

抗原修复法：蛋白酶介导（PIER）或者高温介导（HIER）

甲醛/福尔马林是诊断病理学中最常用的固定剂，因为它可以很好地保持组织形态。然而，大多数经福尔马林固定的组织需要抗原修复步骤来揭露抗体结合位点。抗原修复技术会使用高温（高温诱导抗原表位修复 = HIER）或者酶（蛋白水解诱导抗原修复 = PIER）。

在PIER方法中广泛使用的酶有蛋白酶K、胰蛋白酶和胃蛋白酶，并且通常会在37°C下孵育10-30分钟。然而，这些酶可能会对组织形态产生破坏性的影响。所以恢复免疫活性的成功率很低。

SYSY标准的实验方案中包含一个使用食物蒸锅的HIER步骤，这样能够形成一致并且标准的抗原修复条件。高温诱导的抗原修复也可以用微波炉、高压锅或者设定在 95°C的水浴中进行。对容易损坏的组织，抗原修复可以在设定在60°C的水浴中过夜进行。



使用食物蒸锅进行HIER步骤：

将抗原修复缓冲液加入一个合适的染色容器中并放入蒸锅，随后加热蒸锅至97°C。将切片转入染色容器中，等容器中温度再次升至97°C时，开始抗原修复计时。当抗原修复时间完成时，移出染色容器让缓冲液冷却20分钟至60°C。随后继续实施免疫组化染色实验方案。

SYSY使用以下几种缓冲液，它们是HIER中最受欢迎的缓冲液：

- 柠檬酸盐缓冲液（10 mM 柠檬酸，0.05% 聚山梨醇酯-20，pH 6.0）
- Tris-EDTA 缓冲液（10 mM Tris base，1 mM EDTA，0.05% 聚山梨醇酯-20，pH 9.0）*
- EDTA 缓冲液（1 mM EDTA，0.05% 聚山梨醇酯，pH 8.0）*

*这些缓冲液对大多数抗体效用非常好，并且可以大大提高抗体敏感性，但是经常会导致高背景。

HIER对pH值、温度和缓冲液成分非常敏感。通常温度越高，加热时间越短，反之亦然。特殊配方市场上的抗原修复缓冲液可能优于SYSY缓冲液。

对抗原修复来说没有通用的方法，没有单独一种HIER方法对所有抗原是最优的。因此，对每一种抗体和每一个组织类型，我们推荐根据经验使用不用时间和pH、缓冲液条件。