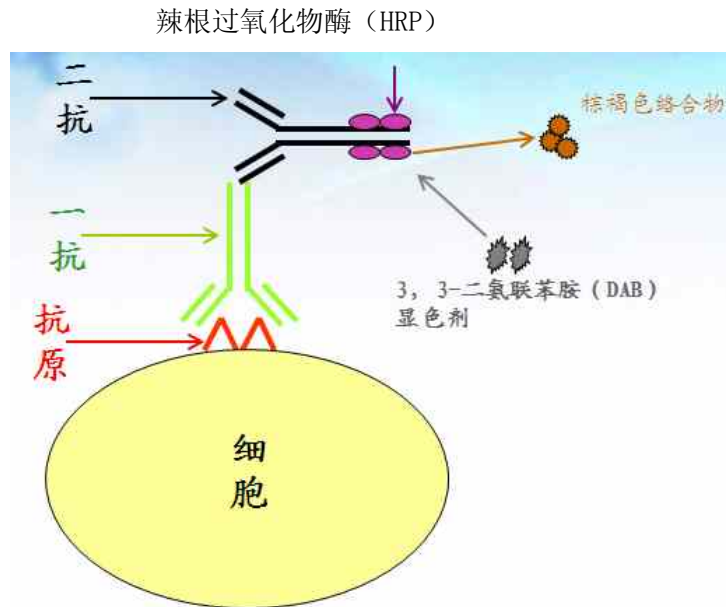


### 一、免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）

#### 1、原理和特点

- 原理：利用抗原与抗体的特异性结合原理和特殊的标记技术，通过化学反应使标记抗体显色，对组织细胞内的特异性抗原进行定位、定性、定量检测的一门技术。
- 特点：免疫组化具有操作简单，特异性强，敏感性高，定位准确，形态与功能相结合等特点。

#### 2、示意图：



#### 3、常见问题分析：

##### A. 显色过深

- 一抗浓度过高或孵育时间过长，建议降低一抗浓度或减少孵育时间。
- 孵育温度过高，建议室温或 4℃ 孵育。
- HRP 标记二抗孵育时间过长，建议缩短时间。

##### B. 非特异性显色

- 石蜡切片脱蜡不彻底，建议延长脱蜡时间。
- 操作过程中冲洗不充分，建议增加冲洗的次数与冲洗时间。
- 组织富含内源性的生物素与过氧化物酶，建议使用相关试剂进行封闭。
- 发生抗原异位。
- 蛋白封闭不充分，建议增加蛋白封闭时间。

