

石蜡切片免疫荧光染色呈非特异性结果解决方案

背景：

因实验需要，于 2008 年 07 月 04 日初次做肝脏组织 ZO-1（一种胞膜蛋白，紧密连接蛋白）免疫荧光染色，以前我对酶免疫组化非常熟悉，在园子内也有不少置顶贴和精华帖，但免疫荧光一直还没做过（原理知道，但细节不太了解）。我先用石蜡切片做了 5 次，结果一直不理想（表现为未见特异性强染色）；近几日，我又切了冰冻切片，做了 2 次，终于基本成功了。在这个过程中，我对免疫荧光染色技术有了全新的认识，而前些天发出免疫荧光求助贴，回复的很少，所以有必要加强对免疫荧光方面的讨论，不妥之处敬请指正。有人会问酶免疫组化做的好好的，为何要做免疫荧光？其实，这也是我以前思考的难题，现在我认为可能胞膜蛋白含量不高，用普通免疫组化可能做不出来，需要敏感的免疫荧光方法来进行蛋白检测（我是看许多外文文献都是这样做的，因此选择免疫荧光染色。）

问题及其解答：如何降低非特异性荧光染色和避免阴性着色？

1、非特异性染色产生原因及其解决方案：

- (1) 游离荧光素残留在二抗中。一部分荧光素未与蛋白质结合，形成了聚合物和衍化物，而不能被透析除去。二抗配置时用透析法或层析法分离荧光素标记的二抗和游离的二抗。购买高质量、高纯度的荧光素二抗。
- (2) 抗体以外的血清蛋白与荧光素结合形成荧光素蛋白，可与组织成分结合。
- (3) 组织抗原封闭不全。除去检查的抗原以外，组织中还可能存在类属抗原（如 Forssman 氏抗原），可与组织中特异性抗原以外之之相应抗体结合。延长血清封闭时间。
- (4) 从组织中难于提纯抗原性物质，所以制备的免疫血清中往往混杂一些抗其他组织成分的抗体，以致容易混淆。
- (5) 抗体分子上标记的荧光素分子太多，这种过量标记的抗体分子带过多的阴离子，可吸附于正常组织上而呈现非特异性染色。
- (6) 荧光素不纯、标本固定不当等。
- (7) 一抗和二抗孵育条件和浓度不合适。调整一抗和二抗孵育条件和浓度至最佳。
- (8) 一抗和二抗孵育后的清洗不充分。增加清洗次数和延长清洗时间。

2、阴性染色产生的原因有：

- (1) 一抗和二抗浓度不合适或孵育条件不妥。
- (2) 荧光素提前衰退。荧光素质量不佳或操作过程中没有注意避光等防止荧光素衰退的事项。
- (3) 血清封闭时间过长。
- (4) 抗体稀释液 PH 值不合适，影响抗原抗体反应。
- (5) 组织切片不平、裂片或脱片很严重，易引起大块阴性着色。
- (6) 组织标本不新鲜或已经冷冻组织制成的切片中抗原易弥散，易引起本来表达的部位阴性染色或弱着色。
- (7) 荧光显微镜不会使用，激发波长选择错误。

Download from wiki.medprober.com