

冷凍切片之原理與使用

一、冷凍切片機原理與目的：

冷凍切片時利用低溫方式使組織結凍，因而增加組織之硬度，以提供切片時所需之支撐性，因此冷凍切片機需經常維持於低溫操作環境。同時藉由低溫冷凍方式，一方面可以縮短組織處理之流程與時間並可在不使用化學固定液處理的條件下，得以保存細胞內生化活性或抗原性之完整，以提供並符合研究或臨床診斷上特殊之要求與需求。但以冷凍方式進行組織之切片，所需之儀器設備上較為昂貴，且進行切片之人員須具備良好之技術、訓練與經驗，方得以切出完整之薄片，並避免在切片過程因低溫造成之傷害，而利用冷凍切片機所切出之組織切片中形態保存上較傳統石臘切片為差，並常有扭曲及變形之發生。

二、冷凍切片機之構造：

冷凍切片機可分為兩大部分：由置於可控溫之低溫恆溫操作台內的切片機主體所構成。切片機之主體與石臘切片機類似，唯因處於低溫環境，故機件潤滑上有別於常溫操作之石臘切片機，必須定期給予專用之低溫潤滑油予以保養，以維持機械零件間之潤滑，不得使用普通或常溫之潤滑油，誤用時可能因凍結而導致機件損壞。同時操作時應配備適當之防護手套，一則防止手部觸及低溫機體而凍傷，再則避免手部汗腺所蒸發之水氣進入機體，凝固後造成機件凍結或干擾機器操作之精密度。

冷凍切片機之恆溫操作台方面，平時應維持於 $-5\sim-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之溫度，切片之前再將溫度調至所欲切片組織之適當溫度〔如附件一〕，當操作時機體達到穩定之低溫環境後再進行切片。一般而言冷凍切片機每下降 10°C 約需 1 小時的時間來降溫並穩定；當溫度低於 -25°C 以下時，則恆溫操作台降溫所需時程會隨之增加，每下降 5°C 約需 1 小時。單溫型冷凍切片機極限溫度視壓縮機所使用冷煤而有所差異，通常約在 -30°C 左右，進行切片時因視組織特性選擇合適之切片溫度，並

避免讓冷凍切片機處於極限溫度下操作。為防止空氣中水氣之進入與凝結，操作時應盡量縮短打開操作窗之時間以維持穩定之低溫環境。

如遇操作中因突發事故而導致供電中斷，此時機體尚處於低溫狀態，一旦壓縮機停止運轉而回溫，機體各處內將凝集大量之水滴。因此，雖獲再度供電，亦不得立即啟動冷凍壓縮機，以免所凝集之水滴凍結成冰，破壞機件。因此當冷凍切片機停機後如欲再度啟動時，必須確認機體所含之水氣均予以完全排除後，方可重新啟動冷凍壓縮機。目前大多數新式冷凍切片機均有斷電回溫保護設計，當斷電造成機體回溫達 0°C 以上時，重新供電後會自動進入乾燥程序，以加熱方式蒸散在機體中所凝結之水氣，一般此程序建議維持至少 72 小時以確保機件完全乾燥，並將機體之排水孔打開以便凝結水之排除。在切片機處於加熱乾燥程序時，加熱會造成金屬機件的膨脹、並造成用以潤滑機件之低溫潤滑油揮發、流失與喪失潤滑功能，因此不應於切片機進入加熱乾燥程序時進行任何其他非必要操作。當加熱乾燥程序完成後，重新啟動冷凍恆溫操作台，當機體達到一般維持溫度 (-5~-10°C) 後，重新以低溫潤滑油將相關機件進行潤滑保養，之後在調至所需切片溫度進行操作。

三、冷凍切片之組織處理：

1. 固定：

冷凍切片之固定方式隨所研究之目的不同，而採用不同之固定方式，但大體上還是分為化學性固定與冷凍固定兩種。其中化學性固定必須考慮所使用之固定液是否會干擾所欲研究標的構造之呈現，如其酵素之活性與表現、免疫反應之抗原性等。因此，通常採用固定效果較低但對組織抗原性或生化活性保存較佳之固定液，如低濃度福馬林等。避免使用如四氧化鐵 (osmium tetroxide) 或戊二醛 (glutraldehyde) 等固定效能高之固定液，以避免因固定藥劑之結合，而破壞原本存在之組織抗原性。

