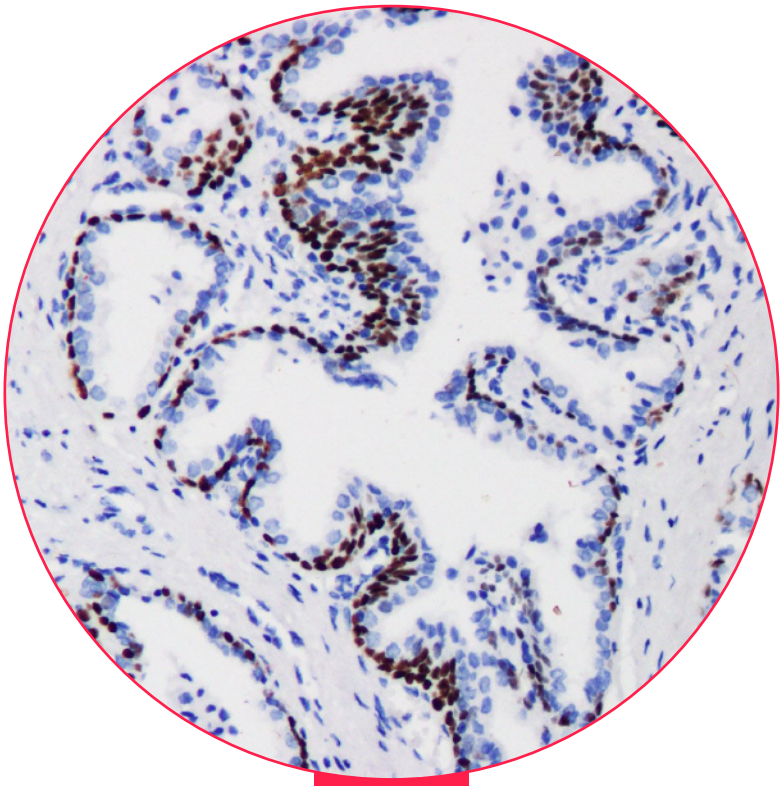
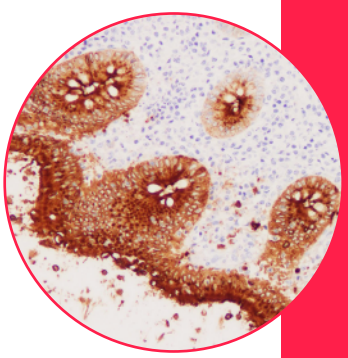
EnkiLife
Life is now and future

免疫组织化学 (IHC) 技术手册





目录

01 技术简介

02 检测与信号放大体系

03 样本制备

04 典型操作流程

05 实验对照设置

06 实验结果分析

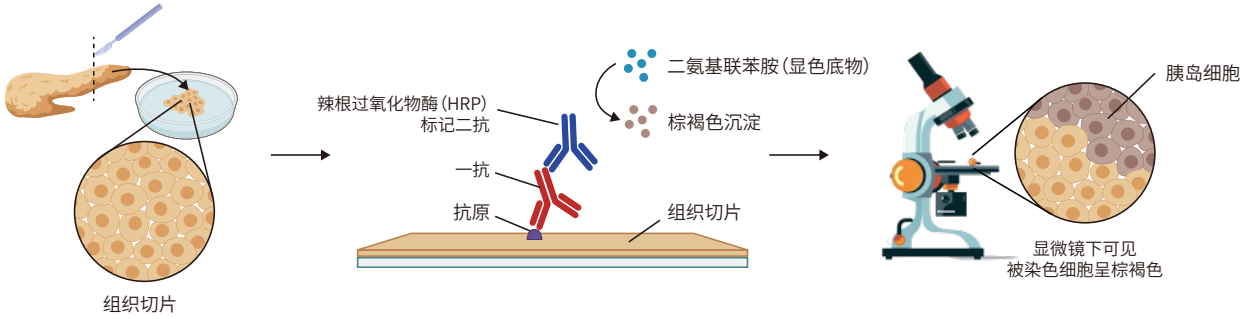
07 常见异常解析

一. 技术简介

免疫组织化学（Immunohistochemistry，IHC）是融合免疫学、组织化学与显微成像的经典生物检测技术。核心依托抗原-抗体特异性结合原理，结合化学显色反应，实现组织细胞内目标蛋白的原位定性、定位与半定量分析，是生命科学研究与临床病理诊断的核心技术之一。

1.1 基本原理

该技术主要以石蜡组织切片或冰冻组织切片为检测样本，其核心流程包括抗原抗体反应与信号放大。首先，组织切片中的目标抗原与特异性抗体（一抗）结合；随后，标记有酶的二抗与一抗结合；最后通过显色底物，将微观的免疫反应转化为显微镜下可见的颜色，从而实现目标分子的可视化。例如，在应用最广泛的HRP-DAB体系中，HRP催化DAB形成不溶性棕褐色沉淀，使目标抗原的位置能够通过明场显微镜直接观察。根据报告酶与抗体的连接方式不同，IHC可采用直接法、间接二抗法和聚合物法等多种检测模式。



1.2 核心技术价值

从技术应用角度来看，IHC的价值可以概括为“特异性识别 + 原位定位 + 可视化检测”。抗体提供对目标抗原的特异性识别，检测体系负责将这种分子识别转化为可观察信号，而组织切片则保留了细胞和组织的空间结构。三者结合后，可以在同一张切片上同时观察组织形态与目标蛋白表达，从而建立蛋白表达与细胞类型、组织区域之间的联系。对于需要研究蛋白定位、组织异质性以及疾病相关组织变化的实验，IHC能够提供单纯蛋白定量方法难以获得的空间信息。

在生物蛋白检测体系中，IHC的核心优势在于将特异性识别、原位定位与半定量分析融为一体，实现从蛋白表达判断到组织空间信息获取的综合检测。

特异性识别：精准判定目标蛋白在待测组织中是否表达，排除基因水平检测的假阳性干扰，直接验证蛋白层面的真实表达情况。

原位定位：这是IHC最核心的独有价值。可明确蛋白表达的具体位置，区分胞核、胞浆、胞膜表达模式，同时区分肿瘤组织、正常组织、间质组织的表达差异，这是WB、qPCR等均质样本检测技术无法实现的核心优势。

半定量分析：依托标准化病理评分体系，结合显色强弱与阳性细胞占比，对蛋白表达水平进行分级量化，可用于组间差异对比、药效评估、疾病分级分析，完全满足科研论文发表与病理检测的数据分析要求。

