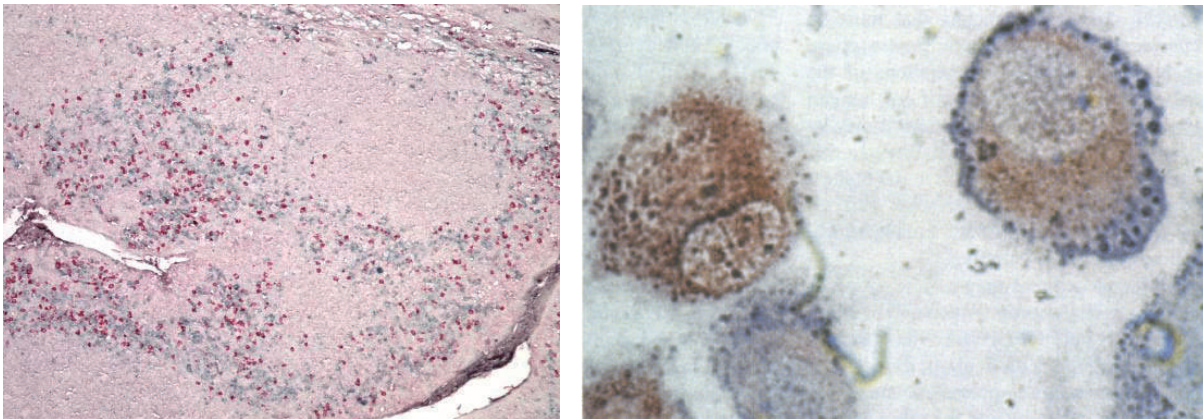


KPL- IHC雙染最繽紛的選擇 滿足你的視野

組織染色 (Immuohistochemistry, IHC) 為探討組織或細胞內蛋白常見的方法，利用抗體與抗原結合找到所需要的蛋白座落的地方，然而為了可以在同一個組織或細胞找到兩個標的蛋白表現或結構(圖一)，或者是在同一組織中觀察不同的細胞型態，雙染的技術 (Double stain) 相對於重要，不但可以節省樣品數量與準備時間，也可有效節省經費之花費。

Double staining 為可以在同一個樣品中進行兩個抗原的定位與檢測，跟螢光方式最大的不同為不需要結合(merge)圖片，肉眼即可發現兩個蛋白顏色之不同；且可以永久保存，不用擔心訊號降解之問題。Double staining 跟傳統的組織染色流程相似，利用一樣的呈色方式與試劑，但其實要在同一個樣品中，呈現兩個不同顏色蛋白其實沒那麼容易，其中的阻隔劑 (blocking buffer)、呈色劑 (substrate)、抗體等試劑可都是有很高深的學問在裡面的，例如 AP 呈色系統中，含有磷酸根的試劑都必須避免，減少訊號之干擾。接下來就讓岑祥小天使帶你們去組織染色的世界遨遊吧!



圖一、右圖為人類視網膜內皮細胞免疫組織染色，利用 HistoMark Biotin-Streptavidin kit (#71-00-39) 放大訊號後，分別再用 HistoMark Red (#55-69-00) 與 HistoMark Blue (#55-70-00) 染色。左圖為人類扁桃腺免疫染色，IgA 為利用 HistoMark RED (#55-69-00) 染色，IgG 則是利用 HistoMark TrueBlue (#57-78-00) 染色。



Blocking

Double staining 時必須特別注意 blocking 的步驟，避免非專一性的結合訊號干擾，尤其是二級抗體 (second antibody) 要辨認一級抗體 (primary antibody) 的步驟，常會發生有雜訊干擾的現象發生，因此 blocking 的步驟更顯得重要，除此之外，Blocking 也是降低背景值的關鍵。高背景值常為 IHC 會遇到的問題，其干擾的訊號來源主要為組織內源性酵素 (endogenous enzymes) 或是抗體 Fc 端的非專一性結合所導致。

