

常见免疫组化难题集锦

1、石蜡切片和冰冻切片的比较？

(1) 要求做冰冻切片的不一定能做石蜡切片，这是今天我向一老师请教得出的结论。因为作石蜡切片时要高温烤片，可能会破坏组织的抗原性，如果组织的抗原性较稳定，则可作石蜡切片；但是要求做石蜡切片的，可作冰冻切片。

(2) 冰冻切片的优点是能够较好的保存组织的抗原免疫活性，做免疫组化时不需抗原修复这一步。缺点是细胞内易形成冰晶而破坏细胞结构，可能会使抗原弥散；切片厚度较石蜡的厚，做的片子没石蜡的漂亮。当你买一抗时，目录上都写着做什么样的切片，如果它写着只能做冰冻，就不能做石蜡，如写着两者都可，那就都能做。

(3) 石蜡切片的优点可以保持组织细胞的形态结构，且容易存放在室温，而冰冻切片比较麻烦，一定要存在-80度的低温冰箱中，尤其是用来做原位杂交的的切片，为了防止RNA降解，保存一贯很重要。由于石蜡切片可以切到4微米左右，所以原位杂交探针容易渗透到组织中去，容易成功，而且得到的颜色/形态都较冰冻切片好。

2、一抗的选择要点和技巧是什么？

(1) 单克隆和多克隆抗体的选择。由一种克隆产生的特异性抗体叫做单克隆抗体。单克隆抗体能目标明确地与单一的特异抗原决定簇结合，就像导弹精确地命中目标一样。另一方面，即使是同一个抗原决定簇，在机体内也可以由好几种克隆来产生抗体，形成好几种单克隆抗体混杂物，称为多克隆抗体。在抗原抗体反应中，一般单克隆抗体特异性强，但亲和力相对小，检测抗原灵敏度相对就低；而多克隆抗体特异性稍弱，但抗体的亲和力强，灵敏度高，但易出现非特异性染色（可以通过封闭等避免）。

(2) 应用范围的选择。有的一抗只能用于Western blotting，或免疫组化、免疫荧光、免疫沉淀等；甚至表明石蜡切片或冰冻切片。

(3) 种属反应性的选择（species reactivity）。这一点很重要，表明这种抗体可能存在种属差异，且这种抗体适合检测哪种种属动物体内的抗原。

(4) 种属来源，一般兔来源的多是多克隆；而小鼠来源的多是单克隆，但也有另外。根据此来源来选择相应的二抗。

(5) 生产厂家的选择。如santa Cruz公司抗体一般1ml，价格2100元左右；而chemicon公司一抗一般100ul，价格2800元左右。这两个厂家的同一种抗体它的实际效价稳定是不同的，我一般用后者抗体做免疫组化效果较好，而前者做Western blotting效果还可以。

3、在什么情况下使用 TritonX-100？

(1) Triton X-100 化学名称为聚乙二醇辛基苯基醚，是一种去污剂。在免疫组织化学(>10um厚切片)和免疫细胞化学中一般用Triton X-100作为细胞通透剂，在膜上打孔。

(2) 其作用原理：Triton X-100可以溶解细胞膜、细胞核膜、细胞器膜上的脂质而使抗体及大分子结构的物质进入胞浆和胞核内，故在细胞免疫组化时尤为推荐使用，这样抗体就能顺利进入胞内与相应抗原结合。

(3) Triton X-100既是一种表面活性剂，也有抗氧化作用，具体参阅：

<http://www.dxy.cn/bbs/post/view?bid=68&id=12301317&sty=1>

4、封闭血清的选择原则是什么？

- (1) 膜上或切片上有剩余的位点可以非特异性吸附抗体，造成后续结果的假阳性！
- (2) 封闭血清一般是和二抗同来源的，血清中动物自身的抗体，预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合，否则在后面的步骤中如果和二抗发生结合，会造成背景。
- (3) 也可以用小牛血清、BSA、羊血清等，但不能与一抗来源一致。

