

# 国家健康和疾病人脑组织资源库

## 样本免疫组织化学实验流程

根据国家健康和疾病人脑组织资源库人脑组织样本神经病理学诊断需要,对所收集的大脑组织在 10%的福尔马林溶液中固定 2-3 周后,按照脑区分切,进行石蜡包埋并切片。随后进行以下系列实验染色,染色方法包括苏木素-伊红染色(HE 染色,方法 1)、硝酸银染色法(方法 2)、GALLYAS(1970)染色法(方法 3)、Luxol 坚牢蓝-焦油紫染色法(方法 4)、Freudenthal 改良刚果红法(方法 5)以及 7 种抗体的免疫组织化学染色(方法 6)。针对疾病大脑,根据病例而主要分为常规病例、阿尔兹海默病(AD)和帕金森氏病(PD)三类而对不同脑区采用不同染色方法:常规病例的染色方法和脑区见表 1,AD 病例见表 2,PD 病例见表 3。

## 方法 1

### HE 染色

#### 一、 溶液配制

A: 0.5~1% 的伊红酒精溶液:

伊红 Y 1g, 溶解于 300ml 的 95%乙醇中, 再滴加适量 (约 4 滴) 的冰醋酸。

B: 苏木素染液配方: (配制 3000 ml, 可按比列减少)

甲液: 苏木精 1 g , 无水乙醇 20ml

乙液: 硫酸铝钾 50 g, 蒸馏水 300 ml

配制方法: 分别配制甲液和乙液, 待完全溶解后, 混合, 煮沸 2-3 分钟; 再加入 0.2g 碘酸钠, 冷却后, 过滤备用。

C: 1%盐酸酒精分化液: 将 1 毫升浓盐酸加入 99 毫升 70%酒精中即可。

#### 二、 染色方法

1、石蜡切片脱蜡至水:

二甲苯 1, 3-5 秒

二甲苯 2, 3-5 秒

100 % 乙醇, 3-5 秒

90 %乙醇, 3-5 秒

80 %乙醇, 3-5 秒

75 %乙醇, 3-5 秒

自来水洗。

2、苏木素染色: 切片入苏木素染液染 3-5min, 自来水洗,

3、分化液分化, 自来水洗, 返蓝液返蓝, 流水冲洗。

4、伊红染色: 染色 5min。

5、脱水封片:

无水乙醇脱水 (100 % 乙醇, 3-5 秒; 90 %乙醇, 3-5 秒; 80 %乙醇, 3-5 秒; 75 %乙醇, 3-5 秒), 二甲苯透明 (二甲苯 1, 3-5 秒; 二甲苯 2, 3-5 秒), 中性树脂胶封固。

#### 三、 结果

胞浆呈红色, 细胞核呈紫色。

## 方法 2

### 硝酸银染色法

#### 一、染液配置

银溶液：

5%六亚基四胺（乌洛托品） 100ml

5%硝酸银 5ml

5%硼酸钠 5ml

（硼酸钠很难溶解，需要搅拌很长时间，溶液需要过滤后使用）

#### 二、染色方法

##### 1、二甲苯脱蜡至水

二甲苯 1， 3-5 秒

二甲苯 2， 3-5 秒

100 % 乙醇， 3-5 秒

90 %乙醇， 3-5 秒

80 %乙醇， 3-5 秒

75 %乙醇， 3-5 秒

自来水洗

2、将银溶液加热到 56℃后放入切片。2-2.5h 左右（随时观察，溶液会慢慢变黑，待斑块和缠结染好后终止染色）。

3、去离子水洗 3 次。

4、10%中性福尔马林（4ml 甲醛+100ml 水）5min。

5、去离子水洗 3 次。

6、5%无水硫代硫酸钠溶液定影 5min（该溶液可循环使用）。

7、无水乙醇脱水（100 % 乙醇， 3-5 秒； 90 %乙醇， 3-5 秒； 80 %乙醇， 3-5 秒； 75 %乙醇， 3-5 秒），二甲苯透明（二甲苯 1， 3-5 秒；二甲苯 2， 3-5 秒），中性树胶封固。

