

免疫组化实验基础操作及数据分析

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司
AtaGenix Laboratories





蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

普健生物（武汉）科技有限公司

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年



免疫组化实验原理

定义

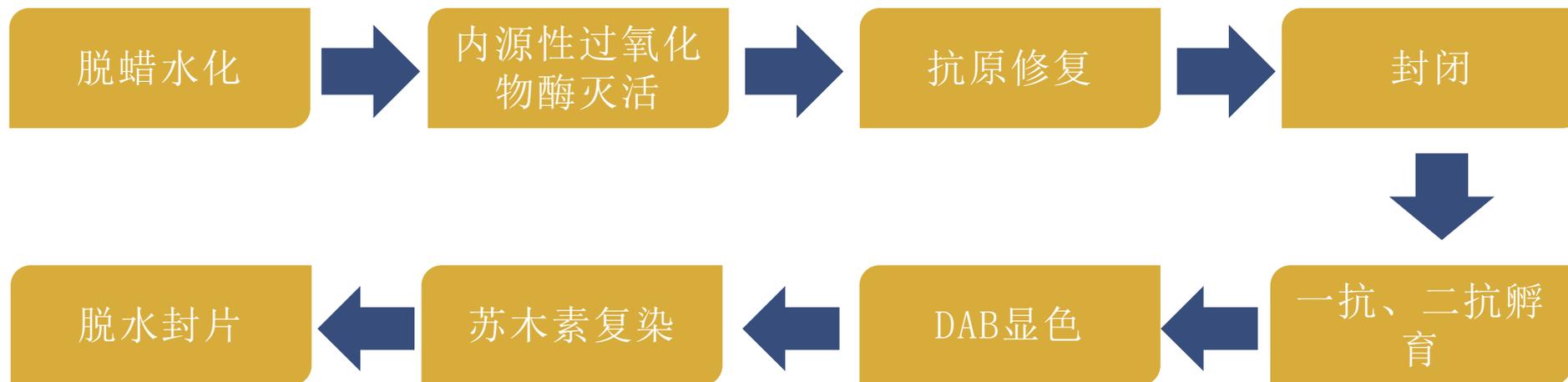
用标记的特异性抗体对组织切片或细胞标本中某些化学成分的分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究，这种技术称为免疫组织化学技术或免疫细胞化学技术。

原理

根据抗原抗体反应和化学显色原理，组织切片或细胞标本中的抗原先和一抗结合，再利用一抗与标记生物素、荧光素等的二抗进行反应，前者再用标记辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AKP) 等的抗生物素 (如链霉亲和素等) 结合，最后通过呈色反应或荧光来显示细胞或组织中化学成分，在光学显微镜或荧光显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能够在细胞爬片或组织切片上原位确定某些化学成分的分布和含量。



免疫组化实验流程





免疫组化实验步骤

1. 脱蜡水化:

脱蜡水化的目的是确保抗体等其他试剂能够充分与组织中的抗原相结合发生反应。弱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。

冰切标本不需要脱蜡，只需要在多聚甲醛里面常温固定 20min，然后晾干后置入纯水中，用较低的修复来做。新鲜组织的冰切可以不固定不修复直接做，但是这样的话，组织的形态可能会比较差。

脱蜡水化流程:

1. 脱蜡液①和切片55℃烘箱烘烤30min;
2. 脱蜡液①(5min) → 脱蜡液②(5min) → 脱蜡液③(5min) → 无水乙醇①(5min) → 无水乙醇②(5min) → 无水乙醇③(5min) → 流水冲洗(5min)

注意事项:

- 流水清洗时水流不能直接对着切片；操作过程中需一直保持切片处于湿润状态，不能干片。
- 每缸所盛液体液面必须保证整个组织都浸入到试剂中。



2. 内源性过氧化物灭活

采用过氧化物酶的检测系统，必须进行内源性过氧化物酶封闭处理。如果不进行处理，组织中的红细胞、粒细胞会干扰染色结果的判断。常用3%双氧水孵育15-20min, 流水冲洗5min。

