



mmi protocol-样品染色

在进行激光显微切割时，需要确定靶标细胞，并与周围的细胞区分。大部分情况下，需要使用组织学染料对组织进行染色。许多染料兼容显微切割和下游分子分析。在进行染色前，建议先进行染料对下游分析（DNA、RNA和蛋白质）影响的评估。常规的染色protocol可能需要进行一些修改以保护要提取的下游分子。此protocol是一个快速染色流程，适用于大部分染料。

材料:

- 二甲苯
- 不同浓度梯度的乙醇（75%，95%，100%）
- 移液器（~100 ul）
- 染色托盘
- 广口瓶
- 无RNA酶的水

方法

对于冷冻组织切片

- 1、准备几个广口瓶，加入以下溶液并标记
 - 75% 乙醇
 - 95% EtOH
 - 100% EtOH
 - 二甲苯
- 2、从-80℃冰箱内取出膜片，在室温下解冻30s；
- 3、将膜片插入到70%乙醇内30s，进行迅速固定；
- 4、立即将膜片插入H₂O内20s，使样品水解，准备进行水溶性染料染色（注：如果使用乙醇类染料，则忽略此步骤）；
- 5、将膜片放在染色盘内，用移液器吸取染料（50-100ul）滴在样品上，孵育10-30s。注：根据最终需要染色的状态可调整染料的浓度；
- 6、将膜片放入H₂O内30s洗去多余的染料；
- 7、将样品放入75%乙醇内30s、放入95%乙醇内30s、放入100%乙醇内30s。此时，样品完全脱水，核酸酶的活性最低。
- 8、将样品置于二甲苯中5min去除多余乙

醇。注：如果二甲苯会影响后续染色，请忽略此步。样品可能会从空气中吸收少量的水分，因此，RNase活性会轻微增加；

- 9、空气干燥样品5分钟以除去二甲苯；
- 10、样品可进行显微切割。尽量在30-120min内进行，否则RNase会影响样品质量，具体时间长短取决于样品本身RNase浓度。

对于FFPE切片

- 1、FFPE样品的染色流程与冰冻切片一样，但是需要先进行脱蜡和逐步水化。
- 2、准备多个广口瓶，加入以下溶液并标记
 - 水
 - 75%乙醇
 - 95%乙醇
 - 100%乙醇
- 3、染色流程如下：
 - 二甲苯- 3 min；
 - 二甲苯- 3 min；
 - 100%乙醇 - 30s；
 - 95% 乙醇 - 30s；
 - 75% 乙醇 - 30s；
 - H₂O - 30s；
 - 染色 - 10-30s；
 - H₂O - 30s；
 - 75% 乙醇 - 30s；
 - 95% 乙醇 - 30s；
 - 100% 乙醇 - 30s；
 - 二甲苯 - 5min；
 - 空气干燥 - 5min。