在雙染的實驗下，可以選擇不同的呈色系統，但常見的還是選擇同一個呈色系統，只需要選不同色即可，但也因為都是同一的系統，因此適合的 Blocking buffer 與專一性高的抗體為重要之課題，根據不同的需求選擇適合的 Blocking 更為重要。



Blocking/Inactivating Enzymes

內源性的過氧化酶 (peroxidases) 與磷酸酶 (phosphatases) 與呈色劑 (substrate) 結合為導致高背景的主因，為了解決這樣的現象，KPL 的 Universal Block (#71-00-61) 可有效抑制過氧化酶與磷酸酶活性，達到降低背景值之訴求。

根據呈色系統，選擇的呈色劑也不同，KPL AP 系統的 HistoMark staining kits 基本上都是內含 levamisole，此分子可有效抑制磷酸酶活性。然而在腸道組織中的磷酸酶則不受到 levamisole 抑制，但神奇的事情發生了，KPL 的 Universal Block (#71-00-61) 即使遇到對於 levamisole 有拮抗性的磷酸酶，還是能夠有效抑制其活性，這也是 Universal Block 廣受好評之原因。

HRP 系統的 HistoMark staining kits 也不遑多讓，內含 Endogenous HRP Blocker 可有效抑制內源性的過氧化酶。有些實驗會建議使用過氧化氫 (H_2O_2) 來阻隔內源性的 HRP 作用，但最常面臨到的問題是實驗過程中產生的氣泡破壞原組織結構，即使將 H_2O_2 溶在甲醇中可以改善氣泡的產生，但卻易導致抗原被破壞，導致單株抗體無法辨認結合，種種因素導致現在越來越多研究者選擇商品化的 blocking buffer。在雙染 IHC 的實驗中，因為會使用兩隻 HRP 標定的抗體，在加第二隻 HRP 標定抗體前，必須確認第一隻 HRP 抗體的酵素活性失活，避免殘留的 HRP 活性影響到後續的訊號，此時 Universal Block 就顯得更為重要，可將第一支抗體上的 HRP 失活，又不傷害抗原結構。



Blocking General Nonspecific Binding

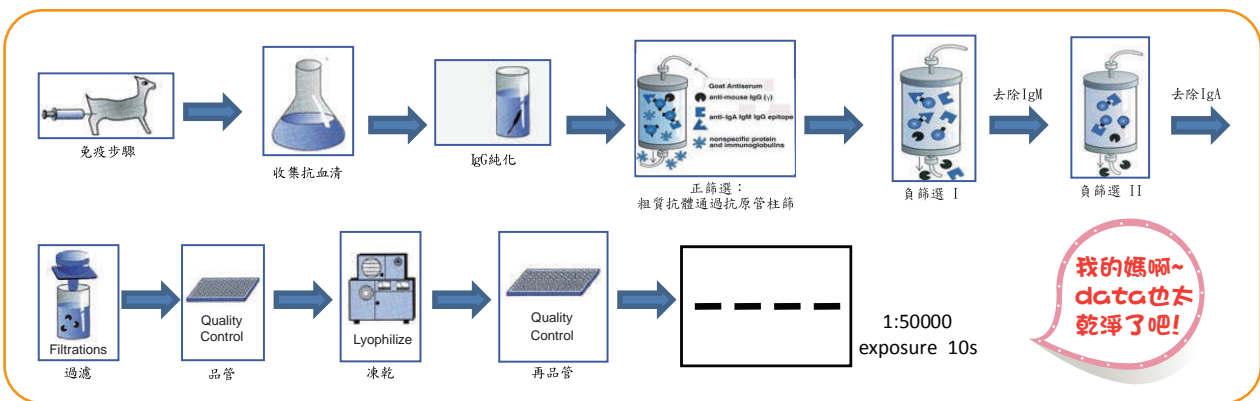
通常為了增加組織貼附性，玻片上會經過一些表面處理，像是 Poly-D-Lysine 處理，然而這樣的處理雖然可以增加貼附，但是在沒有組織的區域也容易導致非專一性蛋白結合，此外抗體也可能會和組織形成非專一性結合影響到後續的判讀。