注意：

内源性酶含量高的组织，可以延长灭活时间至15-20分钟；双氧水需新鲜配制，可提前5-10分钟配制3%的双氧水。



3. 抗原修复

01

由于组织中在甲醛或者多聚甲醛固定过程中，发生了蛋白质之间的交联及醛基封闭作用，从而失去了抗原性；利用化学试剂和热的作用进行抗原修复，使得抗原决定簇重新暴露，
提高抗原检测率。

02

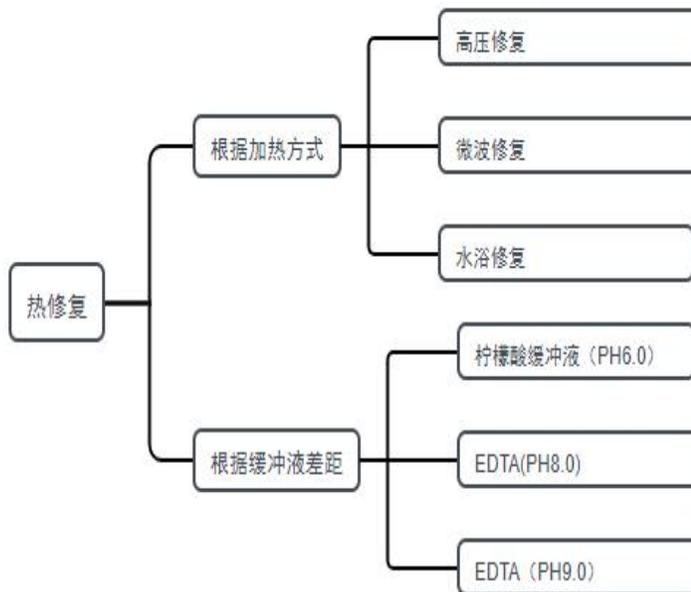
抗原修复目前常用的有热修复（HIER），蛋白酶修复（PIER）和不修复。



免疫组化实验步骤

注意：

热修复（例如微波修复）可能会由于冷热不均匀导致表位修复不理想。剧烈沸腾也可能导致组织脱落。由于酶过度消化可能会破坏组织形态，应掌握消化时间，消化后充分洗涤。





◎ 一般无特殊组织我们选择柠檬酸PH6.0高压热修复。

高压热修复：在高压锅中，加入柠檬酸PH6.0抗原修复液，高火预热；待修复液沸腾后将切片置于其中，并完全浸泡组织，盖好锅盖，扣上压力阀，高火继续加热；待限压阀开始转动喷气后调至中火，同时开始计时3分钟；计时结束后离开热源，自然降压后将高压锅移入冷水中缓慢冷却。待修复液温度降至室温后，用缓冲液PBS洗涤3次，每次1min。

◎ **注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开仪器或中断运行程序；修复完成后避免快速冷却**



4. 血清封闭

组织切片上剩余位点可以与一抗非特异性结合，造成背景着色或者假阳性的结果。封闭血清一般用和二抗来源相同的，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；也可以用小牛血清、BSA、羊血清等，但不能与一抗来源一致。我们常用5%山羊血清。

具体操作：

将切片取出，使用纸巾擦干周围水分，用组画笔围绕组织画圈，并在在组织切片上滴加5%空白山羊血清封闭液；将切片水平放置在底部呈有水的孵育湿盒中，于37℃恒温孵育30分钟。



5. 一抗、二抗孵育

- 一抗孵育温度有几种，4℃、室温、37℃，其中4℃效果最佳。孵育时间:这与温度、抗体浓度有关，我们一般4℃过夜孵育一抗。
- 一抗孵育：甩掉切片上的山羊血清，滴加稀释好的一抗50u1,若组织较大可多加一点一抗，水平放置于孵育湿盒中4℃过夜孵育，PBST洗1次，5min/次，PBS洗3次，5min/次。（一抗4℃过夜后，需复温30min，防止脱片以及可使抗原抗体结合更稳定）
- 二抗孵育：甩掉切片上的PBS,滴加稀释好的二抗50u1，室温孵育50min。PBST洗1次，5min/次，PBS洗3次，5min/次。



