

HUABIO

Antibody | Protein | ELISA Kit | Service

杭州华安生物技术有限公司

☎ 0571-88062880 🖨 0571-88060400

✉ sales@huabio.cn 🌐 www.huabio.cn

📍 杭州市钱塘区白杨街道6号大街452号高科技企业
孵化园区2号楼16层



扫码关注公众号

 华安生物
H U A B I O

免疫组化(IHC)实验手册

Immunohistochemistry (IHC) Handbook

• 从切片制作到问题排查
让研究变得简单



01	免疫组化技术概述.....01-02	04	结果分析与判读标准.....11
	1.1 技术原理与基础01		4.1 显微镜观察要点11
	1.2 免疫组化的应用价值.....01		4.2 结果判读标准.....11
	1.3 实验类型选择.....01-02		4.3 对照设立要求.....11
	1.4 实验流程概述.....02		
02	石蜡组织样本制备标准化流程.....02-05	05	问题排查与解决方案详解.....12-14
	2.1 样本固定标准化操作.....02-03		5.1 染色质量问题深度分析.....12-13
	2.2 脱水、透明与浸蜡04		5.2 组织处理问题.....13-14
	2.3 包埋与切片质量控制05		5.3 操作流程问题.....14
03	免疫组化染色详细步骤.....06-10	06	高级技巧与优化建议.....15
	3.1 脱蜡与水化标准操作.....06		6.1 难检测抗原优化15
	3.2 抗原修复.....06-07		6.2 多重免疫组化.....15
	3.3 内源性酶灭活与封闭08		6.3 特殊组织处理.....15
	3.4 血清封闭.....08		
	3.5 一抗孵育.....08	07	总结.....15
	3.6 二抗孵育.....09		
	3.7 显色与复染.....09-10		
	3.8 脱水、透明与封片10		

免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）是一种利用抗原-抗体特异性结合原理，通过显色或荧光标记体系对组织或细胞中的特定抗原进行**定位、定性和半定量**分析的技术。

自20世纪中叶以来，IHC已成为基础生物学研究与临床病理诊断的重要工具，尤其在**肿瘤标志物检测、疾病分型、分子病理诊断及治疗靶点验证**等方面发挥着关键作用。

1.1 技术原理与基础

免疫组化的核心原理是**抗原与特异性抗体的结合反应**。

当组织切片中的目标抗原与相应抗体结合后，通过不同的检测体系（如酶标显色系统或荧光标记系统），使抗原所在区域产生可视化信号，从而实现对特定蛋白在组织水平的定位与表达分析。

抗原-抗体反应的主要特点

- 特异性（Specificity）**：抗体仅与其对应抗原的特定表位结合，不与其他非相关抗原结合
- 敏感性（Sensitivity）**：通过信号放大系统（如二步法、聚合物法等），可检测到低丰度抗原
- 可定位性（Localizability）**：反应发生在组织原位，可在细胞或亚细胞水平上精确显示蛋白分布

1.2 免疫组化的应用价值

免疫组化技术兼具分子生物学与组织形态学优势，其应用范围极为广泛，主要包括以下方面

- 临床病理诊断**：用于确定肿瘤组织来源、判断良恶性及评估预后，为个体化治疗提供分子依据
- 基础生物医学研究**：应用于研究特定基因的蛋白产物定位、细胞类型特异性表达及组织空间分布
- 药物靶点验证与药效评价**：可检测药物作用靶点在组织中的表达水平，评估药效学相关生物标志物
- 疾病分型**：基于蛋白标志物表达模式对疾病进行亚型划分，如乳腺癌分子分型、淋巴瘤免疫表型等

1.3 实验类型选择

根据检测体系与抗体标记方式的不同，免疫组化（IHC）实验主要分为以下两大类。

1.3.1 按抗体标记方式分类

直接法（Direct IHC）

- 原理**：将显色或荧光标记物直接偶联于一抗上，与组织中原抗原结合后即可进行检测
- 优点**：操作步骤少，非特异性结合低，背景信号较弱
- 缺点**：信号放大效果有限，不利于检测低丰度抗原
- 适用范围**：高丰度抗原的快速检测或对照实验

间接法（Indirect IHC）

- 原理**：一抗与抗原结合后，通过带有标记的二抗识别一抗，实现信号放大
- 优点**：检测灵敏度高，信号稳定，可灵活选择不同标记体系
- 缺点**：步骤较多，若封闭不充分，易出现背景染色
- 适用范围**：大多数抗原检测，是目前最常用的免疫组化方法

1.3.2 按检测标记体系分类

酶促显色法（Enzyme-based Detection）

- 原理**：二抗上连接酶（如HRP或AP），通过底物反应生成可见沉淀
- 常用体系**：
 - a. HRP（辣根过氧化物酶）：底物DAB显棕色沉淀，常用于临床及科研常规染色
 - b. AP（碱性磷酸酶）：底物BCIP/NBT显蓝紫色沉淀，可与HRP双染配合使用
- 优点**：信号稳定、长期保存性好，可用普通光学显微镜观察
- 缺点**：显色产物不可逆，无法动态调节信号强度