5、抗体孵育条件的比较？

- (1) 一抗孵育温度有几种：4度、室温、37度，其中4度效果最佳；孵育时间：这与温度、抗体浓度有关，一般37度1-2h，而4度过夜和从冰箱拿出后37度复温45min。
- (2) 二抗一般室温或37度30min-1h，具体时间需要摸索。

6、一抗4度孵育后为什么要进行37度复温？

- (1) 一方面，防止切片从4度直接放入PBS易脱片；
- (2) 另一方面，使抗原抗体结合更稳定。一般不需要,但对表达较弱的抗原可能有用,4度和37度时分子运动方式不同,前者分子碰撞几率和运动速度小于后者,后者结合更快,但敏感性也提高了并易造成非特异染色。
- (3) 其实，我更赞同后一种说法，因为我尝试把肝脏或睾丸片子从4度过夜拿出后，直接用PBS洗没发生过脱片现象。事实胜于雄辩！

7、DAB显色时间如何把握？

- (1) DAB显色时间不是固定的，主要由显微镜下控制显色时间，到出现浅棕色本底时即可冲洗；
- (2) DAB显色时间很短（如几秒或几十秒）就出现很深的棕褐色，这很可能说明你的抗体浓度过高或抗体孵育时间过长，需要下调抗体浓度或缩短你的抗体孵育时间；
- (3) 此外，若很短时间就出现背景很深，还有可能你前面的封闭非特异性蛋白不全，需要延长封闭时间；
- (4) DAB显色时间很长（如超过十几分钟）才出现阳性染色，一方面可能说明你的抗体浓度过低或孵育时间过短（最好一抗4度过夜）；另一方面就是封闭时间过长。

8、免疫组化结果如何分析？

- (1) 阳性着色细胞计数法。在40*光镜下，随机选择不重叠的10个视野，人工或机器计数阳性着色细胞，每组3~6张不同动物组织切片，然后进行组间比较即可。
 - (2) 灰密度分析法。通过在不同组别和不同动物组织切片上选择相同区域、相同条件下用image j进行灰密度分析，然后进行统计分析即可。
 - (3) 评分法。通过在光学显微镜下对组织切片分别按染色程度（0~3分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色）、阳性范围进行评分（1~4分为0~25%、26~50%、51~75%、76~100%），最终可以分数相加，再进行比较。
- 对于以上这几种方法，各有利弊，请细心选择。要想得到正确结果的前提是你要做出着色均

匀、背景很浅的高质量切片。

9、在什么情况下进行组织抗原修复，抗原修复的条件是什么？

(1) 由于组织中部分抗原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，从而失去抗原性。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。

(2) 修复方法从强到弱一般分为三种，高压修复、微波修复、胰酶修复。修复液也分为若干种（具体的可以查阅相关资料，大量的：中性的、高 pH 的等）。

(3) 微波修复，我们一般用 6min*4 次，效果不错。

10、内源性过氧化物酶的灭活时间和浓度是什么？

(1) 一般 3%过氧化氢灭活时间短点，可以 10min 左右；而 0.3%过氧化氢则可以适当延长封闭时间，一般 10~30min。

(2) 用甲醇配置过氧化氢比双蒸水或 PBS 可能好在保护抗原和固定组织作用，过氧化氢孵育时间过长易引起脱片。

(3) 现用现配，配好后 4 度避光保存。

11、如何才能充分脱蜡？

(1) 蜡不溶于水，如果脱蜡不干净，少许蜡存留于切片上，将会引起染色不均匀、阳性物时隐时现、真假难辨、背景染色增加等。为了解决上述的问题，切片在染色前必须彻底脱蜡，目前用于脱蜡的试剂主要是二甲苯，因它脱蜡力强，脱蜡时间较短；

(2) 脱蜡的时间要根据季节，室温和试剂的新鲜程度是在不同。如果在夏天，室温较高，脱蜡试剂也新鲜，则脱蜡时间不需很多，3-5 分钟就已足够。如果在冬天，室温较低，脱蜡试剂也较陈旧，则脱蜡时间需要延长，10-20 分钟或更长。

