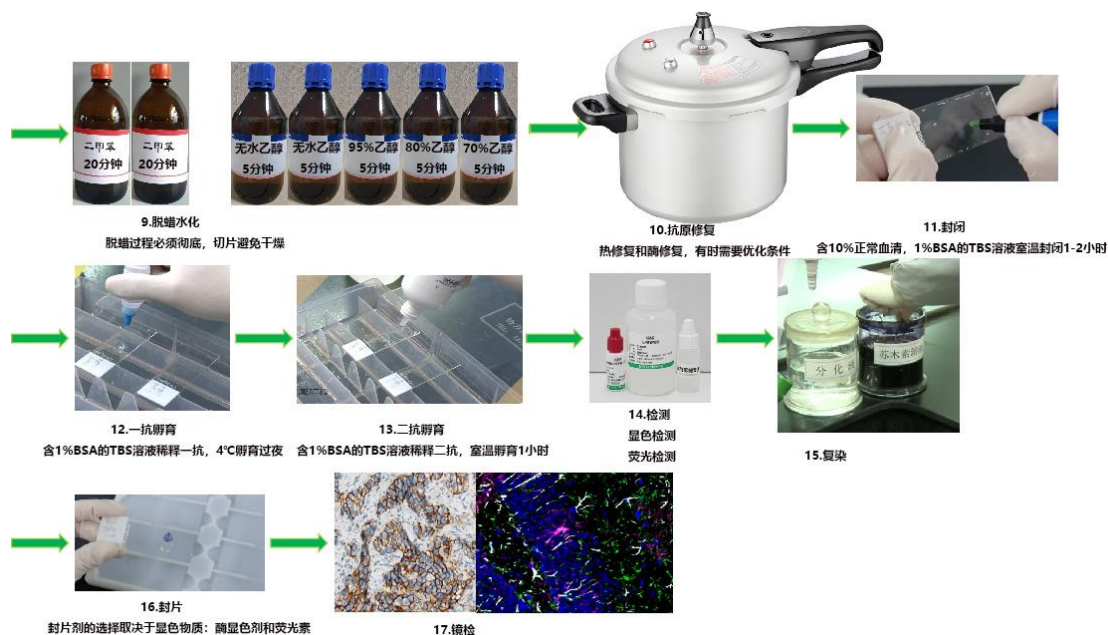


## 免疫组织化学-石蜡切片指南

免疫化学（Immunochemistry），包含免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）和免疫细胞化学（Immunocytochemistry, ICC）。是应用抗原与抗体特异性结合原理，用带显色剂（荧光素、酶、金属离子、同位素）标记的特异性抗体，在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应，对相应抗原（多肽和蛋白质）进行定性、定位、定量的技术。





## 目录

1. 组织取样 .....	4
2. 固定 .....	4
2.1. 固定液选择 .....	4
2.2. 固定方法 .....	4
2.3. 固定时间 .....	5
2.4. 固定步骤 .....	5
3. 浸蜡与包埋 .....	5
3.1. 包埋温度 .....	5
3.2. 包埋方向 .....	5
3.3. 浸蜡与包埋步骤 .....	6
4. 切片 .....	6
4.1. 切片步骤 .....	6
4.2. 切片储存 .....	6
4.3. 石蜡切片的常见问题 .....	7
5. 脱蜡水化 .....	7
5.1. 脱蜡水化步骤 .....	7
5.2. 注意事项 .....	8
6. 抗原修复 .....	8
6.1. 抗原修复方法 .....	8
6.2. 注意事项 .....	9
6.3. 抗原修复步骤 .....	9
7. 封闭 .....	10



7.1. 封闭方法 .....	10
7.1.1. 蛋白封闭 .....	10
7.1.2. 生物素封闭 .....	10
7.1.3. 阻断内源性酶 .....	10
7.1.4. 自发荧光封闭 .....	10
7.2. 封闭步骤 .....	11
8. 一抗孵育 .....	11
8.1. 一抗选择 .....	11
8.1.1. 靶标蛋白表达量 .....	11
8.1.2. 样本种属 .....	11
8.1.3. 验证和克隆性 .....	11
8.1.4. IHC 缩略词 .....	11
8.2. 一抗孵育步骤 .....	12
9. 二抗孵育 .....	12
9.1. 二抗选择 .....	12
9.1.1. 二抗物种 .....	12
9.1.2. 预吸附处理 .....	12
9.1.3. F(ab') <sub>2</sub> 片段化二抗 .....	12
9.1.4. 荧光二抗 .....	13
9.2. 二抗孵育步骤 .....	13
10. 染色 .....	13
10.1. 染色方法 .....	13
10.1.1. DAB 显色 .....	13
10.1.2. AEC 显色 .....	13
10.1.3. BCIP/NBT 显色 .....	14
10.1.4. Fast-red 固红显色 .....	14
10.2. 染色步骤 .....	14
11. 复染和封片 .....	14
11.1. 复染方式 .....	14
11.1.1. 酶显色染色 .....	14
11.1.2. 荧光染色 .....	14
11.2. 封片 .....	15
11.3. 复染和封片步骤 .....	15
11.3.1. 酶显色染色复染步骤 .....	15
11.3.2. 荧光染色复染步骤 .....	15
12. 免疫组化常见问题解析 .....	16