荧光法（Fluorescent IHC/Immunofluorescence）

- 原理**：使用荧光染料（如 FITC、TRITC、Cy3、Alexa Fluor 488/594/647 等）标记抗体，通过荧光显微镜检测
- 优点**：灵敏度高，可进行多重标记，适合蛋白共定位和空间分布研究
- 缺点**：荧光信号易淬灭，切片保存时间有限，需避光操作

⚠ 本手册以HRP标记的间接免疫组化法为主要实验体系，并在部分章节中介绍荧光标记法的应用与优化要点，以便读者根据研究目的灵活选择合适的检测模式。

1.4 实验流程概述

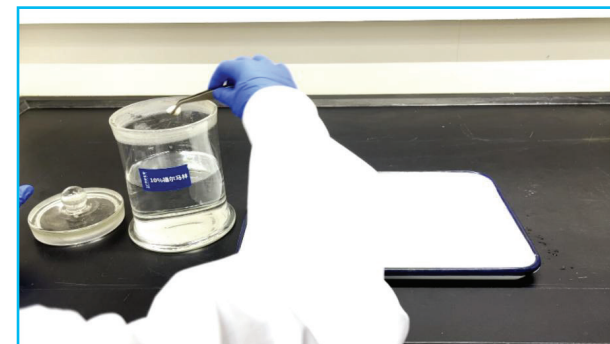
免疫组化的典型工作流程包括三大阶段

- 组织样本制备：取材固定、包埋、切片
- 免疫染色：脱蜡水化、抗原修复、阻断封闭、一抗和二抗孵育、显色封片
- 结果观察与分析：显微镜观察、结果判读、图像分析

石蜡组织样本制备标准化流程

2.1 样本固定标准化操作

组织固定是免疫组化实验的第一步，也是决定后续染色质量的关键环节。其目的是通过化学交联手段保存组织结构与抗原性，防止自溶和腐败，从而维持组织的形态与抗原定位。



2.1.1 关键参数控制

- 固定液体积：组织体积的15-20倍
- 固定温度：22±2℃（or室温）
- 固定时间：根据组织厚度精确控制

a. 厚度≤3mm：固定8～12小时 b. 厚度3～5mm：固定12～18小时 c. 厚度>5mm：需要切修后固定

⚠️ 也可在4℃固定18～24小时，具体时间需要根据组织大小和切片效果做出相应调整。固定不足会导致组织结构松散、抗原流失；固定过度则可能掩蔽抗原表位。

2.1.2 组织取材详细步骤

1. 快速取材：组织离体后应尽快固定，理想时间为30分钟内，动物组织推荐灌流后取材
2. 组织修整：保持切面平整，尺寸建议≤1.0×1.0×0.3cm，保证固定液可充分渗透
3. 避免机械损伤：避免挤压、牵拉等造成假象
4. 方向标记：明确病灶区域、取材方向并做好标签

2.1.3 固定液选择与配制

固定液类型	优点	缺点	适用范围
10%中性福尔马林	保存形态好，经济	可能遮蔽某些抗原表位	常规组织固定，广泛应用
4%多聚甲醛	渗透快、抗原性好	对部分抗原影响大	冰冻切片、培养细胞
乙醇	不掩蔽抗原	组织收缩明显，硬化	免疫荧光，某些磷酸化抗原
甲醇	固定速度快	组织收缩，形态保存一般	血涂片、细胞爬片
Bouin固定液	保存精细结构好	含苦味酸，需特殊处理	睾丸、骨髓等组织

常见固定液的特点及适用范围

10%中性缓冲福尔马林配制

- 甲醛（37%～40%）：100mL
- 磷酸二氢钠：4g
- 磷酸氢二钠：6.5g
- 蒸馏水：加至1,000mL
- pH：7.2-7.4（或以1×PBS代替缓冲盐配制）

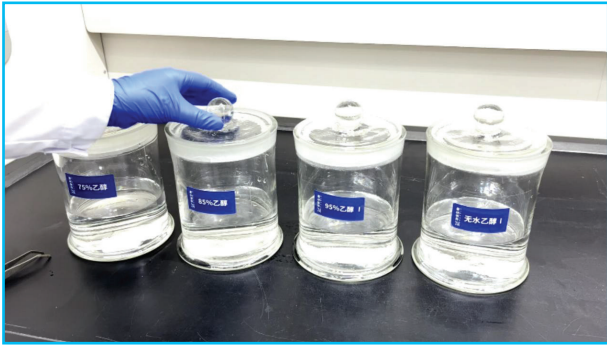
⚠️ 不建议直接用蒸馏水稀释甲醛，因为甲醛会逐渐氧化为甲酸，导致pH下降，影响组织结构与显色背景。石蜡切片推荐使用10%中性福尔马林；冰冻切片推荐使用4%多聚甲醛。

2.1.4 固定后处理

固定结束后，立即以自来水冲洗组织数分钟至数小时以去除残留固定剂。此过程有助于防止抗原进一步交联或背景升高。冲洗后的组织可暂存于4℃ PBS中（不超过 24 小时），应尽快进入脱水程序。

