



The complete Guide to **Immunohistochemistry**

實驗應用指南

abcam 提供了全方位的 IHC 使用指南，從組織處理、阻斷到檢測和對比染色，幫助您順利完成 IHC 實驗。



progress happens together
abcam



台北:(02)8751-5851 台南:(06)311-0133 客服:0800-0123-10
台中:(04)2422-0117 新竹:(03)621-0429 信箱:service@exbio.com.tw



AB-3409-IHC

Introduction

免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

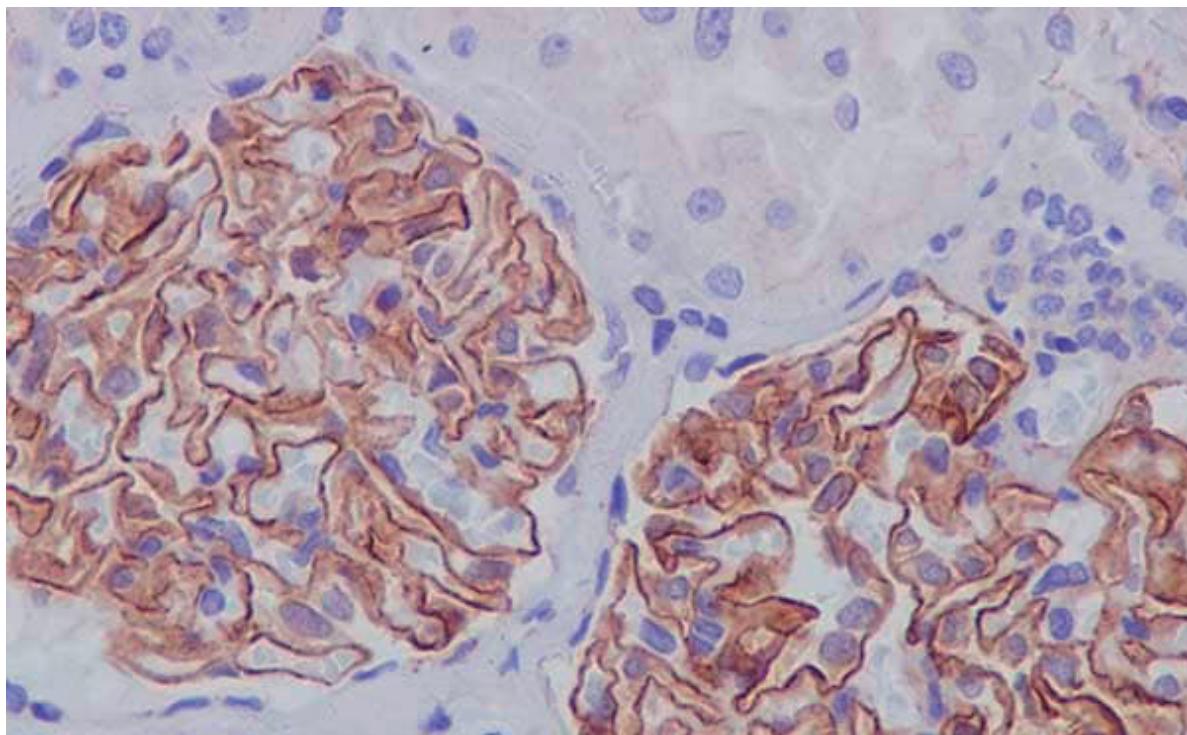
為使用抗體來檢測組織切片中蛋白質表現的方法之一，透過酵素受質 (enzyme-substrate) 呈色或螢光染料的訊號來偵測抗體與抗原的相互作用。雖然相較於西方墨點法 (western blot) 或 ELISA 等分析而言，IHC 的定量性較低，但在完整組織的背景下，IHC 可看出蛋白質定位的信息，對於病理學與疾病診斷是非常重要的研究工具。

