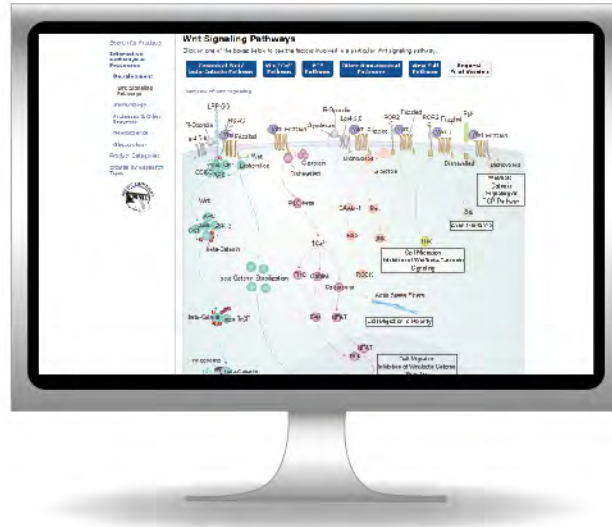


## 免疫组化产品和实验指南

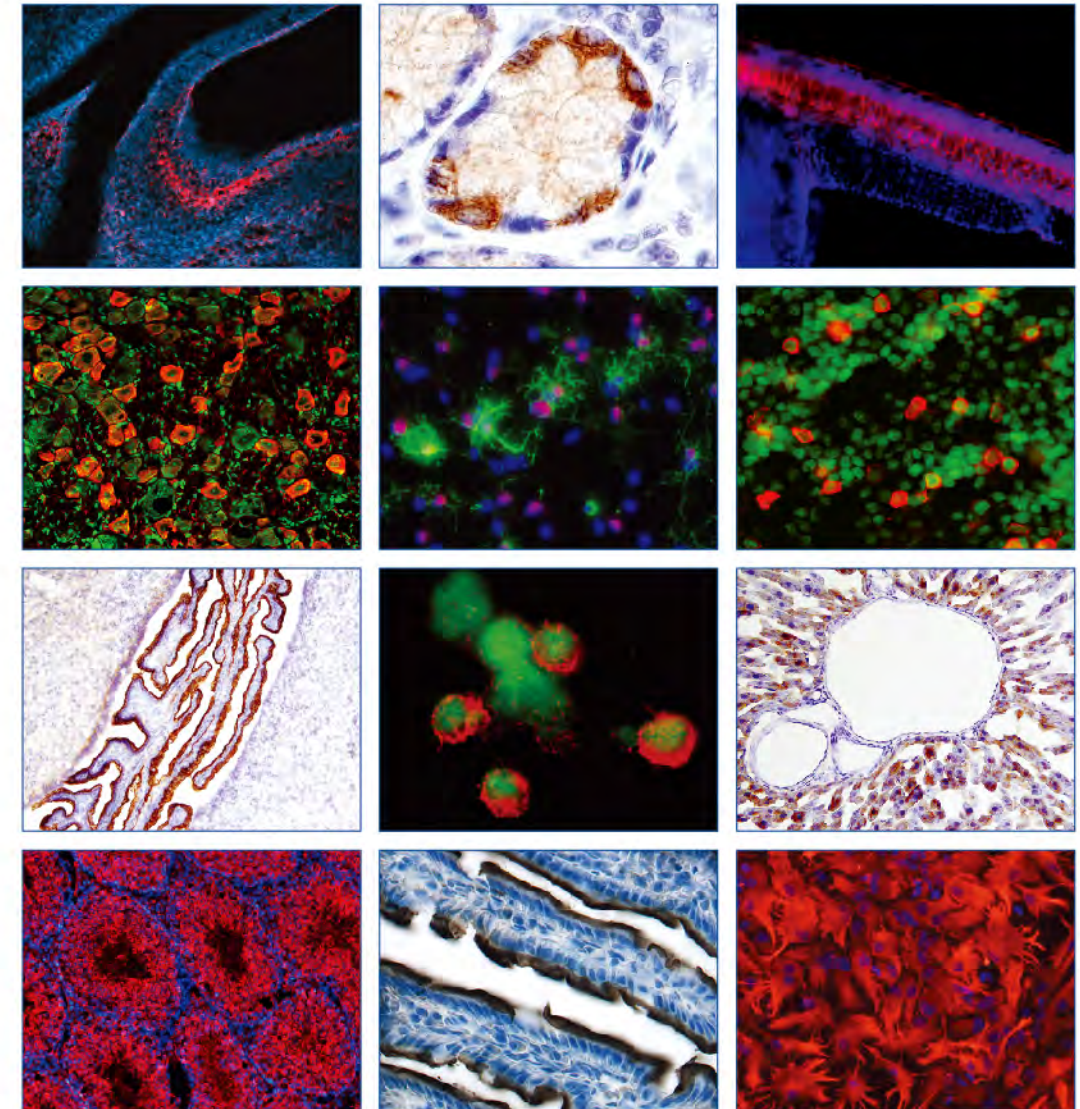
互动通路图，细胞生物学的百宝箱！



R&D Systems很高兴地宣布，我们网站新近添加了一参考工具：Interactive Pathways & Processes. 它将便于您探索包括凋亡、Wnt信号通路及要Th1分化等生物进程。相关网址：  
<http://www.rndsystems.com/cn/Pathways.aspx>

**R&D SYSTEMS**  
a biotechne® brand

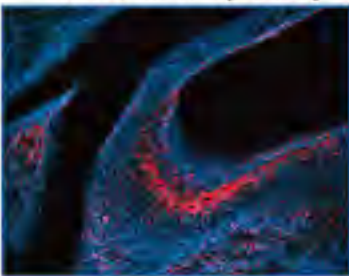
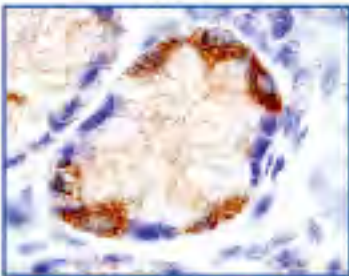
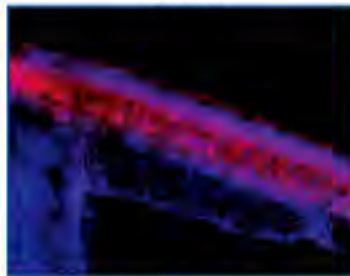
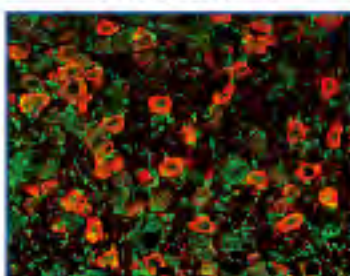
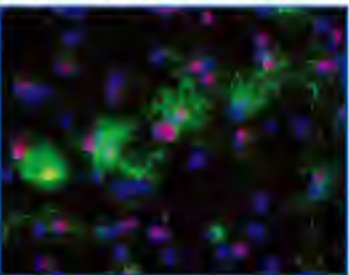
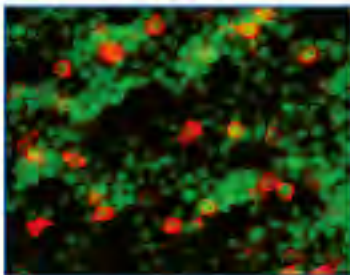
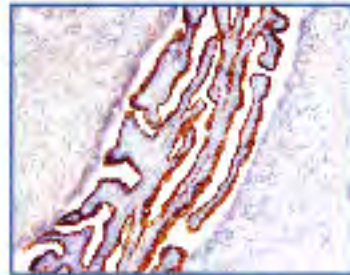
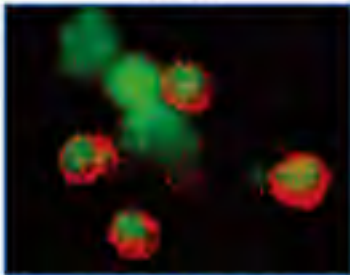
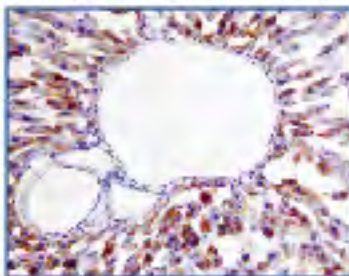
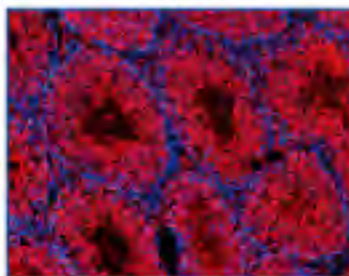

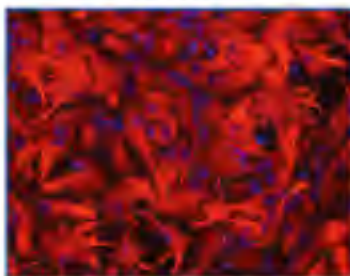
上海市延安西路726号15楼K座，邮编 200050  
电话：+86 (21) 52380373 传真：+86 (21) 52371001  
E-MAIL: [info.cn@bio-technique.com](mailto:info.cn@bio-technique.com)  
[www.RnDsystems.com/cn](http://www.RnDsystems.com/cn)



**R&D SYSTEMS**  
a biotechne® brand



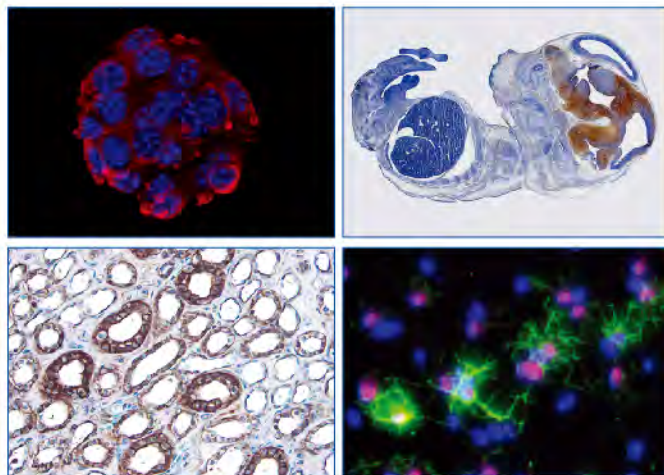
使用R&D Systems一抗的IHC和ICC实验图

<p>胚胎大鼠胃中的 Delta-like 1(DLL1)</p>  <p>货号AF3970</p>	<p>人胃癌组织中的 Wnt-2</p>  <p>货号AF3464</p>	<p>斑马鱼胚胎中的 Tie-2</p>  <p>货号AF928</p>	<p>大鼠背根神经节中的 Vanilloid R1</p>  <p>货号AF3066</p>
<p>大鼠皮质干细胞(RCSC)中的 Oligo2和寡突细胞标记O4</p>  <p>货号AF2418/MAB1326</p>	<p>小鼠脾细胞中的 IL-2受体<math>\alpha</math></p>  <p>货号AF2438</p>	<p>大鼠脉络丛中的 Notch-2</p>  <p>货号AF1190</p>	<p>人外周血单个核细胞中的 STAT6</p>  <p>货号MAB2167</p>
<p>大鼠肝中的谷胱甘肽 过氧化物酶1(GPX1)</p>  <p>货号AF3798</p>	<p>成年小鼠睾丸中的 MESDC2</p>  <p>货号AF4545</p>	<p>小鼠肠中的 Meprin <math>\beta</math>亚基</p>  <p>货号AF3300</p>	<p>大鼠星形胶质细胞中的 GFAP</p>  <p>货号AF2594</p>



本指南介绍了为开展成功的免疫组织化学（IHC）或免疫细胞化学（ICC）所需的技术、实验方案和疑难解答。R&D Systems的IHC/ICC核心团队和技术支持团队参与了本指南的编撰，他们在抗体的筛选和IHC/ICC相关问题的技术指导方面拥有丰富的经验。

简介.....	2-10	IHC/ICC实验方案.....	11-12
设计一个成功的IHC/ICC实验 .....	2	A. 用PBS配制4%的甲醛溶液 .....	12
样品准备 .....	3	B. 制备组织切片用的明胶包被玻片 .....	13
石蜡包埋和冰冻组织		C. 用HRP-DAB显色法检测组织切片 .....	14-15
细胞样品		玻片的处理.....	14
固定 .....	4	用HRP-DAB显色法染色.....	15
甲醛、醇和丙酮		D. 用荧光显微镜检测组织切片的IHC染色 .....	16
组织的固定		E. 用热诱导的表位修复（HIER）进行抗原修复 .....	17
细胞的固定		F. ICC细胞爬片的制备和细胞固定 .....	18
防止非特异性染色 .....	5	G. 细胞的荧光ICC染色 .....	19
防止非特异性疏水相互作用		H. 非贴壁细胞ICC细胞涂片的制备 .....	20
防止非特异性离子相互作用		故障排除指南.....	21
内源性酶的干扰		IHC/ICC辅助试剂.....	22-25
内源性生物素的干扰			
一抗的选择和优化 .....	6		
防止非特异性疏水相互作用			
防止非特异性离子相互作用			
内源性酶的干扰			
内源性生物素的干扰			
检测和显像 .....	7-8		
直接或间接检测，信号放大			
荧光检测			
显色检测			
IHC/ICC对照 .....	9		
内源性组织背景对照			
无一抗对照			
同型对照			
吸附对照			
组织类型对照			
用Western Blot进行参照的局限性			
抗原修复 .....	10		
抗原修复技术			
蛋白酶诱导的表位修复（PIER）			
热诱导的表位修复（HIER）			
优化和局限性			