1.3 主流应用领域

基于原位、可视、可量化的技术特性，IHC广泛应用于基础科研、临床病理、药物研发三大核心领域。

基础医学科研领域：主要用于疾病机制探究、基因功能验证、动物模型表型鉴定。通过检测疾病模型与正常模型组织中靶点蛋白的表达差异，验证信号通路激活状态、基因调控机制，是分子机制研究的核心验证手段，广泛适配各类肿瘤、炎症、退行性疾病、代谢疾病的机制研究。

临床病理诊断领域：作为病理金标准辅助技术，用于肿瘤的鉴别诊断、病理分型、浸润边界判定、预后评估及靶向用药指导。通过特异性肿瘤标志物IHC染色，区分良性与恶性病变、判定肿瘤分化程度，同时为临床靶向药、免疫治疗用药提供分子依据。

新药研发与药理评价领域：应用于创新药物靶点验证、体内药效学评价、安全性病理分析。通过对比给药组与空白组动物组织的靶点蛋白表达变化，直观验证药物对靶蛋白的调控作用，支撑新药临床前研究数据产出，是药企药理毒理实验的必备技术。

二. 检测与信号放大体系

免疫组织化学的核心并不仅仅是“抗体与抗原结合”，更重要的是如何将这种发生在组织微环境中的分子识别过程，转化为稳定、清晰且可被观察和分析的信号。一个完整的免疫组织检测体系通常可以拆解为四个关键环节：抗原识别、信号标记、信号放大以及信号呈现。其中，一抗负责识别组织中的目标抗原，检测系统负责将抗原—抗体结合转化为可检测信号，而不同的放大体系则决定了信号能否被充分增强。最终，信号可以通过DAB等显色底物以明场形式呈现，也可以通过荧光基团以荧光形式输出。

2.1 传统酶促显色IHC

直接检测法

直接检测法是将HRP、AP等酶分子直接标记于一抗的检测方式，无需二抗参与，一抗与组织靶抗原特异性结合后即可直接启动显色反应，该方法实验步骤最少、孵育层级简单，但该体系无信号放大效应，整体检测灵敏度偏低，且标记后一抗活性易受影响，试剂通用性差。

间接二抗法

间接二抗法是免疫组化基础的间接检测体系，通过未标记的一抗与组织靶抗原特异性结合，再利用酶标记的种属特异性二抗结合一抗Fc段，依托单一一抗可结合多个二抗的特性实现信号放大，最终通过酶促反应完成显色成像，该体系整体操作流程简单、试剂通用性强、实验体系稳定，能够满足绝大多数检测需求，是目前免疫组化实验中最常用、通用性最高的基础检测体系。

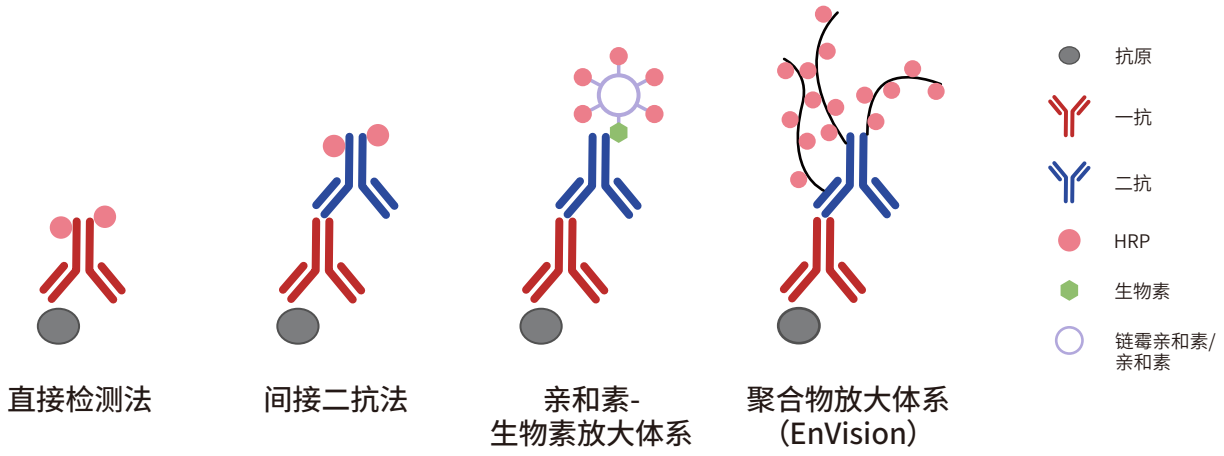
亲和素-生物素放大体系（LSAB / ABC）

亲和素-生物素放大体系是经典的生物素依赖型检测体系，主要包含ABC与LSAB两种常用方法，依靠生物素与亲和素的超高特异性亲和力实现多级信号放大。其中ABC法（Avidin-Biotin-Complex）为早

期经典技术，实验前需将亲和素与生物素化酶体外预孵育形成大分子复合物后再用于组织切片孵育，由于亲和素具备四价结合特性，可形成大分子量网状复合物，信号叠加效果极强，检测灵敏度优异。后续优化的LSAB法（Labeled Streptavidin-Biotin）改良了核心结合介质，酶直接共价偶联链霉亲和素，之后链霉亲和素识别并结合二抗上的生物素，把大量酶分子招募到抗原位点。依靠链霉亲和素与二抗生物素的一对一高亲和力特异性结合完成信号富集与放大。该小型复合物具备更优异的组织穿透能力，且背景干扰更低，检测灵敏度更高。