Tissue processing, fixation, and sectioning

	Paraffin-embedded tissue 石蠟切片法	Frozen tissue 冷凍切片法	Floating sections 漂片法
Fixation 固定	包埋前使用 4% 甲醛 (formaldehyde) 進行固定	切片前/後使用甲醛 甲醇 (methanol)、乙醇 (ethanol) 或丙酮 (acetone) 固定	包埋前使用甲醛進行固定
Embedding / freezing 組織包埋/ 冷凍	組織脫水透化後使用石蠟 (paraffin) 預熱至 60°C 並靜置過夜	使用液態氮、乾冰或、 異戊烷 (isopentane) 或 OCT 包埋法迅速冷凍組織	不須包埋
		急速冷凍對於檢測後轉錄修飾 (post-translational modifications) 例如磷酸化來說非常重要	
Sectioning 切片	切片機	冷凍切片機	震動切片機
Storage 保存方式	室溫下可保存數年	-80°C 約保存一年 (保存於 -190°C 可延長)	保存於冷凍保護劑中 並存放在 -80°C 短期: PBS + azide 存放在 4°C
Advantages 優點	切片容易保存，不易損毀	保留抗原原始型態 較短操作時間 (不須經過冗長的固定步驟)	可處理較厚的切片 (>25 μm) 利於分析 3D 結構
Limitations 限制	固定過程可能造成抗原 型態改變，影響染色結果 可能須進行抗原修復	若組織沒有迅速冷凍處理 過程中可能產生冰晶而導致 組織結構被破壞影響染色效果	不適合處理較小結構或是單顆細胞
	過長固定步驟：在醇類中脫水 並使用二甲苯 (xylene) 以促進石蠟透化。	切片通常比石蠟切片厚 定位分析效果較差 可能需要阻斷具有活性的 內源性酵素 (endogenous enzymes)	需使用特別的透化方法，如： CLARITY 來減少光散射 以及增加組織切片的厚度

Antigen retrieval

甲醛固定會導致蛋白質交互連結 (cross-linking: methylene bridges)，遮蔽抗原表位並限制抗原與抗體的結合。進行抗原修復 (antigen retrieval)，顯露抗原表位使抗原可與抗體結合。



IHC for PDGFR beta in human kidney labeled anti-ZO1 tight junction protein [EPR19945-296] (ab221547). Heat mediated antigen retrieval was performed using Tris/EDTA buffer, pH 9.0 (ab93684).

	Heat-induced epitope retrieval 熱誘導抗原表位修復	Proteolytic-induced epitope retrieval 蛋白水解酶抗原表位修復
優點	屬於較緩和的抗原表位修復方法	有效恢復較難修復的抗原
pH 酸鹼值	普遍使用 pH 6 最佳酸鹼值須依實驗進行調整	普遍使用 pH 7.4
溫度	大約 95°C	大約 37°C
培養時間	10-20 分鐘	10-15 分鐘
緩衝溶液	取決於目標抗原適合的 pH 值 常見的緩衝試劑: sodium citrate、EDTA 與 Tris-EDTA	使用中性的蛋白水解酵素試劑 常見的酵素: pepsin、proteinase K 或 trypsin
注意事項	加熱需要注意受熱是否均勻，劇烈沸騰可能會使切片從載玻片上脫落	使用酵素修復須注意濃度與處理時間

Blocking proteins

利用血清或蛋白阻斷來降低非特異性抗體連接，來降低背景值以及偽陽性的結果，如：
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 或酪蛋白 (casein)。

如果使用與樣本相同物種 (在小鼠組織上使用小鼠抗體) 的一級抗體，
應使用針對該物種的次級抗體的 F(ab) 片段進行阻斷。
F(ab) 片段結合到組織切片中的任何內源性抗體，阻斷二級抗體的結合。

Blocking endogenous enzymes

針對酵素呈色法，需要阻斷 (blocking) 內源性酵素以免混淆您的實驗結果。
可在與一級抗體培養後阻斷內源性酵素，如經過 H₂O₂ 處理能損害表位而影響結合。
如果您的抗體為 HRP 連結的一級抗體，建議在培養一級抗體前進行阻斷。

Peroxidase blocking

When using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies for detection, non-specific or high background staining may occur due to endogenous peroxidase activity. Incubate tissues with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate before primary antibody incubation to check for endogenous peroxidase activity.

If the tissues turn brown, endogenous peroxidase (found in red blood cells, for example) is present and you require a blocking step. Hydrogen peroxide (H₂O₂) is the most common peroxidase blocking agent.