6. DAB显色

- 显色原理：将抗原抗体结合的部位显示出来，常用DAB(3' 3-二氨基联苯胺)，将阳性细胞染成棕黄色(HRP显色剂)，显色反应稳定、不褪色，应用最广。
- 酶—— 催化剂H₂O₂ —— 底物 DAB——供氢体 反应原理：
HRP+H₂O₂ —— HRP.H₂O₂ (第一复合物)
DAB ↓
HRP.H₂O₂ —— HRP+H₂O+电子供体(氧化型)
- 生成不溶于水和有机溶剂的有色终产物(棕褐色颗粒)和水，沉着在原来的位置上。
- 具体操作：甩掉切片上的PBS，在组织切片上滴加显色工作液，显微镜下密切观察颜色变化情况，到出现浅棕色本底时即可将切片浸入大量dH₂O中即可终止显色，流水冲洗5min。
- 注意：显色液需现配现用。

DAB显色时间不是固定的，主要由显微镜下控制显色时间。



7. 苏木素复染

将切片浸入Mayer's苏木素中复染切片1-3min，用流水清洗5min；再将切片进入分化盐酸中1s，立马流水清洗5min。

8. 脱水、封片

- 脱水：将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡1次/1min；高温（55℃-60℃）下完全干燥；
封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片。
- 注意事项：
 - 滴加的中性树胶封片剂不能有气泡，否则会导致封好的片子上有气泡，影响后面拍照，若封片效果不满意可浸入二甲苯中重新封片。
 - 以上的每一步操作都要注意不要戳到组织或者刮片，否则会影响拍照效果。