##### C. 显色强度弱

- 一抗浓度过低或孵育时间过短，建议增加一抗浓度或延长孵育时间。
- 试剂超过保质期，建议实验前确认试剂的保质期。

操作过程冲洗过度，建议适度冲洗。

##### D. 无染色

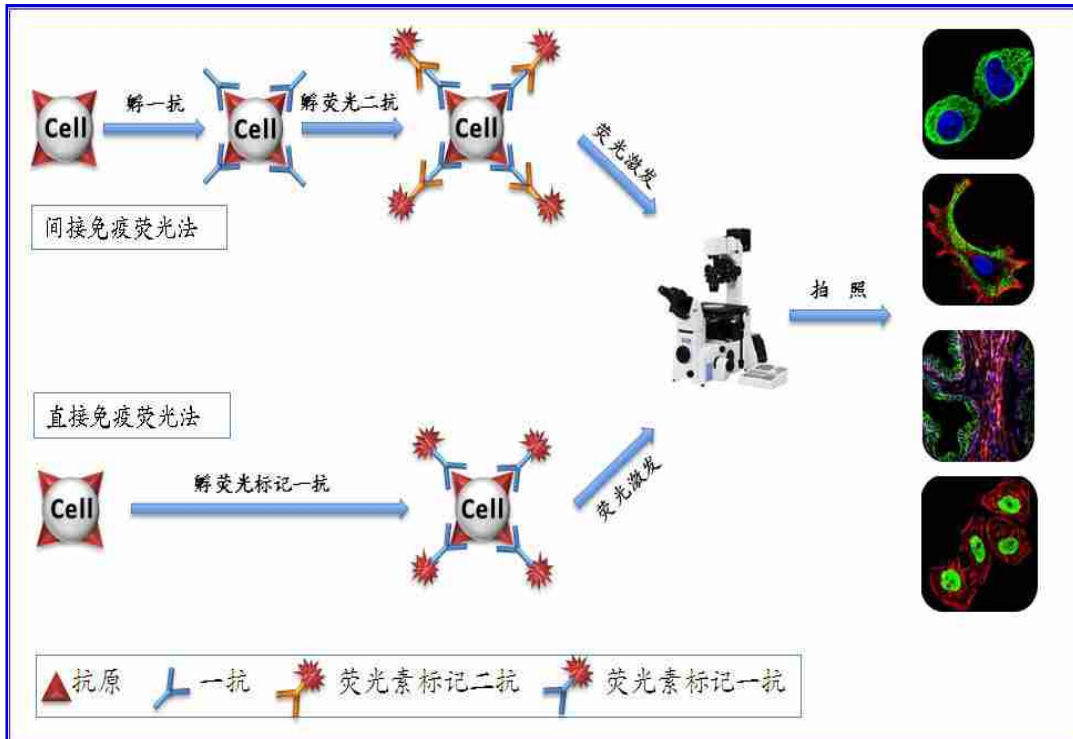
- 组织中无目的抗原的表达。
- 一抗种属来源与二抗不匹配，建议实验前确认一抗的种属来源。
- 显色物质与 HRP 系统不匹配，建议实验前确认显色体系。

## 二、免疫荧光 (Immunofluorescence, IF)

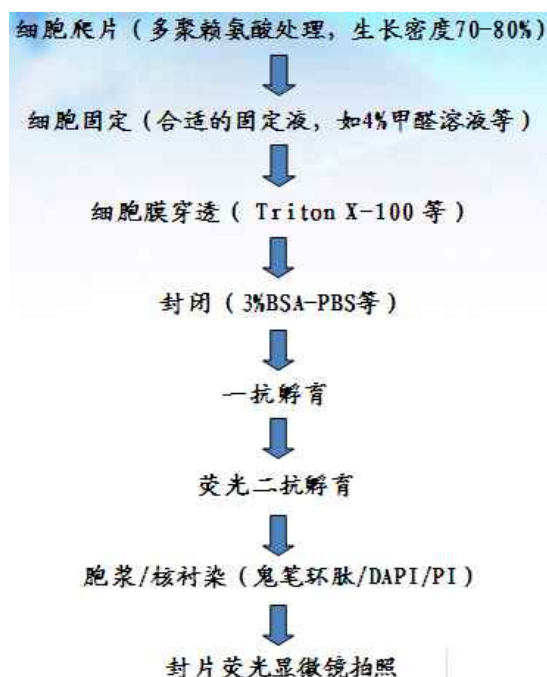
### 1、原理和特点:

- 原理: 免疫荧光就是利用抗原与抗体的特异性结合原理及特殊的荧光素标记技术, 通过激光激发使荧光素发出荧光, 在荧光显微镜下观察荧光的变化从而对细胞内的抗原进行分析的技术。用免疫荧光显示和检查细胞或组织内抗原或半抗原物质等方法称为免疫荧光细胞 (或组织) 技术。
- 特点: 免疫荧光具有特异性强、敏感性高、速度快等特点。

### 2、原理示意图:



### 3、实验流程:



## 4、常见问题分析：

### A、背景过高

- 一抗质量不高，建议使用特异性高、效价高的一抗。
- 一抗/二抗浓度太高，建议降低一抗/二抗浓度。
- 封闭不完全，建议增加蛋白封闭时间。
- 洗涤不充分，建议增加冲洗次数与时间。
- 可通过调节荧光显微镜的参数来减低背景。

