

# 免疫组化（IHC）实验方案

## 石蜡切片和冰冻切片

实验人员可使用移液器手动添加试剂，如果条件允许，也可利用自动和半自动系统实施实验方案。

为了避免因组织干透而导致的非特异性结合和高背景染色问题，孵育需要在湿盒中进行。在带密封盖的浅塑料盒底部垫上湿纸巾即可做成湿盒，切勿让载片接触纸巾，保持载片水平放置，避免试剂流出。

将塑料移液管切割成适合孵育室的长度，然后把这些移液管按两根一组粘在孵育室底部，每组间隔约 4 cm。这样可抬高载片平面，使载片不会接触到湿纸巾。

一抗和二抗的稀释倍数列于说明书数据表中，您也可通过预实验进行梯度稀释来确定最适宜的稀释倍数。建议您根据实验结果对稀释倍数进行适当优化。

酶偶联物相关方法中，辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AP）是最常用的两种酶，这些酶适用于多种显色底物。

## 石蜡切片，请在开始免疫染色之前先执行抗原修复。

### 1. 抗原修复步骤：

可选一，微波法：切片脱蜡之后，将组织切片置于盛满 EDTA (PH9.0) 抗原修复液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复（根据情况，也可以选择其他 PH 的抗原修复液），此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

可选二，高压法：切片脱蜡之后，将组织切片置于盛满 EDTA (PH9.0) 抗原修复液的修复盒中（根据情况，也可以选择其他 PH 的抗原修复液），将修复盒放入高压锅中加热至沸腾。盖上压力阀至喷汽后持续 1—4 分钟。自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2. 如果使用 HRP 偶联物进行检测，需要封闭内源过氧化氢酶。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可抑制内源性过氧化氢酶的活性，达到降低背景染色的目的。为了验证这一现象，实验前，可先用 DAB 底物进行显色。如果组织变为棕色，说明存在内源性过氧化氢酶，而封闭步骤很有必要。  
**注意特殊组织：**对于肝脏、肾脏、脾脏等血细胞含量丰富的组织，其内源性过氧化氢酶活性尤其高。处理这类样本时，可能需要适当延长封闭时间或提高双氧水（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）浓度，以确保封闭彻底。

一般封闭内源过氧化氢酶步骤可以有 2 种选择：

选择 1：在蛋白封闭之前进行封闭内源过氧化氢酶步骤，该选择是一个常规标准操作步骤。该步骤的好处是，一抗之后进行 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理，不会产生由于封闭剂（如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）可能

破坏一抗的结构，导致一抗从抗原上脱落或失活，从而出现目标信号显著减弱或完全消失（假阴性）的情况。但是氧化氢处理可能会修饰某些抗原表位，影响这些抗原与抗体的结合。

选择 2：在孵育一抗之后进行封闭内源过氧化氢酶步骤。该选择可避封闭剂（如  $H_2O_2$ ）影响这些抗原与抗体的结合问题。

一般情况下，先选择 1 方案，如果出现目标信号很弱，怀疑是过氧化氢损伤了抗原表位的情况，再进行优化选择 2 方案处理。

注：过氧化氢可使用 TBS 或水进行稀释。对于血液涂片或其它富含过氧化物酶的组织（见上述），建议使用甲醇溶液；用甲醇稀释过氧化物还有助于减少水溶液引起的对组织的损伤。对于其它组织，请使用 TBS 或水进行稀释。甲醇/过氧化氢溶液孵育会导致某些抗体-抗原的结合有所下降，其中细胞表面蛋白质尤为明显。如果使用 AP 或荧光检测，则可不需要封闭过氧化氢酶，封闭过氧化氢酶仅适用于 HRP 偶联物。

选择 1. 蛋白封闭前进行封闭内源过氧化氢酶步骤（可选步骤）：将载片置于含 3%  $H_2O_2$  的 TBS 溶液中孵育 15-25 分钟，需室温避光进行。

