

碧云天免疫组化技术服务

Immunohistochemistry by Beyotime



碧云天
Beyotime



碧云天网站



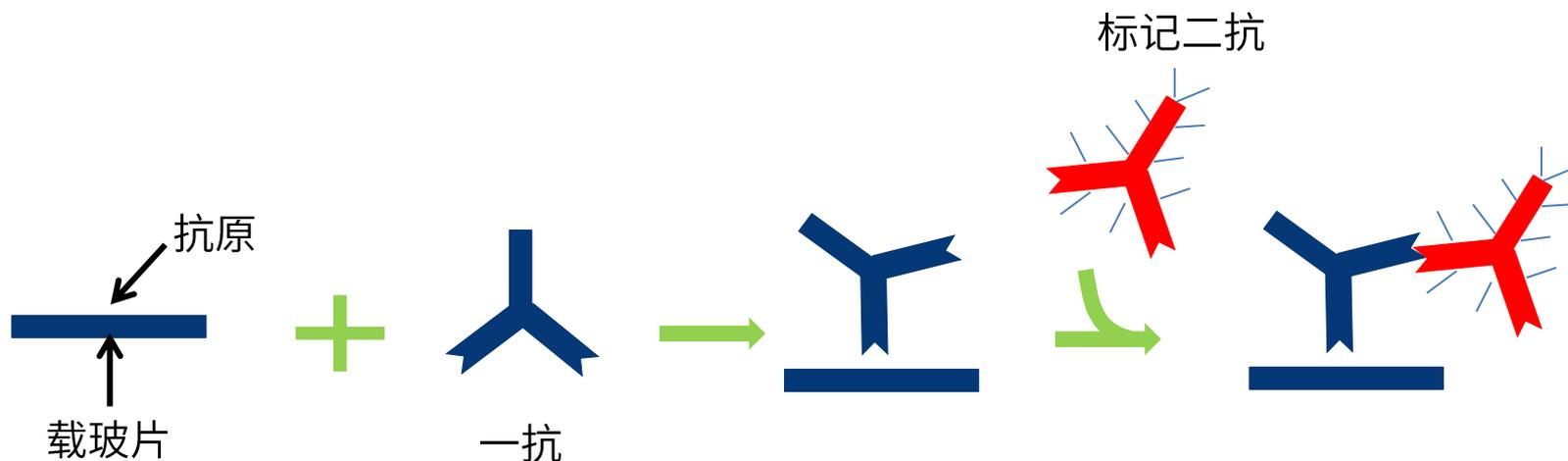
微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>

碧云天免疫组化技术服务

原理

- 免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC)，或称免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC) 技术，是一项利用免疫学中抗原-抗体特异性反应的原理(如下图所示)，通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(如多肽和蛋白质)，研究抗原定位、定性及定量的实验技术。



碧云天免疫组化技术服务原理示意图(间接法)

碧云天免疫组化技术服务

概述

- 碧云天凭借多年的蛋白免疫相关试剂盒研发经验，拥有专业的技术服务团队，可以为客户定制个性化的实验方案，积极促进客户的实验研究和产品开发，为客户提供优质的免疫组化技术服务。碧云天专业的技术人员拥有丰富的行业经验，帮助优化实验条件，严格监管实验过程中的各个环节，保证服务质量。
- 免疫组化具有高特异性、高灵敏度、定位准确、多层面多角度观察和检测组织细胞结构等特点，目前广泛应用于基础科学研究和临床疾病诊断领域。

碧云天免疫组化技术服务

碧云天的优势

- ◆ **金品质：**碧云天专业的技术服务团队根据客户样本筛选、优化最佳实验条件，提供最优质的服务。
- ◆ **服务优：**碧云天可以为客户定制个性化的实验方案，积极促进客户的实验研究和产品开发。
- ◆ **高质量：**碧云天拥有多年的蛋白免疫相关试剂盒研发经验，为客户提供准确可信的实验数据及专业的结果分析。
- ◆ **高效率：**碧云天专业的技术人员拥有丰富的行业经验，保证快速、有效的完成实验。
- ◆ **低价格：**碧云天以最优惠的价格为客户提供最全面的服务，帮助客户合理有效节约实验成本。