### B、信号弱或无信号

- 无目的蛋白或表达量极少，建议选用表达量高的细胞或组织。
- 细胞通透性差，建议增加通透剂的作用时间或浓度。
- 一抗/二抗浓度太低，建议增大其浓度。
- 二抗选择错误（种属不匹配），建议选用与一抗种属相匹配的二抗。

### C、荧光猝灭快

- 荧光素本身特性决定，光稳定性差，建议选用光稳定性好的荧光素二抗。
- 用普通的封片剂封片，建议选用防荧光猝灭剂封片。

### D、细胞有自发荧光

- 使用了戊二醛固定，建议在固定后荧光染色前进行荧光猝灭，如使用 NaIO<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>, 甘氨酸等，染色前检查自发荧光。
- 材料本身（如石蜡）有自发荧光，建议设立阴性对照，通过降低荧光显微镜的参数来消除背景染色。
- 细胞成分中能够产生自发荧光的分子（例如核黄素、细胞色素等）的含量高；培养细胞中死细胞 / 活细胞比例高；

## 三、流式细胞术（Flow Cytometry, FC）

### 1、定义、原理

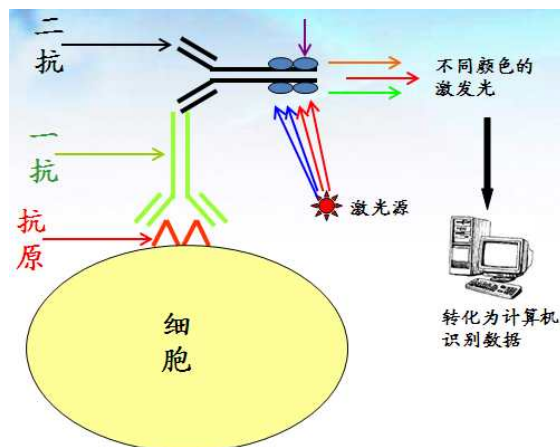
#### ➤ 流式细胞仪（FLOW CYTOMETOR）：

进行流式细胞分析的仪器，是集光电子物理，光电测量，计算机，细胞荧光化学，抗体技术为一体的高科技细胞分析仪。

#### ➤ 流式细胞术（FLOW CYTOMETRY）：

利用流式细胞仪对处于快速流动的细胞或生物颗粒进行多参数、快速（每秒可达 1000-10000 个）的定量分析和分选（纯度可达 99%以上）的技术。

### 2、反应原理示意图：荧光物质（FITC、PE 等）



### 3、实验流程:



### 4、常见问题分析:

#### A、荧光强度/背景过高

- 一抗/二抗浓度太高, 建议降低一抗/二抗浓度。
- 封闭不完全, 建议增加蛋白封闭时间。
- 洗涤不充分, 建议增加冲洗次数与时间。

#### B、信号弱或无信号

- 无目的蛋白或表达量极少, 建议选用表达量高的细胞。
- 细胞通透性差, 建议增加通透剂的作用时间或浓度。
- 一抗/二抗浓度太低, 建议增大其浓度。
- 二抗选择错误 (种属不匹配), 建议选用与一抗种属相匹配的二抗。

#### C、柱形图分析时出现荧光双峰

- 抗原本身特性所决定 (比如不同时期的细胞蛋白表达量不同)
- 进样针堵塞, 建议清洗管路。
- 进样速度太快, 建议调低进样速度。

#### D、管路系统偏移导致焦距偏离, 建议请专业维修人员校准。

### 四、免疫组化 (IHC)、免疫荧光 (IF)、流式细胞术区别 (FC):

	流式细胞术 (FC)	免疫组化 (IHC)、免疫荧光 (IF)
控制	电脑 (客观)	人 (主观)
结果显示方式	荧光激发后被探测器捕获信号	化学显色/荧光通过显微镜观察拍片
样本	单细胞 (或颗粒) 悬液 (流动)	组织切片/细胞爬片 (静止)
细胞数量	大 (上万个)	小
样本利用	分选后可回收利用	不可回收利用
结果揭示信息	细胞群体特征分布	揭示细胞内部结构信息
功能	可同时检测多个参数	一个或几个参数