聚合物放大体系

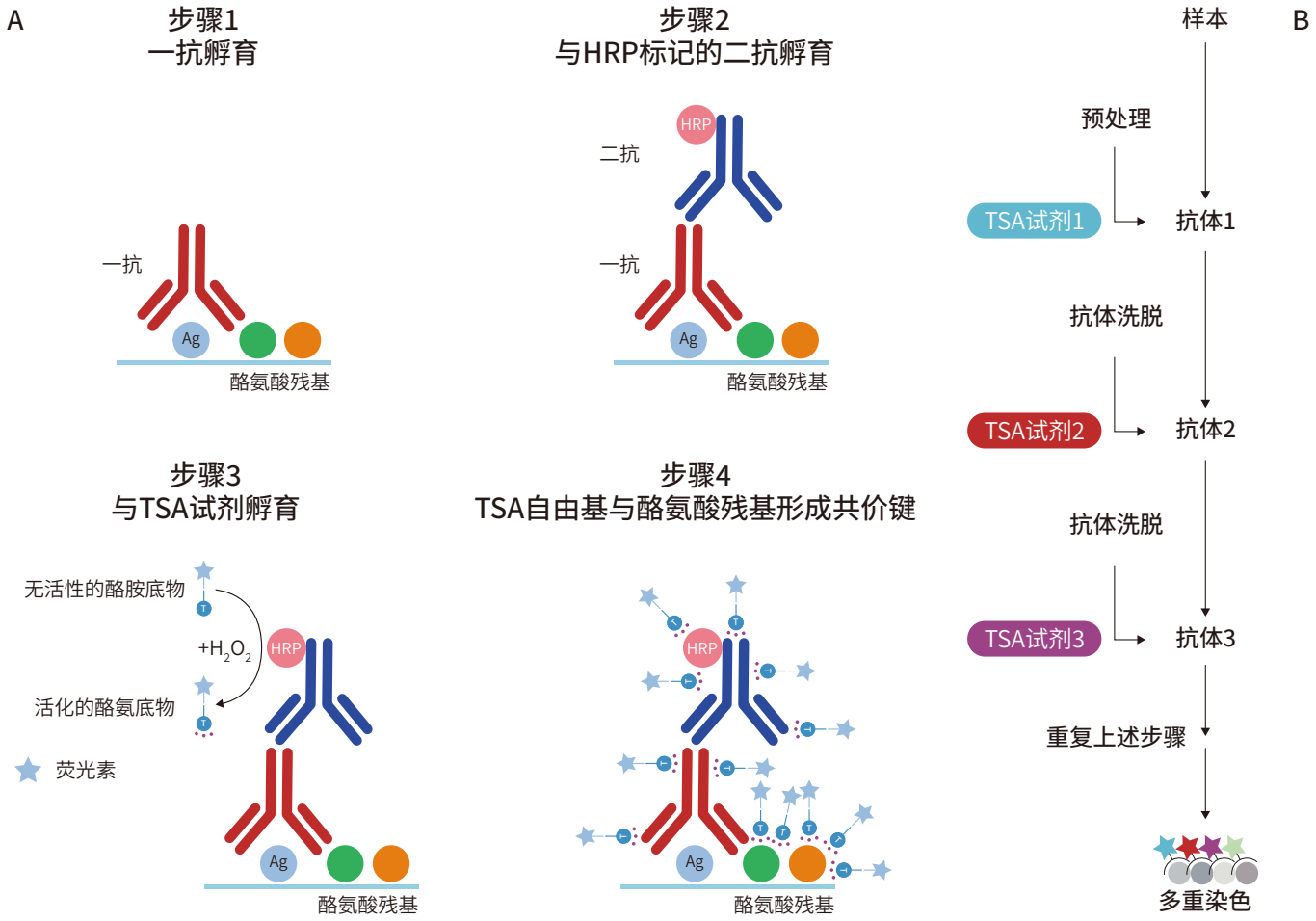
聚合物放大体系（EnVision体系）是规避生物素干扰的非生物素型标准化检测体系，解决了传统生物素体系的本底偏高问题。早期聚合物法以葡聚糖为骨架，偶联多个二抗与酶分子实现信号放大；新型微聚合物/致密聚合物法进一步优化结构，采用更小分子量的检测复合物，有效避免试剂聚集，提升了组织穿透性与染色均匀度，进一步提高检测灵敏度。适配FFPE石蜡切片、冰冻切片及生物素富集的特殊组织。



2.2 从酶促显色到荧光检测

传统显色IHC具有组织结构直观、信号稳定、明场显微镜即可观察等优势，同时DAB沉淀能够较好地保留目标抗原的组织定位信息，因此尤其适用于单一或少数标志物的组织表达与定位分析。然而，随着研究问题从“某一个蛋白是否表达”进一步拓展到多个蛋白是否共表达、不同标志物分别定位于哪类细胞，以及不同细胞之间存在怎样的空间关系，传统单色显色IHC在多标记检测和信号区分方面逐渐受到限制。在此背景下，基于荧光信号的免疫检测技术进一步发展，为多靶标共检测、共定位分析以及组织空间信息解析提供了更灵活的技术手段。

TSA（Tyramide Signal Amplification，酪胺信号放大）是一种基于HRP酶促催化的高灵敏信号放大技术，其核心并非简单增加抗体数量，而是利用HRP在过氧化氢参与下催化荧光标记酪胺形成具有反应活性的中间体，使其在HRP所在的目标抗原附近发生原位共价沉积，从而实现局部荧光信号的高密度富集。相比常规免疫荧光依赖荧光标记抗体携带有限荧光分子的方式，TSA通过酶促催化实现信号累积，可有效提高部分低丰度靶标的检测可见性。进一步结合循环染色策略，不同靶标可按照一抗识别→HRP检测→TSA荧光沉积→抗体洗脱→下一靶标染色的流程依次检测，使各靶标信号保留在原有空间位置，最终通过多通道成像在同一组织切片上实现多标志物检测、共定位及空间关系分析。



三. 样本制备

3.1 石蜡切片

组织固定

组织固定的核心目的是完整保存组织细胞结构与免疫反应性，抑制蛋白、抗原自溶降解，规避后续实验操作对组织样本的损伤，保障免疫染色效果。常用10%中性缓冲福尔马林作为固定液，适配绝大多数石蜡组织样本。操作时需选取大小适中的组织块，厚度不宜超过5mm，用生理盐水或PBS冲洗去除表面血液、体液。固定液体积需为组织体积的10-20倍，确保组织完全浸没，固定过程通常需要4 - 24 小时。大块组织需切开固定防止内部腐败。固定完成后用流水冲洗数分钟，去除残留固定液与结晶。固定需规避高温环境，固定时长不可过久，避免组织硬化、抗原性丧失，同时保证容器洁净，防止样本污染。

脱水透明浸蜡

该步骤目的是彻底去除组织内部水分，以石蜡置换透明剂，让石蜡充分渗透组织，为包埋提供稳定支撑结构。以5mm厚度组织块为标准，依次进行梯度脱水处理：75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇 I 、无水乙醇 II 依次浸泡。脱水完成后采用二甲苯进行透明处理，直至组织完全透亮。随后将透明后的组织放入恒温熔化石蜡中充分浸蜡，保障石蜡均匀渗透组织内部。全程需保证脱水彻底，避免透明、浸蜡失败，同时严控二甲苯作用时长，防止组织脆化受损。

石蜡包埋

包埋核心作用是固化组织样本，为切片操作提供支撑，维持组织完整形态。将充分浸蜡的组织块放入专用模具，摆正组织切面后倒入熔融石蜡，室温自然冷却凝固，完全固化后脱模保存。操作需严控温度与时间，保证石蜡均匀渗透，冷却过程避免骤冷，防止石蜡碎裂、组织变形，且必须在组织充分固定、脱水后开展包埋操作，保护样本抗原性与完整性。