冷凍固定法使用時可將新鮮取下之動物組織置於冷凍包埋劑中，直接投入液態氮或經液態氮預先降溫之冷凍劑（如 isopentane）中凍結。此種固定方法對組織之生化活性保存最好，可保存組織之酵素之活性，提供酵素活性或免疫分析。但切片後之保存需較嚴格之條件，以防止切片組織結構與活性之衰減。

2. 包埋：

冷凍切片時通常使用冷凍包埋劑（OCT）作為介質，提供組織適當之支撐性。為避免因水份結凍時形成冰晶，造成組織塊之硬度不一與結構性破壞，而妨礙切片之進行。因此在包埋之前，可將已固定之組織塊逐次置入較高濃度之蔗糖緩衝溶液中，最後再置入 OCT 中降溫包埋，藉以避免冰晶之生成利用。組織包埋之降溫過程之時間越迅速，則組織之形態保存越佳，且形成冰晶之情形也越低。應此可藉由液態氮或冷凍劑之使用，達到快速降溫之功能。經包埋後之組織塊可置於-20~-70°C之冷凍櫃保存，切片前一至兩小時前再由冷凍櫃取出，置於冷凍切片機之操作箱內，使組織回復到適當之切片溫度。

經切片過之組織塊，因組織部分已經於切面處暴露，如需保存組織塊，則須於暴露之組織切面上覆蓋冷凍包埋劑，以防止水氣自切面區域昇華、蒸散，造成組織之脫水、皺縮及變形。經冷凍包埋後之組織塊，宜儘速進行切片，雖可置於-20~-70°C之超低溫冷凍櫃進行保存，但如冷凍保存時間過久，可能導致表面冷凍包埋劑之乾縮，影響所製作之切片形態與品質。

四、冷凍切片：

1. 組織塊之修整：

經包埋之組織塊成白色狀，而組織通常成淡黃橘色至紅棕色。組織包埋時常以鋁箔為模型，因此當組織塊黏載於固定盤時，應將鋁箔完全除去，以免切片時造成刀口或組織之毀損。修整組織塊時以能將組織之切面暴露為原則，同時將組織塊邊緣含氣泡、破碎或不規則之冷凍包埋劑削除即可，不必如石臘切

片時修成梯形之檯狀。

2. 冷凍切片機之使用：

冷凍切片機之使用與切片方式與石臘切片相似，唯使用時需注意組織切片時之溫度，同時避免操作時遭到凍傷或割傷。切片時除需注意刀片之切片角度調整外，尚需調整切片刀上方之切片導板之位置。切片導板位置過於前面可能造成摩擦、擠壓組織塊，因而無法順利切片；導板位置過於後退則造成切片捲曲而無法伸展，亦無法載片；唯導板位置正確，方可將所切下之切片平展伸張於切片導板與刀片之間。冷凍切片每次以切取單一切片為主，每次切取切片後立即予以載片，經風乾後冷凍保存。冷凍切片之厚度選擇受實驗之目的不同而有所影響，一般而言所設定之切片厚度較石臘切片為厚，約在 10~30 μ m。

3. 載片：

冷凍切片之載片時，將已塗覆 (coating) 黏著劑之載玻片之黏著劑面著下，直接沾覆於切片上，此時切片因受熱而融化，即可黏貼於載玻片上。載片後之切片經空氣中自然陰乾後，即可收藏保存。載片時需避免載玻片碰觸切片刀之刃部，以避免造成刀面之污損或造成刀口之損壞。如發現刀口上有包埋劑凝固之殘餘污染，而妨礙切片之進行時，可以紗布沾丙酮 (acetone) 輕拭即可，但擦拭後須待刀片降回低溫後才可重新切片。載片後之切片經水洗後，可以蘇木紫 (hematoxylin) 或 toluidine blue 染色，以觀察其組織及細胞之形態。

4. 切片之保存：

冷凍切片保存時應置於切片保存盒中，經密封後置於 -20 ~ -70 $^{\circ}$ C 冷凍保存，可長時間保存其組織之抗原性與酵素活性。冷凍切片如採行冷凍固定方式，除細胞之蛋白活性保存良好外，如組織來源為病理組織或帶原動物，其組織間所存在的病原性細菌、病毒之生物活性及傳染能力均被完整保存，故操作及處理過程與廢棄物處理上亦須特別小心、謹慎，**謹遵相關法令之規範與限制，避免相關之生物性或感染性污染及擴散。**

