

DAB 染色后切片着色一片黄/背景深解决方案

背景：

奥运会期间我们课题组研究生都在实验室做实验，许多从北京购买的试剂买不到，对我们的许多实验产生了很大的影响。我以前一直用中杉金桥的 SP 三步法染色试剂盒，效果不错，在奥运会期间我准备做同批实验分不同批次酶免疫组化实验，第一批组化实验结果很好，抗体浓度感觉比较合适（Santa Cruz 公司 1：200），等做第二批时发现封闭血清不够了，为了保证实验顺利进行，我又从福州迈新顶了一个 SP 试剂盒，同时抗体稀释液也不够了，我又重新从博士德公司买了一小瓶 10ml。从第二批实验开始，组化实验结果一直显示强背景着色，特异性染色很难辨别。

问题及其解答：产生组织切片非特异性染色的原因有哪些？如何解决？

- 1、 抗体孵育时间过长、抗体浓度高易增加背景着色。这可通过缩短一抗/二抗孵育时间、稀释抗体来控制。这是最重要的一条。
- 2、 一抗用多克隆抗体易出现非特异性着色，建议试用单克隆抗体看看。
- 3、 内源性过氧化物酶和生物素在肝脏、肾脏等组织含量很高（含血细胞多的组织），需要通过延长灭活时间和增加灭活剂浓度来降低背景染色；
- 4、 非特异性组分与抗体结合，这需要通过延长二抗来源的动物免疫血清封闭时间和适当增加浓度来加强封闭效果；
- 5、 DAB 孵育时间过长或浓度过高；
- 6、 PBS 冲洗不充分，残留抗体结果增强着色，在一抗/二抗/SP 孵育后的浸洗尤为重要；
- 7、 标本染色过程中经常出现干片，这容易增强非特异性着色。

我的实际解决方案：

以上的分析可能对于初学者还是不容易的，下面我就把我的排除实验的具体过程与大家进行分享、交流和讨论。

- 1、首先排除抗体孵育条件。一般来说，着色效果的好坏与抗体的孵育条件是密不可分的，由于用 SP 法已经做出来过一次且效果不错，因此对于同样组织的同一抗原进行分析，这种因素可以先排除。
- 2、其次，DAB 孵育时间是否太长？做出来那一次我是孵育 8min，后来也是 8-10min，我单独

做了一次实验来排除该因素。结果孵育 2、5min 时先出现背景，而特异性染色较浅，故这不符合常理，一般先出现特异性染色，然后随着时间的延长，会出现非特异性背景着色。

3、最后，血清封闭的问题？以前我一般孵育 15-30min，所以我单独做了一次实验用血清封闭室温 1h，其它条件同做出来的那一次，结果也一样背景着色很深。

4、此外，我在改进的同时，也对 PBS 清洗不断地延长时间和增加次数，甚至完全参照试剂盒说明书来进行操作（我以前一般一抗 4 度过夜且室温复温 45min、二抗 37 度 30min、SP 反应 37 度 30min），以及过氧化氢灭活加强等等均未起到效果。

我冷静地分析了一下整个实验流程，与第一次做出来相比，只有两个地方做了改动：因血清不够而更换了不同厂家试剂盒、因抗体稀释液用完而重新买了抗体稀释液。

5、我用 PBS 替代一抗稀释液（我以前还回收抗体，自我觉得抗体稀释液中含防腐剂和蛋白稳定剂），其它步骤和组织切片完全与第一次做出来的一致（包括血清也是老试剂盒内剩余的一点），奇迹出现了：结果很好。--因为抗原抗体反应除温度、抗原/抗体浓度外，然后就是 PH 值，于是我测了新抗体稀释液、老抗体稀释液和 PBS 的 PH 值，结果是前者偏酸性（<6、0），而后两者均在 7、5 左右。

6、看来主要祸根是抗体稀释液的 PH 值出问题了，于是我又用 PBS 替代抗体稀释液和新试剂盒内的试剂对组织切片做了免疫组化，结果还是没有做出来：背景很深。这真把我搞惨了。难道还有什么原因吗？通过仔细分析：一抗一定是结合上去了（老 SP 试剂盒结果很好），问题是二抗没有结合上去也不对（因为最后背景很深，这说明二抗可能也结合上去了），DAB 孵育时间现在只用 1、5min 也是背景深而特异性染色浅，那我又怀疑封闭血清了。

7、我做了两张切片：一张用老试剂盒内还剩下一点的血清而另一张用新试剂盒内的封闭血清，其余试剂（二抗、SP）均用新试剂盒提供的，结果是前一张效果很好，而后一张能够看到特异性染色，但背景太深，拍照效果不佳。--看来封闭血清也是罪会祸首之一。

结果分析显示：抗体稀释液的 PH 值偏低和封闭血清的失效导致了我的免疫组化结果的不佳，望大家在以后的组化实验中也要注意这两个不太引人注意的关键问题。--惨痛的教训，值得引以为鉴。