2.2 脱水、透明与浸蜡

脱水、透明、浸蜡的核心目标是用石蜡替代组织内水分，为切片提供坚固支持。建议在全自动脱水机中完成以确保精确时间控制。



2.2.1 脱水过程

步骤	试剂	时间(分钟)	温度(℃)	质量控制点
1	70% 乙醇	60	室温	起始浓度，温和脱水
2	80% 乙醇	60	室温	中等浓度脱水
3	95% 乙醇	60	室温	高强度脱水
4	100% 乙醇	45	室温	首次完全脱水
5	100% 乙醇	45	室温	二次完全脱水

脱水注意事项

- 组织越致密，时间需越长
- 肝、脾等疏松组织可适当缩短时间
- 脱水不足会导致透明不完全，后续蜡渗不良

2.2.2 透明步骤

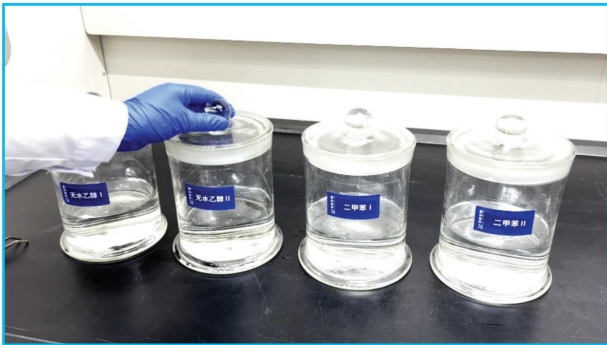
透明剂应与乙醇和石蜡均能混溶，最常用为二甲苯（Xylene）。

透明步骤

1. 二甲苯 I：20～30分钟（室温）
2. 二甲苯 II：20～30分钟（室温）

透明质量控制

1. 时间过短：组织不透明
2. 时间过长：组织变脆
3. 完成标志：组织呈均匀透明状态

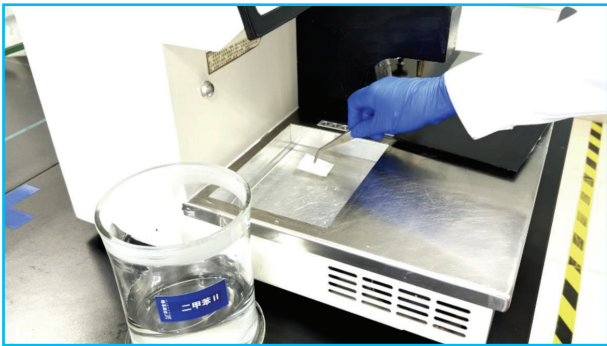


2.2.3 浸蜡过程详解

步骤	试剂	时间(分钟)	温度(℃)
1	石蜡 I	30~45	58~62
2	石蜡 II	30~45	58~62
3	石蜡 III	60	58~62

浸蜡参数控制

- 浸蜡温度应高于石蜡熔点2-4℃
- >62℃容易损坏抗原；<58℃蜡黏度高渗透差
- 浸蜡时间需依组织密度微调



2.3 包埋与切片质量控制

包埋与切片直接影响切片完整性与抗原保持，是组织学制片质量的核心。

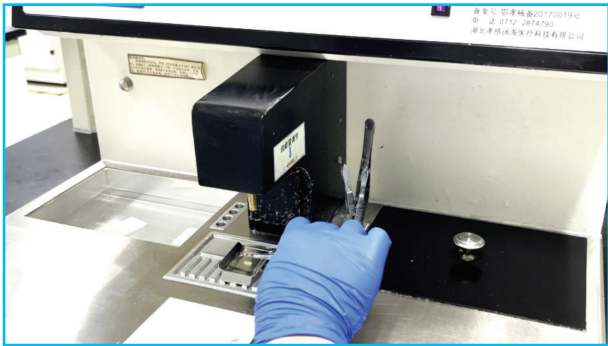
2.3.1 石蜡包埋详细操作

包埋操作要点

- 石蜡温度：62±1℃
- 冷却方式：缓慢降温，避免晶化
- 切面方向：朝下
- 样本编号：清晰、唯一

包埋具体步骤

- 模具预热后加少量熔蜡
- 将组织放入，调整方向
- 注满石蜡后转冷台冷却
- 表面凝固后室温静置
- 完全凝固后于-20℃冻1-2分钟脱模
- 标注信息并存放