设计一个成功的IHC/ICC实验

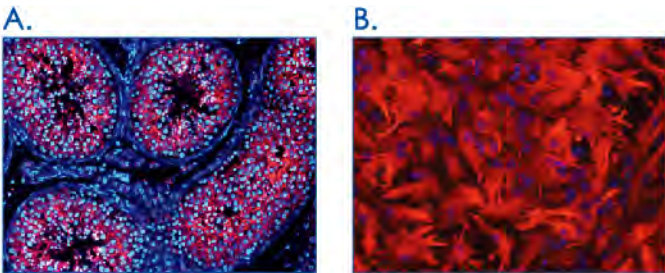
免疫组织化学（IHC）和免疫细胞化学（ICC）是用来定位检测抗原表达的技术，其主要原理是利用抗原表位和抗体间的相互作用。IHC使用组织切片，而ICC使用培养的细胞或细胞悬浮液。最后，IHC/ICC均需使用分子标记物（荧光或染料）来得到阳性染色结果。简而言之，先固定样本以保持细胞完整性，再使用封闭试剂孵育该样本，以覆盖抗体可能结合的非特异性位点，最后使用一抗、二抗孵育该样本，并在显微镜下观测信号结果。

从技术上讲，IHC/ICC是相对简单和直接的实验方法。然而，每个IHC/ICC实验都有多个需要优化的变量。最主要的挑战是针对不同抗原，如何优化实验条件,以产生特异性高且信号强的实验结果。例如，在培养的细胞上检测一种高丰度的蛋白，固定时间和封闭时间可能就需要缩短，并适合使用荧光偶联的一抗检测。相反，如果在一个冰冻组织切片中检测磷酸化表位，可能需要进行抗原的修复，染色信号也需要放大。下表列出了影响IHC/ICC的变量和因素，旨在有助于IHC/ICC实验的设计、优化及疑难的解答。

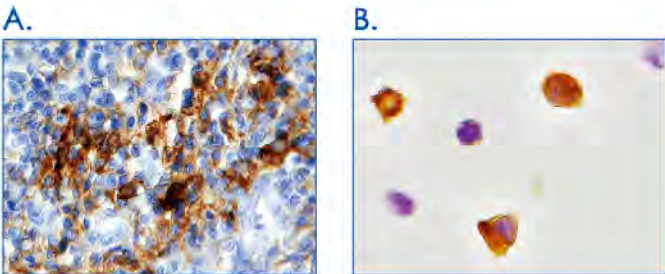
影响实验设计和优化的变量

变量	因素
抗原	种属、表达水平、样品类型、亚细胞定位
表位	构象、翻译后修饰
样品类型	组织或细胞
样品制备	组织：包埋或冰冻 细胞：贴壁或悬浮
合适的对照	无一抗对照、同型对照、吸附对照、组织类型对照
固定方法	灌流或浸润（冰冻或不冰冻）
固定剂*	甲醛、乙醇或丙酮
封闭试剂*	普通血清、BSA或脱脂奶粉
抗原修复*	蛋白酶诱导的抗原修复（PIER）或 热诱导的抗原修复（HIER）
检测方法	直接或间接（有或无信号放大）
一抗*	单克隆或多克隆
二抗*	种属、标记物
标记方法	荧光或显色
标记物	发色团，光谱属性 显色剂：3,3' 二氨基联苯胺（DAB）， 3-氨基-9-乙基咪唑（AEC）
复染	荧光法：4,6'-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI） 显色法：苏木精
封片剂	荧光法：抗淬灭封片剂 显色法：水性封片剂
观察和分析	荧光显微镜或标准光学显微镜

\* 这些变量还需要对额外因素进行优化包括浓度、pH、温度、孵育时间和稀释度。  
该表格并不包含所有细节，但是涵盖了R&D Systems所使用的最常用的IHC/ICC方法。



IHC和ICC的荧光检测实例。A. 用抗人VSIg1亲和纯化多克隆抗体（货号AF4818）对人睾丸冰冻切片中的V-set and Ig domain-containing protein 1（VSIg1）进行荧光IHC检测。使用NorthernLights-557标记的抗绵羊IgG二抗（货号NL010；红色）染色组织并用DAPI（蓝色）复染。B. 用抗人GFAP亲和纯化多克隆抗体（货号AF2594）对胶质纤维酸性蛋白进行荧光检测，以测定在大鼠皮质干细胞分化培养物中的表达。用NorthernLights-557标记的抗绵羊二抗（货号NL010；红色）染色细胞并用DAPI复染（蓝色）



IHC和ICC的显色检测实例。A. 用抗人IRF8亲和纯化多克隆抗体（货号AF5117）对石蜡包埋的人淋巴瘤组织切片中的干扰素调节性转录因子8（IRF8）进行显色检测。用anti-sheep HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit（货号CTS019；褐色）染色组织并用苏木精（蓝色）复染。B. 用calcium ionomycin（0.5mg/mL）和PMA（50ng/mL）刺激人外周血单个核细胞并用抗人IFN-γ亲和纯化多克隆抗体（货号AF285）对IFN-γ的表达进行显色检测。用anti-goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit（货号CTS0008，褐色）染色



## 样品准备

组织和细胞样品必须经正确地收集和处理之后才能用于IHC/ICC研究。为了便于孵育，必须将组织切成超薄的切片（5-10 $\mu$ m）或切成小块用于whole mount IHC。若是做ICC实验，在染色之前必须将细胞吸附在玻片上。样品准备的方法取决于固定的方法，而固定的方法又受所要使用的检测技术的影响（荧光或显色）。在多数情况下，通过单个实验变量可以确定最合适的样品制备方法。例如，用甲醛浸润固定的组织必须经石蜡包埋并用显微切片机制成薄片。如果检测磷酸化依赖型的表位，需要将组织速冻并在低温恒温器中进行切片，然后醇固定。

## 石蜡包埋的组织

若要长期保存组织样品，石蜡包埋是最佳选择。在包埋之前必须先固定组织。可以在组织剥离之后立即用灌注或浸润的方法固定，通常需要4-24小时。不建议固定超过24小时，因为过度固定会导致抗原被遮蔽起来（见第10页）。如果不能立即包埋，可以将固定后的组织置于乙醇中暂时保存。

因为石蜡不透水，所以在加入熔解的石蜡前必须先将组织脱水。脱水可以通过将组织在浓度递增的乙醇中浸泡来实现。这一方法提供逐渐变化的疏水环境，使细胞受到的损伤降到最低。脱水之后，将组织在二甲苯中孵育以除去残留的乙醇。通常用加热到60 $^{\circ}$ C的的石蜡包埋并冷却过夜。再用锋利的刀片在显微切片机制成薄片。之后将切片置于玻片上干燥，干燥后的切片可以在室温下保存。在进行IHC/ICC操作（见第14页）之前，必须先将组织切片再水化。石蜡是最廉价、使用最普遍的一种组织包埋剂。也可以用朔料包埋组织，这样硬度更高，可以切成更薄的切片（1.5 $\mu$ m vs. 5 $\mu$ m）。

## 冰冻组织

冰冻组织样品的好处之一是可以省去石蜡包埋之前的固定步骤，节约了时间。对于检测翻译后修饰如磷酸化，速冻尤其具有优势。将组织浸润在液氮或液态的异戊烷中，或埋在干冰中处理，以得到冰冻组织样品。在冰冻和切片之后可以对样品进行短暂的固定。最常用的固定剂是乙醇，使用乙醇固定可以避免表位被甲醛交联，无需进行抗原修复。在冷冻恒温箱内将冰冻组织切片，切片可以在-80 $^{\circ}$ C保存最多一年。

冰冻组织切片的处理过程比石蜡包埋切片快捷。但是，要长期保存组织，冰冻是不够的，而且冰晶的形成可能会破坏亚细胞结构。此外，冰冻切片通常比石蜡切片更厚。因为冰冻组织中的酶仍然具有活性，封闭可能会影响IHC监测的酶的活性就显得尤其重要（见第5页）。

## IHC样品准备比较

	固 定	
	石蜡包埋	冰冻
固 定	包埋前	切片后
切 片	显微切片机	低温恒温器
储 存	室温下多年	-80 $^{\circ}$ C一年
优 点	组织形态保存较好	酶活性和抗原功能保存较好
缺 点	过度固定可能会遮蔽抗原	冰晶形成可能会破坏组织结构

## 细胞样品

为了进行ICC研究，必须将细胞吸附在固体支持物上，如显微镜的载玻片或盖玻片。对于贴壁细胞，这很简单，可以让其直接生长在铺在6孔或24孔板里的高级别、无菌盖玻片上。在盖玻片上预包被上带电多聚物如多聚L赖氨酸和/或胞外基质蛋白如层黏蛋白、纤粘蛋白或胶原可以增强细胞粘附。通过在每个孔中加入或吸取相应的溶液，所有的染色操作都可以在微孔板上进行。通过Cytospin®离心或在包被了多聚L赖氨酸的玻片上孵育10分钟，悬浮细胞也可以粘附在玻片上。

**注意：**辨别样品准备不好造成的人为因素的影响对于正确解释实验结果很重要。例如，组织的褶皱或裂缝，或组织/细胞核玻片之间的气泡会引起染色试剂的非特异性聚集并造成假阳性结果，使阳性染色难以区分。



## 固定

IHC和ICC实验中所有样品都必须固定，以保护组织形态和目标分子的抗原性。固定会改变组织的化学组成，在保护组织结构和维持抗原表位之间常常需要进行权衡。细胞或组织固定不充分给蛋白在组织内快速降解留下了机会，这会影响特异性的免疫反应。然而，过度固定会遮蔽抗原表位或导致很强的非特异性的背景染色，掩盖特异性染色。如前面部分所讲，固定的方法和顺序必须在样品准备的时候考虑到。另外，时间、温度和pH值也会影响固定的程度。

## 甲醛

甲醛是用于保存组织和细胞中目标蛋白的最常用的固定剂。一般认为甲醛介导的组织固定取决于蛋白和蛋白或蛋白和核酸之间的亚甲基(-CH<sub>2</sub>-)交联的形成。甲醛可以将NH<sub>2</sub> (氨基)和CONH (肽基)、NH<sub>2</sub>和NH或NH<sub>2</sub>和NH<sub>2</sub>化学交联在一起。

对于大多数IHC/ICC应用来说甲醛是个不错的选择，但并不是通用的固定剂。甲醛的过度固定会改变抗原表位中的氨基酸并阻止抗体的结合。不过，大多数情况下可以使用抗原修复试剂（见第10页）修复抗原的表位并恢复和抗体的结合。甲醛会导致磷酸依赖型的表位从膜转移到胞质溶胶中。在这种情况下，冰冷的无水甲醇或无水乙醇则是合适的固定剂。

**注意：**虽然有许多种不同的固定剂，甲醛仍然是最常用，并且对于大多数IHC/ICC实验来说是合适的初始选择。甲醛溶液应当分装并冷冻保存，在4-8℃下储存不超过一个月。请参考第12页的实验步骤配制经典的4%的甲醛溶液。

## 醇

细胞和组织固定最常用的醇类是甲醇和乙醇。甲醇和乙醇的分子结构和水很接近。因此，它们能够和水竞争蛋白质中的氢键，替代组织中的水分子。这会减少蛋白质的介电常数，使其在等电点处沉淀，并且由于蛋白构象的变化，这会阻止抗体和其表位的结合。虽然醇会破坏蛋白质的疏水相互作用并影响到其三级结构，却似乎能够稳定蛋白质的二级结构。

然而，通常认为醇对组织形态的保护不如甲醛类固定剂。醇的穿透能力不如甲醛，主要用于固定冰冻组织切片和细胞。因此，醇固定更适合于细胞膜表面抗原。醇固定之后不建议进行抗原修复，因为通常认为这样的处理太剧烈，很有可能破坏组织切片或细胞的完整性。

## 丙酮

丙酮是强脱水剂，会引起组织蛋白的不可逆沉淀，通常用于未固定的速冻组织。丙酮处理之后再用水或甲醇固定。

## 组织的固定

当研究小动物如小鼠、大鼠和豚鼠的完整组织时，全动物灌流固定往往是保存抗原的最佳方法。这种方法是用固定剂来替代动物全身的血液。但是，对于所感兴趣的组织的固定，全动物灌流不一定充分。在这种情况下，可以将剥离出来的组织浸泡在固定剂中。PBS溶解的4%的甲醛是组织的灌流和浸润固定的常用溶剂。

为了增强固定剂的穿透作用，组织最好不要超过10mm厚。对于完全固定，固定剂的体积应当超过组织体积的50-100倍。固定通常在室温下进行4-24小时。固定条件的优化非常重要，因为固定不足或过度固定都会减少或破坏组织的免疫反应。

## 细胞的固定

与组织样品相比，细胞的固定所需时间更短，可以使用浓度更低的固定剂。例如，用2%的甲醛溶液在室温下固定20分钟就足以保存细胞形态和抗原性。

细胞的固定通常就只需要去掉培养基并加入固定剂。然而，去除培养基之后表面张力的变化会破坏某些类型的细胞。如果这样的话，可以在培养基中直接加入固定剂。例如加入和培养基等体积的4%的甲醛即得到2%的甲醛溶液，足以对细胞进行预固定。两分钟后，换掉预固定培养基，加入新鲜的2%的固定剂。预固定的处理使细胞更加坚固，可以承受表面张力的变化造成的破坏性效果。

**注意：**固定会导致组织蛋白的疏水性交联。交联的程度取决于时间、温度、pH和所用的固定剂。一旦固定方案经过优化，应当保持操作的一致性。

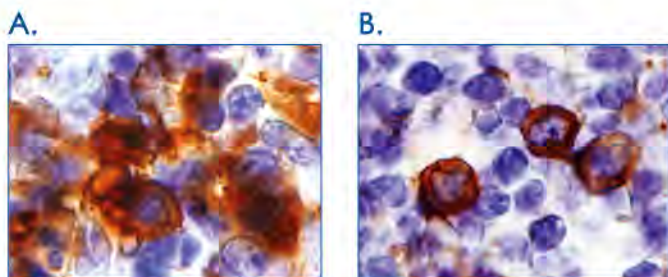


## 防止非特异性染色

用合适的方法准备和固定组织和细胞样品之后,就可以进行染色了。所有IHC/ICC实验都依赖于特异性的抗体-表位结合,这种结合是由疏水相互作用、离子相互作用、氢键和其他分子间作用力来维持的。然而,同样这些作用力也会导致非特异性染色,即抗体会结合特异性抗原表位之外的氨基酸。这是IHC/ICC实验中的一个普遍问题。关键在于要在不影响抗体-表位结合的前提下降低非特异性结合。引起非特异性结合的因素包括一抗和二抗与血清蛋白间的相互作用、抗体和组织间的离子相互作用以及抗体和能影响到所用的IHC检测体系的内源性分子之间的相互作用。这些因素会导致高背景,使得目的抗原在相应的位置难以观察到。使用封闭试剂封闭非特异性相互作用可以解决这类染色问题。这些需要在将样品与一抗孵育之前进行。