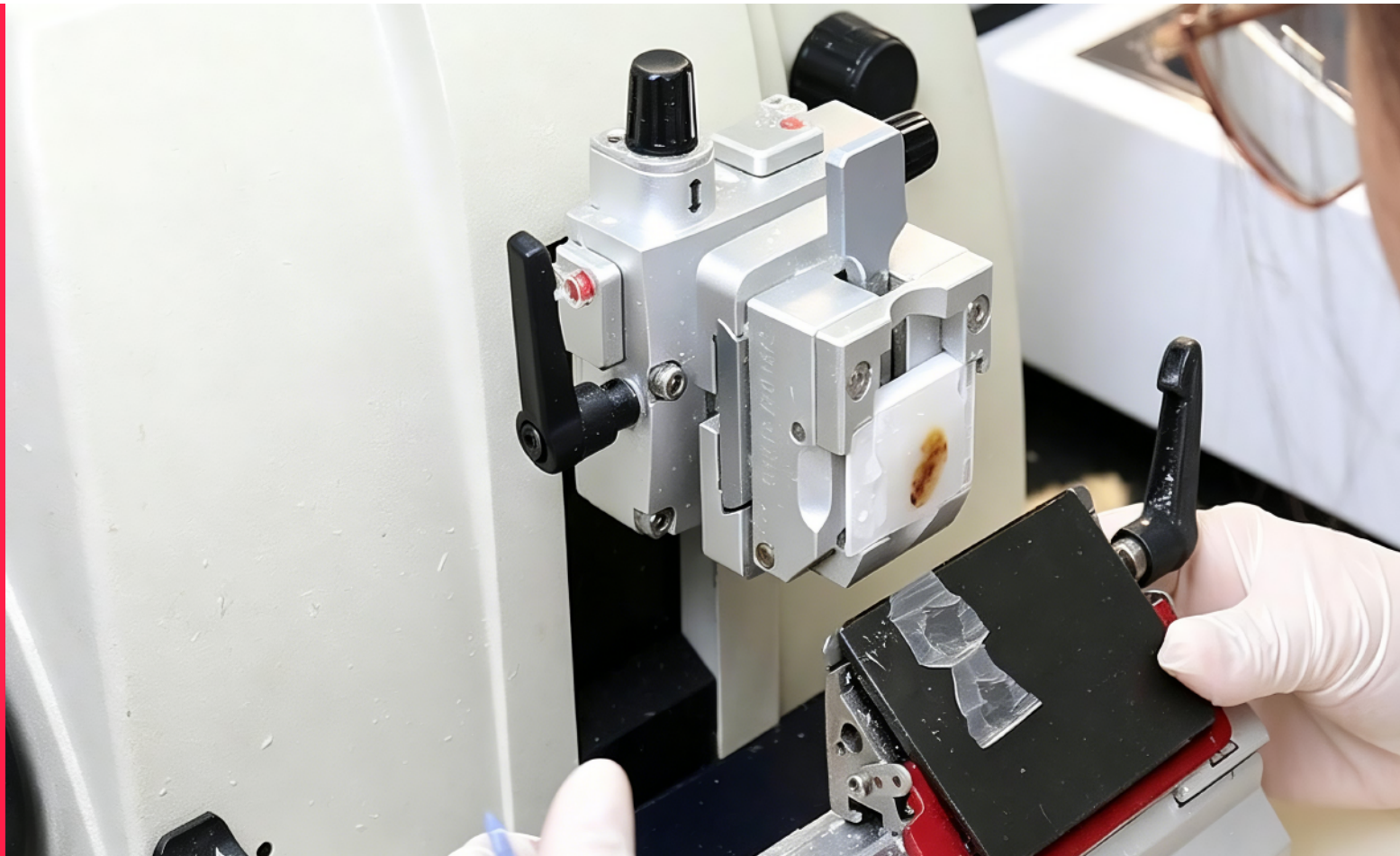
切片烤片

本步骤用于制备符合显微观测标准的组织薄切片，保证切片牢固附着于载玻片。待石蜡组织块完全冷却固化后，使用切片机修整切面，通常设置切片厚度为3-5μm。将切取的薄片轻柔放入温水展平，消除组织褶皱后捞至防脱载玻片，最后置于60°C左右的环境烤片2h。操作需保证切片刀锋利、切片速度均匀，全程避免切片干燥，防止抗原流失、组织变性，杜绝后续实验脱片问题。

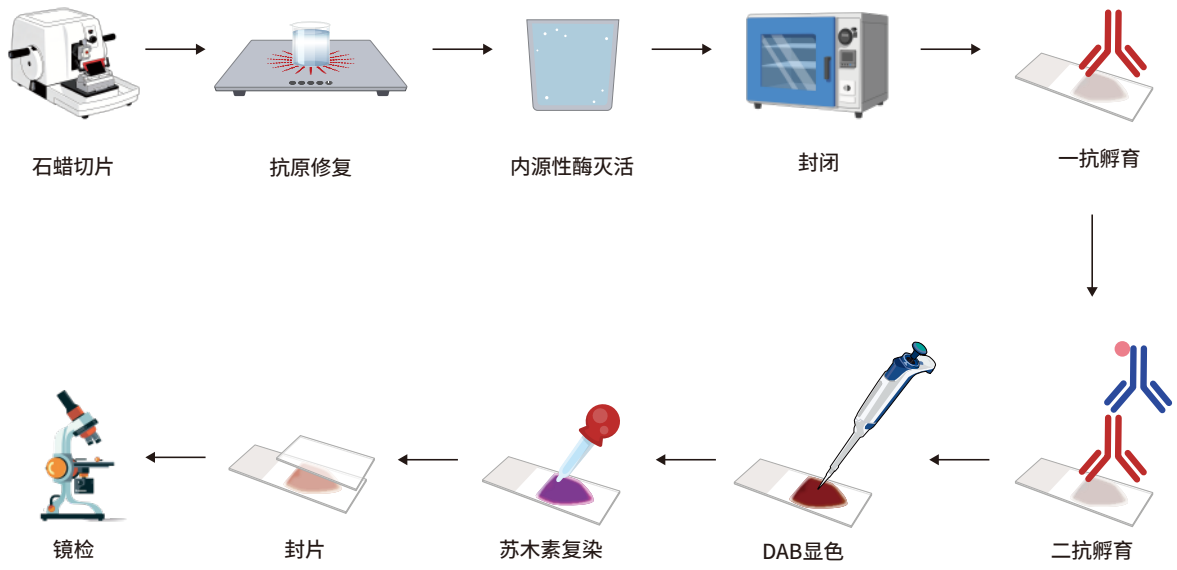
3.2 冰冻切片

冰冻切片主要用于对甲醛交联敏感、热修复易丢失的抗原检测，无需福尔马林固定与石蜡包埋，最大程度保留抗原活性，但组织形态完整性弱于石蜡切片，样本不宜长期反复冻融。取材后快速修剪组织块，预冷 PBS 快速漂洗去除血液，优先使用 OCT 包埋剂包埋；可直接放入液氮速冻或者-80°C冷冻机速冻，速冻完成后置于-80°C冰箱长期保存。切片前将冰冻样本转移至冷冻切片机回温至-18~-22°C，切片厚度设置 8-10μm，捞至防脱载玻片；切片完成后可选择室温晾干 15-30 min，再用 4% 多聚甲醛室温固定 10-15 min，PBS 洗去固定液，即可进入后续染色流程；未立即染色的切片可密封-80°C保存，避免反复冻融。