## 1. 组织取样

1. 材料必须新鲜，组织取样动作要迅速轻柔，避免自溶和撕扯带来的机械损伤，同时要尽量避免化学损伤和热损伤。避免组织风干，若不能立刻进行固定，先使用生理盐水浸润过的纱布包裹组织。
2. 尽量缩短取材到固定的时间，建议控制在 1 小时内。穿刺或切除后的实体肿瘤（如乳腺癌组织）应在 1 小时内进行固定，消化系统肿瘤（如胃癌样本）要求在 30 分钟内固定。
3. 大体积组织在固定前要进行适当切割，确保组织厚度小于 0.5cm。含血的组织样本，固定前先用生理盐水进行清洗，以免影响后续步骤。
4. 如果实验允许，同时取阳性和阴性组织对照。阳性对照组织可以验证 IHC 实验流程的有效性和排除假阴性，阴性对照组织可以检查是否存在非特异性结合和去除假阳性。

## 2. 固定

### 2.1. 固定液选择

组织固定液一般用 10%中性福尔马林或 4%多聚甲醛（4%PFA）；柔软精细的组织（如卵巢、性腺）一般用 Bouin 固定液；Zenker 固定液可以提供良好的胞核保存效果，适合于造血和网状内皮组织样品的固定。

### 2.2. 固定方法

#### （1）浸泡固定

浸泡固定是最常见的固定方式，小组织可以直接放入装有固定液的容器中浸泡。固定液用量应是组织体积的 10 倍以上。

#### （2）注射、灌注固定

对于动物实验标本的固定，一般采用注射、灌注固定，以达到更快速、均匀的固定。若使用灌流固定，组织取样后，还需使用固定液继续固定 18-24 小时，切片后无需再固定。

#### （3）冷冻固定

冷冻组织可以通过组织浸入液氮/异戊烷或将样本埋入干冰的方式制备。检测磷酸化等翻译后修饰时，常使用速冻方式。若使用异戊烷等速冻固定新鲜组织，切片后需要用 4°C 预冷的 PFA 或甲醇固定 10 分钟。

#### （4）蒸气固定

比较小而薄的标本可用钒酸或甲醛蒸气固定。主要用于血液、细胞涂片以及某些薄膜组织的固定。具体方法：在有盖的培养皿内滴入 1-2%钒酸水溶液 3 滴，将涂片放入其中，固定 30 秒到 1 分钟左右，立即水洗后进行染色。

#### （5）微波固定



将组织块进入固定液中，置于医用微波仪中，经微波作用加快组织固定的方法，称为微波固定法，常用于脑组织固定。经微波固定的组织具有收缩较小、核膜清晰、染色质均匀等特点，但必须严格控制微波固定的时间和温度。

## 2.3. 固定时间

对于大多数样本，使用 4%PFA，室温固定 18-24 小时较为合适。对于一些脂肪含量较高的组织，为更好地获得脂肪瘤或分化良好的脂肪肉瘤切片，建议固定时间延长至 48 小时。固定不足可能会导致边缘染色，固定过度可能会掩盖表位，有些时候即使进行抗原修复也无法检测到信号。

## 2.4. 固定步骤

1. 使用锋利的刀、剪切取组织块，组织块的厚度约为 0.2-0.3cm，大小 1.5cm×1.5cm×0.3cm 为宜。若不能立刻进行固定，先使用生理盐水浸润过的纱布包裹组织。
2. 取好的组织（1 小时内），放入含 10 倍体积的 4%PFA，室温固定 18-24 小时。
3. 组织固定后，流水冲洗数小时或过夜。使用含苦味酸固定液固定的需用酒精多次浸洗。使用酒精或酒精混合液固定的组织，可不洗涤。
4. 采用梯度乙醇脱水，即从较低浓度乙醇开始，逐渐替换到无水乙醇。从 30%或 50%乙醇开始，依次经 70%、80%、95%乙醇进行脱水，各 1-2 小时；再放入无水乙醇 I、无水乙醇 II 脱水，各 30 分钟-1 小时。如不能及时进行各级脱水，组织可以放在 70%酒精中保存。脱水过程必须彻底。
5. 无水乙醇和二甲苯等量混合液浸渍 15-30 分钟，再放入二甲苯 I、二甲苯 II 浸渍，各 15 分钟（至透明为止）。透明剂的浸渍时间根据组织块大小及组织部位进行调整。