## 防止非特异性疏水相互作用

虽然疏水相互作用对于表位抗体的结合很关键,但这些作用力也会促进非特异性结合。由于一些氨基酸具有中性侧链,大多数蛋白质都有某种程度的疏水性。用热灭活的正常血清或牛血清白蛋白(BSA)与组织孵育是一种常用的降低非特异性疏水结合的方法。正常血清类型的选择对于防止与一抗或二抗或与待染组织/细胞的非特异性结合很重要。例如,山羊血清就不适合作为山羊来源的一抗的封闭试剂。而与二抗来源种属相同或不相关种属的血清则可以用于封闭。BSA和脱脂奶粉也是常用的封闭试剂。通常在一抗和二抗的稀释液中也会加入这些试剂。非离子去污剂如0.3% Triton X-100™或Tween 20™也可以降低非特异性疏水相互作用。



血清可以有效封闭非特异性结合。A. 用生物素标记的抗人CD14亲和纯化多克隆抗体(货号BAF383)检测石蜡包埋的人扁桃体组织中的CD14。使用碱性抗原修复试剂盒(货号CTS013)修复组织抗原。用HRP标记的高灵敏度链霉亲和素(HSS-HRP)和DAB染色并用苏木精复染(蓝色)。B. 在平行实验中,与一抗孵育之前用动物血清室温下封闭15分钟显著降低了非特异性背景染色。R&D Systems的所有细胞和组织染色试剂盒中都含有HSS-HRP和动物封闭血清(可选的试剂盒参考第25页)。

## 防止非特异性离子相互作用

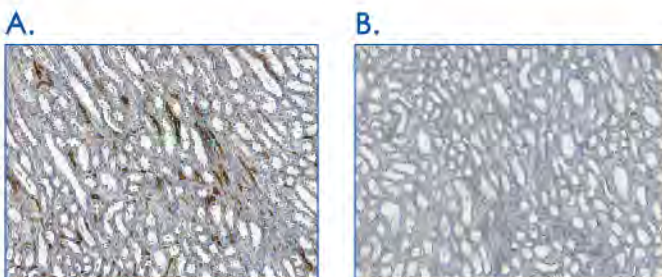
如果使用的抗体和靶组织带有相反的净电荷,离子相互作用就会引起非特异性背景染色。例如,相对的羧基和氨基基团之间的相互吸引、两性分子之间的范德华力(一种弱静电相互作用)都可以导致非特异性染色。增加固定剂和/或抗体稀释缓冲液的离子强度可以减少离子相互作用。但是表位-抗体的结合也依赖于离子力,因此这种方法也可能降低染色的特异性。由于单表位特异性,比起多克隆抗体,单克隆抗体更容易受到离子强度降低的影响。

Triton X-100是Dow Chemical的商标。Tween是ICI Americas的商标

## 内源性酶的干扰

显色检测方法通常使用偶联的酶使表位-抗体的相互作用显现出来。若使用这种方法检测,需要封闭内源性的酶活性。例如,有些实验方案使用辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP),这就可能需要相应的试剂来封闭非特异性信号。

肾、肝或含有血管(包含红细胞)的组织等都有内源性的过氧化物酶活性。用3-10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>配制的过氧化物酶封闭试剂可以用来防止内源性过氧化物酶剪切底物。肠、肾、淋巴和其他组织中的AP酶可以用1mM的Levamisole封闭。肠形式的AP不受Levamisole的影响但是可以用1%的醋酸封闭。



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理可以清除内源性过氧化物酶活性。A. 在染色前未清除内源性过氧化物酶活性的人类肾组织切片呈现出假阳性信号。组织染色用的是anti-goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit(货号CTS008;褐色)。B. 同一组织在染色前于室温下用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇溶液处理15分钟,去除内源性过氧化物酶活性。

## 内源性生物素的干扰

IHC/ICC实验的另一种常用的检测系统是利用链霉亲和素与生物素标记的一抗和二抗的结合。因此,在链霉亲和素孵育之前必须先封闭内源性生物素。许多组织中都含有内源性生物素,包括肝、肾、心、脑和肺。将样品与亲和素孵育是封闭内源性生物素的常规方法。之后必须与生物素孵育以封闭亲和素分子上额外的生物素结合位点。在用生物素/亲和素封闭之后,样品便可以与一抗孵育。



一抗的选择和优化

在设计IHC/ICC实验时，一抗的选择是最重要的因素。而一抗的关键特征是抗原表位的特异性。IHC/ICC实验的所有步骤都必须经过优化，以便观察到特异染色，并尽可能减少非特异的背景染色。这包括开展预实验，以确定每个一抗的适当孵育条件。抗原亲和纯化的多克隆抗体的稀释度通常低于单克隆抗体，但这些值必须根据经验确定。为了获得可靠特异的信号，应当采用交叉反应性极少的高质量抗体。

一抗供应商的选择

在搜索一抗时，产品很可能有几个不同的商业来源，而它们的抗体质量可能参差不齐。最初的选择也许决定了这是个成功的实验，抑或是个错失的机会。第一步是寻找独立验证。这包括在文献中检查抗体过去是否成功使用。许多供应商（包括R&D Systems）都可以为寻找这一信息的研究人员提供协助。另一个问题是询问抗体是否真的由供应商制造，还是它采购了之后转售？直接购买确保了供应商对制造、质量控制流程、以及运输和储存条件的完全控制。此外，一旦抗体的使用出现问题，制造商是提供优质技术服务的最佳选择。

单克隆还是多克隆

单克隆和多克隆抗体的内在特征决定了它们用于IHC/ICC时的优势和限制。单克隆抗体由单个B细胞克隆产生，代表了同质群体，能够高亲和力和高特异性地与单个表位结合。这在检测蛋白家族的某个成员时特别有用，因为蛋白家族有着高比例的氨基酸同源性。

抗体结合往往依赖于目标蛋白维持其天然的结构象状态。与其他蛋白的相互作用、翻译后修饰、温度、pH、固定和盐浓度都会影响抗体接近目的表位。多克隆抗体是异质的，可识别多个表位，因此它们较少受到蛋白构象变化的影响。一般而言，多克隆抗体在一定pH和盐浓度范围内也比单克隆抗体更为稳定。基于这些原因，多克隆抗体更常用于IHC/ICC实验。

多克隆抗体的亲和纯化

多克隆抗血清是抗体混合物，它们由大量B细胞克隆产生。组成多克隆抗血清的抗体以不同的特异性和亲和力与目标表位结合，也与不相关的目标分子交叉反应（非特异相互作用）。为了富集与目的抗原特异性和亲和力最高的抗体，R&D Systems的多克隆抗体经过抗原亲和纯化。在此过程中，多克隆抗血清流过固定了抗原分子的亲和柱。特异抗体被固定了的抗原保留，而非特异抗体流过柱子，被丢弃。随后从柱子上洗脱经抗原亲和纯化的抗体。抗原亲和纯化的抗体主要与目的抗原相互作用，降低了背景染色，与未纯化抗体相比产生了更一致的结果。

单克隆抗体的结合



多克隆抗体的结合



单克隆和多克隆抗体结合的区别。单克隆抗体只与单个表位结合，而多克隆抗体与同一个蛋白的不同表位结合。

一抗孵育条件的优化

一抗浓度、稀释液、孵育时间和温度都影响染色质量。这些变量需要针对每个抗体和样品来优化，以便实现特异染色和低背景。优化通常是保持孵育时间和温度不变，而改变抗体浓度，以确定何时获得最佳信号和低背景噪音。例如，如果使用高亲和力的抗体，那么相对较高的浓度可能需要较短的孵育时间。相反，较低的抗体浓度可能需要较长的孵育时间。人们通常采用较长的孵育时间，以确保抗体完全渗透到体视学技术所用的组织切片。为了促进特异染色，较长时间的孵育通常在低温下开展（即4 °C vs. 室温）。

R&D Systems组织切片染色方案的优化首先是一抗在4 °C孵育过夜。对于细胞染色，通常选择在室温下与一抗共同孵育1小时。抗原亲和纯化的多克隆抗体的工作浓度（1.7-15 µg/mL）通常比单克隆抗体（5-25 µg/mL）要低。在比较不同浓度的相同抗体染色的样品时，在孵育步骤时必须使用一致的时间和温度。当第一次使用新抗体时，建议开展预实验，检验各种抗体浓度。

一抗孵育的起始条件

样品	抗体	
	单克隆	多克隆
组织	5-25 µg/mL, 4 °C孵育过夜	1.7-15 µg/mL, 4 °C孵育过夜
细胞	5-25 µg/mL, 室温下1小时	1.7-15 µg/mL, 室温下1小时
优点	单表位特异性	所需浓度较低
缺点	易受表位遮蔽的影响	异质群体



## 检测和显像

与一抗孵育之后，可利用适当的检测系统来观察抗体结合。检测方法可以是直接的，也可以是间接的，产生荧光或显色信号。直接检测涉及到与标记直接结合的一抗的使用。间接检测方法则利用标记由一抗的宿主物种中产生的二抗。间接方法还包括放大步骤，以增强信号强度。观察表位-抗体相互作用的常用标记包括一些荧光基团和酶，这些酶将可溶的底物转化成不可溶、显色的终产物。标记的选择受到检测方法、个人偏好以及可用的显微镜设备的影响。

### 直接或间接检测，信号放大

选择直接检测还是间接检测，这常常取决于抗原的表达水平。例如，高表达表位的检测可通过与标记直接结合的一抗来实现。直接检测的优点包括多色染色更为简单，且没有二抗非特异结合的顾虑。主要缺点在于直接检测达不到观察较低表达水平的灵敏度。在极少数情况下，标记过程可能会对一抗的亲合力产生不良影响。

相比之下，间接检测方法通常有着更高水平的灵敏度，并产生更强烈的信号。信号经过间接方法放大，因为至少有两个标记的二抗与每个一抗结合。不过，二抗的使用需要额外的封闭步骤和对照。

利用亲和素和链霉亲和素与生物素的强亲和力，可实现信号的进一步放大。亲和素是一种存在于蛋清中的糖蛋白，按化学计量与生物素结合。链霉亲和素纯化自链霉菌 *Streptomyces avidinii*，未糖基化，表现出比亲和素更低的非特异结合。两种蛋白的每个分子都结合四个生物素。如果采用生物素化的二抗，那么通过与亲和素-生物素（ABC方法）或标记的链霉亲和素-生物素（LSAB方法）的孵育可明显放大信号。链霉亲和素可与检测酶（辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）或荧光染料结合。使用这些放大方法需要额外的步骤来防止非特异结合（见第5页）



### 检测方法与信号强度

直接	
优点	缺点
便于多色检测	灵敏度低

间接	
优点	缺点
灵敏度高	二抗可能引起非特异性结合

信号放大—ABC方法	
优点	缺点
信号强度高	需要额外的时间和对照

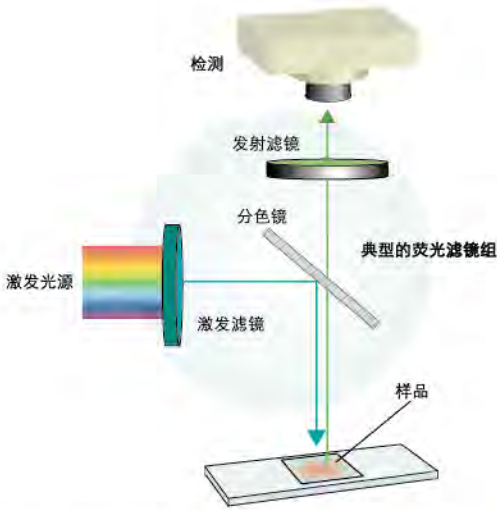
信号放大-LSAB方法	
优点	缺点
信号强度高	需要额外的时间和对照



# 荧光检测

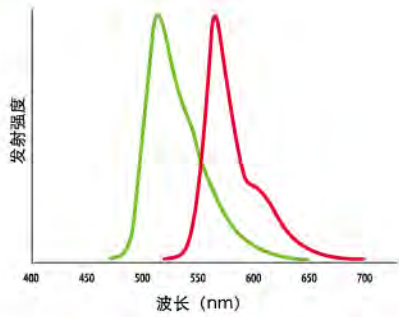
荧光检测是基于荧光色素的使用，它们在受到较短波长的光激发时发光。荧光色素可直接与一抗或二抗结合，或与链霉亲和素结合。免疫荧光常用于多个细胞目标的同时观察。例如，组织可与不同的一抗混合物孵育，再与结合有荧光色素的二抗孵育，这些荧光染料在不同波长下发光。

多色实验必须经过设计，以限制检测试剂之间的交叉反应性，以及所使用的荧光染料在光谱性质上的交叉。为了限制二抗之间的交叉反应性，一抗应来自不同的物种。这样就能使用物种特异的二抗，分别只识别一个一抗。不过，也有一些情况，需要同时使用同一个物种的抗体。这可通过使用一个生物素化的一抗来实现。在使用这种技术时，组织必须先与非生物素化的抗体孵育，再与荧光基团结合的二抗孵育。之后将组织与生物素化的一抗孵育，再与链霉亲和素结合的荧光色素孵育。这种方法确保链霉亲和素结合物只与生物素化的抗体结合，限制了交叉反应性。

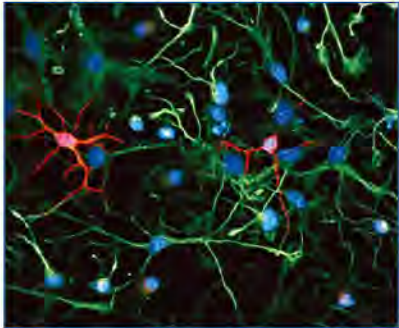


多色荧光显微镜。典型的免疫荧光设置包括光源、适合目的荧光染料的滤光片组合，以及检测机制。

A.