3. 在含 0.025% Triton X-100 的 TBS 溶液中洗涤载片两次并轻轻搅动，每次 5 分钟。  
含 0.025% Triton X-100 的 TBS 溶液可降低表面张力，使试剂轻松覆盖整个组织切片。该溶液还可溶解 Fc 受体并减少非特异性结合。推荐使用 TBS，而不推荐用 PBS，以便获得更加清晰的背景。
4. 使用含 10% 正常血清及 1% BSA 的 TBS 溶液室温封闭 2 小时。  
二抗可能会与组织中的内源性免疫球蛋白发生交叉反应，使用产生二抗宿主来源的非免疫血清预处理该组织可最大程度减弱此反应。  
在一抗孵育之前使用非免疫血清进行封闭可避免 Fc 受体与一抗和二抗的结合，此外，加入 BSA 能够减少疏水作用引起的非特异性结合。
5. 除去组织上的液体（请勿冲洗），然后使用纸巾擦拭载片周围。
6. 加一抗孵育（用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释）。  
将一抗稀释至抗体说明书推荐的浓度或预实验确定的最佳浓度，大部分抗体在 IHC 中的使用浓度为 0.5 - 10  $\mu\text{g/mL}$ 。  
一抗宿主应与所检测的组织来源不同，例如，如果使用小鼠组织，并且一抗也是来源于小鼠，则抗小鼠 IgG 二抗会与小鼠组织中的所有内源性 IgG 结合，并导致背景偏高。

如果遇到一抗来源与组织样本来源同一物种的情况时，强烈建议使用避免交叉反应的封闭液进行封闭，可以有效的解决背景高的问题。可以参考选择以下产品：

一抗鼠来源：产品货号：**A10025** [IHC/IF 封闭液（鼠源组织避免交叉反应专用款）](#)  
[辅助产品-](#)

一抗兔来源：产品货号：**A10045** [IHC/IF 封闭液（兔源组织避免交叉反应专用款）](#)  
[辅助产品-](#)

7. 在 4 °C 下孵育过夜。  
过夜孵育保证了抗体滴度较低或亲和力较弱的抗体充足的时间与抗原结合。无论抗体对其目的蛋白的滴度或亲和力如何，一旦组织达到饱和点，就无法结合更多抗体，孵育过夜可确保组织达到饱和。
8. 在含 0.025% Triton X-100 的 TBS 溶液中洗涤载片两次并轻轻搅动，每次 5 分钟。

选择 2. 一抗孵育后进行封闭内源过氧化氢酶步骤（可选步骤）：将载片置于含 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 TBS 溶液中孵育 15-25 分钟，需室温避光进行。

## 检测步骤

### 酶偶联物检测（HRP 或 AP 偶联的二抗）

1. 使用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释二抗，并将酶偶联二抗涂覆于载片上然后在室温下孵育 1 小时。
2. 在室温下用显色底物显色约 10 分钟。
3. 使用流动的自来水冲洗 5 分钟。
4. 复染（如果需要）。  
常用的复染剂有苏木精（蓝色）、核固红或甲基绿。使用荧光检测时，可使用 DAPI（蓝色）或碘化丙啶/PI（红色）。
5. 脱水、清洗、和封片。  
AEC、固红、INT 或任何其它水性色原底物都是醇溶性的，请使用合适的水性封片介质，不需要进行脱水处理和清洗。  
DAB、新品红、Vega Red、NBT、TNBT 等显色底物形成的沉淀物可以利用梯度乙醇脱水处理。使用合适的有机封片剂对切片进行封片。  
使用有机封片剂进行封片比水性封片剂封片折射率更佳，因而可呈现出更加清晰的显微图像。

**注：IHC 显色需要使用带有 Poly HRP 的二抗，推荐使用信号增强型免疫组化试剂盒，A10026，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2049851>；A10027，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2049852>；可增强 IHC 显色强度。**

### 荧光检测

1. 使用 1% BSA 的 TBS 稀释荧光基团偶联二抗，并覆盖于组织上。
2. 在室温下孵育 1 小时。  
为避免光漂白效应，这些操作应在黑暗中进行。
3. 使用 TBS 清洗 3 次，每次 5 分钟。
4. 用适合的封片剂进行封片，并盖上盖玻片。