#### 三、结果

神经原纤维缠结呈黑色，细胞核黑色，胞浆等呈不同程度的黄色。

## 方法 3

### GALLYAS(1970)染色法

#### 一、染液配置

##### 1、5%高碘酸:

高碘酸	5g
水	100ml

##### 2、silver jodide oplossing 液:

氢氧化钠	4g
碘化钾	10g
双蒸水	50ml
5%硝酸银	0.7ml

搅拌均匀(剧烈搅拌后黄色沉淀物消失)加水至 100ml

##### 3、显影液:

A 液: 碳酸钠(无水) 50g, 水 1000ml

B 液: 硝酸铵 2g, 硝酸银 2g, 钨硅酸 10g, 水 1000ml

C 液: 硝酸铵 2g, 硝酸银 2g, 钨硅酸 10g, 水 1000ml, 35% 甲醛 7.5 ml

使用前按 10:3:7 的比例混合 A、B、C 原液, 并充分搅拌。

##### 4、5% 硫代硫酸钠:

硫代硫酸钠	5g
水	100ml

#### 二、染色方法

1、石蜡切片切 6 $\mu$ m。

2、脱蜡至水

二甲苯 1, 3-5 秒

二甲苯 2, 3-5 秒

100% 乙醇, 3-5 秒

90% 乙醇, 3-5 秒

80% 乙醇, 3-5 秒

75% 乙醇, 3-5 秒

3、蒸馏水 5min。

4、5%高碘酸(Merck, Sigma) 内 30 min。

5、蒸馏水冲洗 2 $\times$ 5min。

6、Silver jodide oplossing 液 30min。

7、蒸馏水冲洗 3 $\times$ 30s。

8、0.5%醋酸冲洗 5min。

- 9、显影，切片放入显影液内，组织由浅灰色至棕色后终止显色，显微镜下检查。
- 10、0.5%醋酸冲洗 5min
- 11、蒸馏水冲洗。
- 12、5%硫代硫酸钠固定 15min。
- 13、蒸馏水冲洗 2×5min。
- 14、0.05% 甲苯酚紫（焦油紫）复染。
- 15、无水乙醇脱水（100 % 乙醇， 3-5 秒；90 %乙醇， 3-5 秒；80 %乙醇， 3-5 秒；75 %乙醇， 3-5 秒），二甲苯透明（二甲苯 1， 3-5 秒；二甲苯 2， 3-5 秒），中性树胶封固。

### 三、结果

神经原纤维缠结呈黑色，细胞核黑色，胞浆等呈不同程度的黄色。

## 方法 4

### Luxol 坚牢蓝-焦油紫染色法

#### 一、染液配置

- 1、 坚牢蓝染液：

Luxol 坚牢蓝	1g
95% 乙醇	100ml
10% 醋酸	5ml
  
- 2、 焦油紫染液：

焦油紫	0.1g
蒸馏水	100ml
10%醋酸	17 滴
  
- 3、 焦油紫分化液：

95% 乙醇	90ml
氯仿	10ml
冰醋酸	3 滴

#### 二、染色方法

##### 1、石蜡切片脱蜡至水

- 二甲苯 1, 3-5 秒
- 二甲苯 2, 3-5 秒
- 100 % 乙醇, 3-5 秒
- 90 %乙醇, 3-5 秒
- 80 %乙醇, 3-5 秒
- 75 %乙醇, 3-5 秒
- 自来水洗

##### 2、入 Luxol 坚牢蓝染液 37℃下染色过夜。

##### 3、95%乙醇洗。

##### 4、蒸馏水洗。

##### 5、0.05%碳酸锂分化 10s, 直至灰、白质区别清晰。

##### 6、蒸馏水洗。

##### 7、焦油紫染液内 10min。

##### 8、蒸馏水洗。

9、无水乙醇脱水（100 % 乙醇, 3-5 秒; 90 %乙醇, 3-5 秒; 80 %乙醇, 3-5 秒; 75 %乙醇, 3-5 秒），二甲苯透明（二甲苯 1, 3-5 秒; 二甲苯 2, 3-5 秒），中性树脂胶封固。