Alkaline phosphatase blocking

Endogenous alkaline phosphatase (AP) can produce high background when using an AP-conjugated antibody for detection. Tissue can be tested for endogenous AP by incubating with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT); if a blue color appears, then endogenous AP is present, and blocking is necessary.

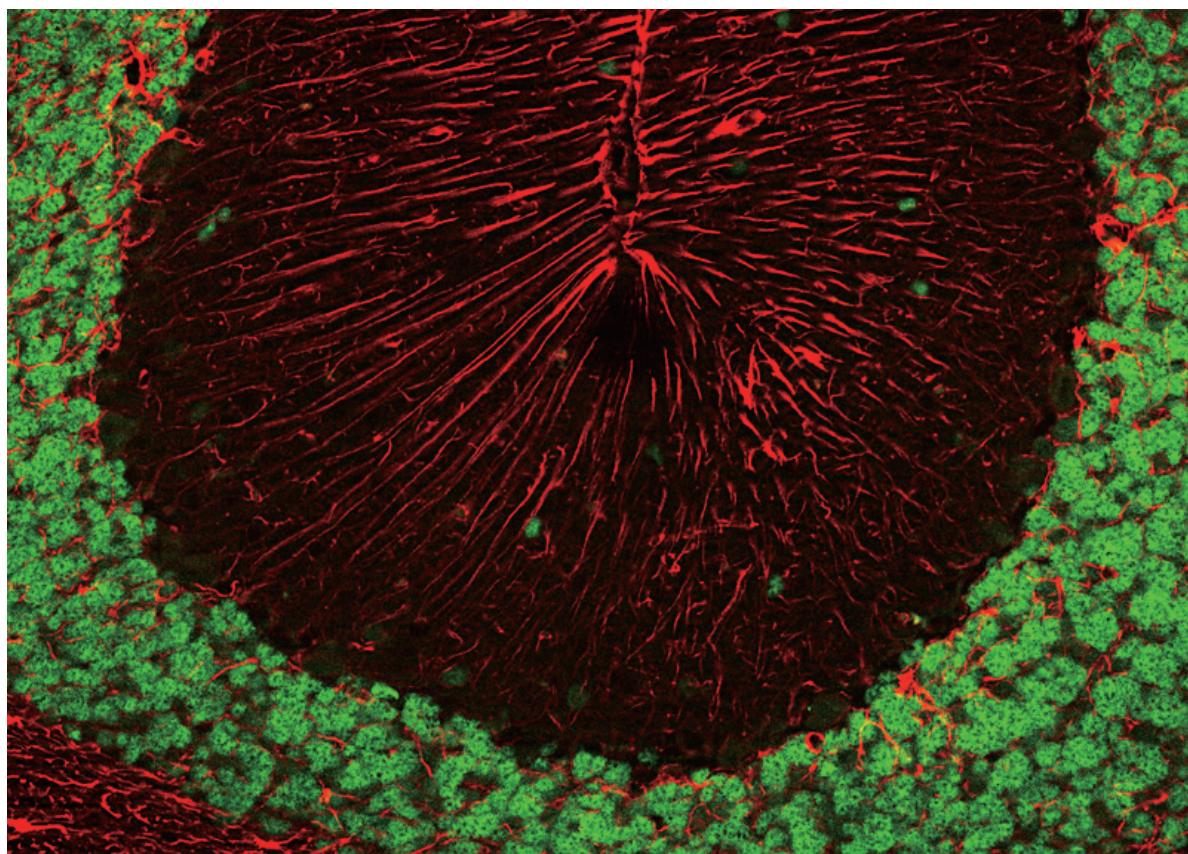
There are several AP inhibitors available, including levamisole hydrochloride and tetramisole hydrochloride.