## 3. 浸蜡与包埋

### 3.1. 包埋温度

石蜡包埋的温度建议不超过 60°C，否则会使石蜡聚合物降解而变硬变脆。包埋时要先倒石蜡后放组织，包埋后建议自然冷却。

### 3.2. 包埋方向

对于多数平坦的组织，通常放置于包埋底模中央，最大横切面与蜡块最大横径保持一致。动脉、静脉、输卵管、输精管等管状组织，横切面向下放置。皮肤、肠、胆囊和其他上皮组织，上皮层垂直于包埋面放置，组织切面向下，有利于切片后在显微镜下观察到各个层次的



组织结构。线性的长组织，对角线方向放置。

### 3.3. 浸蜡与包埋步骤

1. 二甲苯和石蜡等量混合液浸泡 1-2 小时，再放入石蜡 I、石蜡 II 浸蜡，各 1-2 小时。浸蜡应在高于石蜡（56-58℃）熔点 3℃ 的恒温箱（60℃）中进行，以利于石蜡浸入组织内。
2. 根据组织大小和厚度，选择合适的包埋底模，揭开包埋盒上盖，在底模中加入少量熔化的石蜡，将样本放置在底模上，与底模接触的面即为切面。
3. 底模转移到冷冻台，将样本固定，用镊子轻轻按压样本，保证切面处于同一平面，注意居中包埋。
4. 放置组织包埋盒，继续加蜡，观察包埋盒下方是否有气泡，若有气泡，可将包埋盒掀起排出气泡。
5. 在冷冻台上冷冻数分钟脱模，将包埋盒四周多余的蜡刮干净即可。包埋后的蜡块应质地均匀、无气泡，组织位于蜡块中心且距边缘 >2mm。

## 4. 切片

### 4.1. 切片步骤

1. 包埋好的蜡块，夹在切片机的夹物台上，调整切片厚度为 10-20um 进行粗修，粗修时可以用旧刀片。
2. 经过粗修后的蜡块置于冰盘或冰箱内冷冻 30 分钟左右，蜡块温度不宜过低。
3. 切片前更换新的刀片，冷冻好的蜡块开始进行切片，调整切片厚度为 3-5μm。
4. 先缓慢转动切片机，使蜡块慢慢接近刀座，快切到蜡块时，再快速转动切片机，直到带出蜡带。摇转速度不可太急，通常以 40-50r/min 为宜。
5. 切成的蜡带到 20-30cm 长时，用毛笔轻轻将蜡带挑起，在凉水中展开，小镊子轻轻地将连在一起的切片分开。
6. 打开水浴锅，使水温维持在 40-45℃。
7. 用洁净的载玻片将分开的切片捞起，放至水浴锅中，使之充分展开。
8. 另取洁净的载玻片，快速捞起展开的切片，使其位于切片 1/3 处，另一端（磨边，粗糙的一端）磨面上标记或贴上标签，放于切片架上。
9. 将切片置于烤片机或 65℃ 烘箱内烤片 1-2 小时。

### 4.2. 切片储存

石蜡包埋的组织块和完成免疫染色的切片可室温保存。未完成免疫染色的切片建议时使

用自封袋封存，暂时置于-20℃冰箱，为避免储存过程中抗原免疫反应性降低，建议切片完成后一周内完成后续染色分析。

### 4.3. 石蜡切片的常见问题

常见问题	原因	解决方法
切片上卷且无法形成连续蜡带	刀片不够锋利	重新磨刀
	蜡块四周留蜡边过少	重新包埋或对蜡块四周进行融化，再放入包埋框中补蜡
	蜡块硬度过大或黏度不够	适量加入蜂蜡或换熔点较低的石蜡重新包埋
	刀与蜡块角度不对	调整切片刀与蜡块的角度
切片弯曲无法形成直带	蜡块四边不平行，不整齐	反复修平对称
	切片刀口和蜡块不平行	调整蜡块夹持器
	切片刀各处锋利度不一致	移动刀口位置，更换至锋利处
切片上出现裂纹 	刀刃有小缺口或不整齐	刀刃有缺口，可更换刀片位置或重新磨刀；若缺口过多或不平整，应在磨刀石上垂直刀锋轻磨几次，再按常规方法磨刀
	组织中含有较硬物质	不宜使用该组织进行切片
	包埋过程中石蜡冻结速度过慢	包埋时，通常在蜡块周围凝结一层后，即可将其放入冷水中加快冻结
切片厚度不均匀	切片机使用不当或刀刃磨损扬中	确保切片机操作正确，定期检查刀刃磨损情况，及时更换刀片

