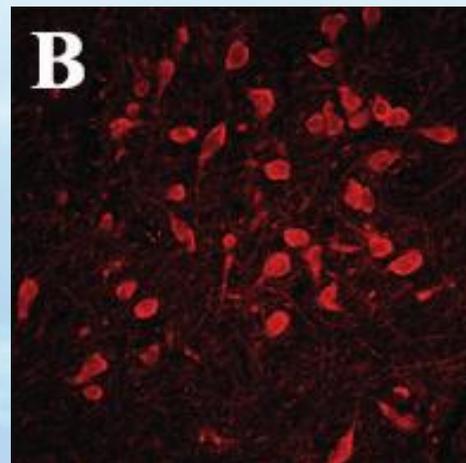
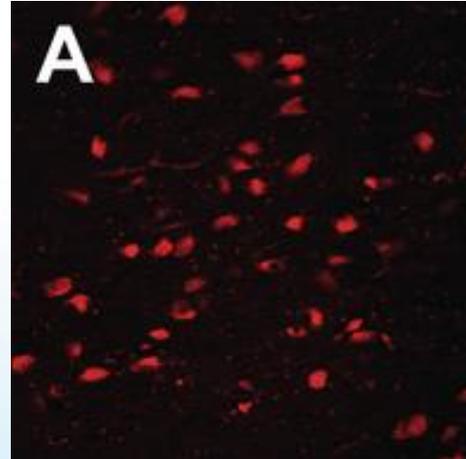
有些组织自发荧光

#### 鉴别方法:

用不同颜色的激发光鉴别

高倍观察是否有荧光颗粒

设置阴性对照



**Thank You !**