#### 三、结果

髓鞘及髓磷脂呈蓝色，细胞核呈紫红色。

## 方法 5

### Freudenthal 改良刚果红法

#### 一、试剂配置

刚果红染色液：刚果红 1g，5%碳酸钠水溶液 100ml。

#### 二、染色方法

##### 1、切片脱蜡至水。

二甲苯 1， 3-5 秒  
二甲苯 2， 3-5 秒  
100 % 乙醇， 3-5 秒  
90 %乙醇， 3-5 秒  
80 %乙醇， 3-5 秒  
75 %乙醇， 3-5 秒  
自来水洗

2、浸入 10%甲醛液， 15-30min。

3、直接入刚果红染色液 15min。

4、经自来水洗 2min，蒸馏水稍洗。

5、苏木素 2min。

6、自来水洗后入 0.5%盐酸乙醇分化。

7、充分水洗反蓝。

8、无水乙醇脱水（100 % 乙醇， 3-5 秒； 90 %乙醇， 3-5 秒； 80 %乙醇， 3-5 秒； 75 %乙醇， 3-5 秒），二甲苯透明（二甲苯 1， 3-5 秒；二甲苯 2， 3-5 秒），中性树胶封固。

#### 三、结果

淀粉样物质呈鲜红色，胞核呈蓝色。

## 方法 6

### Protocols of IHC staining

1. Deparaffinize and hydrate the sections in xylene-ethanol series:  
Put the sections in xylene at 60°C for 10 minutes,  
xylene 1, 3-5 seconds  
xylene 2, 3-5 seconds  
100 % ethanol, 3-5 seconds  
90 % ethanol, 3-5 seconds  
80 % ethanol, 3-5 seconds  
75 % ethanol, 3-5 seconds
2. Rinse the sections in the tap water for 3-5 minutes;
3. Rinse the sections in PBS (pH = 7.0) for 3x5 minutes ;
4. Dip in Hydrogen peroxide (1%, 10 minutes);
5. Place the sections in the boiling sodium citrate buffer (100 °C pH= 6) for 10 minutes.  
Cool down the sections at the room temperature;
6. Rinse the sections in PBS for 3x5 minutes;
7. Incubate the sections with first antibody diluted in PBS(pH = 7.0) containing goat serum albumin (5%) and 0.03% Triton X100 at 4°C overnight;
8. Rinse the sections in PBS for 3x5 minutes;
9. Incubated with secondary antibody diluted (2:1) in PBS for 1 hour at 37°C in the incubator.
10. Rinse the sections in PBS for 3x5 minutes;
11. Stain with DAB solution for 1 minute;
12. Dehydrate and transparentize in reversed ethanol and xylene series;  
75 % ethanol, 3-5 seconds  
80 % ethanol, 3-5 seconds  
90 % ethanol, 3-5 seconds  
100 % ethanol, 3-5 seconds  
xylene 1, 3-5 seconds  
xylene 2, 3-5 seconds
13. Cover the sections with Neutralbalsam.



表 1. 常规病例的染色方法和脑区

	英文名称	中文名称	特殊染色					免疫组化						
			HE	Congo	M-Ag	Kluver	Gallyas	AT8	$\alpha$ -syn	$\beta$ A4	TDP43	p62	RD3	RD4
1	G. pre + postcentral	中央前回和中央后回	×		×									
2	Meninges	脑膜	×	×						×				
3	Hypothalamus	下丘脑	×											
4	Temoral pole	颞极	×	×	×		×	×				×	×	×
5	Frontal	额叶	×	×	×		×			×			×	×
6	Gyrus cinguli	扣带回	×			×								
7	Caudatum / Putamen	尾状核、壳核	×											
8	Putamen / Pallidum/ Ins.	壳核苍白球、岛叶	×											
9	Amy + ent. cort.	杏仁体、内嗅皮质	×		×		×			×	×			
10	Hippocampus ant.	海马前段	×	×	×		×	×						
11	Hippocampus mid.	海马中断	×	×	×		×	×		×	×	×	×	
12	Hippocampus links	海马后端	×	×	×		×							
13	Thalamus / subthal.	丘脑及底丘脑	×											
14	Lob. par. inf. (cerad)	顶下小叶	×				×	×						
15	Parietal	顶叶	×	×	×		×			×			×	×
16	Occipital pole	枕极	×	×	×		×			×			×	×
17	Substantia nigra	黑质	×						×					
18	Colliculus inf. / pons	脑桥下丘	×											
19	Loc. Coeruleus / pons	脑桥蓝斑	×					×						