## 5. 脱蜡水化

### 5.1. 脱蜡水化步骤

1. 将切片依次置于二甲苯 I、二甲苯 II 中浸泡，每次 20 分钟。以溶解和去除切片上的石蜡。也可以根据脱蜡情况，适当调整脱蜡时间。
2. 将切片依次置于无水乙醇 I、无水乙醇 II，95% 乙醇、80% 乙醇和 70% 乙醇中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
3. 在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。

## 5.2. 注意事项

脱蜡过程必须彻底，以确保石蜡被完全去除。否则，残留的石蜡会影响后续的抗原检测和染色。

避免干燥：在整个脱蜡水化过程中，应确保切片始终保持在湿润的状态，避免干燥。干燥会导致非特异性抗体结合，从而出现高背景染色。

## 6. 抗原修复

醛类固定的组织，固定过程中形成的亚甲基桥会将蛋白交联起来，掩盖掉抗原位点。在免疫组化染色前需要进行抗原修复步骤，以破坏亚甲基桥，暴露出抗原位点，使抗体能够与之结合。用于抗原修复的方法分别为热诱导抗原修复和酶诱导抗原修复。一般情况下冰冻切片不需要做抗原修复，如使用醛类试剂（如 PFA 等）进行固定的冰冻切片，可尝试使用酶修复。

	热诱导的抗原表位修复	蛋白水解酶诱导的抗原表位修复
分类	微波热修复、水浴热修复、高压热修复	胰蛋白酶修复、胃蛋白酶修复、蛋白酶 K 修复
优势	抗原表位的修复更温和，参数更可控	适用于较难修复的抗原表位
缓冲液及 PH	通常使用 PH6.0 的柠檬酸盐缓冲液和 PH9.0 的 Tris-EDTA 缓冲液	酶的中性缓冲液，PH 通常为 7.4
温度	约 95℃	通常为 37℃
孵育时间	10-20 分钟	10-15 分钟
注意事项	微波炉加热可能会导致抗原修复不均匀。剧烈沸腾会导致脱片	酶修复有时会破坏切片的形态-浓度和时间需要优化

### 6.1. 抗原修复方法

#### 1. 微波热修复

常用修复液有 Tris-EDTA (PH9.0)、EDTA (PH8.0) 或者柠檬酸钠 (PH6.0) 修复缓冲液，免疫组化抗原修复盒加入适量抗原修复液，放入切片，置于微波炉中火煮沸 5 分钟，关火 1 分钟，再中火加热 5 分钟，放置室温自然冷却，30-40 分钟后，即可进行下一步实验。

#### 2. 水浴热修复

电炉或水浴锅中加热 Tris-EDTA (PH9.0)、EDTA (PH8.0) 或者柠檬酸钠 (PH6.0) 修复缓冲液至 95℃左右，放入切片加热 10-15 分钟，放置室温自然冷却，30-40 分钟后，即可进行下一步实验。

#### 3. 高压热修复



在不锈钢高压锅中加入适量 Tris-EDTA (PH9.0)、EDTA (PH8.0) 或者柠檬酸钠 (PH6.0) 修复缓冲液, 加热至沸腾, 放入切片, 锁紧锅盖, 关闭压力阀, 继续加热。当温度达到 121°C 计时 1.5-2 分钟, 停止加热, 室温冷却, 本方法适用于较难检测或核抗原的修复。

#### 4. 酶修复

常用的消化酶有 0.1% 胰蛋白酶和 0.4% 胃蛋白酶等。胰蛋白酶和切片预热至 37°C, 消化时间约为 10-40 分钟, 对于某些陈旧的组织可适当延长消化时间; 胃蛋白酶 37°C 消化 10 分钟, 放置室温自然冷却。

## 6.2. 注意事项

1. 热修复推荐使用高压热修复, 可以尝试 110°C 修复切片 15 分钟, 修复后要自然冷却, 避免放入冷水中, 以免温度骤降引起脱片。
2. 对于质地比较脆, 在高温高压修复过程中易脱片的组织 (如骨, 软骨); 或组织本身切面比较小, 如坐骨神经, 可以选择微波修复。
3. 对多数醛类固定 (18-24h) 的石蜡切片, 建议在开始染色前先进行抗原修复。对醛类固定 (18-24) 的冰冻切片, 可以尝试使用酶进行抗原修复。
4. 不建议使用家用微波炉进行热修复, 因为常见的热点和冷点问题会导致修复不均匀, 由于没有加压环境, 此方法的修复时间通常较长, 极易导致切片脱片, 因此科研用微波炉更加合适。
5. 酶修复有时会损坏组织的形态结构, 因此需要优化酶浓度和孵育时间。
6. 热修复加热后建议自然降温。当高温中的抗原蛋白分子链脱离了束缚或联结, 需要有一个自然的降温过程让其慢慢恢复到原来的形态和构型, 如果采用冰块或冷水强行降温, 则可能松开后的蛋白分子肽链骤冷固定, 无法恢复原有的构型, 达不到预想的效果。
7. 建议使用过量的抗原修复液进行抗原修复。抗原修复大多是高温状态, 液体容易挥发干涸, 造成不可逆的切片损伤, 因此, 在做抗原修复时要使用过量的抗原修复液, 延缓液体挥发, 将抗原修复进行彻底。勿让载玻片变干。
8. 没有一种抗原修复方法适合所有抗原, 建议尝试不同抗原修复方法以获得理想实验结果。