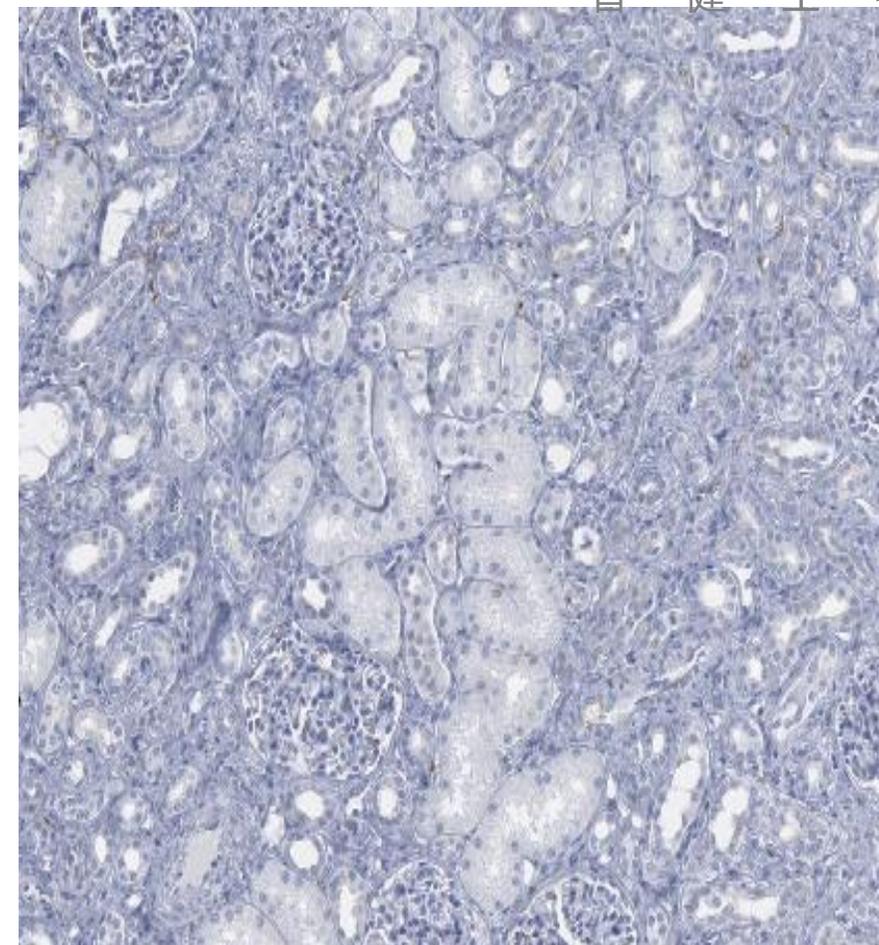


常见问题分析



AtaGenix
普健生物

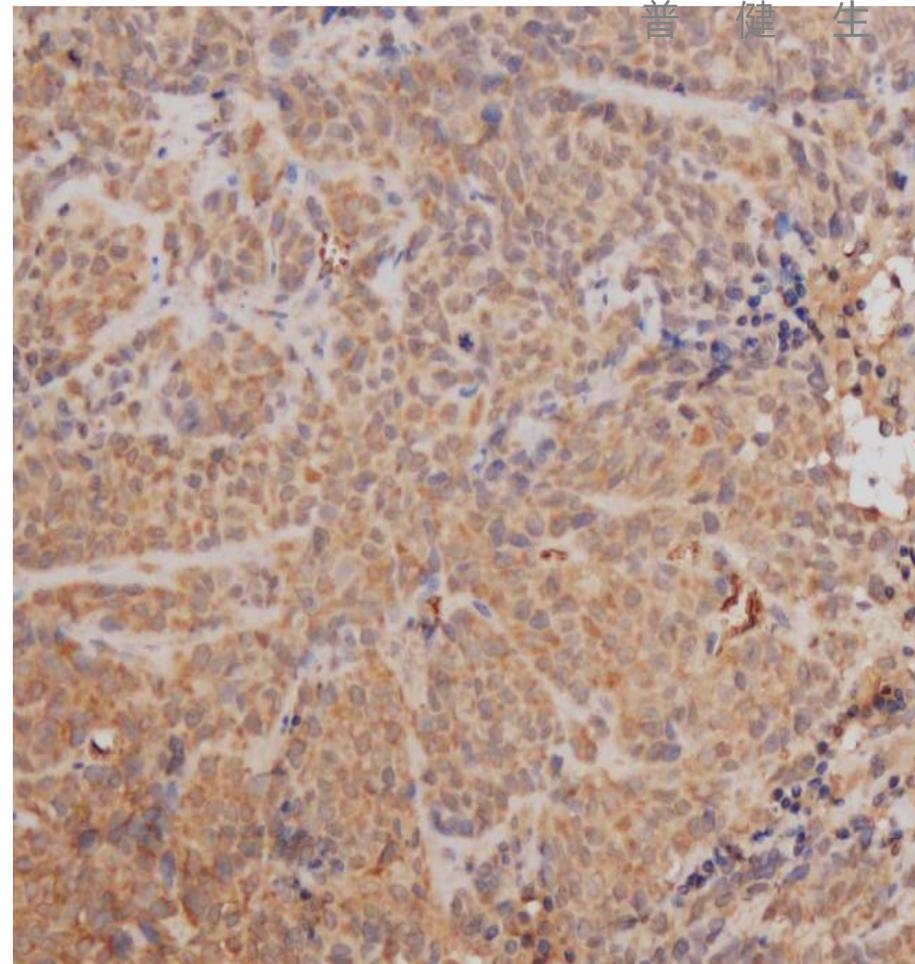
问题	原因	解析
无表达	组织本身为阴性，或者模型建构不成功	更换标本、重新造模
	一抗（抗体效价，是否适合做IHC，是否适合标本种属）	更换合适的抗体或者做阳性对照片，排除抗体等问题，以验证实验结果
	抗原修复强度不够或修复方法不当；	这种情况，一般是冰冻切片，或者骨头的标本。如果是冰冻切片，则可以改做石蜡切片，石蜡切片可以选择更高的修复方式。