免疫組織化學染色

一、免疫組織化學染色之原理：

免疫組織化學染色主要利用抗體之專一性結合方式，藉以標定出組織內特定抗原所在之位置。但因抗體本身亦無法直接觀察，故需在抗體上結合可觀察之標定物或呈色劑，一般上經常使用之標定物或呈色劑包括重金屬顆粒 (如黃金)、螢光物質 (如 FITC, TRITC, TAXAS red 等)、及酵素 (如 peroxidase) 等。因免疫組織化學染色法在對特定物質之染色或標定上較傳統之組織化學染色法為高、且具有專一性，故在研究及臨床診斷上極為重要。

二、抗體：

抗體又稱免疫球蛋白 (immunoglobulin)，為當身體免疫系統接觸外來物質時，免疫系統根據所接觸外來物質之抗原性，誘導 B 淋巴球 (B lymphocyte) 特化成為特定之漿細胞 (plasma cells)，以分泌針對此抗原專一性結合之抗體。人類之抗體可分為五大類，分別為 IgG (約佔血液中抗體數目之 80%)、IgA (約佔血液中抗體數目之 15%)、IgM (約佔血液中抗體數目之 5%)、IgD (含量低於血液中抗體總數之 1%) 及 IgE (含量低於血液中抗體總數之 1%) 等五大類。抗體之基本結構包含由胺基酸序列所組成之兩條重鏈及兩條輕鏈，其中輕鏈與重鏈間及重鏈與重鏈間經由雙硫鍵 (disulphide bond) 結合成 "Y" 形。其中 "Y" 形分叉之兩端為可變異區 (包含輕鏈及重鏈之前半部)，針對不同抗原結合之抗體其可變異區之胺基酸序列亦不相同；而 "Y" 形之柄部 (由重鏈之後半部分所組成) 稱為固定區，屬同一大類之抗體其固定區之胺基酸序列均相同。

由於免疫系統在辨識抗原之過程，同一個外源性構造或分子可於其構造之表面多處同時誘發而產生不同之抗原反應，因而產生多株針對其表面不同之抗原區域 (epitopes) 結合之抗體。因此，將這些可對同一物質之不同抗原區域結合的不同株抗體合稱為該物質之多株抗體 (polyclonal antibodies)。如在免疫反應誘導後將針對單一抗原區域產生抗體之漿細胞予以個別分離純化，經與癌細胞融合後分離培養，經篩檢後可得到只產生針對單一種抗原區域專一結合抗體之融合瘤，所產生之抗體純化後稱為該抗原之單株抗體 (monoclonal antibodies)。單株抗體因只與單一抗原結合位置故具備高度之專一性與敏感性，但對於免疫反應之環境要求也較為嚴格，包括 pH 值、溫度、離子濃度等。相對的多株抗體則因其結合位置之親和性與專一性之間差異較大，且有較高之非專一性結合情形發生，但因多株抗體對反應所需之環境允許範圍較廣，可適合在未知條件下之免疫化學反應進行。

三、染色方式：

免疫組織化學染色原理上雖然都是運用抗體之專一性結合能力在組織中進行標定，但在實際應用會根據實驗之目的與需求上的不同，採用不同之免疫染色法。

1. 直接免疫染色法 (direct method)：直接免疫染色法主要利用在針對特定抗原之抗體上直接結合或標定上可供識別之呈色劑。依照呈色方式與成分之不同，可區分為：酵素、膠體金以及螢光染料等。直接免疫染色法當抗體結合上組織中抗原之同時帶上呈色劑，在操作之程序上最為簡便，但如組織中抗原含量較低時，其染色之效果不佳。
2. 間接免疫染色法 (indirect method)：間接免疫染色法由直接免疫染色法改良而來，當初級抗體 (primary antibody) 結合上抗原後，再以所用之初級抗體為目標或抗原，利用標定過呈色劑之二級抗體 (secondary antibody)、protein A、Avidin-biotin...等再去結合初級抗體。由於初級抗體上可提供抗原結合之反應位置增加，因此所能標定上之二級抗體在數量上遠超過初級抗體之數量，亦即在這種染色過程中可將訊號予以放大，對於一些原本組織中抗原含量不高的觀察上均能有相當不錯之效果。