冰冻切片样本制备关键提示：取材到速冻间隔尽量缩短，避免组织自溶；切片后固定步骤不可省略，防止组织在孵育洗涤过程中脱片。



四. 典型操作流程



4.1 脱蜡水化

实验目的

清除切片表面及组织内石蜡，解除石蜡对后续反应的阻隔，将组织恢复至水性实验环境，为抗原修复、抗体结合等后续步骤奠定基础。

操作步骤

脱蜡：二甲苯 I 浸泡10 min → 二甲苯 II 浸泡10 min → 二甲苯III浸泡10 min，充分脱除组织石蜡。

梯度水化：无水乙醇 I 5 min → 无水乙醇 II 5 min → 95%乙醇5 min → 85%乙醇5 min → 70%乙醇5 min，逐步置换有机溶剂。

纯水浸泡：清洗5 min。

4.2 抗原修复

实验目的

解除固定过程中形成的蛋白交联结构，暴露被遮蔽的抗原表位，提升抗原与抗体的结合特异性及染色信号强度，避免假阴性结果。

常用修复缓冲液

Tris-EDTA（pH9.0）、EDTA（pH8.0）和柠檬酸（pH6.0），靶标抗原需预实验筛选最优缓冲液。

修复方案

微波修复：在组织修复前调至高档火加热修复液至沸腾，调至中小火，维持初沸状态，待状态稳定后，放入切片，确保液体完全浸没切片上的组织，中小火持续加热 15~30 min。之后室温自然冷却。

水浴修复：修复液恒温92°C，持续浸泡修复40 min，室温自然冷却。

高压修复：修复液浸没切片，高压上汽后计时2-3 min，关火静置10 min，自然冷却至室温。

酶解修复：选用胰蛋白酶、胃蛋白酶或蛋白酶K，37°C恒温孵育20 min，结束后水洗冷却。

4.3 内源性酶灭活

实验目的

消除组织内源性过氧化物酶活性，降低背景杂色。

操作步骤

灭活内源性过氧化物酶：HRP检测系统，常用的去除方法是 3% 过氧化氢水溶液，室温孵育 15-20 min。

洗涤：缓冲液或蒸馏水洗涤切片3次，每次3-5 min，洗净残留灭活液。

4.4 封闭

实验目的

封闭组织切片上非特异性疏水结合位点，减少抗体与组织的非特异性吸附，降低背景杂色。

操作步骤

非特异位点封闭：滴加封闭液（5%　BSA溶液或同源动物血清），确保完全覆盖组织区域，无裸露组织；37°C条件下孵育30 min。

4.5 一抗孵育

实验目的

特异性结合组织中的靶标抗原，形成抗原-一抗复合物，为后续信号放大、显色反应提供特异性结合基础。

操作步骤

稀释一抗：严格按照抗体说明书稀释一抗，配制工作液。

孵育一抗：沥干切片表面多余缓冲液，滴加适量一抗工作液，完全覆盖组织，孵育（37°C 1 h / 4°C过夜）。

洗涤：PBST/TBST缓冲液摇床洗涤3次，每次3~5 min，洗净未结合一抗。

4.6 二抗孵育

实验目的

利用HRP/AP标记的种属特异性二抗，精准结合一抗恒定区，实现抗原信号逐级放大，提升染色灵敏度，便于靶标定位观察。

操作步骤

稀释二抗：严格按照抗体说明书稀释二抗，配制工作液。

孵育二抗：滴加适量二抗工作液，完全覆盖组织，室温孵育30~60 min。

洗涤：PBST/TBST缓冲液摇床洗涤3次，每次3~5 min，去除未结合二抗。

4.7 显色

实验目的

酶催化DAB底物发生氧化沉淀反应，在抗原特异性结合位置形成有色不溶性沉淀，直观显示靶标抗原的表达位置与表达量。

操作步骤

加入酶的底物：取实验前新鲜配制的DAB显色工作液，滴加覆盖全部组织。

显色：显微镜下实时动态观察显色强度，达到预期染色效果后，立即用纯水冲洗终止反应。

4.8 苏木素复染

实验目的

衬染细胞核，清晰区分组织细胞形态结构，精准定位靶蛋白的亚细胞分布位置，便于结果判读与分析。

操作步骤

复染：苏木素染液室温孵育染色5 min；自来水充分冲洗返蓝。

提示：染色过深可采用稀盐酸酒精轻微分化，染色过浅可再次复染。

4.9 脱水透明

实验目的

逐步去除组织内水分，通过二甲苯实现组织透明。

操作步骤

脱水：70%乙醇→85%乙醇→95%乙醇→无水乙醇 Ⅰ →无水乙醇 Ⅱ，依次浸泡5min。

透明：二甲苯透明处理2次，每次5 min。

4.10 封片与观察

实验目的

封存组织切片，保护染色结果，便于显微镜成像观察、图像采集及长期保存。

操作步骤

封片：切片组织位置滴加适量中性树胶封片剂，轻柔覆盖盖玻片，全程避免产生气泡。

干燥：室温避光自然干燥后，置于显微镜下观察、采集实验图像。干燥后的切片可以长期保存，并随时用于观察。

关键技术要点

a)不建议进行抗原修复的情况：新鲜冰冻组织样本经短暂固定不会遮蔽抗原表位，因此无需抗原修复处理。

b)组织切片需全程保湿：石蜡切片完成脱蜡水化操作后，后续抗原修复、封闭、抗体孵育、洗涤等全部实验流程均需保证组织维持湿润状态，禁止组织切片暴露在空气中风干；组织一旦风干，会引发不可逆的非特异性蛋白吸附，造成大面积背景染色，严重时还会出现组织碎裂、脱片。