常见问题分析

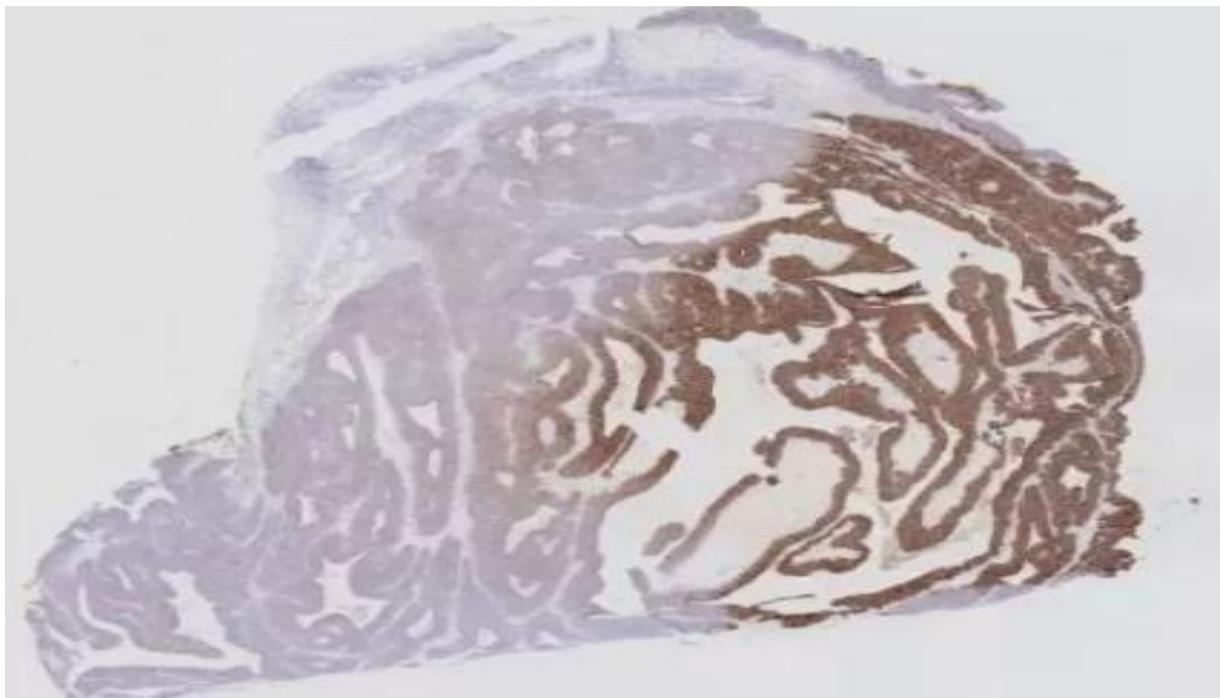
问题	原因	解析
背景深、 非特异性染色	血清封闭时间过短	适当延长血清封闭时间
	显色时间太长	显色时显微镜下观察，控制显色时间
	抗体浓度过高	多试几个浓度梯度
	内源性过氧化物酶含量很高	延长灭活时间
	操作不规范，例如干片了，或者修复液没有充分冷却就把片子取出来了	注意操作规范
	抗体特异性不好	换效果更有保证的抗体