20	Cerebellum / dent.	小脑齿状回	×											
21	Medulla oblongata	延髓	×						×					
22	Spinal cord C	脊髓颈段	×											
23	Basilar Artery	基底动脉	×											
总计			23	8	9	1	9	5	2	4	2	3	5	5

表 2. AD 病例的样本染色部位及其实验种类

	英文名称	中文名称	特殊染色					免疫组化						
			HE	Congo	M-Ag	Kluver	Gallyas	AT8	$\alpha$ -syn	$\beta$ A4	TDP43	p62	RD3	RD4
1	G. pre + postcentral	中央前回和中央后回	×		×									
2	Meninges	脑膜	×	×						×				
3	Hypothalamus	下丘脑	×		×									
4	Temoral pole	颞极	×	×	×		×	×				×	×	
5	Frontal	额叶	×	×	×		×			×			×	
6	Gyrus cinguli	扣带回	×		×	×								
7	Caudatum / Putamen	尾状核、壳核	×		×									
8	Putamen / Pallidum/ Ins.	壳核苍白球、岛叶	×		×									
9	Amy + ent. cort.	杏仁体、内嗅皮质	×		×		×			×	×			
10	Hippocampus ant.	海马前段	×	×	×		×	×						
11	Hippocampus mid.	海马中断	×	×	×		×	×		×	×	×	×	
12	Hippocampus links	海马后端	×	×	×		×							
13	Thalamus / subthal.	丘脑及底丘脑	×											
14	Lob. par. inf. (cerad)	顶下小叶	×				×	×						
15	Parietal	顶叶	×	×	×		×			×			×	
16	Occipital pole	枕极	×	×	×		×			×			×	
17	Substantia nigra	黑质	×		×				×					
18	Colliculus inf. / pons	脑桥下丘	×											
19	Loc. Coeruleus / pons	脑桥蓝斑	×					×						

20	Cerebellum / dent.	小脑齿状回	×		×									
21	Medulla oblongata	延髓	×						×					
22	Spinal cord C	脊髓颈段	×											
23	Basilar Artery	基底动脉	×											
总计			23	8	15	1	9	5	2	4	2	3	5	5

表 3. PD 病例的样本染色部位及其实验种类

	英文名称	中文名称	特殊染色					免疫组化						
			HE	Congo	M-Ag	Kluver	Gallyas	AT8	$\alpha$ -syn	$\beta$ A4	TDP43	p62	RD3	RD4
1	G. pre + postcentral	中央前回和中央后回	×		×				×					
2	Meninges	脑膜	×	×						×				
3	Hypothalamus	下丘脑	×											
4	Temporal pole	颞极	×	×	×		×	×	×			×	×	×
5	Frontal	额叶	×	×	×		×		×	×			×	×
6	Gyrus cinguli	扣带回	×			×			×					
7	Caudatum / Putamen	尾状核、壳核	×											
8	Putamen / Pallidum/ Ins.	壳核苍白球、岛叶	×											
9	Amy + ent. cort.	杏仁体、内嗅皮质	×		×		×		×		×	×		
10	Hippocampus ant.	海马前段	×	×	×		×	×						
11	Hippocampus mid.	海马中断	×	×	×		×	×			×	×	×	×
12	Hippocampus links	海马后端	×	×	×		×		×					
13	Thalamus / subthal.	丘脑及底丘脑	×											
14	Lob. par. inf. (cerad)	顶下小叶	×				×	×						
15	Parietal	顶叶	×	×	×		×		×	×			×	×
16	Occipital pole	枕极	×	×	×		×			×			×	×
17	Substantia nigra	黑质	×						×					
18	Colliculus inf. / pons	脑桥下丘	×											
19	Loc. Coeruleus / pons	脑桥蓝斑	×					×	×					

20	Cerebellum / dent.	小脑齿状回	×											
21	Medulla oblongata	延髓	×						×					
22	Spinal cord C	脊髓颈段	×											
23	Basilar Artery	基底动脉	×											
总计			23	8	9	1	9	5	10	4	2	3	5	5