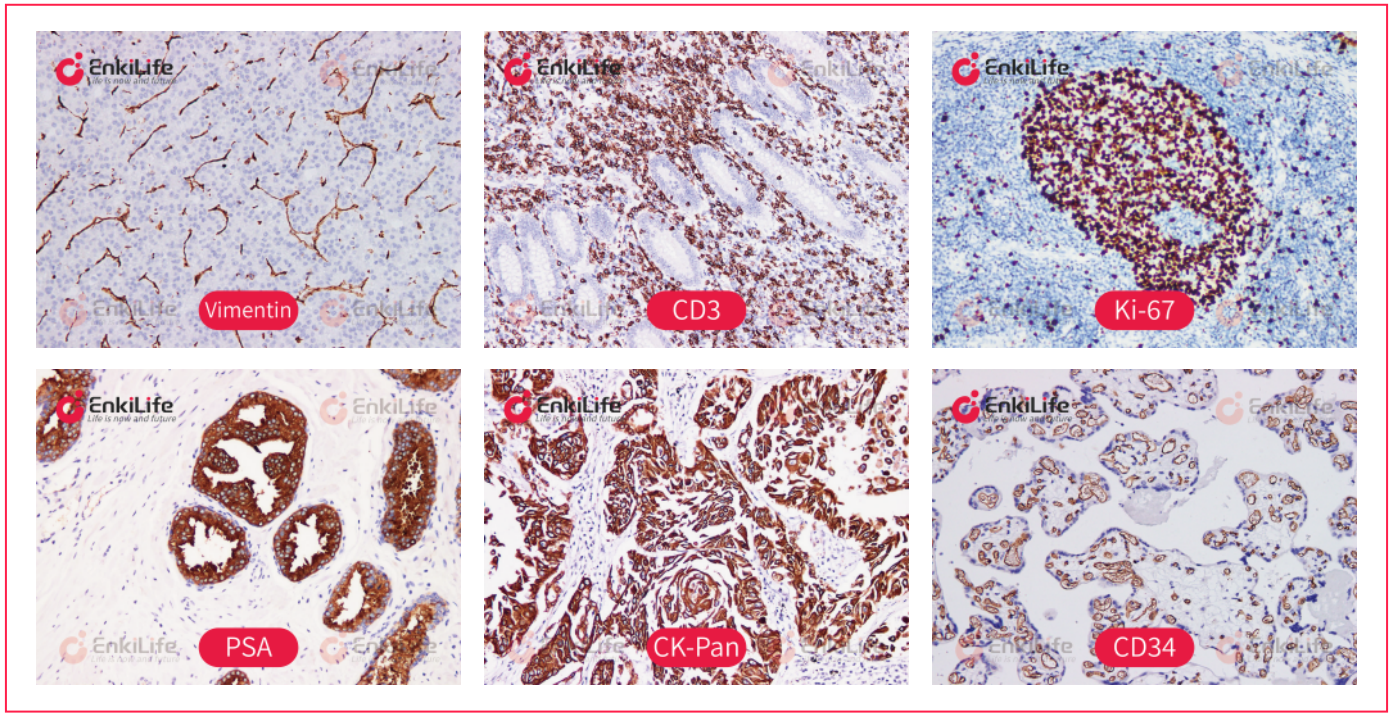
c)需设置阴阳对照：每组切片实验时必须同步配套设置适配实验体系的阳性对照切片与阴性对照切片，阳性对照用于验证整套染色流程、试剂及操作有效，阴性对照排除试剂、操作带来的假阳性干扰。

d)一抗选择：实验需选用经对应应用验证、适配目标检测靶标的一抗，通常选用多克隆抗体和单克隆抗体两种。挑选抗体时还需结合抗原表位特征，如空间构象、磷酸化等翻译后修饰类型，保证检测信号能够真实反映待测蛋白的生物学状态。实验优先采用抗体厂商推荐稀释比例，在此基础上进行浓度梯度滴定，最大化特异性染色信号，同时降低非特异背景染色。

单克隆抗体与多克隆抗体各有优劣，选择取决于实验的具体需求。

对比特性	单克隆抗体	多克隆抗体
定义	单一B细胞克隆制备， 仅识别抗原单一表位	多种 B 细胞克隆制备， 可识别抗原多个不同表位
特异性	特异性高，交叉反应概率低	特异性偏弱， 易与同源相似蛋白发生交叉反应
检测灵敏度	灵敏度可能偏低； 靶标表位遮蔽后易出现假阴性	灵敏度通常更高； 部分表位受损仍可结合其余位点
批次一致性	批次间一致性优异，结果重复性好	批次差异较大， 不同免疫动物所得抗血清性能波动明显
染色背景	非特异性背景染色低	易产生较高背景
制备成本周期	成本高，依托杂交瘤技术，制备周期长	成本低廉，仅需动物免疫，制备周期短

结果展示



五. 实验对照设置

免疫组化实验流程环节多、可变因素复杂，组织固定方式、抗原修复条件、一抗选型、抗体孵育体系、显色检测系统等任一环节出现偏差，均会引发背景升高、信号丢失、假阳性、定位异常等实验问题。因此，每轮免疫组化实验必须配套设置完整对照体系，通过多维度对照佐证，精准区分样本真实特异性生物

学信号，有效排除实验操作偏差、试剂体系缺陷、组织内源干扰、实验漂移及人工染色假象，保障实验结果的真实性、准确性与可重复性。

5.1 组织对照

阳性对照：验证整套实验流程、试剂体系及操作方法的有效性即便待测样本全部呈现阴性染色，只要阳性对照信号正常，即可判定实验体系无异常，待测样本阴性结果真实可靠。每轮实验同步纳入已知稳定表达靶蛋白的组织，或靶基因过表达转基因组织切片，与待测样本进行完全一致的全流程实验操作。

阴性对照：明确无靶抗原表达组织的基础背景染色水平，界定实验本底范围，区分特异性阳性信号与组织固有背景、非特异染色假象，排除假阳性干扰。选用已知不表达靶抗原的正常组织，或经过基因敲除（KO）、基因敲降（KD）的验证阴性组织，与待测样本同步完成全部实验流程，观察体系固有背景染色情况。

组织完整性/抗原保存对照：监测样本前期处理质量，识别组织过度固定、固定不足、抗原修复不当、抗原流失、组织降解等问题，判定整体样本处理流程是否合格。选用稳定表达的管家标志物进行验证，如波形蛋白（Vimentin）标记间充质、内皮细胞。

5.2 抗体对照

无一抗对照：单独检测二抗及显色检测体系本身产生的非特异背景，区分背景染色来源于抗体体系而非靶抗原特异性结合。实验流程中省略一抗孵育步骤，仅加入二抗与显色体系。

同型对照：排除一抗Ig恒定区（抗体骨架）与组织蛋白发生的非特异性吸附结合，精准区分抗原特异性结合与抗体骨架非特异结合信号。使用与实验组一抗种属相同、亚型一致、工作浓度等同的无关同型抗体，替代一抗进行孵育。