常见问题分析

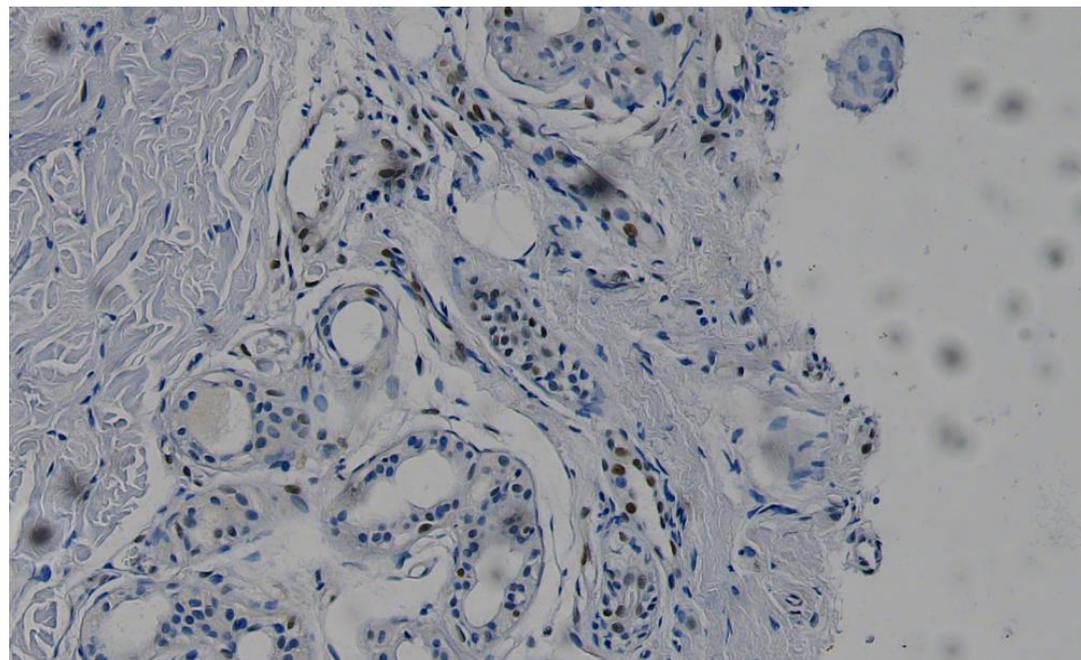
问题	原因	解析
染色不均匀，出现阴阳脸	干片，片子摆放不平整	注意操作规范
	试剂没有滴加均匀或者试剂没有完全覆盖组织	滴加试剂时最好将片子来回左右摇匀，使片子上所有区域的试剂浓度一致，完全覆盖组织





常见问题分析

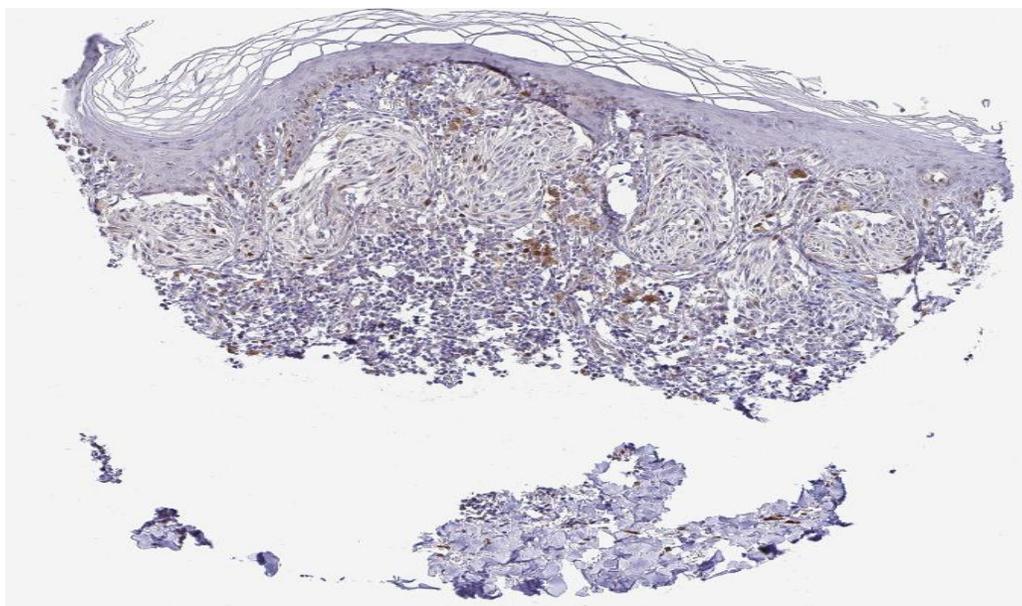
问题	原因	解析
有杂质	试剂有杂质	更换新的试剂或者过滤
	洗涤不充分	增加洗涤时间或次数