## 6.3. 抗原修复步骤

1. 柠檬酸盐 (PH6.0) 修复液: 将切片浸入 1× 柠檬酸盐修复液, 再放入微波炉中加热直至沸腾, 继续保持亚沸腾温度 (95-98°C) 10 分钟, 在实验台上冷却切片 30 分钟。
2. Tris-EDTA (PH9.0) 修复液: 将切片浸入 Tris-EDTA (PH9.0) 修复液中, 再放入微波炉中加热至沸腾, 继续保持亚沸腾温度 (95-98°C) 18 分钟, 在实验台上冷却切片 30 分钟。
3. EDTA (PH8.0) 修复液: 将切片浸入 1 X EDTA 修复液, 再放入微波炉中加热直至沸腾; 继续保持亚沸腾温度 (95° -98° ) 15 分钟。无需冷却。
4. 胃蛋白酶: 37° C 消化 10 分钟。



## 7. 封闭

### 7.1. 封闭方法

免疫组化实验通常需要多个封闭步骤，以降低背景信号并减少假阳性。主要包括蛋白封闭、生物素封闭、内源酶封闭和自发荧光封闭，需要根据实验试剂使用情况判断需要的封闭方法。

#### 7.1.1. 蛋白封闭

使用血清或 BSA 进行封闭对于防止抗体与组织或 Fc 受体发生非特异性结合至关重要。血清是一种常见的阻断剂，因为它含有可与非特异性位点结合的抗体。推荐使用与二抗种属相匹配的血清。如二抗是 Donkey Anti-Goat IgG(H+L)-HRP，封闭液要选驴血清。

#### 7.1.2. 生物素封闭

如果使用基于生物素的检测系统，建议对内源性生物素进行封闭。生物素存在于许多组织中，特别是肾、肝和脑组织中。生物素的封闭通过用抗生物素蛋白预孵育组织的方式进行，然后预孵育的组织与生物素一起孵育以封闭抗生物素蛋白分子上的其他生物素结合位点。

#### 7.1.3. 阻断内源性酶

##### (1) 过氧化物酶封闭

使用辣根过氧化物酶（HRP）二抗进行检测时，内源性过氧化物酶活性可能会导致非特异性或高背景染色。诸如肾脏、肝脏和含有红细胞的组织（例如维管组织）含有内源性过氧化物酶。通常情况下，在 3%过氧化氢中孵育 10-15 分钟，即可实现封闭。

##### (2) 碱性磷酸酶封闭

使用碱性磷酸酶（AP）二抗进行检测时，内源性 AP 可产生高背景。它存在于肾脏、肠道、成骨细胞、淋巴组织和胎盘中，冰冻组织中的 AP 活性较高。在一抗孵育前，建议将左旋咪唑和显色底物一起加入，用于封闭内源 AP。

#### 7.1.4. 自发荧光封闭

使用荧光二抗检测时，组织可能自发荧光，导致高背景。组织固定可以诱导自发荧光，特别是在使用醛类固定剂（如福尔马林）时，该固定剂会与胺反应，发出非特异荧光。推荐使用添加 1%的 BSA 和终浓度为 0.3M 甘氨酸的封闭液，以淬灭醛基引起的自发荧光。



## 7.2. 封闭步骤

1. 先用免疫组化笔在切片上画圈，不要碰到或太靠近组织。
2. 用洗涤缓冲液 TBS 冲洗切片 2 次，持续 5 分钟。画圈后及时冲洗，避免干片。
3. 甩干，滴加 3% 过氧化氢，室温孵育 10 分钟（荧光检测可跳过此步）。
4. 用洗涤缓冲液 TBS 溶液冲洗 3 次，每次 5 分钟。。
5. 在每个切片上滴加 100–400  $\mu$ l 封闭液（含 10%正常血清及 1%BSA 的 TBS 溶液），室温封闭 1-2 小时。如果用荧光抗体检测，封闭液可换成含 10%正常血清+1%BSA+0.3M 甘氨酸的 TBS 溶液。
6. 甩干，除去切片上的液体（请勿冲洗），然后使用纸巾擦拭玻片周围（注意不要干片）。