在免疫細胞中的 FCγ receptor 也有可能造成高背景的現象，主要是因為 FCγ receptor 對於 IgG 結合能力都不相同，然而高親和性與低親和性 IgG 結合能力所使用的 blocking 方式也有所不同。如果組織中為低親和性的 FCγ receptor 就比較不用擔心，只要增加清洗試劑培養的時間即可破壞其鍵結；但如果是高親和性的 FCγ receptor 則較為棘手，因為對於 IgG 的結合能力比較強，因此只靠清洗試劑是無法將非專一性的結合去除，血清或是未標記的 IgG 可以有效減少專一性的結合。10% BSA Diluent/Blocking Solution (#50-61-00) 或是 10% 血清最常被拿來使用抑制非專一結合；少量的 Detergent 存在，例如 0.05% Tween 20 溶在 blocking buffer 或是清洗試劑也可以改善非專一性結合的問題。

Choice of Antibodies

免疫染色一直都是研究的潮流，陸續都有許多抗體公司研發 IHC 專用抗體去迎合市場，然而抗體品質很重要，美國 RayBiotech 公司針對免疫染色推出一系列的一級抗體，可以在原廠的網頁上查詢，包含免疫原 (Immunogen)、物種、濃度、建議稀釋倍數、Gene ID 或是 Reference 等等，原廠都有提供相關資料，讓客戶買得安心，用得也心安。

然而除了一級抗體外，辨認一級抗體的二級抗體更是關鍵，大都是多株抗體，最大的好處為可以增加訊號，也因此更受到市場之喜愛。但多株抗體最常遇到的問題為不同物種間的交叉反應 (cross-reactivities)，因此即使是二抗，最好也要通過不同物種間的血清吸附反應，減少交叉反應的發生。許多廠商為了壓低價格，只會經過 3-4 道純化手續，主要就是 IgG 純化後，進行 Filter 過濾並乾燥包裝，然而這樣粗糙的純化手法，常常會影響客戶後續的實驗，容易有雜訊的產生。反觀美國大廠 KPL 為了嚴格管控二抗的品質，會經過 10 道純化手續步驟(圖二)，包含正篩選 IgG 外，會再通過負篩選，將構型相似的 IgM 或 IgA 去除後，再進行後續的過濾包裝，這樣繁雜的手續可以讓背景值降到最低，且專一性與稀釋倍數高，且有些抗體會通過血清吸附之實驗，減少物種交叉反應之發生，難怪如此受到美國 FDA 與 NIH 的喜愛。



圖二、KPL 純化抗體之過程。

Biotinylated Antibodies

如果兩隻一級抗體皆來於同一物種時，沒有辦法利用二級抗體去做雙染的實驗，主要原因為二抗為辨認一抗之物種，如果一級抗體的物種相同時則無法分辨為哪一隻抗體之訊號，因此如果實驗遇到這樣的狀況，則會建議在其中一隻一級抗體後方接上生物素 (Biotin)，這樣就可以利用 Biotin 會與鏈霉親和素 (streptavidin) 結合的特性去區分，所以其中一隻的二級抗體為要選擇 Streptavidin 接上 HRP 或是 AP 酵素即可做後續呈色的實驗。如果是這樣的做法的話，未標定的一抗要先偵測，之後再 blocking 掉非專一性的結合，並後續再加入另外一隻有標定 biotin 的一級抗體即可。當然除了 Biotin- streptavidin 的方式，也有其他替代方案，例如選擇 FITC 標定一級抗體，那二抗選擇 anti-FITC 即可，這也是方法喔!