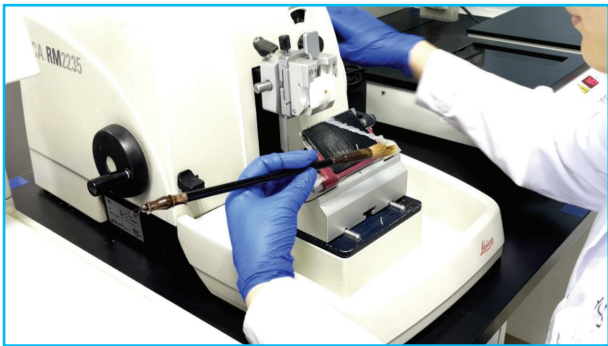
2.3.2 切片详细操作

切片前准备

- 预冷蜡块：-20℃，30分钟
- 修整切面：保证平整
- 调整切片机：检查刀片锋利度与角度

切片参数

- 切片厚度：3~5μm
- 切片速度：均匀缓慢，避免皱褶
- 水温展片：42±1℃水浴短时展平
- 捞片角度：45°角轻柔捞取



2.3.3 烤片与保存

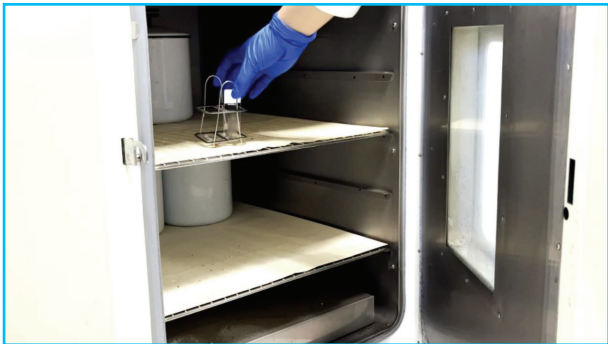
烤片条件

- 温度：62℃（干燥箱）
- 时间：至少2小时
- 目的：促进组织牢固附着

⚠ 烤片时间和温度可根据实际情况做出适当调整，在烤片温度和时间

保存条件

- 短期保存：室温、避光
- 长期保存：-20℃，密封防潮
- 防脱处理：使用多聚赖氨酸、APES处理或粘附玻片



3.1 脱蜡与水化标准操作

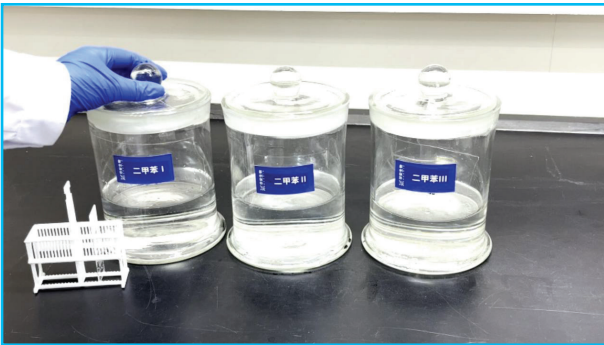
目的：去除组织中的石蜡，使切片重新暴露组织结构，便于后续水性操作。

3.1.1 脱蜡步骤

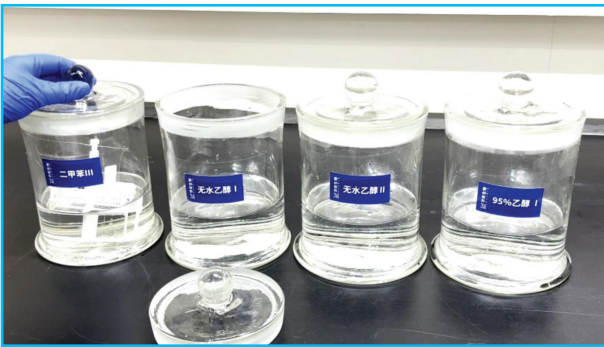
步骤	试剂	时间(分钟)
1	二甲苯 I	10
2	二甲苯 II	10
3	二甲苯 III	10
4	无水乙醇 I	3

脱蜡注意事项

- 每步完成后需充分沥干
- 二甲苯时间需根据季节调整：
夏季（室温高）：3-5分钟;冬季（室温低）：10-20分钟
- 二甲苯定期更换，防止石蜡残留
- 可在冬季增加37℃加热或延长时间以提高脱蜡效率



步骤	试剂	时间(分钟)
5	无水乙醇 II	3
6	95%乙醇	3
7	流水冲洗	3



3.1.2 水化步骤

目的：使组织重新处于水合状态，为后续抗体反应提供基础。

水化检查标准

- 组织应均匀湿润，无白色石蜡残留
- 如完全水化，可直接进行抗原修复
- 切片过程中严禁干燥，以防背景增高

3.2 抗原修复

抗原修复是免疫组化实验中最关键技术环节之一。由于福尔马林固定过程中组织中的蛋白质氨基酸基会与醛基交联形成亚甲基桥（-CH2-），遮蔽抗原表位，导致抗体无法结合，通过抗原修复可以暴露这些被遮蔽的抗原决定簇，显著提高抗原检测率。



3.2.1 修复液选择与配制

修复液	成分	pH	适用抗原
Tris-EDTA	Tris 1.21 g/L + EDTA 0.37 g/L	9.0 ± 0.1	膜蛋白、部分核抗原
柠檬酸钠缓冲液	柠檬酸三钠 2.94 g/L	6.0 ± 0.1	常见抗原
酶修复液	胰酶、胃蛋白酶等	酶学条件	脆弱组织或特定抗原

3.2.2 抗原修复方法详解

修复方法	优点	缺点	适用抗原
水煮热修复	温和，组织损伤小；适合大多数抗原，特别是膜或胞质抗原	修复时间较长；对某些核抗原或强交联抗原效果有限	易受损组织；常规抗原
高压热修复	高温高压，修复效率高，适合难修复抗原；时间短；核、膜、胞质抗原均可用	操作要求高；可能破坏组织形态	难修复的核抗原；强交联抗原
微波热修复	时间短	温度不均；操作要求高；容易造成组织破裂或翘曲	中等难度抗原；一般膜和胞质抗原
酶修复	温和，对脆弱组织和胞质抗原损伤小；可特异性暴露某些敏感抗原；不需要高温设备	易造成组织破坏或切片脱落；对大多数核抗原修复不如热修复有效；酶活性难控制，易产生背景或非特异染色	某些胞质或膜抗原；脆弱组织或低固定样本