Detection and amplification systems

Chromogenic vs fluorescent detection

偵測方法可以使用酵素呈色法如含有 HRP 或 AP 標記的抗體；或是利用螢光染色 (immunofluorescence) 如含有 FITC、R-PE 或 Alexa-Fluor®。

	Chromogenic 酵素呈色法	Fluorescent 螢光染色法
實驗原理	生物素 (biotin) 和鏈親和素 (streptavidin)-HRP 可以進一步使用 ABC 的方法擴增以放大訊號	經由不同的波長可激發出多重的螢光，可對不同抗原進行多重染色 (multi-color IHC)
儀器設備	可見光顯微鏡	須具備可偵測螢光的顯微鏡
優點	部分呈色物質穩定 (HRP/DAB)，大部分都可以在玻片中保存數年之久	螢光訊號更適合進行定量分析，具有更高品質的呈像結果
限制	相較於螢光染色，容易有塊狀沉澱物，容易造成判讀錯誤的情況 步驟較繁複需要多次靜置時間與阻斷步驟	螢光訊號不穩定，容易隨著時間減弱，不易於保存



Fluorescent IHC image of NeuN in paraffin-embedded mouse cerebellum tissue sections. Green is anti-NeuN [EPR12763] (ab177487), with goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor® 488 (ab150097), red is anti-GFAP (ab4674), with goat anti-chicken IgY conjugated to Alexa Fluor® 594 (ab150176). Image by Carl Hobbs, King's College London, UK.

Enzymes and chromogens 酵素與呈色受質

實驗當中需要考慮的其他條件為酵素和呈色受質，不同的呈色受質可以搭配的酵素也不同。其中以 HRP-DAB 為最常使用的方法。酵素呈色的優點為可搭配封片劑一起使用，可產生更清晰的圖像。然而，可使用水性的封片劑能夠在不脫水的情況下進行操作。

酵素	呈色受質	顏色	封片劑	優點	缺點
HRP	DAB	咖啡	有機/水溶性		
	DAB + nickel enhancer	黑	有機/水溶性	顯色度高/永久呈色	內源性的過氧化物酶活性表現在組織中可能會有假陽性的結果
	AEC	紅	水溶性	顯色度高/ 與藍色形成強烈對比	
AP	BCIP/NBT	藍/黑	有機	顯色度高	
	Fast red	紅	水溶性		內源性的 AP 活性表現在組織中 可能會有假陽性的結果
	Permanent Red	紅	有機/水溶性		

Counterstaining

在進行 IHC 實驗時應使用對比染色，可以看出抗體染色與組織中的細胞結構之間的關係。

類型	染料	目標	顏色
Chromogenic	Hematoxylin	細胞核	藍/紫色
	Nuclear fast red (Kernechtrot)		紅色
	Methyl green	核酸	藍色
Fluorescent	DRAQ5™		紅色
	DRAQ7™		紅色
	Nuclear yellow (Hoechst S769121)	核酸	黃/藍色
	Nuclear Green DCS1		綠色
	Hoechst stain		藍色
	DAPI		藍色
	Propidium iodide		紅色

Troubleshooting IHC experiments

No staining 無訊號

可能原因	解決方法
一抗與二抗不吻合	<ul style="list-style-type: none">確認二級抗體是否辨認一級抗體的物種及 isotype
一抗不足結合目標蛋白	<ul style="list-style-type: none">增加一抗使用濃度增加抗體培養時間 (4°C, overnight)
一抗無法辨認目標蛋白的3D結構	<ul style="list-style-type: none">確認抗體是否經過 IHC 實驗認證 (甲醛固定/石蠟包埋冷凍切片等)利用 WB 測試抗體 native (non-denatured) 型態 (抗體已驗證可以做 WB)
抗體失去活性	<ul style="list-style-type: none">進行陽性對照組實驗確認抗體是否具有活性
目標蛋白不存在檢體中	<ul style="list-style-type: none">進行陽性對照組實驗
螢光二抗沒有儲存在避光環境下	<ul style="list-style-type: none">避免螢光二抗受到光照
去蠟步驟 (deparaffinization) 不足	<ul style="list-style-type: none">延長去蠟時間並更換新的 xylene
固定步驟影響抗體辨認抗原表位	<ul style="list-style-type: none">嘗試不同的抗原修復方法減少檢體固定時間
目標蛋白位於細胞核，抗體無法穿透	<ul style="list-style-type: none">使用較強的打洞試劑如: Triton™ X-100 至緩衝溶液中
PBS 緩衝溶液受到細菌汙染導致破壞磷酸化蛋白上的磷酸基	<ul style="list-style-type: none">在 PBS 抗體儲存緩衝溶液中添加 0.01% azide，或使用新鮮滅菌過的 PBS