碧云天免疫组化技术服务

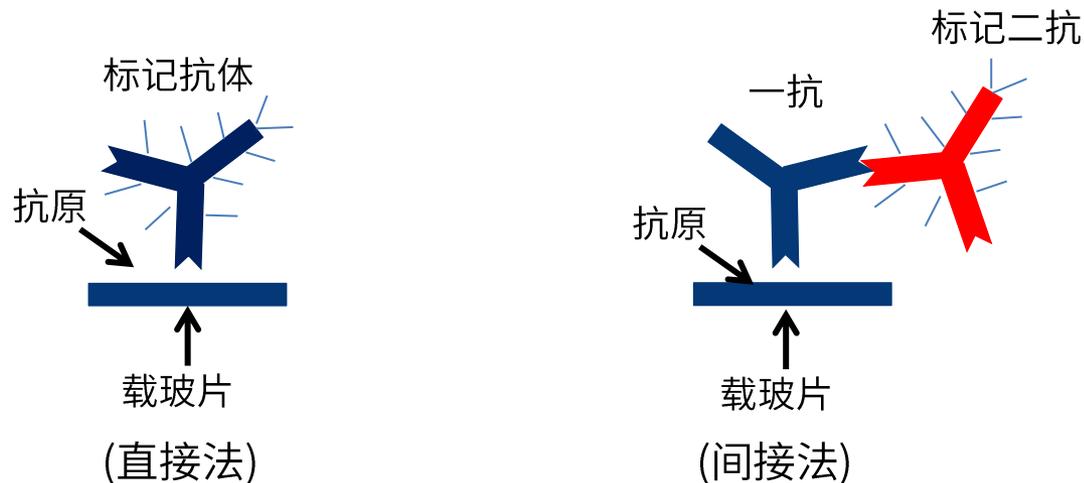
技术分类

➤ 按标记物质的种类

- ✓ 如荧光染料、放射性同位素、酶(主要有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)、铁蛋白、胶体金等，可分为免疫荧光法、放射免疫法、免疫酶标法和免疫金银法等。

➤ 按染色步骤

- ✓ 可分为直接法(又称一步法)和间接法(二步、三步或多步法)。与直接法相比，间接法的灵敏度提高了许多。



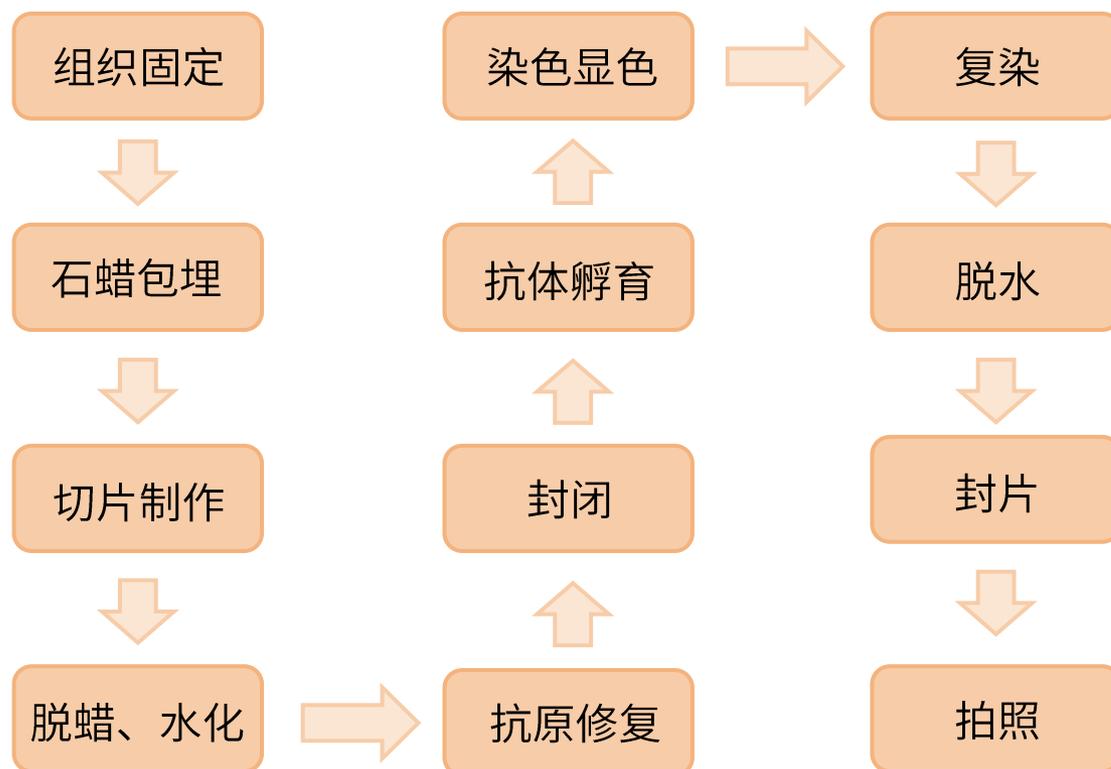
碧云天免疫组化技术服务

实验标本

- 实验所用标本主要分为**组织标本**和**细胞标本**两大类：
 - ◆ 组织标本包括：**石蜡切片**(病理切片和组织芯片)和**冰冻切片**。
 - ✓ **石蜡切片**是制作组织标本最常用最基本的方法，对于组织形态保存好，且能作连续切片，有利于各种染色对照观察；还可以长期存档，供回顾性研究。
 - ◆ 细胞标本包括：**组织印片**、**细胞爬片**和**细胞涂片**。