B.



R&D Systems的NorthernLights荧光色素有着不重叠的光谱性质，非常适合多色IHC和ICC。  
A. NorthernLights-493 anti-goat IgG (货号NL003; 绿色) 和NorthernLights-557 anti-mouse IgG (货号NL007; 红色) 的发射曲线。B. 利用anti-rat Nestin亲和纯化的多克隆抗体 (货号AF2736; 绿色) 和anti-neuron specific beta-III Tubulin单克隆抗体 (克隆号TuJ-1) (货号MAB1195; 红色) 多色检测大鼠皮层干细胞中的Nestin和beta-III Tubulin。细胞经过NorthernLights-493 (货号NL003; 绿色) 和NorthernLights-557 (货号NL007; 红色) 二抗染色，并经DAPI (蓝色) 复染。

## 显色检测

为了方便显色检测，一抗、二抗或链霉亲和素可与酶结合。在加入可溶的有机底物时，酶与底物反应，产生不溶的有色产物，沉积在抗原表达的位置。常用的酶包括辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶，它们分别将3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 和3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC) 转化成棕色和红色的终产物。DAB比AEC更常用，因为后者易溶于酒精，且暴露在过度光照下时更容易褪色。在使用AEC时必须用水性的复染剂和封片剂。

通常认为显色检测比免疫荧光更为灵敏，但没那么方便，因为孵育和封闭步骤更多。与免疫荧光相似，显色检测也允许多个抗原的观察，但这些抗原只能在细胞和组织的不同位置，因为重叠的颜色可能会使结果难以解释。DAB显色检测的好处在于，HRP和DAB发生反应生成的有色沉淀物对光不敏感，玻片可保存数年。与需要专门光源和滤光片组合的荧光显微镜不同，显色技术只需要一般的光学显微镜。

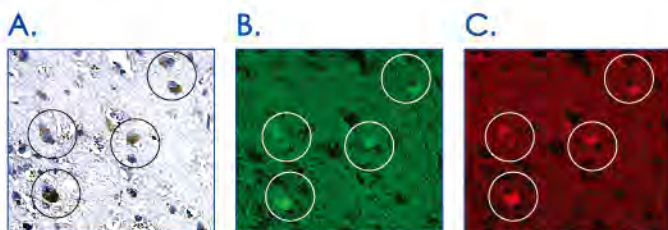


## IHC/ICC对照

适当的对照对于IHC/ICC结果的准确阐释至关重要。令人满意的IHC/ICC实验设计产生的结果能够证明抗原位于正确的组织、细胞类型或亚细胞定位。固定、封闭、抗体孵育和抗原修复步骤的优化将产生强烈而特异的信号。然而，IHC/ICC实验必须包含阳性和阴性对照，以支持染色的有效性，并识别实验假象。此外，抗体特异性、实验条件、组织类型的生物学条件、甚至研究人员的差异都可能产生不一致的染色，导致不准确的结论。为了获得一致的结果，详细记录是IHC/ICC研究的一个重要因素。在此，我们介绍了一些公认的对照，可用于证实您IHC/ICC结果的特异性。

### 内源性组织背景对照

某些细胞和组织可能有着固有的生物学性质，产生背景染色，从而导致结果的误读。在一抗上样之前，应利用荧光（适用于荧光标记）或明视场（适用于显色标记）照明在显微镜下检查细胞和组织，以确保组织本身没有信号。例如，脂褐质是一种内源的自发荧光色素，可与阳性染色混淆。



**神经系统组织中的脂褐质的自发信号。**脂褐质是一种色素，随年龄增长在多种组织类型中积累。它也有着自发荧光的性质，其激发和发射光谱与常用的荧光色素重叠。上面显微照片中圈出的就是包含脂褐质的神经元，它可以在明视场显微镜（A）或荧光显微镜的绿色（B）和红色（C）光谱中被标记出来。

### 无一抗对照

将组织与抗体稀释液孵育，其中不包含一抗的对照通常也是必需的。之后与二抗和检测试剂孵育。只用检测试剂染色应该是可以忽略的，它不会掩盖特异染色，或者说其染色模式不同于特异染色。

### 同型对照

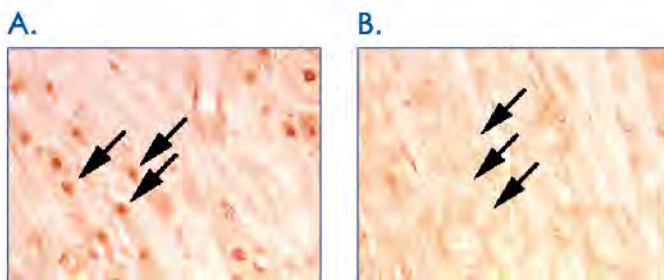
在使用单克隆一抗时，可利用此对照。将样品与抗体稀释液孵育，并添加与一抗相同亚型（如IgG1、IgG2A、IgG2B、IgM）和浓度的非免疫性免疫球蛋白。之后将样品与二抗和检测试剂孵育。这些步骤将确保所呈现的特异染色不是由免疫球蛋白分子与样品的非特异相互作用引起的。背景染色应该是可以忽略的，与特异染色不同。

### 吸附对照

为了证明抗体是与目的抗原特异结合，首先要将抗体与免疫原预孵育。这会使抗体失活，组织应该无染色或很少染色。抗原与抗体的混合物应以10:1（摩尔比）配制，并在4°C预孵育过夜。随后将预吸附的抗

体与组织共同孵育，以取代一抗。将一抗产生的染色模式与预吸附抗体产生的相比较。

如果免疫原是肽段，那么吸附对照效果更好。不过，如果抗体是由整个蛋白产生的，则抗体与蛋白混合物的添加可能导致更高的非特异染色。尽管机理还不清楚，但有可能是预吸附所用的抗原本身与组织结合，产生非特异染色。因此，必须注意，使用整个蛋白的吸附对照不一定能验证抗体与组织中蛋白结合的特异性。



**大鼠背根神经节中用吸附对照确定染色结果的特异性。**A. 利用anti-human phospho-MSK1亲和纯化过的多克隆抗体（货号AF1036）对大鼠背根神经节冰冻切片中的磷酸化MSK1（S212）进行染色。B. 如果抗体用S212磷酸化免疫原预先吸附，则细胞核染色（箭头所指）消失。

### 组织类型对照

IHC/ICC实验的其他对照包括使用已知表达（或不表达）目的表位的组织样品。这种策略可提供有用的参考，也可使用在初步优化研究中。来自转基因动物的组织特别有用，它们过表达或不表达抗原。此外，可以使用不同物种的组织样品，以证实抗体的物种特异性。

### 用Western Blot进行参照的局限性

人们常常开展Western blot实验，以补充或支持IHC/ICC研究。不过，在变性过程中蛋白构象的变化可能产生误导性的结果。对于某一特定抗体，Western blot与IHC/ICC研究之间的不一致可能只是反映出实验条件的差异。由于多克隆抗体识别多个表位，故没那么容易产生这种实验假象。



## 抗原修复

尽管固定对于组织形态的保留是必不可少的，但这一过程对IHC/ICC检测也有不良影响。固定可能改变蛋白的生化特性，如目的表位被掩盖，不再与一抗结合。表位的掩盖可能是由表位内氨基酸的交联、表位或附近位点与无关肽段的交联、表位构象的改变或抗原静电荷的改变引起的。抗原修复指的是任何可以逆转表位掩盖和恢复表位-抗体结合的技术。

## 抗原修复技术

抗原修复的需要取决于多个变量，包括但不限于，目的抗原、所使用的抗体、组织类型，以及固定方法和持续时间。多克隆抗体能识别多个表位，因此即使不进行抗原修复，它们也比单克隆抗体更有可能检测到特定抗原。

目前有多种技术可恢复表位的免疫反应性。简单的方法有改变抗体稀释液的pH或阳离子浓度，这可能影响抗体与表位的亲和力。对于部分掩盖的表位，在开始抗原修复之前可以先试试改变一抗的孵育条件。不过，这一步也需要抗体浓度、孵育时间和温度的进一步优化。在讨论抗体修复方法时，技术通常分为两大类，蛋白酶诱导的表位修复（PIER）和热诱导的表位修复（HIER）。一旦优化好，抗原修复的影响可以是明显的。

### 蛋白酶诱导的表位修复（PIER）

在PIER方法中，蛋白酶K、胰蛋白酶和胃蛋白酶等都曾成功恢复抗体与表位的结合。人们认为作用机制是切割了可能遮盖表位的肽段。PIER的缺点在于恢复免疫反应性的成功率低，且有可能破坏组织形态和目的抗原。

### 热诱导的表位修复（HIER）

HIER被认为能逆转一些交联，并实现表位二级或三级结构的重建。实验方案必须针对每种组织、固定方法和待研究抗原进行优化。总的来说，HIER的成功率比PIER要高得多。

HIER可利用微波炉、高压锅、蒸屉、高压灭菌锅或水浴开展。在HIER实验中，微波炉是越来越流行的设备。这些方案大多加热5分钟，然后更换缓冲液。对于所有HIER方法，在开始IHC/ICC孵育之前必须让玻片冷却。HIER对时间、温度、缓冲液和pH特别敏感，最佳方法必须根据经验确定。

### 优化和局限性

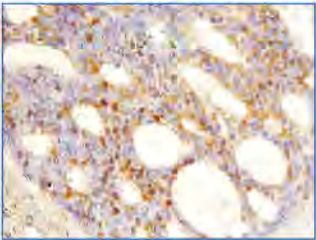
抗原修复可能需要加强样品与玻片或盖玻片的附着。此外，此技术对于冰冻组织切片和醇固定切片通常过于剧烈。对于每种设备，时间、温度和pH必须经过优化（如92-95 °C水浴要5-10分钟，而120 °C高压锅要1-5分钟）。为了优化抗原修复，必须开展预实验，使用时间、温度和pH的各种组合。在使用抗原修复方法时，应始终考虑到假阳性的可能性。实验应当包含对照，以证明特异的抗体结合，因为染色常受到实验中多个变量的影响

时间	抗原修复液的pH		
	酸性	中性	碱性
1分钟	玻片#1	玻片#2	玻片#3
5分钟	玻片#4	玻片#5	玻片#6
10分钟	玻片#7	玻片#8	玻片#9

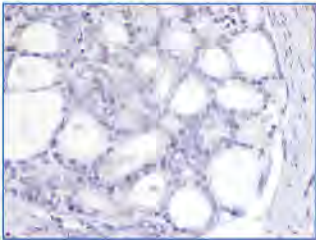
HIER的优化。这是一个典型的实验设置，以确定最佳的HIER孵育时间和pH。结果应与第十块玻片（无HIER）相比较。您可采用类似的方法来优化孵育温度。

R&D Systems提供了一些试剂，可改善组织抗原检测，并增强免疫反应性。在初次优化时，研究人员可比较经中性pH 7.0通用抗体修复液（货号CTS015）处理的样品和未经过抗原修复的同一组织样品。之后可能需要使用酸性或碱性的抗原修复液，这取决于组织。在R&D Systems，我们发现碱性抗原修复液（货号CTS013）的处理通常很成功。我们也提供酸性（货号CTS014）以及试用装（货号CTS016）的抗原修复液。与中性溶液相比，酸性和碱性抗原修复液更可能影响组织形态。