水煮热修复详细步骤

- 1. 加入足量修复液，加热至沸
- 2. 沸腾3 ~ 5分钟确保低火下无气泡
- 3. 将切片放入修复液前先悬停预热
- 4. 维持90-95℃低沸20分钟
- 5. 室温冷却10分钟，流水冲洗

高压热修复详细步骤

- 1. 修复液煮沸后放入切片
- 2. 将切片放入修复液前先悬停预热
- 3. 加阀加压至喷气后继续2分钟
- 4. 自然降温，待压力阀落下后开盖
- 5. 流水冲洗冷却

3.2.3 抗原修复注意事项

- 修复后需将切片自然冷却至室温，不可骤冷，以免抗原表位构象发生改变
- 修复液应新鲜配制
- 严控时间与温度，防止组织损伤

微波热修复详细步骤

- 1. 将切片置于盛有抗原修复液的容器中
- 2. 微波中火加热8分钟，停火7分钟
- 3. 再转小火加热8分钟
- 4. 自然冷却至室温

酶修复详细步骤

- 1. 切片甩干后用组化笔在组织周围画圈
- 2. 滴加酶修复液，湿盒内室温孵育20分钟
- 3. 蒸馏水浸洗3次，每次3分钟

3.3 内源性酶灭活与封闭

目的：防止内源性酶导致假阳性。

过氧化物酶阻断（适用HRP标记）

- 3% H₂O₂，室温避光10分钟
- 注意事项：H₂O₂应现用现配，避光保存

碱性磷酸酶阻断（适用AP标记）

- 1 ~ 5mM 左旋咪唑（TBS溶液），室温15 ~ 30分钟



3.4 血清封闭

封闭液组成建议

- 与二抗同源的正常血清5-10%
- 1% BSA（增强封闭）
- 可加入0.1-1% Triton X-100 和 0.3 M 甘氨酸

操作要点

- 室温封闭10 ~ 30分钟
- 封闭时间过长可能影响抗体结合
- 切片保持湿润，防止干片造成背景

推荐配方

- IHC-P（石蜡切片）：1×TBS-T + 1% BSA + 10% 山羊血清
- IF-Tissue和IHC-Fr：1×TBS-T + 1% Triton X-100 + 0.3 M 甘氨酸+10% 山羊血清

3.5 一抗孵育

抗体稀释液

- PBS或TBS-T缓冲液或商品化抗体稀释液

稀释比例确定

- 根据抗体说明书推荐
- 结合预实验确定最佳浓度
- 常规范围：1:50 ~ 1:2,000（或0.5 ~ 20µg/ml）

一抗孵育条件

- 常规孵育：室温1小时
- 加强孵育：4℃ 过夜（16-18小时）

关键细节

- 1. 甩去载玻片上的封闭液，可不用清洗
- 2. 滴加稀释好的一抗，确保覆盖组织
- 3. 湿盒中孵育，防止干燥
- 4. 温度、时间严格控制
- 5. 洗涤：纯水3次 + TBS-T 3次，每次3分钟



⚠ 若一抗与组织同种属，易出现背景。可用F(ab')₂片段预封闭或设置阴性对照。当一抗和被染色的组织来自同一种属时，容易产生背景信号或非特异染色。因为免疫组化的信号放大依赖于二抗识别一抗的Fc片段，当一抗与组织来源相同种属时，组织中可能存在：内源性免疫球蛋白（IgG/IgM）、Fc受体（FcR），尤其是血管、浆细胞、巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、NK细胞等。如必须使用同种属抗体时，可预先使用一抗相同种属的免疫球蛋白或F(ab')₂片段进行预封闭，或做好阴性对照帮助区分特异信号与背景。

3.6 二抗孵育

3.6.1 二抗选择

种属匹配

- 二抗必须与一抗种属对应（例如：Mouse 一抗 → Anti-Mouse 二抗）

标记物选择

- HRP（辣根过氧化物酶）：最常用
- AP（碱性磷酸酶）：某些特殊应用
- 荧光基团：荧光检测

⚠ 如果组织样本经醛类固定液固定后用荧光法检测，在一抗之前的血清封闭阶段，需要在封闭液中添加0.3 M 甘氨酸共同封闭。因为在固定过程中，可能会有未反应的游离醛基保留在组织中，这些醛基会在一抗、荧光标记二抗的氨基发生非特异性结合，导致背景荧光增加。而甘氨酸的氨基会与游离醛基形成亚胺键，消耗游离醛基，降低非特异性荧光背景。

3.6.2 二抗孵育控制

操作步骤

1. 去除洗涤缓冲液
2. 滴加稀释好的二抗，湿盒中室温孵育20分钟（显色法）或1.5小时（荧光法），荧光法需避光
3. 洗涤：（同一抗）纯水3次 + TBS-T 3次，每次3分钟