## 8. 一抗孵育

### 8.1. 一抗选择

#### 8.1.1. 靶标蛋白表达量

根据靶标蛋白的表达量高低，选择直标抗体或是间标抗体。直标抗体适用于高表达的抗原，不需要二抗，没有额外的孵育步骤，也消除了二抗带来的背景染色，增加了多重染色实验设计的灵活性。间标抗体增加了二抗孵育环节，但起到了信号放大的作用，多重染色时，需要选择不同宿主的一抗。

#### 8.1.2. 样本种属

抗体宿主避免选择和样本同样种属，如样本是小鼠，则抗体尽量选择兔抗，而不要选择鼠抗。

#### 8.1.3. 验证和克隆性

优先选择经 IHC 验证的、特异性高、亲和力强的抗体，优先选择经敲除验证的单克隆抗体。

#### 8.1.4. IHC 缩略词

IHC-P: 免疫组织化学-石蜡切片，组织一般浸泡固定，切片前样品包埋在石蜡中，染色前需



要对切片进行脱蜡。

IHC-Fr: 免疫组织化学-冰冻切片, 组织一般是浸泡固定, 在切片前要冷冻处理。

IHC-FoFr: 免疫组织化学-灌注固定冰冻切片, 组织进行灌注固定, 在切片前要冷冻处理。

IHC-FrFI: 免疫组织化学-漂片/自由浮动式切片, 组织可能是浸泡固定或者灌注固定。样品在切片前要冷冻处理。样品漂浮在溶液中进行免疫染色。

IHC-Wmt: 免疫组织化学-整体染色, 组织一般是浸泡固定, 组织没有切片, 免疫染色在小块组织上进行, 通常是胚胎组织。类似于免疫细胞化学, 但样本通常要大得多。

## 8.2. 一抗孵育步骤

1. 进行初次实验时, 根据抗体说明书选择合适的抗体稀释比, 用适当的抗体稀释液 (用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释) 稀释一抗。
2. 取 100-400  $\mu$ l 稀释好的一抗, 均匀滴加在封闭好的切片上, 放入湿盒, 室温孵育 1 小时或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

## 9. 二抗孵育

对于间接检测, 二抗是成功显示一抗分布的关键。二抗可以是酶标记的抗体 (过氧化物酶 HRP、碱性磷酸酶 AP)、荧光素标记的抗体 (FITC、PE、Alexa-Fluor) 或生物素标记的抗体。

### 9.1. 二抗选择

#### 9.1.1. 二抗物种

二抗反应性应与一抗的宿主保持一致。如一抗是 GAPDH Mouse Monoclonal antibody, 则二抗应该选 Goat Anti -Mouse IgG(H+L)-HRP。HRP 二抗, 是使用最多的二抗, 可以使用含 1% BSA 的 TBS 作为稀释液。如果仍遇到高背景染色, 可以增加 BSA 浓度。

#### 9.1.2. 预吸附处理

二抗的预吸附处理可以减少非特异背景。例如, 在对来源于人的组织或细胞进行染色时, 建议使用经人血清预吸附处理过的二抗。

#### 9.1.3. F(ab')<sub>2</sub> 片段化二抗

对于富含 Fc 受体的组织 (如脾脏、胸腺、血液), 可以优先使用 F(ab')<sub>2</sub> 片段化二抗。



F(ab')<sub>2</sub> 片段化二抗较小，更容易穿透组织，特别适用于多重 IHC 染色。

#### 9.1.4. 荧光二抗

荧光二抗，需要在暗盒中进行二抗孵育，避免光淬灭现象发生。如果实验允许，建议添加不加一抗只加二抗的对照。多重染色时，应确保不同荧光二抗之间的光谱重叠最少。

### 9.2. 二抗孵育步骤

1. 根据抗体说明书选择合适的稀释比，用适当的抗体稀释液（用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释）稀释 HRP 二抗。
2. 取出切片，将切片放入洗涤缓冲液 TBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。
3. 甩干、擦净，取 100-400  $\mu$ l 稀释好的二抗，均匀滴加在切片上，放入湿盒，室温孵育 1 小时（荧光二抗需避光）。

## 10. 染色

染色方式一般有两种，酶显色染色和荧光染色。DAB 是最常用的酶显色试剂盒，用来检测 HRP 标记的二抗。

### 10.1. 染色方法

#### 10.1.1. DAB 显色

DAB 显色主要通过 HRP 催化 DAB（3,3'-二氨基联苯胺）与双氧水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应，使 DAB 被氧化形成棕黄色的沉淀。这种产物不仅色泽鲜明，易于观察，而且具有高度的稳定性和持久性，是目前免疫组化中最常用的显色方法。