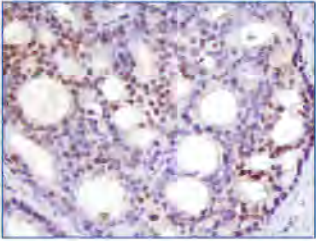
### 未经修复



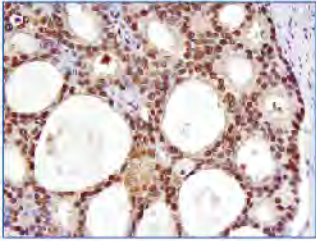
### 酸性HIER



### 中性HIER



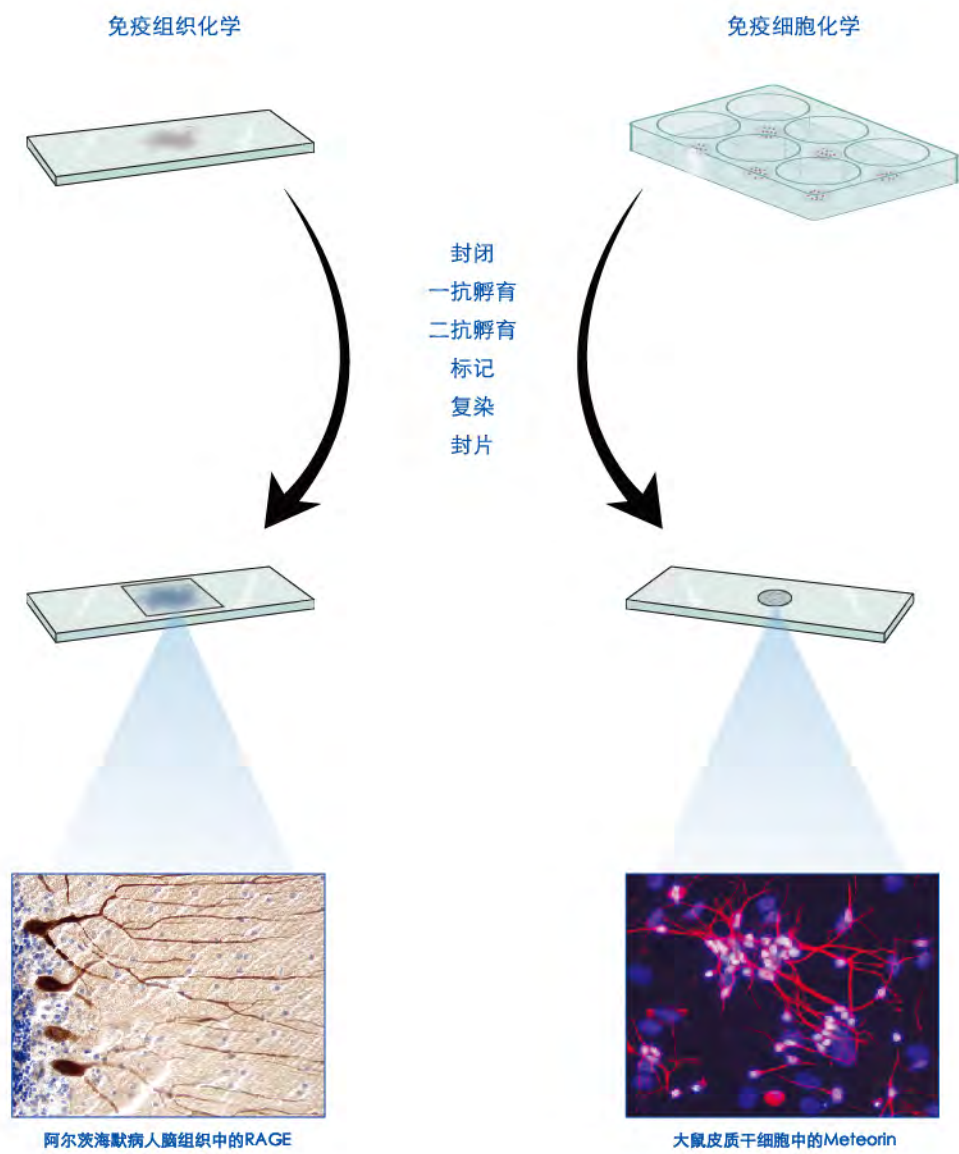
### 碱性HIER



抗原修复改善了p27的检测。石蜡包埋的人前列腺癌切片在指定的抗原修复液中以95 °C孵育10分钟后，IHC图像显示了p27的检测。与无HIER处理相比，中性（pH 7.0）和碱性（pH 9.5，货号CTS013）抗原修复液的孵育都增强了p27的检测，但酸性（pH 5.0，货号CTS014）抗原修复液没有效果。P27是利用anti-human/mouse/rat p27单克隆抗体（货号MA822561；棕色）检测的。



# IHC/ICC实验方案





## A.用PBS配制4%的甲醛溶液

在绝大多数IHC/ICC的实验流程中，组织和细胞的固定都使用了基于甲醛的固定剂。以下实验流程配制含4%甲醛的PBS溶液。最有效的固定剂必须根据实验确定。

**注意：**甲醛是有毒的，请在实验前阅读这种化学品的MSDS。应穿戴手套和安全眼镜，在通风橱内进行操作。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 实验用品

#### 试剂

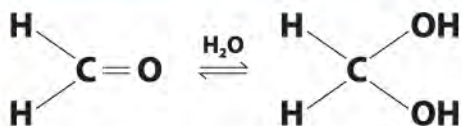
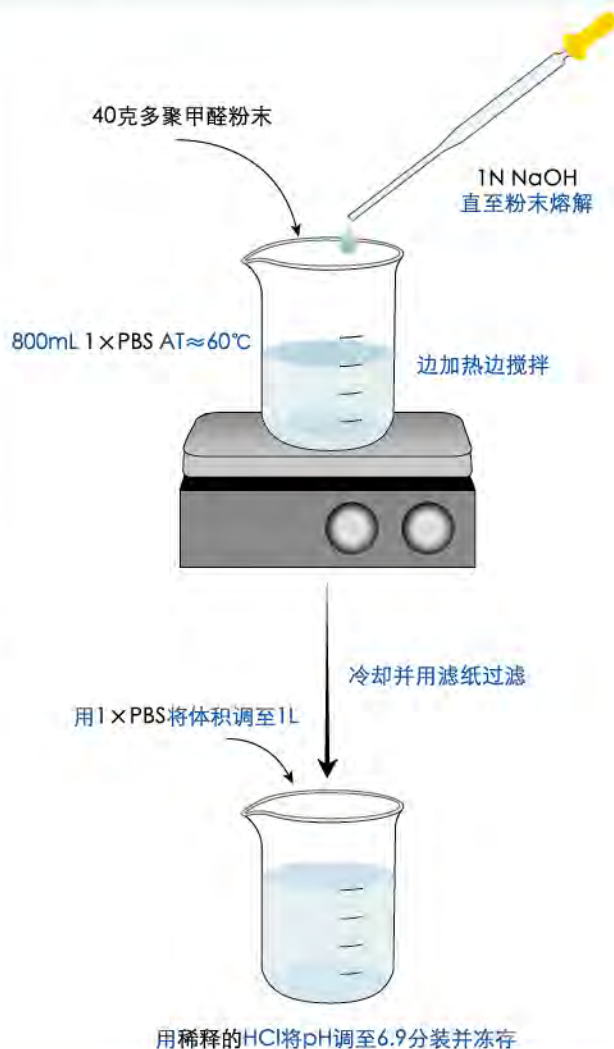
- 去离子水
- HCl（稀释）
- NaOH（1N）
- 多聚甲醛粉末
- PBS（1x）: 0.137 M NaCl, 0.05 M

#### 材料

- 过滤器
- 玻璃器皿和搅拌棒（甲醛溶液专用）
- 手套和安全眼睛
- 带加热板的磁力搅拌器
- 温度计
- 通风罩

### 步骤

1. 配制1 L 4%甲醛需要在通风橱中，把烧杯放在搅拌器上，加800 mL 1x PBS到烧杯中。搅拌的过程中加热至约60℃。注意使溶液不沸腾。
2. 加入40克多聚甲醛粉至加热的PBS溶液中。
3. 粉末不会立即溶解到溶液中，逐滴加入1N NaOH慢慢提高pH值，至溶液澄清。
4. 一旦多聚甲醛溶液溶解，应冷却并过滤。
5. 加入1x PBS调整溶液体积为1L。
6. 重新检查pH值，使用少量稀释的HCl调整pH值到接近6.9。
7. 该溶液可以分装并冷冻，可在4℃下保存不超过一个月。



Formaldehyde

Methylene Glycol

**甲醛结构。**在水溶液中，甲醛主要以甲二醇的形式存在

**多聚甲醛、甲醛和福尔马林的区别。**多聚甲醛（化学名polyoxymethylene）是一种多聚化甲醛的粉末，本身并不能固定组织。要用作组织固定剂，必须用热水溶解多聚甲醛成为甲醛溶液。福尔马林是含有10-15%甲醇的饱和甲醛水溶液（质量浓度37%，体积浓度40%）。加入甲醇是为了减缓甲醛的聚合，这会降低其固定能力。当用多聚甲醛配制时，福尔马林也可以不含有醇类。



## B.制备组织切片用的明胶包被玻片

为了使组织切片染色和洗脱步骤中能保留在玻片上，需要在玻片上涂抹带粘性的化合物。虽然有很多种该类化合物，但明胶最常使用于组织切片。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 实验用品

#### 试剂

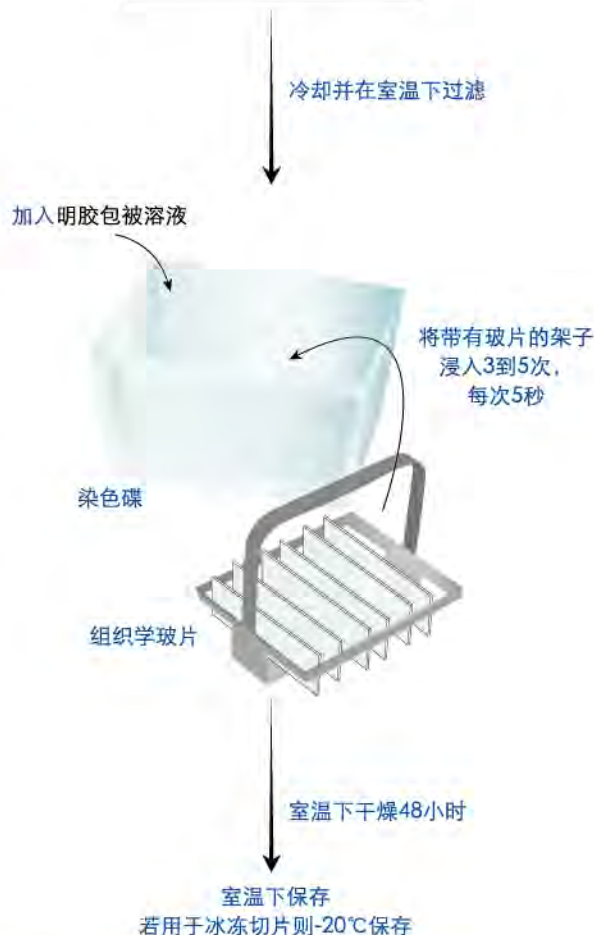
- 明胶包被溶液：1L去离子水，5克明胶，0.5克硫酸铬钾 ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ )

#### 材料

- 过滤器
- 组织学玻片
- 带加热板的磁力搅拌器
- 玻片架
- 染色碟
- 温度计

### 步骤

- 1.准备包被明胶溶液：在1L 加热的去离子水（温度不应超过45℃）中溶解5 克明胶。
- 2.明胶溶解后，加入0.5克硫酸铬钾。硫酸铬钾使玻片带上正电荷，这样可以吸附带负电荷的组织切片。
- 3.过滤溶液，使用前在2-8℃储存。在使用前建议再次过滤（过滤前恢复到室温）。
- 4.将组织学玻片放进金属架。  
**注意：**玻片应当用肥皂水清洗并浸洗干净，先用自来水再用去离子水。
- 5.将带有玻片的架子浸入明胶包被溶液中3到5次（每次大约5秒）。
- 6.去除带有玻片的支架并吸干。用滤纸吸干支架上多余的溶液（将架子在滤纸上轻拍以便获得更好的效果）。
- 7.将带有玻片的架子放在实验台上，盖上纸巾，避免灰层。
- 8.在室温下干燥48小时。
- 9.在使用前可将干燥的玻片放入包装盒中于室温下保存。用于冷冻切片的玻片可以保存在-20℃。





## C.用HRP-DAB显色法检测组织切片

以下实验方案由R&D Systems IHC/ICC实验室设计并优化，使用HRP-DAB细胞和组织染色试剂盒（见25页）。该方案须依据具体使用的组织类型进行适当调整。实验者应当确定抗体的最佳工作稀释度。若使用R&D Systems的一抗，请参考说明书上的相应工作稀释度。其他的试剂请参考相应厂商的使用说明。

**注意：**DAB是有害物质，应穿戴手套和安全眼镜，在通风橱内操作。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

## 实验用品

### 试剂

- 水性封片剂（货号CTS011，或类似产品）
- 一抗
- 细胞和组织染色试剂盒：（见第112页）
  - 抗羊（货号CTS008），抗小鼠（货号CTS002）
  - 抗兔（货号CTS005），抗大鼠（货号CTS017）
- 试剂盒组份：过氧化物酶封闭试剂，亲和素封闭试剂，生物素封闭试剂，生物素标记的二抗，高灵敏度链霉亲和素-HRP偶联物（HSS-HRP），DAB显色溶液，血清封闭试剂
- 去离子水
- 稀释缓冲液：PBS（1×），1%牛血清白蛋白，1%正常驴血清，0.3% Triton™ X-100和0.01%叠氮化钠
- PBS（1×）：0.137M NaCl，0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH7.4
- 洗涤缓冲液：PBS（1×）
- 对于石蜡包埋的组织切片：
  - 二甲苯（混合异构体） 100%乙醇
  - 95%乙醇 70%乙醇
  - 50%乙醇

### 可选试剂

- 抗原修复试剂（见第17页）
- DAB增强剂（货号CTS010）

### 材料

- 盖玻片
- 组织学玻片
- 免疫染色笔

## 步骤

### 1.冷冻切片的玻片准备

- 若要染色存在低温下的冰冻切片，将玻片在室温下放置10-20分钟。

### 石蜡包埋组织切片的玻片准备

- 将玻片浸在二甲苯（混合异构体）中2次，每次10分钟。
- 将玻片浸在100%的乙醇中2次，每次10分钟。
- 将玻片浸在95%的乙醇中5分钟。
- 将玻片浸在70%的乙醇中5分钟。
- 将玻片浸在50%的乙醇中5分钟。
- 用去离子水浸洗玻片。

- 用洗涤缓冲液再水化玻片10分钟。吸干多余的洗涤缓冲液。若要进行第15或16页上的染色步骤，用免疫染色笔将组织圈住。  
**如有必要，进行抗原修复（见第17页的操作步骤）**  
**如组织中有内源性过氧化物酶**
- 用1-3滴或氧化物酶封闭试剂孵育样品5分钟  
**注意：**这一操作可能会影响未固定冰冻组织的形态。这就需要减少孵育时间。
- 浸洗样品，用洗涤缓冲液轻柔洗涤5分钟
- 用免疫染色笔将组织圈住。继续第15页的染色步骤。