抗原封闭竞争对照：终极验证一抗的靶标结合特异性，确认阳性信号为一抗与目的抗原的特异性结合，彻底排除抗体杂结合、非靶标结合假象。正式孵育前，将一抗与其对应免疫原预先共孵育封闭，优先选择特异性更高的小分子多肽抗原（全长蛋白易引入非特异杂结合干扰），封闭后再进行切片孵育，若阳性信号完全消失则证明抗体特异性良好。

5.3 内源背景对照

内源酶干扰：排查组织内源性过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（AP）活性导致的非特异显色，避免酶本底造成的假阳性染色。如肝肾组织、红细胞富集区域高表达内源过氧化物酶，肠道、肾脏、淋巴组织高表达内源碱性磷酸酶。可在加抗体前单独滴加显色底物，判断内源酶活性；配套对应封闭手段：HRP体系采用新鲜3%过氧化氢封闭，AP体系采用左旋咪唑特异性封闭。

内源生物素干扰：排除肝脏、肾脏、脾脏、心脏、脑组织、肺组织及各类冰冻组织中高表达的内源生物素干扰，解决ABC、LSAB生物素放大体系常见的背景偏高问题。可采用亲和素 - 生物素双重封闭体系预处理切片；或直接更换无生物素的聚合物放大检测体系（EnVision）。

组织自发荧光：做多重荧光免疫组化实验前，需排查胰腺、脑组织、含脂褐素组织、细胞外基质及福尔马林固定样本的固有自发荧光。染色前采集未染色空白切片，在实验所用荧光通道下成像，确定基础荧光背景。

染色实验开展前，逐项确认以下条件：

阳性、阴性对照切片与待测样本同步完成全部前处理流程

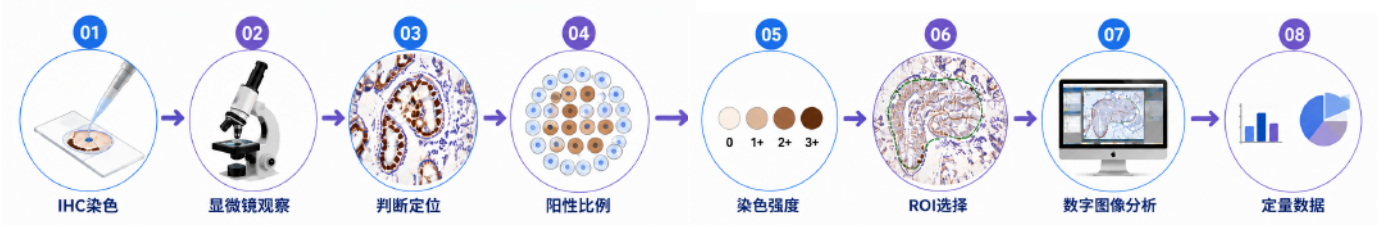
新抗体首次实验必须设置无一抗对照、同型对照

若采用 HRP/AP 酶促显色、ABC/LSAB 生物素放大体系，提前规划内源酶与生物素封闭步骤

多重荧光免疫组化实验提前筛查组织自发荧光，按需调整荧光染料选型

六. 实验结果分析

IHC染色完成后，结果分析并不是简单判断组织“有没有变棕”，而是需要结合染色位置、阳性范围和染色强度，对目标蛋白的表达情况进行综合判断。传统IHC主要通过DAB显色观察目标抗原在组织中的分布，并可进一步结合阳性细胞比例和染色强度进行半定量分析。随着数字病理和图像分析技术的发展，IHC结果还可以进一步转化为阳性面积、阳性细胞密度、光学密度等客观数据，从而减少人工判读的主观差异，提高不同样本之间比较的可重复性。



6.1 判断阳性定位

IHC结果分析首先应关注阳性信号的位置是否符合目标蛋白已知的组织分布和亚细胞定位特征。不同蛋白可能主要定位于细胞膜、细胞核或细胞质，因此不能仅依据颜色判断阳性，还需要结合组织结构和细胞形态判断信号究竟来自哪里。只有当染色位置、细胞形态以及目标蛋白的生物学特征基本一致时，才能进一步对阳性比例和染色强度进行分析。

6.2 阳性细胞比例

阳性细胞比例是IHC结果中常用的评价指标，用于反映目标蛋白阳性细胞在分析区域中的占比。通常可以通过人工计数或图像分析统计阳性细胞数与总细胞数，并计算阳性细胞比例。该指标主要回答“有多少细胞表达目标蛋白”，对于比较不同组织样本或实验组之间的表达范围具有较好的参考价值。

6.3 染色强度

除了阳性范围，还需要观察阳性细胞的染色强度。DAB显色通常可以根据颜色深浅将阳性信号划分为弱阳性、中等阳性和强阳性等不同等级，从而评价目标蛋白的相对表达水平。染色强度与阳性细胞比例结合后，可以比单独观察其中一个指标更加全面地反映组织中的蛋白表达情况。

6.4 阳性比例+染色强度——提高结果评价的完整性

单独统计阳性细胞比例有时无法区分“多数细胞弱表达”和“少数细胞强表达”这两种情况，因此实际研究中常将阳性比例与染色强度结合进行综合评价。H-score就是一种常见的半定量分析方法，通过对不同染色强度的阳性细胞赋予不同权重，得到一个综合评分，从而同时考虑目标蛋白的表达范围和

染色程度。

6.5 从人工观察到数字图像分析

传统IHC结果主要依赖研究人员在显微镜下进行观察和评分，而数字病理可以将染色切片扫描为高分辨率数字图像，再通过图像分析软件识别组织、细胞及DAB阳性信号，实现更加客观的定量分析。通过数字化分析，可以将原本的“颜色深浅”和“阳性多少”转化为阳性细胞比例、染色强度、阳性面积和细胞密度等可统计的数据。

6.6 ROI选择决定分析结果的代表性

进行数字图像分析时，需要根据研究目的选择合适的ROI（感兴趣区域）。同一张组织切片可能同时包含肿瘤区域、正常组织、间质、坏死区域等不同组织成分，如果将所有区域直接进行整体分析，可能会影响最终结果。因此，在不同样本之间进行比较时，应尽量按照统一标准选择具有代表性的分析区域，并避免明显坏死、组织脱落或非目标区域对结果造成干扰。