常见问题分析

问题	原因	解析
裂片、叠片、脱片，形态不好	组织前期脱水包埋有问题，组织不平整；	检查掉片组织的蜡块是否有问题
	修复强度过高	适当降低修复强度
	比较容易掉片的组织：冰冻切片、骨头、皮肤、眼球、脑。	





免疫组化数据分析

image J光密度分析原理



根据染料颜色染色的深浅及分布的面积来确定目标蛋白的量



染色区域分布面积与目标蛋白量成正比



染色颜色的深浅与目标蛋白量的定量关系符合，朗伯比尔定律，是对数关系。



免疫组化数据分析

灰度值 (Gray value) : 纯黑灰值为0, 纯灰白值为255, 0-255之间则为灰。免疫组化图片无组织背景则为白色。

光密度值 (Optical density, OD) : 是直接和染色物质量相关, 被测物质量越多, OD值越高, 透射出的光越少, 反映在照片上就越黑

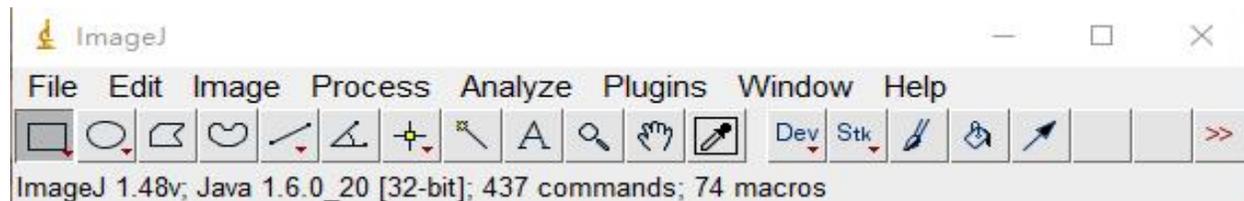
其对应关系如下图:



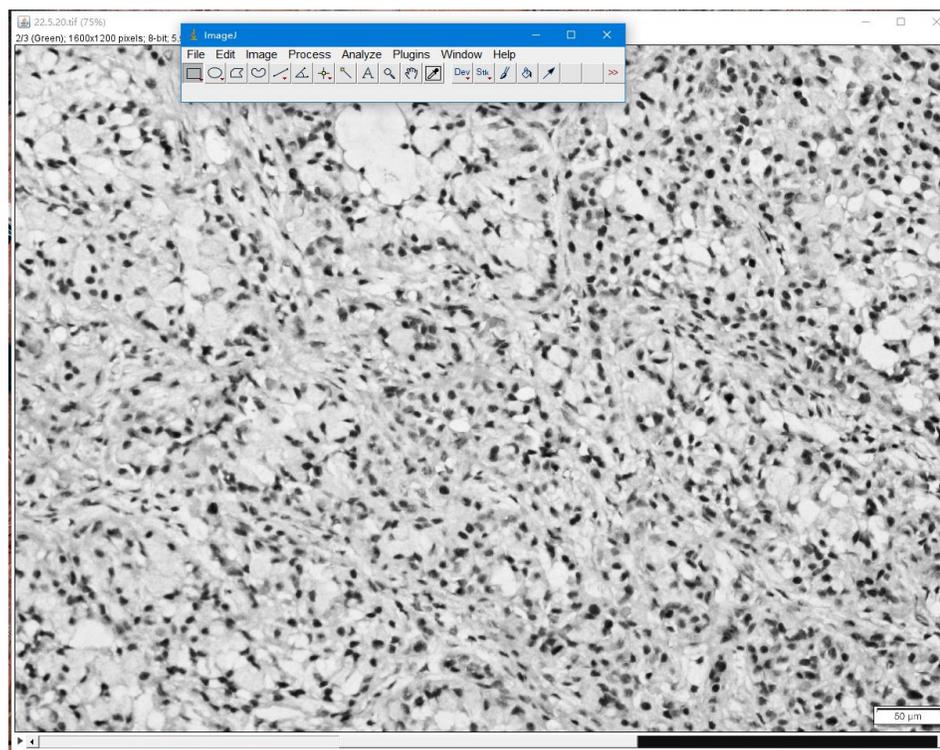


免疫组化数据分析 image J平均光密度值分析操作指南

1. 打开Image J软件，安装好，如图所示。



2. 打开图片，Image, type, 8-bit将图片转换为灰度图片。



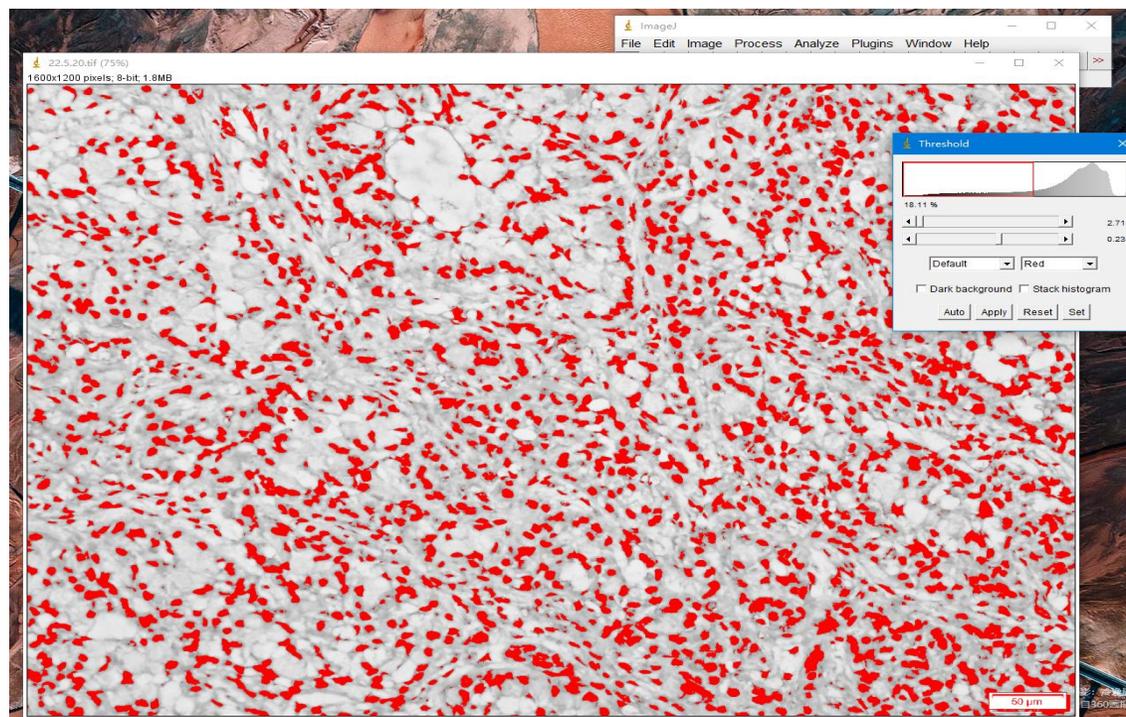


免疫组化数据分析 image J平均光密度值分析操作指南

3. 将8-bit灰度图片转换为OD值: Analyze, Calibrate, 选择Uncalibrate OD即可校准

选择需要测量的参数: 在ImageJ软件Analyze下选择Set Measurements设置测量参数, 选Integrated density, Area, Limit to threshold (Image -> Adjust -> Threshold 调节阈值, 红色代表选中, 选择Limit to threshold只计算红色选择的面积), 点击OK。

4. Image -> Adjust -> Threshold 调节阈值, 选择所有阳性信号 (红色代表选中):





5. Analyze, Measure (快捷键Ctrl+M), 得到结果:

File	Edit	Font	Results						
	Area	Feret	IntDen	RawIntDen	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret	
1	190133	2000	118374.402	12588424	0	0	143.130	1200	

AOD=IOD/Area
AOD=118374.402/190133=0.62

谢 谢 观 看!

网址: www.atagenix.cn

邮箱: Sales@atagenix.com

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