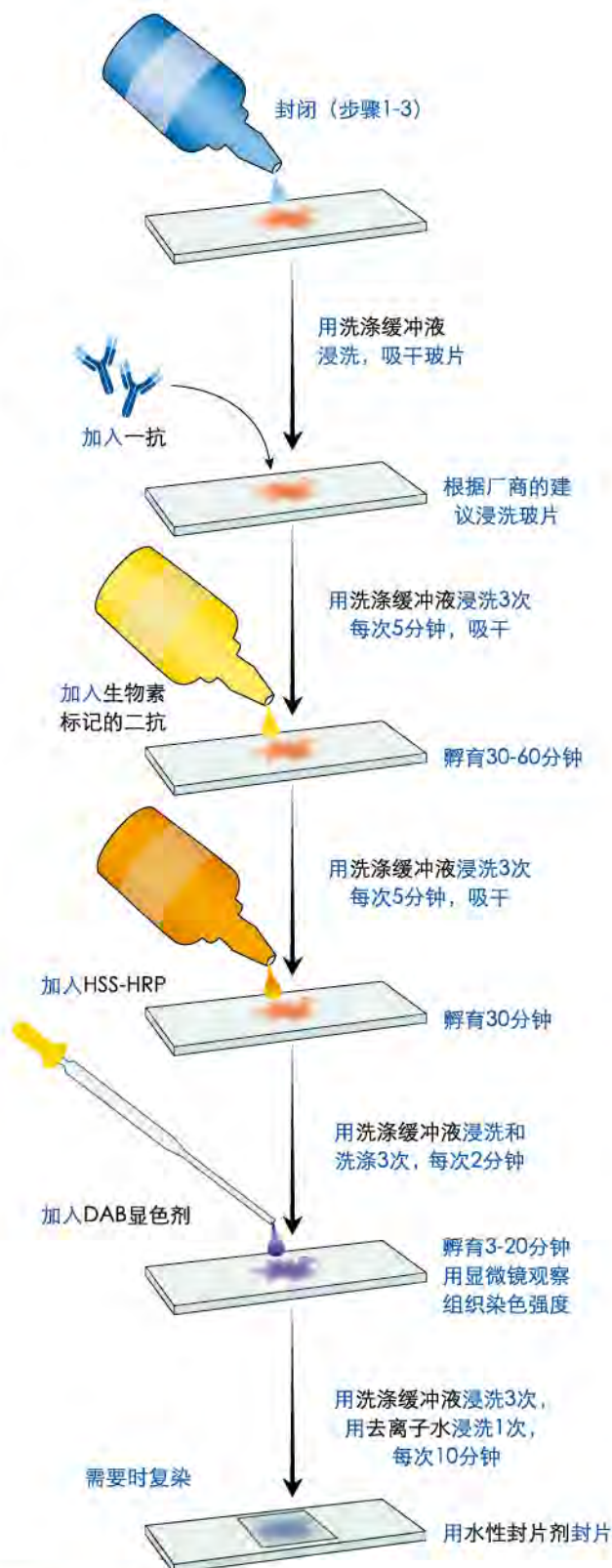




## 用HRP-DAB显色法检测

### 步骤

1. 用1-3滴血清封闭试剂封闭玻片15分钟。吸干玻片，在下一步之前擦去残余的封闭试剂。不要浸洗。
2. 用1-3滴亲和素封闭试剂孵育样品15分钟。用洗涤缓冲液浸洗样品，吸干玻片，擦去残余的洗涤缓冲液。
3. 用1-3滴生物素封闭试剂孵育样品15分钟。用洗涤缓冲液浸洗样品，吸干玻片，擦去残余的洗涤缓冲液。
4. 用稀释缓冲液溶解的一抗孵育样品。工作稀释度、孵育时间和温度参考厂商的建议。这些变量可能需要根据你的系统进行修正。
5. 用洗涤缓冲液浸洗样品并洗涤3次，每次5分钟，之后吸干玻片。
6. 用1-3滴生物素标记的二抗孵育样品30-60分钟，根据切片的厚度调整孵育时间（大约5-10 $\mu$ m厚的切片30分钟，10-20 $\mu$ m厚的60分钟）。
7. 用洗涤缓冲液浸洗样品并洗涤3次，每次15分钟，之后吸干玻片。
8. 用1-3滴HSS-HRP孵育样品30分钟。
9. 用洗涤缓冲液浸洗样品并洗涤3次，每次2分钟。
10. 根据完全覆盖组织切片需要100-200 $\mu$ L体积来计算DAB显色剂的工作体积。加入1-5滴DAB显色剂完全覆盖组织切片并孵育3-20分钟。在显微镜下观察组织染色强度。  
**注意：**DAB增强剂可以用来增强DAB显色剂的效果。DAB是有害物质。根据MSDS进行安全处理。
11. 用洗涤缓冲液浸洗样品3次，每次10分钟。
12. 用去离子水浸洗并吸干玻片。
13. 染色的组织可以不经复染直接封片或用苏木精复染以便更好地观察组织形态。
14. 用合适尺寸的盖玻片覆盖染色的组织。将玻片垂直置于滤纸或纸巾上以吸去多余的封片剂并使玻片干燥。
15. 在光学显微镜下观察组织。





## D.用荧光显微镜检测组织切片的IHC染色

以下实验方案由R&D Systems IHC/ICC实验室设计并优化，使用Northernlights二级染色试剂（见23页）。该方案须依据具体使用的组织类型进行适当调整。实验者应当确定抗体的最佳工作稀释度。若使用R&D Systems的一抗，请参考说明书上的相应工作稀释度。其他的试剂请参考相应厂商的使用说明。

**注意：**DAB是有害物质，应穿戴手套和安全眼镜，在通风橱内操作。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 荧光IHC染色额外所需用品

#### 试剂

- 一抗
- 抗淬灭封片剂  
(i-BRITE Plus, 货号SF40000, Neuromics, Inc., 或类似产品)
- 封闭缓冲液: 10%正常驴血清, 0.3%Triton X-100
- 稀释缓冲液: PBS (1×), 1%牛血清白蛋白, 1%正常驴血清
- 0.3% Triton™ X-100, 0.01%叠氮化钠
- Northernlights荧光二抗/链霉亲和素偶联物 (或类似产品)
- PBS (1×): 0.137M NaCl, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4
- 洗涤缓冲液: PBS (1×)

#### 材料

- 盖玻片
- 带有石蜡包埋或冷冻组织切片的玻片

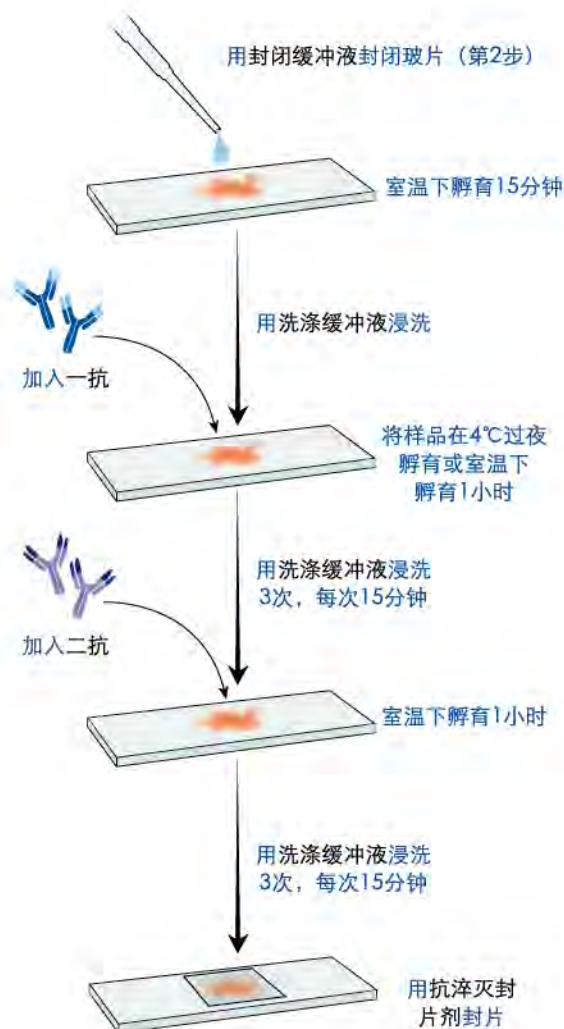
### 使用荧光显微镜的IHC染色

#### 步骤

- 1.玻片准备（见第14页第1步）。
- 2.用封闭缓冲液在室温下封闭玻片15分钟，用洗涤缓冲液洗涤。
- 3.根据厂商的说明将一抗用稀释缓冲液稀释至工作浓度，在玻片上加入少量稀释后的一抗，4℃孵育过夜或室温孵育30-60分钟。  
**注意：**只要能够避免使用具有相同种属反应性的二级试剂，在第5步中可以同时加入针对不同抗原的一抗。如果有可能，一抗也应当来自于不同种属。详见第8页。  
**注意：**应当使用阴性对照和/或同型匹配对照以区分二抗的非特异性结合。关于IHC/ICC对照，详见第5页。
- 4.用洗涤缓冲液洗涤玻片3次，每次15分钟。
- 5.用溶于稀释缓冲液的、Northernlights标记的、可以识别一抗来源种属的二抗（或类似试剂）在室温下孵育1小时。或者，如果一抗是生物素标记的，则可以使用Northernlights标记的链霉亲和素。  
**注意：**有些组织可以非特异性地结合生物素-亲和素标记成分，造成高背景染色（见第5页）。

6.用洗涤缓冲液洗涤玻片3次，每次15分钟。

7.用抗淬灭封片剂封片。





## E.用热诱导的表位修复（HIER）进行抗原修复

在组织的制备过程中，抗原修复可暴露被遮蔽的抗原表位。下面的实验方案介绍了R&D Systems所使用的技术，适用于冰冻切片和石蜡包埋切片。本方案可使用R&D Systems的酸性、碱性或通用抗原修复试剂。这些溶液的预处理可诱导免疫反应性的显著增强。不过，它们也可能影响组织形态。抗原修复的最佳方法必须通过实验来确定。使用抗原修复的IHC示例见第10页。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 实验用品

#### 试剂

- 抗原修复液（10×）：
  - 碱性抗原修复试剂（货号CTS013）或
  - 酸性抗原修复试剂（货号CTS014）或
  - 通用抗原修复试剂（货号CTS015）
- 去离子水
- PBS（1×）：0.137 M NaCl、0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.4

#### 设备

- 聚丙烯coplin染色缸（或类似产品）
- 92-95℃水浴

#### 材料

- 带有石蜡包埋或冰冻组织切片的玻片

### 步骤

- 1.将1份10X抗原修复浓缩液与9份去离子水混合，制备工作液。
- 2.将装有修复液的聚丙烯Coplin染色缸放入水浴中，让修复液预热到92-95 ° C。
  - 注意：加热可能导致玻璃染色皿的破裂。
- 3.将玻片浸没在预热的修复液中2-10分钟。
  - 注意：抗原修复剂的效果取决于它们的温度（90-100 ° C）和孵育时间（最多30分钟），每位研究人员须自行确定最佳条件。
  - 注意：冰冻切片比石蜡包埋切片对修复液的伤害更为敏感。为了避免组织伤害，有必要将孵育时间缩短至2-5分钟。
- 4.在孵育完成后，从水浴中取出装有修复液和玻片的Coplin染色缸，让其冷却至室温。
- 5.轻柔冲洗玻片，先用去离子水，再用PBS。
  - 注意：修复之后组织可能会较为松散，因此避免剧烈冲洗，以防止组织从玻片上脱落。
- 6.组织现在可用于封闭和一抗孵育。





## F.ICC细胞爬片的制备和细胞固定

组织切片IHC实验的基本原理也同样适用于ICC。但是，这些实验方案必须针对细胞或细胞悬液进行特别的调整。以下实验方案介绍ICC实验中如何制备明胶包被的盖玻片和细胞固定方法。

开始之前请仔细阅读整个实验流程

### 用明胶处理盖玻片

许多种细胞在玻璃盖玻片上粘附能力都不强。有几种技术可以增强细胞粘附，包括使用多聚鸟氨酸、多聚赖氨酸和/或胞外基质蛋白如层粘连蛋白或纤粘蛋白。在盖玻片上铺上一薄层明胶也常用来增强细胞与玻璃的粘附。

### 实验用品

#### 试剂

- 明胶包被的溶液：去离子水溶解的0.1%的明胶

#### 材料

- 盖玻片（无菌处理的）
- 细胞培养板（6孔或24孔）

### 步骤

- 1.将盖玻片无菌处理并将其置于24孔板的孔中。
- 2.加入400 $\mu$ L明胶包被溶液并在室温下孵育10分钟。
- 3.去除明胶包被溶液并风干玻片15分钟。
- 4.使用前可以将风干的玻片置于室温保存

### 在盖玻片上准备和固定细胞

### 实验用品

#### 试剂

- 固定剂：溶于PBS的2-4%的甲醛
- 洗涤缓冲液：溶于PBS的0.1%的BSA
- 细胞培养及
- PBS（1 $\times$ ）：0.137M NaCl, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4

#### 材料

- 置于24孔板中的明胶包被的盖玻片

### 步骤

- 1.在放有明胶包被的盖玻片的板孔中加入0.5ml的含有约5000个细胞的培养基，培养细胞。
- 2.当细胞达到所需密度/老化状态时，去除孔中的培养基并用PBS洗2次。
- 3.每孔加入300-400 $\mu$ L 2-4%的甲醛并在室温下孵育20分钟。
- 4.每孔用PBS洗涤2次并加入400 $\mu$ L洗涤缓冲液覆盖。盖玻片可以在3-8 $^{\circ}$ C下保存3个月或立即进行染色。

**注意：**固定会导致组织蛋白质的疏水交联。交联的程度取决于固定的时间、温度、pH和固定剂。固定方案一经优化，就应遵循同样的操作步骤。





## G.细胞的荧光ICC染色

以下实验方案的建立和优化使用的是R&D Systems的一抗和Northernlights荧光二抗（见第8页）。该实验方案针对特定的ICC实验可能需要优化。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 实验用品

#### 试剂

- 一抗
- 封闭试剂：10%正常驴血清，0.3%Triton X-100
- DAPI（4',6-二脒基-2-苯基吲哚）溶液：每5 mL PBS中加入1  $\mu$ L 14.3 mM储液。将未使用的DAPI储存在2-8 °C，用铝箔包住
- 去离子水
- 稀释缓冲液：PBS（1×）、1%牛血清白蛋白（BSA）、1%正常驴血清、0.3% Triton X-100和0.01%叠氮化钠
- 抗淬灭封片剂
- Northernlights标记的二级试剂（见第110页）或类似产品
- PBS（1×）：0.137 M NaCl、0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，pH 7.4
- 洗涤和抗体稀释缓冲液：溶于PBS（1×）的0.1%的BSA