碧云天免疫组化技术服务

实验步骤



碧云天免疫组化技术服务

组织固定

- 常用固定剂：大多为醛类和醇类。其固定原理有所不同，各有优缺点。
 - ✓ 醛类(常用甲醛、戊二醛和多聚甲醛)
 - ✓ 醇类(常用乙醇)
 - ✓ 其它(丙酮)
- 组织固定目的
 - ✓ 使细胞内蛋白质凝固，终止胞内酶活化反应，防止细胞自溶，保持细胞固有形态和结构，防止细胞脱落，去除干扰抗原抗体反应的类脂，最主要的是保存组织细胞的抗原性，在染色和反复清洗过程中使抗原不致释放。

碧云天免疫组化技术服务

石蜡包埋

- 浸蜡包埋是使蜡进入到组织中使其变硬便于切片。蜡的熔点一般为56-58°C。
- 包埋蜡的温度应与组织块温度接近。

碧云天免疫组化技术服务

切片制作

➤ 石蜡切片

- ✓ 较好的保持组织细胞的形态
- ✓ 切片有连续性
- ✓ 长期存档，供回顾性研究
- ✓ 切片厚2-4 μm
- ✓ 抗原的保存量不如冰冻切片

➤ 冰冻切片

- ✓ 制片方法简单
- ✓ 较好的保存组织的抗原
- ✓ 细胞内易形成冰晶而使抗原弥散
- ✓ 切片厚度较石蜡的厚

碧云天免疫组化技术服务

脱蜡、水化

- 脱蜡与水化的目的是确保抗体等其他试剂能够充分与组织中抗原等结合发生反应。若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。

碧云天免疫组化技术服务

抗原修复

◆ 化学方法：

- ✓ 主要是通过一些酶的作用，使抗原决定簇暴露。常用的酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶等。

◆ 加热方法

- ✓ 水浴加热法
- ✓ 微波照射法
- ✓ 高压加热法

碧云天免疫组化技术服务

封闭

➤ 封闭非特异性蛋白：

- ✓ 组织切片上有些剩余的位点可以与一抗非特异性结合，造成后续结果的假阳性。
- ✓ 封闭血清一般是和二抗同一起来源的，血清中有一些动物自身的抗体，预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合。

碧云天免疫组化技术服务

抗体孵育

➤ 抗体的选择(一抗)

- ✓ 单克隆抗体：针对某一抗原决定簇，由单淋巴细胞产生的抗体。
- ✓ 多克隆抗体：多株B细胞针对多个抗原决定簇产生的抗体。
- ✓ 单克隆抗体的特异性更强，多克隆抗体的敏感性更高。如何使用二者取决于使用的目的。
- ✓ 弄清一抗的动物来源对后续二抗的选择至关重要。

碧云天免疫组化技术服务

抗体孵育

➤ 抗体的选择(二抗)

◆ 在抗体上用化学方法连接某种标记物，目的是使抗原抗体的结合能被观察到。

✓ 荧光素：异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明(TRITC)

✓ 酶：辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)

✓ 重金属：胶体金

碧云天免疫组化技术服务

染色显色

- 在免疫组化中，由于抗原抗体所形成的复合物本身没有颜色，不能直接观察，只能借助于其他某些化学基团的显色作用，使复合物显色，有利于显微镜下观察。
- 常用的标记酶及其显色底物
 - ◆ 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP): DAB或AEC显色系统
(染色结果: 棕黄色)
 - ◆ 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP): NBT/BCIP (染色结果: 蓝黑色)