四、呈色劑 (chromogens)：

呈色劑之目定在使組織中原本無法進行觀測、區別之抗體位置能夠呈現，目前常用之免疫組織染色法根據呈色劑之機制與原理之不同，可分為下列四類。

- 酵素：
 - 將酵素結合在抗體上，利用酵素作用將透明而水溶性之受質 (substrates) 反應成為有顏色且不可溶之物質而呈現。一般實驗及研究中最常用來與抗體結合標定之酵素為 HRP，而使用最廣泛之呈色劑為 DAB，經反應後成為有顏色之深棕色產物、且不會溶於常規染色流程中之酒精與二甲苯等溶劑。
- 膠體金：
 - 利用還原方式製備，將氯化金 (AuCl) 溶液之金離子還原成極細小金球稱為膠體金，在與抗體適當結合後做為成像標定之用。一般膠體金之直徑低於光學顯微鏡之解像能力，因此無法作為光學顯微觀察時做為標定呈色之用，多應用於穿透電子顯微鏡之免疫染色。

- 螢光染劑：

- 螢光染劑能吸收波長較短而能量較高之激發光源照射的同時釋放出波長較短而能量較低之螢光，因此當以螢光物質與抗體結合後做為細胞組織中特定抗原染色之用，可藉由螢光產生來辨別組織中該特定抗原之位置。如將經螢光染色之切片置於一般之光學顯微鏡中觀察時，因其所產生之螢光相對較弱且常為背景光線所遮蓋而無法觀測，因此需使用經特殊設計能將激發光與螢光分別進行分離、過濾而達成像目地之螢光顯微鏡來進行觀察。

- 放射線同位素：

- 利用帶有放射線同位素之抗體進行染色標定之切片，並無法直接以任何種類之顯微鏡進行觀測。在染色標定完成後，須在組織切片上塗覆上一層適當之感光乳膠，利用放射線同位素衰變過程所釋放之射線或粒子撞擊乳膠中溴化銀等感光物質所引發曝光反應，經一段時間後以類似底片顯像沖洗方式而成像。

免疫組織化學染色對於特定抗原之呈現上雖具有相當高度之專一性，但實際應用時常受抗體濃度、作用環境（如溫度、鹽類環境、pH 值）、組織結構與固定狀態、染色時間、抗體結合能力、抗原呈現狀態...等因素，而有相當大之差異，實驗操作者應針對所購入或自製的不同抗體株進行測試，並建立其合適之染色操作流程。而對於染色結果亦需進行相同操作流程但未加入一級抗體的負染色以茲對照，確定所標定呈現均為抗體專一性反應所致。

五、對照染色：

免疫組織化學染色對於特定抗原之呈現上雖具有相當高度之專一性，但實際應用時常受抗體濃度、作用環境（如溫度、鹽類環境、pH 值）、組織結構與固定狀態、染色時間、抗體結合能力、抗原呈現狀態...等因素，而有相當大之差異，實驗操作者應針對所購入或自製的不同抗體株進行測試，並建立其合適之染色操作流程。而對於染色結果亦需進行相同操作流程但未加入一級抗體的對照染色（又稱負染色）以茲對照，確定所標定與呈現均為抗體專一性反應所致。

| 免疫組織化學染色流程 | | date | | |
|-----------------------------------------|-----|-------|--|--|
| Name | | | | |
| 凡士林畫圈 | | | | |
| PBS wash 5min | | 10:00 | | |
| Serum blocking 20min 37°C | | 10:10 | | |
| Primary Antibody 60min 37°C | | 10:30 | | |
| PBS wash 10min*2 | 1st | 11:40 | | |
| | 2nd | 11:50 | | |
| Secondary Antibody 50min 37°C | | 12:00 | | |
| PBS wash 10min*2 | 1st | 13:00 | | |
| | 2nd | 13:10 | | |
| DAB 染色 | | 13:20 | | |
| 流水 10min | | 13:45 | | |
| Hematoxylene 20min | | 14:00 | | |
| 流水 15min | | 14:20 | | |
| 0.5% HCl in 95% Alcohol 1~2 次 | | 14:35 | | |
| 流水 15min | | 14:35 | | |
| 飽和 Li ₂ CO ₃ 3min | | 14:50 | | |
| 75% Alcohol 5 次 | | 14:55 | | |
| 85% Alcohol 5 次 | | 14:56 | | |
| 95% Alcohol 1min | | 14:58 | | |
| 100% Alcohol 1min | | 15:00 | | |
| 100% Alcohol 5min | | 15:05 | | |
| 100% Alcohol 5min | | 15:10 | | |
| Xylene 1min | | 15:15 | | |
| Xylene 1min | | 15:20 | | |
| Xylene 1min | | 15:25 | | |
| 封片 | | 15:30 | | |
| 烘乾 72hr 60°C | | 16:00 | | |

PBS：0.01M 磷酸緩衝溶液，pH 7.4

DAB：3,3'-diaminobenzidine, 免疫組織化學染色之呈色劑