#### 材料

- 置于6孔或24孔板中的细胞爬片
- 细镊子

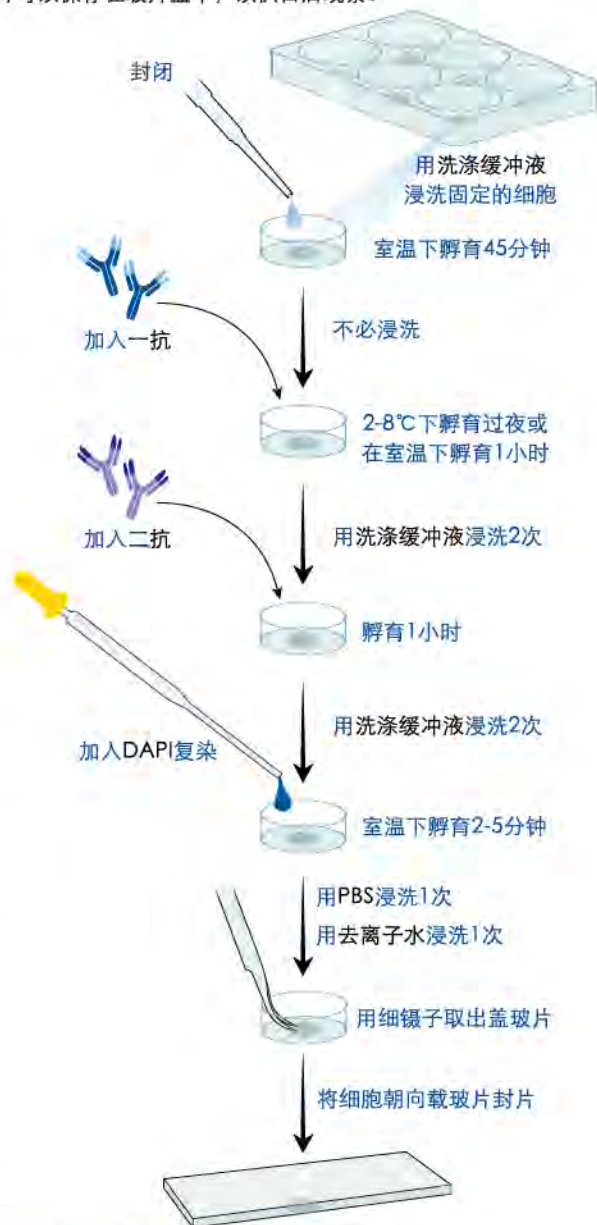
### 步骤

注意：这一方案是针对生长在6孔或24孔板中盖玻片上的细胞优化的，可以适当调整。

- 1.用400 $\mu$ L的洗涤缓冲液洗涤固定有细胞的玻片2次。
- 2.加入400 $\mu$ L的封闭缓冲液在室温下封闭45分钟。
- 3.去除封闭缓冲液，不必浸洗。
- 4.按照厂商的说明用稀释缓冲液稀释无标记的一抗（或荧光标记的一抗）。2-8℃下孵育过夜或室温下孵育1小时。  
注意：可能需要尝试不同的抗体浓度和孵育时间来达到最佳标记效果。
- 5.用400 $\mu$ L的洗涤缓冲液洗涤2次。如果使用的是直接荧光标记的一抗，跳到第8步。
- 6.根据厂商的说明用稀释缓冲液稀释二抗。每孔加入400 $\mu$ L，室温下在暗处孵育1小时。从这一步开始，都需要避光操作。
- 7.用400 $\mu$ L的洗涤缓冲液洗2次。
- 8.每孔加入300 $\mu$ L稀释好的DAPI并在室温下孵育2-5分钟。DAPI结合在DNA上，是一种方便的核复染方法。它在358nm处有最大吸收值，在461nm的最大发射波长处发出蓝色荧光。
- 9.用PBS洗一次，用水一次。

10.小心地去除玻片并吸去残余的水分。在显微镜载玻片上每块盖玻片的位置滴上一滴抗淬灭封片剂。将有细胞的一面朝向载玻片，盖上盖玻片。

11.使用荧光显微镜和与荧光标记相应的滤镜组观察。在-20℃下，玻片可以保存在玻片盒中，以供日后观察。



## H.非贴壁细胞ICC细胞涂片制备

将非贴壁细胞涂布在明胶包被的玻片上，形成单层细胞，可通过ICC轻松观察。

开始之前请仔细阅读整个实验流程。

### 实验用品

#### 试剂

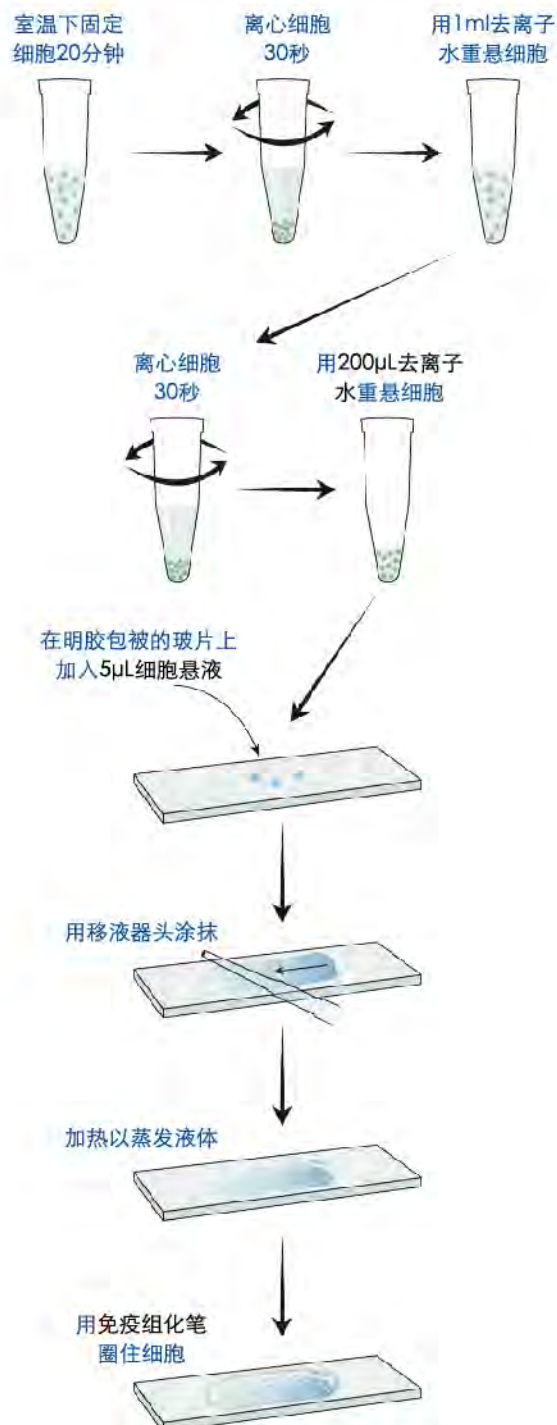
- 去离子水
- 固定剂：溶于PBS (1×) 的4%的甲醛
- PBS (1×)：0.137M NaCl, 0.05M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.4

#### 材料

- 微离心管 (1.5mL)
- 明胶包被的显微镜玻片
- 电炉
- 免疫组化笔
- 微离心机

### 步骤

- 1.在室温下用4%甲醛固定细胞20分钟，将甲醛直接加入培养基中，调整至大约 $1 \times 10^6$  细胞/mL。
- 2.在1.5 mL microfuge离心管中加入1 mL细胞溶液。
- 3.在microfuge离心机中离心细胞30秒。
- 4.弃上清，将细胞沉淀重悬于1 mL去离子水中。
- 5.在microfuge离心机中离心细胞30秒。
- 6.弃上清，将细胞沉淀重悬于200  $\mu\text{L}$ 去离子水中。
- 7.在明胶包被的玻片上加入5  $\mu\text{L}$ 细胞悬液（每块玻片上3个点），并用移液器吸头的侧面涂抹。
- 8.将玻片放在电炉上（低温设置），让液体蒸发。
- 9.在显微镜下检查玻片，确保无盐的晶体。如果观察到盐的晶体，用水洗涤玻片。
- 10.用免疫组化笔圈定细胞，让其自然风干。
- 11.将玻片保存在 $2-8^\circ\text{C}$ ，最多3个月，或立即染色。





问题：缺乏染色	
可能的原因	检测方法和相应的措施
没有抗原	用原位杂交的方法检测蛋白表达（有时即使能检测到mRNA，翻译也有可能受阻）。
由于错误的储存方法，抗体失效	按照说明书储存。通常，将抗体按照足够制备单次实验工作溶液的体积分装。储存在手动除霜冰箱中（-20到-70℃），避免反复冻融。
无效的一抗或二抗	单独检查报告系统以评估试剂的有效性。
固定不充分	尝试增加固定时间或改用不同的固定剂。
过度固定	减少浸润或固定后步骤的时间。如果必须使用浸润法固定（例如病理实验室中的尸检组织或切片），可以用抗原修复试剂修复被遮蔽的表位。
不兼容的二抗和一抗	使用可以与一抗结合的二抗。例如，如果一抗是兔源的，则使用抗兔的二抗。
在与一抗孵育前抗原被破坏	如果内源性过氧化物酶的封闭是在加入一抗前进行的，则改为加入一抗之后再封闭。
在固定或包埋过程中表位发生改变	尝试使用不同的抗原修复技术恢复免疫反应性。在58℃以下包埋组织。
抗原修复无效	增加修复时间或更换修复液。
漏用试剂或未按正确的顺序加入试剂	重复染色并确定使用的试剂和加入的顺序正确。
问题：高背景	
可能的原因	检测方法和相应的措施
一抗或二抗的浓度过高	对抗体进行滴定以确定获得特异性反应的最佳浓度。
抗体和组织中蛋白的疏水相互作用	降低抗体稀释液的离子强度（降低盐浓度对单克隆抗体尤其有效）。
一抗和/或二级试剂与组织的非特异性结合	一抗孵育前进行封闭（我们用1%的牛血清白蛋白或者10%的正常驴血清，也可以使用脱脂奶粉）。
二抗的非特异性结合	使用去除了交叉反应性IgG的抗体（针对样品目标种属去除）。
组织过于干燥	在染色过程中避免组织干燥。
试剂粘附在旧的或未制备好的玻片上	用新鲜制备或购买的玻片进行实验。
由于离子相互作用造成的背景	增加稀释缓冲液的离子强度。
问题：细胞/组织的形态被破坏	
可能的原因	检测方法和相应的措施
抗原修复方法过于剧烈	在修复抗原的时候根据经验确定合适的条件以保持组织形态。
组织切片从玻片上脱落（更常见于冰冻切片）	增加固定时间。根据经验增加额外的或更换固定剂。使用新鲜准备的，带有充足电荷的玻片。
组织切片撕裂或褶皱。切片下有气泡	使用锋利的刀片重新切片或者在分析结果的时候忽略受损的区域。
组织形态难以分辨	切片的时候切得薄些。冰晶有可能破坏冰冻切片的形态。
固定不充分的组织或细胞在染色时可能遭到破坏	增加固定时间和/或进行二次固定。提高固定剂/组织的比例。将组织切得较小以获得更彻底的浸润固定。
组织的自发裂解产生很多染色的坏死碎片	增加固定时间，比率。考虑使用交联性固定剂。
问题：染色不正确	
可能的原因	检测方法和相应的措施
固定方法对于抗原不合适	尝试不同的固定剂或增加固定时间。
抗原修复方法对于抗原或组织可能不合适	尝试改变抗原修复条件。
抗原的静电荷发生了变化	尝试调整抗体稀释液的pH值或阳离子浓度。
没有及时固定引起抗原的扩散	立即固定组织。尝试用交联性固定剂替换有机（醇类）固定剂。



二抗

一抗种属和亚型	标记	型号	应用	货号	规格	价格
Chicken IgY	None	Chicken IgY specific polyclonal goat IgG	Western blot	AF010	500 µg	询价
	Biotin	Chicken IgY specific polyclonal goat IgG	Western blot	BAF010	250 µg	询价
Goat IgG	None	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	AF109	500 µg	询价
	Biotin	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	BAF109	250 µg	询价
	Biotin	Goat IgG specific polyclonal rabbit IgG	Western blot	BAF017	250 µg	询价
	Biotin	Goat IgG specific polyclonal chicken IgY	Western blot	BAF019	250 µg	询价
	HRP	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	HAF109	1 mL	询价
	HRP	Goat IgG specific polyclonal rabbit IgG	Western blot	HAF017	1 mL	询价
	HRP	Goat IgG specific polyclonal chicken IgG	Western blot	HAF019	1 mL	询价
	APC	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Flow Cytometry	F0108	100 Tests	询价
	Fluorescein	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Flow Cytometry	F0109	100 Tests	询价
	PE	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG	Flow Cytometry	F0107	100 Tests	询价
Goat IgG (H+L)	None	Goat IgG specific polyclonal rabbit IgG	Western blot	R-401-C-ABS	500 µg	询价
	PerCP	Goat IgG specific polyclonal donkey IgG (H+L) chains	Flow Cytometry	F0124	100 Tests	询价
Hamster IgG	APC	Monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub> clone # MAH1.12	Flow Cytometry	F0121	100 Tests	询价
	PE	Monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub> clone # MAH1.12	Flow Cytometry	F0120	100 Tests	询价
	None	Monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub> clone # MAH1.12	Western blot	MAB011	500 µg	询价
	Biotin	Monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub> clone # MAH1.12	Western blot	BAM011	250 µg	询价
Human IgG Fc	None	Human IgG Fc specific polyclonal goat IgG	Western blot	G-102-C	100 µg	询价
Human IgG <sub>1</sub> Fc	None	Human IgG <sub>1</sub> Fc specific monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	Western blot	MAB110	500 µg	询价
Human IgM	None	Human IgM specific polyclonal goat IgG	Western blot	G-105-C	100 µg	询价
Human IgE	None	Human IgE specific polyclonal goat IgG	Western blot	G-107-C	100 µg	询价
Human IgG (H+L)	None	Human IgG specific polyclonal goat IgG (H+L) chains	Western blot	G-101-C-ABS	500 µg	询价
Mouse IgG	PerCP	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0114	100 Tests	询价
	None	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	AF007	500 µg	询价
	Biotin	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	BAF007	250 µg	询价
	Biotin	Mouse IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	BAF018	250 µg	询价
	HRP	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	HAF007	1 mL	询价
	HRP	Mouse IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	HAF018	1 mL	询价
Mouse IgG Fc	None	Mouse IgG Fc specific polyclonal goat IgG	Western blot	G-202-C	100 µg	询价
Mouse IgG	None	Mouse IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	D-201-C-ABS2	500 µg	询价
Mouse IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L)	APC	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0101B	100 Tests	询价
	Fluorescein	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0103B	100 Tests	询价
	PE	Mouse IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0102B	100 Tests	询价
Rabbit IgG	None	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	AF008	500 µg	询价
	Biotin	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	BAF008	250 µg	询价
	HRP	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	HAF008	1 mL	询价
	APC	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0111	100 Tests	询价
	Fluorescein	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0112	100 Tests	询价
	PE	Rabbit IgG specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0110	100 Tests	询价
	None	Rabbit IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	D-301-C-ABS2	500 µg	询价
	HRP	Rat specific polyclonal goat IgG	Western blot	HAF005	1 mL	询价
Rat IgG	None	Rat IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	AF005	500 µg	询价
	PerCP	Rat IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0115	100 Tests	询价
	Biotin	Rat IgG specific polyclonal goat IgG	Western blot	BAF005	250 µg	询价
Rat IgG F(ab') <sub>2</sub>	APC	Rat IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0113	100 Tests	询价
Rat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L)	Fluorescein	Rat IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0104B	100 Tests	询价
	PE	Rat IgG specific polyclonal goat IgG F(ab') <sub>2</sub> (H+L) Fragment	Flow Cytometry	F0105B	100 Tests	询价