#### 10.1.2. AEC 显色

AEC 是 3-氨基-9-乙基咔唑，在过氧化物酶 HRP 的催化下，ACE 被氧化成稳定的红色沉淀。该红色产物不溶于水，溶于有机溶剂，必须在水溶性介质中复染和封片。



### 10.1.3. BCIP/NBT 显色

BCIP/NBT 是碱性磷酸酯酶 AP 的常用底物。在碱性磷酸酯酶 AP 的催化下，BCIP 会被水解产生强反应性的产物，该产物会和 NBT 发生反应，形成深蓝色至蓝紫色的沉淀。

### 10.1.4. Fast-red 固红显色

Fast-red（固红）是 AP 的常用显色剂。在碱性磷酸酯酶 AP 的催化下，Fast-red 会产生一种红色反应产物，可以使用明场或荧光显微镜观察到。

## 10.2. 染色步骤

1. 将切片在洗涤缓冲液 TBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。（如荧光检测，需避光，即可进行核复染）
2. 甩干，配制 DAB 染色工作液，A 液和 B 液按 20: 1 体积比混匀。滴加 50-100 $\mu$ l 完全覆盖切片组织（根据组织大小调整用量），孵育 3-10 分钟，显色时间不固定。
3. 镜下观察，控制显色时间，观察到出现特异性染色，即可用去离子水冲洗，终止显色。

## 11. 复染和封片

### 11.1. 复染方式

为了形成细胞轮廓，更好的定位目标蛋白，可以进行核复染，核复染的颜色应尽可能与检测抗体的颜色区分开来。核复染试剂的选择取决于样品的染色方式：酶显色染色和荧光染色。

#### 11.1.1. 酶显色染色

苏木精是辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 显色体系中最常用的核复染试剂。苏木精的蓝色和 DAB（棕色）、AEC（红色）、固红（红色）等显色剂可以形成很好的对比，但它不适用于荧光检测。

#### 11.1.2. 荧光染色

DAPI 是 IHC 荧光染色中最常用的核荧光染料。DAPI 深蓝色，最好与非蓝色的荧光染



料联用。

## 11.2. 封片

在保存和观察被固定和染色的组织和细胞过程中，必须联合使用封片剂和盖玻片。

DAB 不溶于有机溶剂，如果染色后的切片不经脱水处理，可以在 DAB 染色后用水溶性封片剂来封片。但大多数选用 DAB 的实验，更倾向于使用经乙醇和二甲苯脱水处理的切片，并选用树脂这类非水溶性封片剂来封片。

当使用 AEC 和固红显色时，需搭配使用水溶性封片剂，并显色后的切片不要进行脱水处理，直接封片。

荧光染色建议使用水溶性封片剂。水溶性封片剂都包含防淬灭剂，在观察染色结果时，可以减弱荧光素的淬灭。

## 11.3. 复染和封片步骤

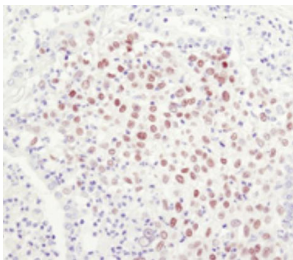
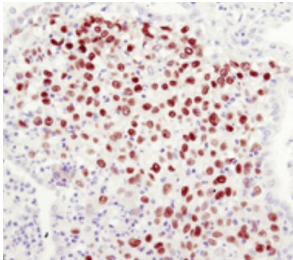
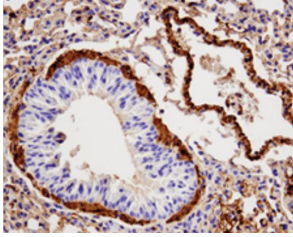
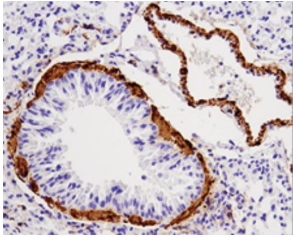
### 11.3.1. 酶显色染色复染步骤

1. 甩干、擦净，将切片置于苏木素染色液中，室温孵育 2-5 分钟，用去离子水将其从切片上清洗干净。
2. 将切片置于分化液 1-2 秒，用去离子水清洗切片 2 分钟。
3. 将切片置于返蓝液中 2-5 分钟，至样本呈蓝色。如果染色过浅可重复染色，如果染色过深可使用盐酸进行分化。
4. 取出切片，在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。
5. 脱水：切片依次置于 70% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。然后将切片分别置于二甲苯 I、二甲苯 II 中各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
6. 从二甲苯中取出切片，室温晾干后，用中性树胶封片，显微镜下镜检。