(3) 当天切的切片，烧烤 2 小时后进行染色，切片带有温度进行脱蜡这将可加速脱蜡的过程，如果预先切好烤好的切片，在染色前，还必须对切片进行加温 10-20 分钟，然后再行脱蜡，这样脱蜡速度加快，效果魁伟更好。

总之，操作时应根据不同的季节，不同的室温，不同的试剂来决定，脱蜡的时间，原则上是要彻底、干净、完全地脱去切片上的蜡。

12、如何最大限度地降低组织非特异性染色？

(1) 缩短一抗/二抗孵育时间、稀释抗体来控制。这是最重要的一条。

(2) 一抗用多克隆抗体易出现非特异性着色，建议试用单克隆抗体看看。

(3) 内源性过氧化物酶和生物素在肝脏、肾脏等组织含量很高（含血细胞多的组织），需要通过延长灭活时间和增加灭活剂浓度来降低背景染色；

(4) 非特异性组分与抗体结合，这需要通过延长二抗来源的动物免疫血清封闭时间和适当增加浓度来加强封闭效果；

(5) 缩短 DAB 孵育时间或降低 DAB 浓度/过氧化氢浓度等；

(6) 适当增加 PBS 冲洗次数和浸洗时间，在一抗、二抗或 SP 孵育之后的浸洗尤为重要；

(7) 防止标本染色过程中出现干片，这容易增强非特异性着色。

13、苏木素复染时间的把握？

(1) 苏木素复染时间要看当时的室温、溶液的新旧、目标抗原的定位等情况，一般数秒-数分钟。不过这个如果染色不理想可以补救的。即：染色深则分化时间稍长些即可；染色浅则再置于苏木素中染色即可。

(2) 盐酸酒精是分化，氨水是返兰。作用不同。片子复染完后流水振洗，然后置于盐酸酒精中数秒（一定动作要快）后拿出流水振洗，在放入氨水中返兰即可。

(3) 如果分化的颜色过浅，可以复置于苏木素中染色。

14、PBS 的清洗方式选择、次数和时间的选择？

(1) 单独冲洗，防止交叉反应造成污染。

临床上每天检测的病例很多，所用的抗体种类及项目也多，如果在加入一抗孵育完后，将它们在一个缸内洗，这样就会造成交叉污染，影响最后的结果。正确的做法是单独地进行冲洗，冲洗的 PBS 为一次性，保证切片没有相互交叉污染的机会。

(2) 温柔冲洗，防止切片的脱落。

冲洗切片，取出切片，将 PBS 从上轻轻地冲洗，让 PBS 自上而下流下来，不要拿起切片将 PBS 对准切片冲洗，这样由于冲出的 PBS 有一定的冲击力，很容易使切片周边引起松动，导致切片的脱落。

(3) 冲洗的时间要足够，才能彻底洗去结合的物质。

冲洗切片有人提出用微振荡器振染，振下未结合的各种物，使之不产生背景，此种做法一是浪费时间，二是很容易导致切片的脱落。切片的冲洗据实践认为，用一小烧杯柔和地于切片上冲洗，就能彻底冲洗去未结合的物质，无需附加其它条件，冲洗好于切片上再注入 PBS，持续 2 分钟左右就完全足够了。

(4) PBS 的 PH 和离子强度的使用和要求。

刘彦仿指出：中性及弱硷性条件 (PH7-8) 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。[] 免疫组化 P56 我们目前常用的 PBS 的 PH 在 7.4-7.6 浓度是 0.01M，根据本室十几年来使用情况，认为该溶液价格便宜配制方面，使用效果好。

(5) 常用试剂的配制和使用。

在免疫组织化学的染色过程中，用得最多的试剂就是缓冲液，因为切片在整个染色中，抗体的加、换、切片的冲洗，DAB 的配制都离不开缓冲液。可见缓冲液在整个染色中都起至关键的作用，缓冲液的过酸或偏碱，都将影响染色的结果。