⚠ 如果采用荧光法检测，则结束此步后即可DAPI染细胞核和封片了。如采用底物显色，需继续进行下述操作。

孵育条件

- 稀释液：同一抗或参考说明书
- 浓度：根据说明书推荐稀释度

3.7 显色与复染

3.7.1 DAB显色

DAB工作液配置

- 参照试剂厂家推荐的使用方法

显色监控流程

1. 开始时间：滴加后立即计时
2. 监控频率：每分钟显微镜观察
3. 终止标准：阳性信号清晰，背景无着色
4. 显色时间：30秒~5分钟
5. 终止方法：去离子水或自来水冲洗
6. 清洗：流水冲洗5~10分钟

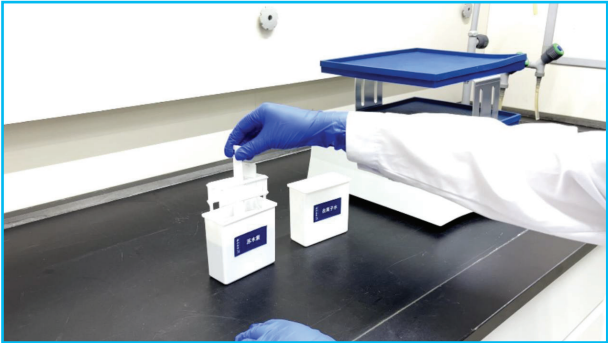


3.7.2 复染

苏木素染色

- 时间：不同类型的苏木素染色时间不同：Harris苏木素：1~5分钟；Mayer苏木素：5~15分钟
- 浓度和时间：根据染色效果调整
- 温度：室温
- 复染后流水冲洗3分钟

⚠ 免疫组化中推荐使用Mayer苏木素，稳定、背景干净，对DAB信号影响小。

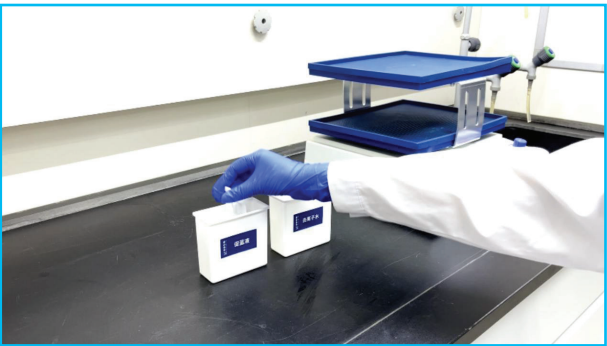


返蓝

- 返蓝：碱性水处理1分钟（或流水冲洗1~15分钟）
- 返蓝后流水冲洗3分钟
- 目的：形成细胞轮廓，定位目标蛋白

判断标准

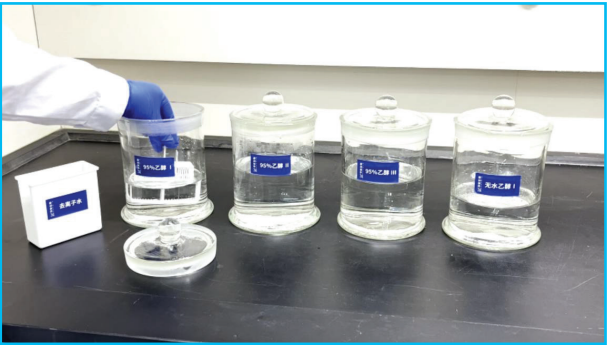
- 核：清晰、呈淡蓝色或灰蓝色
- 背景：无明显蓝染
- DAB信号：棕色清楚可辨，不被蓝色掩盖



3.8 脱水、透明与封片

3.8.1 脱水透明程序

步骤	试剂	时间(分钟)
1	95%乙醇 I	1
2	95%乙醇 II	1
3	95%乙醇 III	1
4	100%乙醇 I	1
5	100%乙醇 II	1
6	二甲苯 I	1
7	二甲苯 II	1



注意事项

- 彻底脱水，试剂保持新鲜
- 防止组织干裂

3.8.2 封片操作

封片剂选择

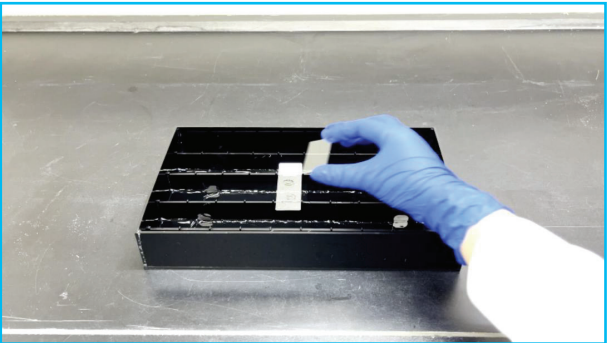
- 中性树脂：HRP显色体系
- 抗荧光淬灭剂：IF实验
- 水性封片剂：AEC、固红、Fast Blue等不耐有机溶剂体系