碧云天免疫组化技术服务

复染、脱水、封片

➤ 复染

- ◆ 目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位，常用试剂：苏木素。

➤ 脱水

- ◆ 不同浓度的乙醇脱水

➤ 封片

- ◆ 中性树胶

碧云天免疫组化技术服务

拍照分析

- 免疫组化结果的判断原则
 - ◆ 必须设对照
 - ◆ 抗原表达必须在特定部位
 - ◆ 阴性结果不能视为抗原不表达

免疫组化的呈色深浅可反映抗原存在的数量，可作为定性、定位和定量的依据。

碧云天免疫组化技术服务

注意事项

➤ 出现假阳性的原因

- ◆ 抗原表达必须在特定部位，组织切片质量不佳容易造成假象，如刀痕裂缝边缘的组织着色过深，不能作为阳性判断的证据。
- ◆ 出血和坏死：红细胞的内源性过氧化物酶，坏死细胞释放的内源性过氧化物酶均可出现假阳性反应。
- ◆ 抗体交叉反应

碧云天免疫组化技术服务

注意事项

➤ 出现假阴性的原因

- ◆ 固定时间过长，浸蜡、烤片温度过高，导致抗原丢失，无法补救。
- ◆ 固定液不合适或浓度不对，导致固定不佳。
- ◆ 抗体浓度过低。
- ◆ 孵育时间太短，或孵育温度太低。
- ◆ 缓冲液pH值不正确。

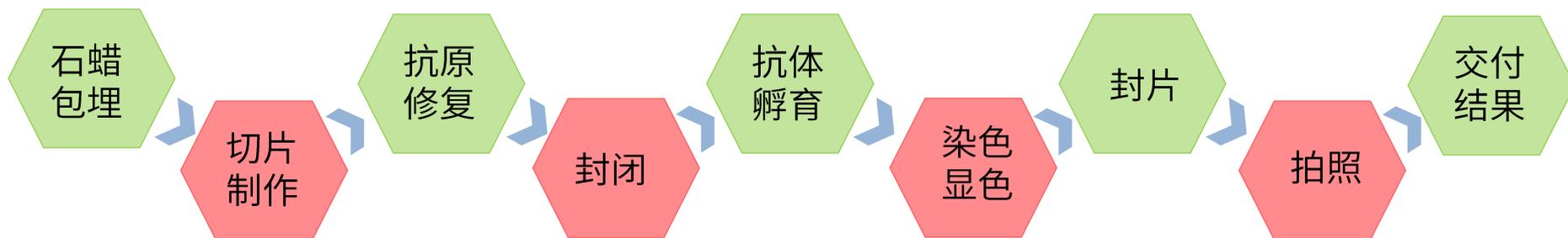
碧云天免疫组化技术服务

注意事项

- 必须严格设置阳性对照和阴性对照
- DAB有致癌性，用后不应随处倒弃

碧云天免疫组化技术服务

服务流程



附件 (碧云天免疫组化询价单)

碧云天免疫组化技术服务

询价与订购

- 请您下载并填写《碧云天免疫组化询价单》，发送至service@beyotime.com，我们将为您设计最佳方案。
- 若有订购意向，碧云天的技术服务人员会与您联系，并签订《碧云天免疫组化服务协议书》。

碧云天免疫组化技术服务

客户须知

➤ 样品要求

- 客户需提供固定好的组织/组织切片/细胞爬片/包埋好的蜡块组织，详细的样品资料(如组织来源等)。
- 组织切片厚度小于20 μm ，一般为5 μm 。
- 用于石蜡包埋的组织，活检或手术切除标本应在2小时内取材或固定，避免组织自溶及抗原变性等影响免疫组化结果。
- 用于冰冻切片的组织，取材后应立即液氮速冻，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 取材时应保持所检样本原有的结构、形态，为避免挤压组织，尽量使用锋利刀片，并且避开坏死组织，除取病灶或含待检抗原部位外，还应取病灶与正常交界处，即所取组织切片中同时应有抗原阳性和阴性区，以形成自身对照。
- 若客户提供一抗，须为符合技术要求的浓缩或即用型一抗，同时提供抗体说明书；也可由碧云天代购。
- 具体的样本寄送要求详见《碧云天免疫组化生物送样要求》和《碧云天免疫组化生物样本信息表》。

碧云天免疫组化技术服务

客户须知

➤ 服务说明

- 碧云天免疫组化技术服务采用SP(三步法)或二步法免疫组化试剂盒进行检测，DAB显色。预实验与正式实验均按照切片张数进行收费。
- 客户应对所提供的材料及信息负责，如因客户提供的材料及信息不准确而引起的实验延误或经济损失由客户承担。
- 因科学实验的不确定性，实验结果不一定会出现阳性结果，我们保证实验结果的真实准确性，但是对结果是否符合预期不做承诺。

碧云天免疫组化技术服务

服务承诺

➤ 碧云天承诺交付：

- ◆ 1张显微镜图片/切片；
- ◆ 染色后的切片；
- ◆ 完整实验报告，包括：实验步骤、IHC检测照片。

Thank You



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>