15、脱片产生的原因和如何防止脱片？

(1) 多聚赖氨酸玻片质量的问题。我原先是买的，迈新按说也是不错的，可是都脱成什么样子了。后面补做第二批时用的病理科老师自己做的片子，要好一点。

(2) 组织切的不好，切片机的的问题例如比较老的旧的机器切的厚或者不均匀，或者切片者手法不好等。

(3) 组织的问题，我用的组织癌症的很多，越是癌症组织有坏死之类越容易脱。

(4) 没烤好，时间短温度不够之类。

(5) 操作的时候甩的太猛了，有脱片嫌疑的片子最好不甩或轻轻甩，用卫生纸从边缘上慢慢吸水。

(6) 修复的问题：抗原修复的时候高压时间过长了，或者放进 100 度的修复液时手法不好，咚的一声就丢进去了，这样超容易脱片。此外，用 EDTA 修复比柠檬酸容易脱片，但是你要用到 EDTA 的时候也没办法，只有从另外的问题上着手。

(7) 此外，一旦见到有组织漂起来操作就更加要谨慎，用 PBS 的时候尽量用泡的，不要冲。基本上把这些方面都注意到了，能改善的尽量改善，脱片可以减少很多。

16、背景染色较深的原因有哪些？

(1) 抗体浓度过高：一抗浓度过高是常见的原因之一。解决办法是，每次使用新抗体前应当对其工作浓度进行测试，使每一抗体个体化，找到适合自己实验室的理想工作浓度，即使是即用型的抗体也应如此，不能只简单的按说明书进行染色。

(2) 抗体孵育时间过长或温度较高：解决办法是，严格执行操作规程，最好随身佩戴报时表或报时钟，及时提醒，避免因遗忘而造成时间延长。现在流行的二步法 (Polymer) 敏感性很高，要求一抗孵育的时间不是传统的 1 小时，而是 30 分钟，因此，要根据染色结果进行调整。

(3) DAB 变质和显色时间太长：DAB 最好现用现配，如有沉渣应进行过滤后再用。配制好的 DAB 不应存放时间太长，因为在没有酶的情况下，过氧化氢也会游离出氧原子与 DAB 产生反应而降低 DAB 的效力，未用完的 DAB 存放在冰箱里几天后再用这种似乎节约的办法是不可取的。DAB 的显色最好在显微镜下监控，达到理想的染色程度时立即终止反应。不过当染色片太多时或用染色机时，这样做似乎不现实，但至少应对一些新的或少用的抗体显色时进行监控，避免显色时间过长。

(4) 组织变干：修复液溢出后未及时补充液体、染色切片太多、动作太慢、忘记滴液、滴液流失等都是造成组织变干的原因。解决的办法是操作要认真仔细，采用 DAKO 笔或 PAP Pen 在组织周围画圈，可以有效的避免液体流失，也能提高操作速度。

(5) 切片在缓冲液或修复液中浸泡时间太长 (大于 24 小时)：原因上不清楚，但现象存在。有的实验室喜欢前一天将切片脱蜡至修复，第二天加抗体进行免疫组化染色，如果将装有切片和修复液的容器放在 4°C 冰箱过夜，对结果无明显影响，如果放在室温，特别是炎热的夏天，会出现背景着色，因此，不可存放时间太长。

(6) 一抗变质、质量差的多克隆抗体：注意抗体的有效期，过期的抗体要麼不显色要麼背景着色。用新买抗体时最好设立阳性对照和用使用过的抗体作比较。

17、苏木素复染后氨水返蓝这一步如何做、浓度多少、时间多长？

答：返蓝可以用碱性溶液 (PBS/Na₂HPO₄/淡氨水) 或 45 度温水、冷水蓝化均可。一般蓝化 5~10 min。淡氨水有人用 50ml 自来水 + 三四滴的氢氧化铵。