HRP 與 AP 為 IHC 中最常被使用的酵素，雙染的實驗中，也可以搭配前面提到 KPL 的 HistoMark Enzyme Blocker 或是 Universal Block 去抑制內源性的 HRP 酵素活性，再去用二抗進行偵測。反觀 AP 系統，好處為可以較長時間表現訊號，但過度冗長的呈色也會導致高背景值的發生，通常不建議超過 10-20 分鐘，搭配 Universal Block 抑制內源性的 AP，再可以搭配 KPL ReserveAP™ 抗體，此系列的抗體可以增加約兩倍的訊號值但不會增加背景值。



Whole Antibody vs. Fab vs. F(ab')₂

市面上的抗體除了有 whole IgG，也有不同的 isotype，像是 Fab 或是 F(ab')₂，F(ab')₂ 與 Fab 差在中間是否有雙硫鍵的結合。如果樣品是淋巴系統或是其他免疫系統的話，因為要考慮 Fc receptor 的問題，F(ab')₂ 與 Fab 為不錯的選擇，且他們的分子小，也比較容易滲透入福馬林固定的組織中。但因為他們製造過程較繁複，所以抗體的價格會較高。



Choice of Substrates

為了能夠分辨出不同的 target 蛋白，要避免相同色系或是吸收光譜，KPL 針對 HRP 與 AP 系統，推出一系列不同顏色的 substrate，讓客戶可以依自己的實驗去做選擇搭配。HRP 系統常見的 substrate 為 DAB，為棕色沉澱，其產物非常穩定，適合做雙染的選擇，KPL 的 HistoMark DAB HRP 系列皆為液態裝在滴瓶中，不需要再自行泡粉末，減少人為操作變異。HistoMark StableDAB HRP Substrate Solution (#54-11-00) 較傳統 DAB 穩定，有 A 劑與 B 劑，混合後可在常溫下保存一周，若保存在 4 度 C 可放兩周。此外也有其他顏色的 DAB 系統可以選擇，包含黑色的 HistoMark BLACK (#54-75-00) 與橘色的 HistoMark ORANGE (#54-74-00)，這兩種呈色劑皆為 DAB 的呈色方式，只是 HistoMark BLACK 是利用 cobalt-based DAB 做呈色，而 HistoMark ORANGE 則是利用 Nickel-based DAB，客戶可以依自己的實驗設計去選擇適合的呈色。

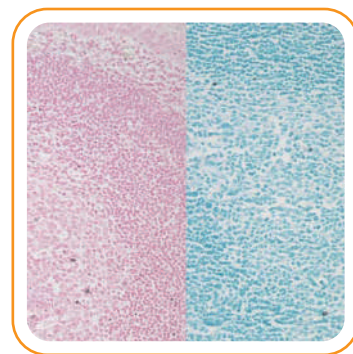
為了節省抗體的使用，呈色劑的靈敏度最好可以提高，KPL 的 HistoMark TrueBlue Kit (#54-78-00) 為 HRP 系統，屬最高階的呈色劑，為藍色沉澱。若跟 DAB 相比，除了顏色不同外，呈色時間快速，且靈敏度也較 DAB 佳。在相同的訊號強度下，如果使用 DAB 系統，其抗體稀釋倍數需約 2500-5000 倍，但 TrueBlue 系統，抗體最多可以稀釋 50 萬倍。當使用 DAB 呈色劑發現蛋白質訊號微弱時，更是強力推薦使用 TrueBlue 做偵測，靈敏度也較 DAB 多 50-100 倍。但由於 HistoMark TrueBlue Kit 非常的靈敏，建議為最後使用的呈色劑，避免顏色褪色，且只需浸泡 100% 酒精 5 秒脫水即可，最後再使用 xylene-based 封片膠封片。

AP 系統較沒有 HRP 系統普及，但 KPL 還是有推出專門針對 AP 系統的呈色劑。HistoMark BLUE (#55-70-00) 為藍色沉澱，為三劑的套組，由於產物在酒精或是乙醇下屬於不穩定的狀態，故不建議利用酒精或是 xylene-based 封片膠，用水性的封片膠即可，也不需要利用乙醇做玻片脫水。HistoMark Red (#55-69-00) 則為紅色沉澱，但其產物較為穩定，較適用於雙染的實驗中。