### 11.3.2. 荧光染色复染步骤

1. 在切片上滴加 50-100 $\mu$ l 的 DAPI-TBS，放于湿盒中室温孵育 5-10 分钟（避光）。
2. 将切片在 TBS 中漂洗 2 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡（避光）。
3. 向盖玻片上滴加一滴水性封片剂，确定样品在盖玻片和载玻片之间。
4. 用指甲油密封盖玻片防止变干，并移至荧光显微镜下观察。

## 12. 免疫组化常见问题解析

结果	原因	解析
<b>无信号或信号弱</b>  	检测组织中不存在目的蛋白	设置文献中或抗体供应商推荐的阳性对照
	组织中目标蛋白丰度不够	采用信号放大步骤, 将信号最大化
	蛋白位于核内, 切片太厚, 抗体不能进入细胞核	封闭前增加通透步骤, 在玻片上滴加 0.1% Triton X-100 in PBS, 室温通透 10 分钟。
	醛类固定, 改变了抗体识别的表位	进行抗原修复, 缩短切片固定时间
	脱蜡不充分	延长切片的脱蜡时间, 使用新配制的二甲苯
	一抗和二抗不兼容	使用正确的二抗
	一抗/二抗失效, 信号放大试剂盒失去活性	设置阳性对照, 以确保一抗/二抗和检测试剂的有效性
	二抗未避光 (荧光检测时)	始终保证二抗处于避光状态, 如避光保存和避光孵育
	透化作用破坏了膜蛋白 (跨膜蛋白检测时)	使用温和的表面活性剂, 如在玻片上滴加 0.2% Tween 20 in PBS, 室温通透 10-30 分钟
	抗原修复操作不当或遗漏	参照抗体说明书进行正确的抗原修复操作
抗体浓度低, 孵育时间短	提高抗体浓度, 4°C 孵育过夜	
PBS 缓冲液被细菌污染	使用新配制的无菌 PBS	
<b>高背景或非特异染色</b>  	荧光检测时, 福尔马林或多聚甲醛固定剂, 引起自发荧光	福尔马林/PFA 通常自发绿色光谱, 尝试使用红色光谱或红外范围的荧光基团
	没有封闭内源性酶活性	对 AP 使用左旋咪唑 (2mM) 对过氧化物酶使用 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 对生物素, 使用 Avidin 生物素阻断试剂
	没有对非特异性结合进行封闭或封闭不充分	延长封闭时间, 推荐使用二抗宿主的 10% 血清的 1% BSA in PBS 溶液进行封闭
	一抗/二抗浓度过高	测试抗体的最佳浓度, 梯度稀释抗体, 4°C 孵育
	孵育温度过高	4°C 孵育切片

	二抗存在非特异性结合	使用不加一抗的二抗对照
	洗涤不充分	用 PBS 或 TBS 充分洗涤组织，添加表面活性剂，如 0.1% Triton，增加洗涤时间
	底物过多	稀释底物，或缩短底物孵育时间
	切片变干（观察切片，如果边缘比中心背景高，可能是切片已经变干）	保持切片湿润，避免变干，使用湿盒孵育切片
	固定延迟导致抗原弥散	组织取样后立即完成固定
非特异性染色	切片变干	保持切片湿润，避免变干，使用湿盒孵育切片
	脱蜡不充分	延长切片的脱蜡时间，使用新配制的二甲苯
	抗体宿主种属和染色组织种属一样	更换其他宿主的抗体，或用 F(ab) 片段二抗封闭，或用直标一抗
	没有封闭内源性酶活性	对 AP 使用左旋咪唑（2mM） 对过氧化物酶使用 3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 对生物素，使用 Avidin 生物素阻断试剂
	一抗/二抗浓度过高	降低抗体浓度或缩短孵育时间
	一抗可能结合其他抗原的表位	使用特异性更高的单克隆抗体
组织形态不清晰或受损	组织自溶	选择新鲜组织，缩短组织采取和固定之间的时间
	组织未充分固定	1. 延长固定时间 2. 提高固定剂与组织比例 3. 切割更小块的组织，浸泡固定
	组织切片从载玻片上脱落（冰冻切片更常见）	延长固定时间 尝试更换固定剂 使用新鲜制备的载玻片贴片时，组织切片和载玻片保持温度差 固定前风干切片几分钟
	组织切片撕裂或折叠，或切片下方可见气泡	使用锋利的刀片重新切片或调整切片速度，研究不受影响的组织区域
	冷冻切片产生冰晶	尝试石蜡包埋，重新切片组织进行速冻或蔗糖脱水
	切片变干	保持切片湿润，避免变干，使用



		湿盒孵育切片
	抗原修复方法可能过于苛刻	尝试优化抗原修复条件