封片技巧

1. 从二甲苯中取出切片后尽快滴加封片剂
2. 在组织区域滴加适量封片剂
3. 倾斜盖片，排除气泡
4. 避免封片剂过多或过少

保存条件

- 显色法：室温避光
- 荧光法：4℃避光，可用指甲油密封边缘



4.1 显微镜观察要点

免疫组化染色完成后，应在光学显微镜下进行系统观察，注意以下要点。

明场显微镜（DAB显色）

- 阳性信号：棕色沉淀
- 背景：浅棕色或无着色
- 复染对比：蓝色细胞核

荧光显微镜

- 激发/发射波长匹配
- 多色荧光注意通道分离
- 及时采集，避免荧光淬灭

4.2 结果判读标准

准确的免疫组化结果判读必须依赖适当的对照和标准化方法。

4.2.1 阳性信号定位

首先观察阳性信号的亚细胞定位

- 细胞膜：连续性或点状膜着色
- 细胞质：弥漫性或颗粒状胞质着色
- 细胞核：核内均匀或斑点状着色

不同定位可能具有不同的生物学意义。例如，某些转录因子应在核内定位，膜受体应在细胞膜定位

4.2.3 阳性细胞比例评估

<10%：散在阳性

10%~50%：局灶阳性

>50%：弥漫阳性

可结合多视野计数（至少5个随机高倍视野）进行评估

4.2.2 信号强度评估

阳性信号强度可分为弱、中、强三级。

半定量评分系统

- 0级：无着色或着色细胞<5%
- 1+级：弱阳性，浅棕色，容易识别
- 2+级：中等阳性，棕黄色，清晰可见
- 3+级：强阳性，深棕色，显著着色

强度可结合图像分析软件进行半定量评分，提高一致性

4.3 对照设立要求

每批实验必须设置对照，确保结果可靠且特异。

阳性对照

- 已知表达目标抗原的组织
- 验证实验系统是否正常
- 每批实验必须设立

阴性对照

- 空白对照：省略一抗
- 同型对照：使用相同种属、相同亚型的无关抗体
- 组织对照：使用已知不表达目标抗原的组织

5.1 染色质量问题深度分析

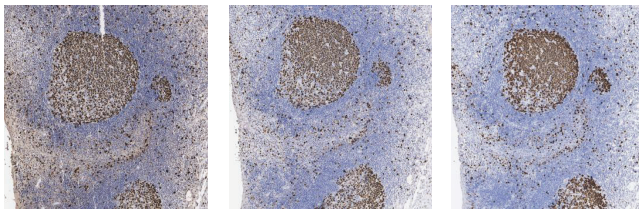
问题一：高背景染色

现象描述：整个切片非特异性着色，背景与特异性信号对比度差。

系统排查方案

第一步：检查抗体浓度

- 进行抗体梯度测试：比如1:50, 1:100, 1:200, 1:500
- 选择信噪比最佳的浓度



HA721115/Ki67, 从左到右稀释比分别为1/500,1/3000,1/5000

第二步：优化封闭条件

- 增加封闭时间至45分钟
- 尝试不同封闭剂：正常血清、BSA、脱脂奶粉
- 增加封闭血清浓度至10%

第三步：改进洗涤流程

- 增加洗涤次数至4次
- 每次洗涤时间延长至8分钟
- 洗涤液中加入0.1%的Tween-20%

第四步：控制显色过程

- 严格显微镜监控
- 准备终止用蒸馏水
- 缩短显色时间

具体解决方案

原因	现象	解决方案
一抗浓度过高/孵育时间过长/交叉反应	全片背景高	优化浓度、缩短时间、更换特异性抗体
二抗浓度过高/非特异结合	局部背景高	降低二抗浓度、增加封闭时间
内源性酶活性未完全阻断	背景信号普遍	使用新鲜H ₂ O ₂ 或碱性磷酸酶抑制剂，延长阻断时间

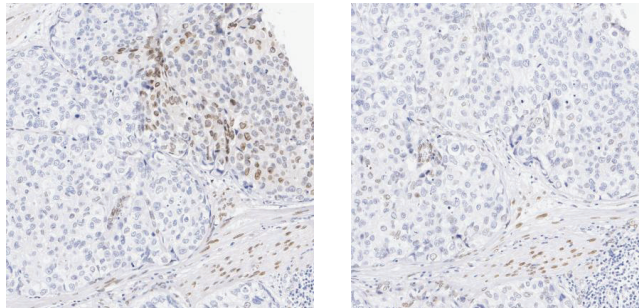
问题二：弱信号或无信号

现象描述：预期阳性区域信号微弱或完全缺失。

系统排查方案

第一步：验证抗原修复效果

- 尝试不同修复方法：高压、微波、水浴
- 测试不同pH修复液：6.0, 8.0, 9.0
- 延长修复时间



HA721198/Fbxw7, 在不同修复液中的染色效果。EDTA修复（左图），柠檬酸修复（右图）

第二步：检查抗体有效性

- 使用已知阳性对照组织
- 验证抗体保质期和保存条件
- 测试不同批次抗体

第三步：确认检测系统

- 检查一抗二抗种属匹配
- 确认试剂添加顺序正确

具体解决方案

原因	现象	解决方案
抗原修复不足	局部阳性/阴性，尤其是切片厚度不均或组织固定时间较长时，部分区域可能抗原暴露不足	增强修复强度，尝试不同修复液
一抗问题	完全无信号	验证抗体有效性，优化浓度
组织过度固定	组织脆，信号弱	缩短固定时间，优化固定条件