二抗

一抗种属和亚型	标记	型号	应用	货号	规格	价格
Sheep IgG	Biotin	Sheep IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	BAF016	250 µg	询价
	HRP	Sheep IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	HAF016	1 mL	询价
	None	Sheep IgG specific polyclonal donkey IgG	Western blot	D-501-C-ABS	500 µg	询价
Mouse IgM	APC	Mouse IgM specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0117	100 Tests	询价
	Fluorescein	Mouse IgM specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0118	100 Tests	询价
	PerCP	Mouse IgM specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0119	100 Tests	询价
	PE	Mouse IgM specific polyclonal goat IgG	Flow Cytometry	F0116	100 Tests	询价

Northernlights™ 一种用于IHC/ICC的荧光基团标记二级试剂

Northernlights二抗发射光强度高、抗淬灭，能够识别小鼠、山羊、绵羊、大鼠和兔子的IgG和鸡的IgY。和所有R&D Systems的抗体一样，Northernlights标记的抗体特异性好、信噪比高。同时还提供用于生物素标记抗体的链霉亲和素偶联物。

描述	标记	货号	规格	价格
Donkey Anti-Goat IgG, Cross-adsorbed	NorthernLights-557	NL001	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL002	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL003	500 µL	询价
Donkey Anti-Rabbit IgG, Cross-adjusted	NorthernLights-557	NL004	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL005	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL006	500 µL	询价
Donkey Anti-Mouse IgG, Cross-adsorbed	NorthernLights-557	NL007	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL008	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL009	500 µL	询价
Donkey Anti-Sheep IgG, Cross-adsorbed	NorthernLights-557	NL010	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL011	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL012	500 µL	询价
Goat Anti-Rat IgG	NorthernLights-557	NL013	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL014	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL015	500 µL	询价
Goat Anti-Chicken IgY	NorthernLights-557	NL016	500 µL	询价
	NorthernLights-637	NL017	500 µL	询价
	NorthernLights-493	NL018	500 µL	询价
Streptavidin NL493	NorthernLights-493	NL997	500 µL	询价
Streptavidin NL637	NorthernLights-637	NL998	500 µL	询价
Streptavidin NL557	NorthernLights-557	NL999	500 µL	询价

对照抗体

描述	标记	型号	货号	规格	价格
Goat IgG	Fluorescein	Normal goat IgG	IC108F	200 Tests	询价
	PE	Normal goat IgG	IC108P	200 Tests	询价
	PerCP	Normal goat IgG	IC108C	200 Tests	询价
	None	Normal goat IgG	AB-108-C	1 mg	询价
	Biotin	Normal goat IgG	BAF108	100 µg	询价
Human IgG, Fc	None	NS0-expressed recombinant protein	110-HG-100	100 µg	询价
Human IgG	None	Normal human IgG	1-001-A	1 mg	询价
	None	Normal sheep IgG	5-001-A	1 mg	询价
	APC	Normal sheep IgG	IC016A	200 Tests	询价
Sheep IgG	Fluorescein	Normal sheep IgG	IC016F	200 Tests	询价

## 对照抗体，续

描述	标记	型号	货号	规格	价格
Mouse IgG <sub>1</sub>	PerCP	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	IC002C	200 Tests	询价
	APC	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	IC002A	200 Tests	询价
	None	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	MAB002	500 µg	询价
	Biotin	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	IC002B	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	IC002F	200 Tests	询价
	PE	Normal mouse IgG <sub>1</sub> , clone # 11711	IC002P	200 Tests	询价
Mouse IgG <sub>2A</sub>	None	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	MAB003	500 µg	询价
	None	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 133304	MAB0031	500 µg	询价
	PerCP	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	IC003C	200 Tests	询价
	APC	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	IC003A	200 Tests	询价
	Biotin	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	IC003B	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	IC003F	200 Tests	询价
	PE	Normal mouse IgG <sub>2A</sub> , clone # 20102	IC003P	200 Tests	询价
Mouse IgG <sub>2A</sub> Fc	None	NS0-expressed recombinant protein	4460-MG-100	100 µg	询价
Mouse IgG <sub>2B</sub>	None	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 20116	MAB004	500 µg	询价
	None	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 133303	MAB0041	500 µg	询价
	None	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 73009	MAB0042	500 µg	询价
	APC	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 133303	IC0041A	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 133303	IC0041F	200 Tests	询价
	PE	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 133303	IC0041P	200 Tests	询价
	PerCP	Normal mouse IgG <sub>2B</sub> , clone # 133303	IC0041C	200 Tests	询价
Mouse IgG <sub>3</sub>	None	Normal mouse IgG <sub>3</sub> , clone # 133316	MAB007	500 µg	询价
	APC	Normal Mouse IgG <sub>3</sub> , clone # 133316	IC007A	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal Mouse IgG <sub>3</sub> , clone # 133316	IC007F	200 Tests	询价
	PE	Normal Mouse IgG <sub>3</sub> , clone # 133316	IC007P	200 Tests	询价
Rabbit IgG	APC	Normal rabbit IgG	IC105A	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal rabbit IgG	IC105F	200 Tests	询价
	PE	Normal rabbit IgG	IC105P	200 Tests	询价
	None	Normal rabbit IgG	AB-105-C	1 mg	询价
Rat IgG	None	Normal rat IgG	6-001-A	1 mg	询价
Rat IgG <sub>1</sub>	None	Normal rat IgG <sub>1</sub> , clone # 43414	MAB005	500 µg	询价
	APC	Normal rat IgG <sub>1</sub> , clone # 43414	IC005A	200 Tests	询价
	Biotin	Normal rat IgG <sub>1</sub> , clone # 43414	IC005B	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal rat IgG <sub>1</sub> , clone # 43414	IC005F	200 Tests	询价
	PE	Normal rat IgG <sub>1</sub> , clone # 43414	IC005P	200 Tests	询价
Rat IgG <sub>2A</sub>	None	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	MAB006	500 µg	询价
	APC	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	IC006A	50 µg	询价
	Biotin	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	IC006B	50 µg	询价
	Fluorescein	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	IC006F	200 Tests	询价
	PE	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	IC006P	200 Tests	询价
	PerCP	Normal rat IgG <sub>2A</sub> , clone # 54447	IC006C	200 Tests	询价
Rat IgG <sub>2B</sub>	PerCP	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	IC013C	200 Tests	询价
	APC	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	IC013A	200 Tests	询价
	Biotin	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	IC013B	200 Tests	询价
	Fluorescein	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	IC013F	200 Tests	询价
	PE	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	IC013P	200 Tests	询价
	None	Normal rat IgG <sub>2B</sub> , clone # 141945	MAB0061	500 µg	询价
Mouse IgG <sub>3</sub>	PerCP	Normal mouse IgG <sub>3</sub> , clone # 133316	IC007C	200 Tests	询价
Mouse IgM	PerCP	Normal mouse IgM	IC015C	200 Tests	询价
Chicken IgY	None	Normal chicken IgY	AB-101-C	1 mg	询价



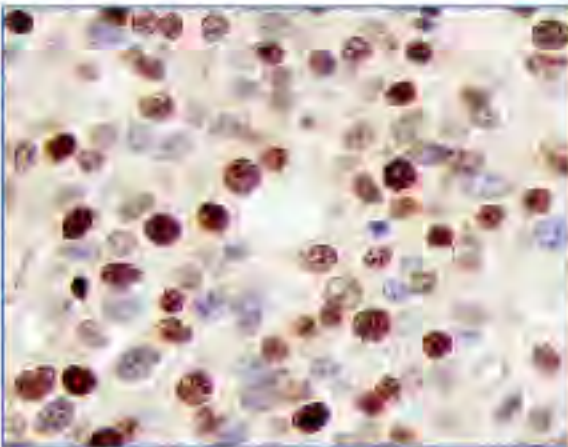
细胞和组织染色试剂盒和试剂

细胞和组织染色试剂盒用于各种组织学和细胞学样品中抗原的定位。这些试剂盒是基于亲和素与结合了组织里目标抗原的一抗之间形成的亲和素-生物素复合物（ABC）的原理，设计成即用型的规格。包含了稀释好的生物素标记的二抗和HSS-HRP，无须额外的孵育步骤，减少了手工操作的时间，降低了人为估算错误的风险，非常方便。

细胞和组织染色试剂盒

种属	标记	组份	货号	规格	价格
Anti-goat Anti-mouse Anti-rabbit Anti-rat Anti-sheep	HRP-DAB System	Secondary Biotinylated Antibody, Streptavidin-HRP Conjugate, DAB Chromogen, DAB Chromogen Buffer, Blocking Reagents	CTS008 CTS002 CTS005 CTS017 CTS019	50 Tests	询价
Anti-goat Anti-mouse Anti-rabbit Anti-rat Anti-sheep	HRP-AEC System	Secondary Biotinylated Antibody, Streptavidin-HRP Conjugate, AEC Chromogen, AEC Chromogen Buffer, Blocking Reagents	CTS009 CTS003 CTS006 CTS018 CTS020	50 Tests	询价

产品	描述	货号	规格	价格
p27/Kip1 IHC Detection Kit	Includes reagents for antigen retrieval, blocking reagent, detection reagents, and a specific monoclonal primary antibody for human p27 antigen	CTS2256	50 Tests	询价

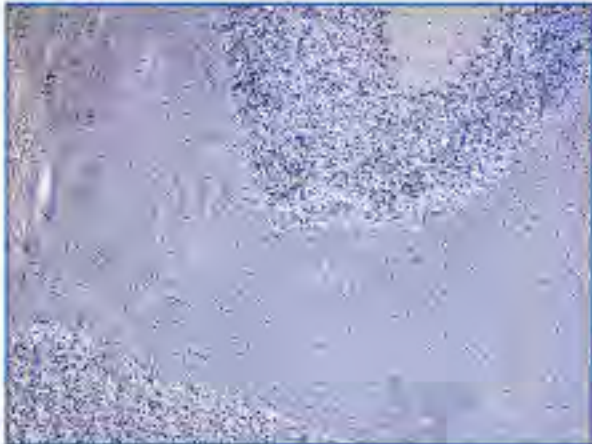


人前列腺癌组织中的p27。用人p27免疫组化检测试剂盒（货号CTS2256）检测石蜡包埋的人前列腺癌组织切片中的p27。用抗小鼠HRP-DAB（褐色）染色并用苏木精复染（蓝色）。

细胞和组织染色试剂

产品	描述	货号	规格	价格
Basic Antigen Retrieval Reagent	Antigen retrieval system that utilizes a heat-induced recovery of cell and tissue antigens.	CTS013	50 mL	询价
Acidic Antigen Retrieval Reagent	Antigen retrieval system that utilizes a heat-induced recovery of cell and tissue antigens.	CTS014	50 mL	询价
Universal Antigen Retrieval Reagent	Antigen retrieval system that utilizes a heat-induced recovery of cell and tissue antigens.	CTS015	50 mL	询价
Antigen Retrieval Reagent Sampler	All three reagents (CTS013, CTS014, CTS015) in one convenient pack.	CTS016	50 mL	询价
Avidin-Fluorescein	For use as a secondary reagent in immunofluorescent assays in conjunction with biotinylated primary labeling reagents.	F0030	100 Tests	询价
Streptavidin-Allophycocyanin	For use as a secondary reagent in immunofluorescent assays in conjunction with biotinylated primary labeling reagents.	F0050	100 Tests	询价
Streptavidin-Phycoerythrin	For use as a secondary reagent in immunofluorescent assays in conjunction with biotinylated primary labeling reagents.	F0040	100 Tests	询价
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	For use in ELISA or Western blot assays.	AR001	1 mL	询价
DAB Enhancer	DAB Enhancer is a concentrated 50X metal based solution used to intensify the DABChromogen (Catalog Numbers # CTS002, CTS005, CTS008, CTS017). In the presence of the DAB Enhancer, the DAB Chromogen produces a clear brown-black staining with minimal background.	CTS010	3 mL	询价
Mounting Medium	Permanent aqueous mounting medium	CTS011	15 mL	询价

对照



抗原修复



小鼠胚胎脑中的ZIC1。用抗人ZIC1亲和纯化的多克隆抗体（货号AF4978）检测E13小鼠脑冰冻切片中的小脑锌指蛋白1（ZIC1）。用抗山羊HRP-DAB细胞和组织染色试剂盒（货号CTS008；褐色）染色并用苏木精复染（蓝色）。