High background 高背景值

可能原因	解決方法
阻斷非特異性結合無效或不足	<ul style="list-style-type: none">增加 blocking 的時間或是更換不同試劑。如果使用血清，建議使用 10% 與二抗物種相同來源的血清培養 1 小時；嘗試配方試劑或是使用預吸附的二級抗體可降低背景值
一抗濃度太高	<ul style="list-style-type: none">對於不同目標蛋白的組織測試最佳的抗體濃度，或針對反應時間進行改變
抗體培養溫度過高	<ul style="list-style-type: none">培養切片檢體於 4°C
二級抗體與非特異型蛋白結合	<ul style="list-style-type: none">進行單獨二抗控制組作為對照，如果發現有訊號建議使用其他二抗或是預吸附的二抗來降低干擾
組織未充分清洗；固定試劑殘留	<ul style="list-style-type: none">使用 PBS/TBS 徹底清洗。添加界面活性劑: 0.1% Triton
檢體內源性過氧化物酶具活性	<ul style="list-style-type: none">使用酵素抑制劑如: levamisol (2mM) 作為 AP 抑制劑或 H₂O₂ (0.3% v/v) 作為過氧化物酶抑制劑
固定步驟導致自體螢光產生	<ul style="list-style-type: none">使用甲醛 (formalin) / 多聚甲醛 (PFA) 固定通常會產生自體螢光 (在綠色光譜中)，建議使用紅色放射光譜範圍的螢光抗體建議使用放射光在遠紅外光範圍的螢光抗體
過度放大訊號 (間接檢測)	<ul style="list-style-type: none">減少放大訊號培養時間；稀釋二抗或是放大訊號試劑
添加過多受質 (酵素呈色法)	<ul style="list-style-type: none">稀釋受質或是減少受質的培養時間
呈色劑與組織檢體內的 PBS 產生反應	<ul style="list-style-type: none">在用受質進行培養前，先使用 Tris 緩衝溶液沖洗切片，培養後再沖洗一次
透化步驟導致細胞膜上蛋白被破壞	<ul style="list-style-type: none">使用較輕微的清潔劑如: Tween® 20，或是將緩衝溶液去除透化劑。

Non-specific staining 非特異性結合

可能原因	解決方法
一抗/二抗濃度過高	<ul style="list-style-type: none">降低抗體濃度或培養時間，可將不表達目標蛋白的組織進行訊號強度的比較。
樣本內源性過氧化物酶具有活性	<ul style="list-style-type: none">使用酵素抑制劑
一抗與組織相同物種，當使用二抗會針對該物種而與所有組織結合	<ul style="list-style-type: none">使用與組織不同物種生產的一抗，或用 F(ab) 片段形式的抗體
使細胞/切片乾掉	<ul style="list-style-type: none">保持細胞/切片在高濕度的狀態下，避免存放在乾燥環境

Poorly resolved or damaged tissue morphology 細胞型態不佳或損壞

可能原因	解決方法
抗原修復太強烈	<ul style="list-style-type: none">改變抗原修復的步驟或是嘗試其他抗原修復的方法
組織固定不完全	<ul style="list-style-type: none">增加固定時間增加固定試劑與組織的比例使用較小片的組織進行有效固定 (透過浸泡的方式)
組織切片從玻片上剝落 (冷凍切片)	<ul style="list-style-type: none">增加固定時間嘗試使用其他固定試劑使用新鮮配置的玻片
組織切片被撕裂或折疊，或在底部產生氣泡	<ul style="list-style-type: none">用鋒利的刀片進行重新切割使用 PAP pen (ab2601) 確認完好無缺的組織定位
組織型態很難分辨	<ul style="list-style-type: none">切較薄的組織切片冰晶可能會破壞切片組織型態，建議重新切割並快速冷凍檢體
組織自動裂解	<ul style="list-style-type: none">增加固定時間增加固定試劑與組織的比例嘗試使用交聯 (cross-linking) 固定試劑

Best of abcam



progress happens together
abcam