6.7 对照是判断结果可靠性的基础

可靠的IHC结果需要结合适当的实验对照进行判断。阳性对照用于确认检测体系能够正常识别目标抗原，阴性对照则有助于判断观察到的信号是否可能来源于非特异性染色或背景。只有在阳性对照表现正常、阴性对照背景可接受的情况下，实验样本中的阳性信号才具有更好的解释基础。

IHC结果分析的最终目的，是将组织中的染色信号转化为具有比较意义的数据。根据研究目的，可以选择阳性/阴性判断、阳性细胞比例、染色强度、H-score、阳性面积或数字图像分析等不同方式。对于样本量较少的研究，规范的人工半定量分析仍然具有实用价值；对于大样本研究或需要提高分析客观性的实验，则可以进一步采用数字病理进行标准化分析。

七. 常见异常解析

7.1 定位错误

可能原因	解决方法
抗体特异性问题	优先选用高特异性单克隆 / 重组单抗
抗原修复方法不当	根据靶标选择合适的修复体系；严格控制修复时长与温度，修复后自然冷却，不可快速水冷
抗体孵育缓冲液盐离子浓度过高，破坏蛋白天然空间构象	重新配制标准 PBS/TBST 缓冲液
样本处理方法不当	离体组织 30 min 内规范固定包埋；冰冻切片染色前需固定，统一样本前处理流程

7.2 高背景/非特异性染色

可能原因	解决方法
冲洗不充分	适当增加冲洗次数或者延长冲洗时间， 但要注意不要过久，防止冲掉组织切片
切片脱蜡不彻底	使用新鲜的二甲苯或其替代品进行脱蜡
过氧化物酶阻断不彻底	配制新鲜 3% H_2O_2，可延长内源性酶灭活时间
封闭不充分	适当延长封闭时间
使用错误的封闭血清	封闭血清一般与二抗检测系统种属相同，或者使用 无血清蛋白封闭，但是不能选择与一抗种属相同的血清
载玻片中粘附剂过厚	重新配制粘附剂，制作新的防脱玻片
抗体浓度过高或者孵育时间太长	降低抗体浓度或减少抗体孵育时间， 或严格按照试剂说明书中建议的孵育方式进行实验
孵育温度过高，超过 37°C	孵育温度一般是室温或37°C
一抗或二抗孵育前切片干涸	保持孵育盒湿度，防止干片

7.3 染色不均/边缘效应

可能原因	解决方法
切片贴附不良（组织与载玻片间有气泡）	重新贴片并轻压排除气泡
抗体孵育时切片未平放， 导致边缘液体流失	用免疫组化笔圈定组织，孵育时水平放置， 避免液体单侧流失
脱蜡不彻底	使用新鲜的二甲苯或其替代品进行脱蜡
滴加一抗 / 二抗 / 封闭液用量太少， 仅局部覆盖组织	足量滴加试剂完全覆盖组织区域；孵育时水平放置
玻片边缘无液体浸润、快速风干	全程保持切片湿润；孵育时加盖保湿
修复时切片堆叠、贴壁	修复容器内切片分散摆放，避免玻片相互贴合，保证受热均匀
组织切片厚薄不一	切片厚度应统一控制，保证切片平整无褶皱
冲洗时液体直喷切片局部， 局部抗体被过度洗脱	缓慢浸洗，避免直冲组织；洗涤缸内切片分开摆放， 摇床匀速洗涤

7.4 无染色/弱染色

可能原因	解决方法
抗体浓度过低，孵育时间过短	提高抗体浓度或适当延长孵育时间， 或严格按照试剂说明书中建议的孵育方式进行实验
试剂超过有效使用期	及时更换试剂
操作中滴加试剂时缓冲液未沥干， 致使试剂稀释	每步滴加试剂前沥干切片中多余的缓冲液 （但防止切片干燥）
孵育温度过低	孵育温度一般是室温或37°C
抗原修复方式不正确或遗漏。 如修复时间、温度， 修复液的 pH 值没有达到要求	按照一抗说明书中建议的抗原修复方式进行抗原修复。 可以先做预实验确定合适修复温度、时间、修复液
组织中无抗原或抗原含量过低	设立阳性对照，以验证实验结果；抗原含量过低可以考虑 使用放大效应更高的二抗检测系统进行实验
一抗与二抗种属不匹配	仔细确定一抗与二抗的种属
水溶性色原显色后（如 AEC、BCIP/NBT、 AP-Red 等显色试剂）使用了含醇 的复染液或用乙醇脱水、二甲苯透明	重新染色，并使用水溶性的复染液和封片剂

7.5 荧光成像光谱相关问题

可能原因	解决方法
光谱串色	重新设计荧光标志物组合，拉大光谱间距；更换匹配滤光片； 采用序列分次采集模式减少通道干扰
组织自发荧光	优先选择长波长荧光染料；醛固定样本可使用 硼氢化钠等试剂进行荧光淬灭处理，降低背景干扰
荧光光漂白	缩短激发照射时长，降低光源功率； 使用抗淬灭封片剂减缓荧光信号衰减

EnkiLife （恩玑生命）
全系列IHC试剂盒产品及配套试剂推荐

产品分类	货号	产品名称
IHC试剂盒	PA10014	免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠)
	PA10015	免疫组化(IHC)检测试剂盒(兔)
	RA10006	免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠/兔)
	PA10016	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠)
	PA10017	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(兔)
	RA10007	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠/兔)
	PA10002	Polymer-HRP 免疫组化双染试剂盒（DAB/AEC）（小鼠/兔）
	PA10020	极速·超敏免疫组化试剂盒（pH 6.0）
	PA10021	极速·超敏免疫组化试剂盒（pH 9.0）
	PA10001	免疫组化双染试剂盒（DAB/AEC）（小鼠/兔）
IHC配套试剂	PA10005	内源性过氧化物酶阻断剂
	PA10006	柠檬酸抗原修复液（20x，PH6.0）
	PA10019	柠檬酸抗原修复液（10x，PH6.0）
	PA10007	Tris-EDTA抗原修复液（20x，PH9.0）
	PA10012	Tris-EDTA抗原修复液（10x，PH9.0）
	PA10013	一步法脱蜡/抗原修复缓冲液（20x，PH6.0）
	PA10018	一步法脱蜡/抗原修复缓冲液（20x，PH9.0）
	PA10003	DAB显色试剂盒 (棕色，50x)
	PA10004	AEC显色试剂盒 (红色，20x)
	PA10008	PBS缓冲液 (10x)
	PA10009	PBST缓冲液 (10x)
	PA10010	TBS缓冲液 (10x)
	RA10002	抗体稀释液
	RA10015	抗体稀释液（病理级）
	RA20080	苏木素染色液

Thank you
for choosing
us!