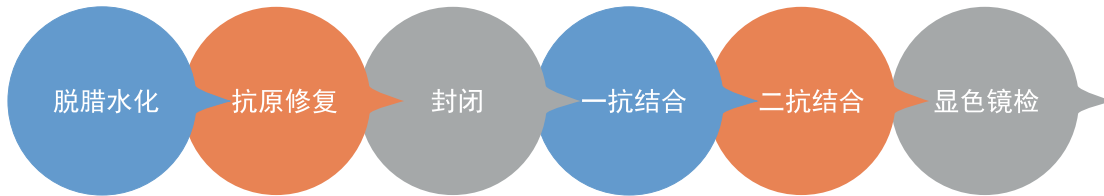




## IHC 原理、操作及注意事项

免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 是利用抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂 (荧光素、酶、金属离子、同位素) 显色来确定组织细胞内抗原 (多肽和蛋白质), 对其进行定位、定性及定量的一项技术。



IHC 的实验流程和方法总体不难, 但做出漂亮的染色结果却不容易, 所谓“细节决定成败”, 也正是 IHC 实验中尤为重要的关键点。那么“细节”主要是哪一些呢? 下面就为您一一道来。(以石蜡组织切片为例介绍)

### 一、标本固定

固定的目的除了使细胞内的蛋白质凝固, 减少或终止内源性或外源性细胞内分解酶的反应, 防止组织细胞自溶, 更是为了保存组织或细胞内的抗原性, 使抗原不失活, 不发生弥散。不同的抗原对固定液耐受程度不同, 因而要选择合适的固定剂。

现在常用的固定剂有中性甲醛液, 4% 多聚甲醛 - 磷酸盐缓冲液。有些固定剂对特殊组织有更好效果, 如苦味酸对于头皮、指甲固定有软化效果, Helly 固定液对于胰岛和垂体效果较好, PLP 固定液对于含糖组织抗原保存更好。

### 二、脱水、石蜡包埋和制片

脱水用梯度乙醇 (由低到高) 充分脱水, 对于一些易脆的组织 (如肝、脾等) 应减少高浓度酒精里的停留时间, 透明的时间也应该控制缩短。

对组织浸蜡时, 一般选用 56°C ~ 58°C 熔点的石蜡, 浸蜡温度最好不超过 60°C, 防止抗原的损失。

包埋时应选好角度动作迅速, 以便切片时有完整的切面。切片时则要该快则快该慢则慢, 及时检查刀片是否出现缺口, 防止蜡带出现划痕。

### 三、脱蜡和水化

使组织恢复到固定后的正常状态暴露出抗原以方便与一抗结合。若脱蜡和水化不全易出现局灶性反应和浸洗不全, 而产生非特异性背景着色。

### 四、抗原修复

由于组织在甲醛或多聚甲醛固定过程中, 发生了蛋白之间交联及醛基的封闭作用, 从而掩盖抗原决定簇。通过抗原修复, 使得细胞内抗原决定簇重新暴露, 提高抗原检测率。

常用的修复方法从强到弱一般分为三种, 高压加热修复、微波修复、胰酶修复。其中高压加热修复这一方法简便易操作, 效果也更好。

使用高压加热修复对于修复温度和时间的把握十分重要, 温度越高修复时间越短, 温度与修复时间呈负相关。修复结束后注意室温冷却, 让蛋白自然复性。其次, 尽量使用过量的抗原修复液, 防止高温液体挥发干涸, 对切片造成不可逆的损伤。



## 五、灭活内源性过氧化物酶和生物素

在传统的 ABC 法和 SP 法中，免疫组化反应容易受到内源性过氧化物酶和生物素的干扰，必须用过氧化氢和卵白素等进行灭活和封闭。

灭活内源性过氧化物酶一般用 3% 过氧化氢灭活约 10 min 左右，用甲醇配制过氧化氢更适合于保护抗原和固定组织。

## 六、血清封闭

为了防止一抗与组织的非特异性结合，造成假阳性，一般会采用 BSA、羊血清等封闭这些位点，封闭血清一般是和二抗同一动物来源的，室温封闭 10-30 min。

## 七、一抗和二抗浓度和孵育时间

不同的一抗浓度，孵育时间和温度等对染色结果往往有着较大的影响。在 4℃ 下，反应缓慢，背景较浅；而 37℃ 反应较快，时间较短；室温介于前两者之间，选择室温孵育有助于实验流程的便利，同时也适用于较多样本的检测。二抗一般室温孵育 30 min。

## 八、切片清洗（浸洗、冲洗和漂洗）

为了防止一抗、二抗等残留而引起非特异性染色，适当地加强清洗尤其重要，建议使用洗瓶冲洗 30s X 3 次，而一抗孵育后可用 TBST 单独清洗。清洗中要注意单独冲洗，防止交叉反应造成污染，同时温和冲洗，防止脱片。TBS 的 pH 和离子浓度建议用为 7.6-8.0，浓度是 0.01 M。中性及弱硷性条件有利于免疫复合物的形成，而酸性条件则有利于分解；低离子强度有利于免疫复合物的形成，而高离子强度则有利于分解。

## 九、DAB 显色

背景的深浅和特异性染色的深浅都可以由 DAB 孵育条件决定。DAB 显色时间不是固定的，主要由显微镜下控制显色时间，到出现特异性染色较强而背景着色较浅时即可冲洗。

DAB 显色时间很短（如几秒或几十秒）就出现很深的棕褐色，这很可能说明一抗浓度过高，需要下调抗体浓度；若很短时间就出现深背景，有可能非特异性蛋白封闭不全，需要延长封闭时间；DAB 显色时间很长（如超过十分钟）才出现阳性染色，可能是一抗体浓度过低或者封闭时间过长。

对于较弱的 DAB 颜色有时可以采取增强方法。如加入金属离子：硫酸铜、六亚甲基胺银、氯化钴、硫酸镍铵、氯化镍及咪唑等。下图就是 DAB 显色后浸泡硫酸铜溶液后的结果。

## 十、复染

免疫组化染色后必须进行复染，以衬托出组织形态结构。目前常用 Mayer's 苏木素复染，一般 2 min 分钟左右，DAB 在核蛋白着色则可适当缩短复染时间，然后氨水或 pH 8.0 的 TBS 返蓝。

## 十一、封片

为了持久保存，通常会使用中性的树胶等封片。封片过程中注意斜靠盖玻片防止气泡产生影响观察。如果树胶较粘稠可以加入适量二甲苯稀释，使树胶在封片中能够快速扩散开。在脱水过后建议采取湿封，即组织上还残留二甲苯时进行封片，同时注意在通风厨中操作。这样有助于气泡排除干净，不影响后续镜检。