

# 免疫组织化学法

## 1. 脱蜡、水合

二甲苯I、二甲苯II中5min；100%乙醇5min；95%乙醇5min；85%乙醇5min；70%乙醇5min；PBS3min×3次。

## 2. 抗原修复

1×柠檬酸钠缓冲液，中高火档加热10min，自然冷却后浸入PBS洗涤3min×3次。

## 3. 灭活酶

加入1滴内源性过氧化物酶阻断剂，室温10min，PBS3min×3次（摇床）。

## 4. 封闭

即用型山羊血清/3%牛血清白蛋白溶液50~100 $\mu$ L，室温孵育20分钟。

## 5. 抗原—抗反应

加入已稀释的一抗，每孔40 $\mu$ L~100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C湿盒内孵育2h，PBS洗涤3min×3次。

## 6. 加增强剂

加反应增强液，室温20min。PBS洗涤3min×3次（摇床）。

## 7. 一抗二抗反应

加入二抗，室温孵育20 min，PBS洗涤3min×3次（摇床）。

## 8. DAB显色

滴加50 $\mu$ L~100 $\mu$ L DAB，显微镜下观察。流水冲洗5~10min终止反应。

## 9. 苏木素复染

滴加50 $\mu$ L~100 $\mu$ L苏木素，显微镜下观察。自来水缓缓水洗。

## 10. 脱水、封片

玻片依次浸泡入70%乙醇5min；85%乙醇5min；95%乙醇5min；无水乙醇5min；二甲苯I10min，二甲苯II10min。风干后，中性树脂封片。光学显微镜下观察组织细胞中抗原的表达分布情况。

## 常见问题解析

### 1. 常规的缓冲液无法实现抗原修复时怎么办？

可尝试使用一些螯合剂，如乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸、乙二胺四乙酸等，有利于某些抗原的修复。

### 2. 免疫组织化学染色时，一抗该如何选择？

首先明确目标抗原的物种来源，如人、鼠、兔、猫、羊等。以小鼠为例，若观察小鼠肺组织中某蛋白表达，一抗可选兔抗小鼠、羊抗小鼠等该对应抗体，其中，兔抗小鼠是常见选择。其次，选择抗体，还要考虑选择单克隆抗体还是多克隆抗体，如果需要精确判断抗原在细胞的定位等，可选择单克隆抗体，单克隆抗体特异性强；如果样本中抗原表达量不高，则选择多克隆抗体可增强信号。订购抗体前，阅读抗体说明书，明确该抗体适合应用于免疫组织化学实验。

### 3. 免疫组织化学染色时，一抗浓度如何确定？

可在说明书推荐范围内，参考文献上的浓度进行预实验，根据预实验的结果调整浓度范围。如果没有参考文献，预实验时，可在说明书推荐的范围内，设置3~5个梯度，根据预实验的结果确定正式实验的一抗浓度。一般以特异性信号强、背景信号低为宜。

### 4. 免疫组织化学染色时，二抗该如何选择？

现在市面上的免疫组织化学试剂盒中，二抗滴剂一般是二抗/HRP聚合物，一般不需要单独购买二抗。选试剂盒时要注意，其中二抗需要与一抗相匹配，如果一抗是兔抗小鼠抗体，二抗可选择山羊抗兔等抗体。

## 参考文献

- [1] 李和，周德山，周国民，等.组织化学与细胞化学技术（第3版）[M].北京：人民卫生出版社，2021.
- [2] 王德田，董建强，王伟，等.实用现代病理学技术（第1版）[M].北京：中国协和医科大学出版社，2012.