问题三：染色不均

现象描述：切片上出现斑块状染色，信号分布不一致。

原因分析

- 1. 抗体覆盖不均
- 2. 修复液温度不均
- 3. 洗涤不充分
- 4. 组织干燥

解决方案

- 确保抗体完全覆盖组织
- 使用足够的试剂体积
- 改进洗涤方法，确保均匀洗涤
- 操作过程中保持组织湿润

5.2 组织处理问题

问题四：组织脱落

现象描述：染色过程中组织从载玻片上脱落。

预防措施

- 1. 使用高质量防脱载玻片
- 2. 优化烤片程序：62°C 2小时 → 45°C 过夜
- 3. 脱蜡时避免温差过大
- 4. 轻柔换液，避免直接冲击组织
- 5. 隔水修复

解决方案

- 增加玻片包被质量
- 控制操作温度一致性
- 避免组织干燥
- 可尝试60°C隔水过夜修复

问题五：非特异性着色

特定区域着色分析

区域	可能原因	解决方案
细胞核染色过深 (局部核蓝染不均)	苏木素染色过度或分化时间不足	适当缩短染色时间，延长分化，流水充分返蓝
结缔组织 (尤其含血管的区域、基底膜周围)	内源性过氧化物酶；封闭不足	延长H ₂ O ₂ 阻断时间至15 ~ 20分钟；使用适当血清或BSA封闭； 在二抗孵育前加封闭剂
红细胞	内源性过氧化物酶	延长H ₂ O ₂ 阻断时间至15 ~ 20分钟；组织灌流
免疫细胞	一抗和组织来自同一种属	预先使用一抗相同种属的免疫球蛋白或F(ab') ₂ 片段进行预封闭； 做阴性对照区分特异信号与背景

问题六：DAB沉淀

现象描述：切片上出现棕色颗粒状沉淀。

原因分析

- 1. DAB配制不当
- 2. 显色时间过长
- 3. 试剂污染

解决方案

- 过滤DAB工作液
- 控制显色时间
- 使用新鲜配制试剂

5.3 操作流程问题

问题七：染色阴性

现象描述：组织切片完全无特异性染色信号。

原因分析

- 1. 操作步骤错误
- 2. 组织中无抗原
- 3. 一抗与二抗种属不匹配
- 4. 蛋白封闭过度
- 5. 细胞通透不全

解决方案

- 重复实验，设立阳性对照
- 使用阳性对照验证
- 确认抗体种属匹配
- 封闭时间不超过12分钟
- 封闭液和抗体稀释液中加入Triton-X增加通透性

问题八：脱蜡不全

现象描述：组织出现异染现象，染色背景不均匀。

原因分析

- 1. 脱蜡时间不足
- 2. 脱蜡液失效

解决方案

- 根据室温调节：夏季3-5分钟，冬季10-20分钟或更长
- 定期更换脱蜡液，使用新鲜二甲苯

问题现象	可能原因	解决方案	预防措施
高背景	一抗/二抗浓度高	优化稀释度	梯度测试
	封闭不充分	增加封闭时间	质量控制
	洗涤不彻底	改进洗涤	标准化流程
弱信号	修复不足	增强修复	方法优化
	抗体失效	更换抗体	定期验证
	显色时间短	延长显色	实时监控
染色不均	覆盖不全	保证覆盖	技术培训
	温度不均	改进设备	定期校准
	操作不当	规范操作	SOP制定
组织脱落	包被质量差	更换玻片	质量检验
	烤片不足	优化条件	过程控制
	操作粗暴	改进手法	技能培训

6.1 难检测抗原优化

低丰度抗原

- 使用高灵敏度检测系统
- 延长一抗孵育时间（4°C过夜）
- 尝试信号放大技术（如TSA）
- 优化抗原修复条件

易降解抗原

- 快速固定处理
- 添加蛋白酶抑制剂
- 优化保存条件
- 使用新鲜组织样本
- 采用冰冻切片技术

6.2 多重免疫组化

顺序染色法

- 合理安排染色顺序
- 彻底洗脱前一轮抗体
- 验证无交叉反应
- 优化洗脱条件

荧光多重标记

- 选择光谱不重叠的荧光染料
- 优化抗体组合
- 使用光谱分离软件
- 注意荧光淬灭问题

6.3 特殊组织处理

骨组织

- 需要脱钙处理
 - EDTA脱钙：温和但时间长
 - 酸类脱钙：快速但影响抗原
 - 电脱钙：快速温和，需要设备
- 延长固定时间
- 优化切片条件
- 使用特殊包埋材料

脂肪组织

- 快速固定
- 充分脱水
- 使用特殊透明剂
- 优化切片温度

总结

免疫组化技术作为生物医学研究和临床诊断的重要工具，其成功依赖于严格的质量控制、标准化的操作流程和丰富的实践经验。通过本手册的详细介绍，希望能够为从事免疫组化工作的研究人员提供全面的技术指导。