Counterstains

Counterstains 為染細胞核的染劑，目的為確認細胞位置，為染背景值的方式，在選擇上，只要顏色沒有跟其他呈色劑重複即可，當然此染色取決於實驗需求，並非必須的程序。KPL 目前提供的 Counterstains 包含了綠色、紅色、藍色與橘色，也有搭配螢光使用的 DAPI 和 PI，都是可以讓客戶去做搭配選擇的，還不趕快連絡當區岑祥小天使，給你 IHC 的全新體驗喔！



圖三. 利用 Counterstain Red 和 Green 染人類扁桃腺細胞。

岑祥玩美主義 - 玩色時尚

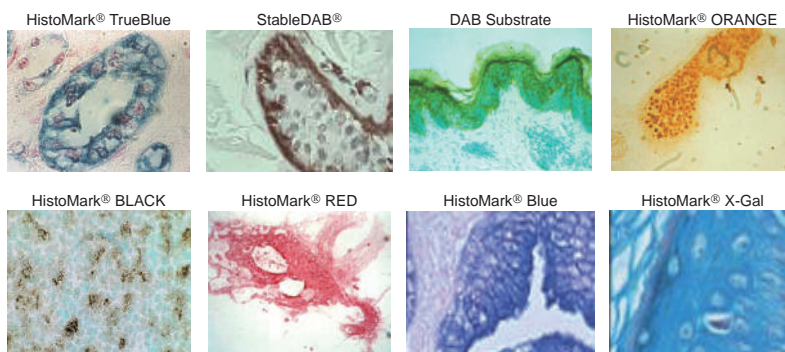
IHC-絢麗多彩的選擇

DAB染色的黃褐色會干擾判讀?

組織染色只有單色太無聊了?

KPL 為美國知名大廠
自行研發，品質保證

- KPL 提供 IHC 多種呈色商品
- 有雙染且多種顏色任君選擇
- 節省抗體: TrueBlue Substrate
二抗最多稀釋 50 萬倍



訂購資訊

貨號	品名	包裝
AP		
55-69-00	HistoMark RED	1000 slides
55-70-00	HistoMark BLUE	1000 slides
HRP		
54-74-00	HistoMark ORANGE	1000 slides
54-75-00	HistoMark BLACK	1000 slides
54-78-00	HistoMark TrueBlue	500 slides
54-11-00	Stable DAB	500 slides
β-galactosidase		
54-13-00	HistoMark X-Gal	200 slides

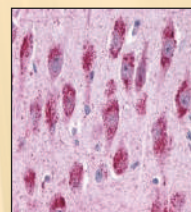
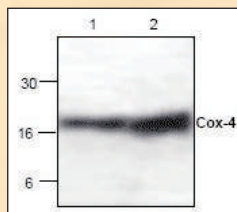
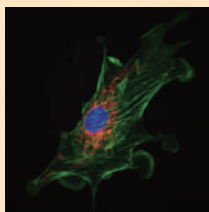
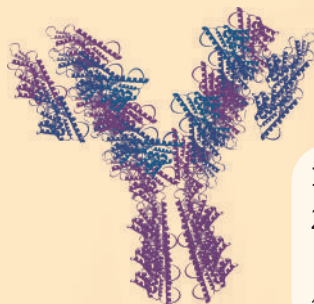
★ 歡迎來電洽詢體驗 TrueBlue 系列

貨號	品名	包裝
Counterstains		
71-01-01	Orcein	50 mL
71-00-11	Contrast GREEN	50 mL
71-00-06	Contrast BLUE	50 mL
71-00-05	Contrast RED	50 mL
71-04-01	Propidium Iodide	1.0 mg
71-03-01	DAPI	1.0 mg
Support Reagents		
71-00-16	Mounting Media	15 mL
71-00-61	Universal Block	100 mL

IHC 抗體

RayBiotech 提供鑽石級的抗體

RayBiotech, Inc.
the protein array pioneer company



1. 原廠提供廣泛應用之抗體，包含 IHC、WB、ELISA、IP 或 FACS 等。
2. 涵蓋領域廣，橫跨了 Cell signal、Cell cycle、Stem cell、Cytokines、Neurosciences、Obesity-related factor 及 Cancer research 等，提供客戶多種選擇，一次購足。