多重荧光免疫组化（mIHC）实验protocol

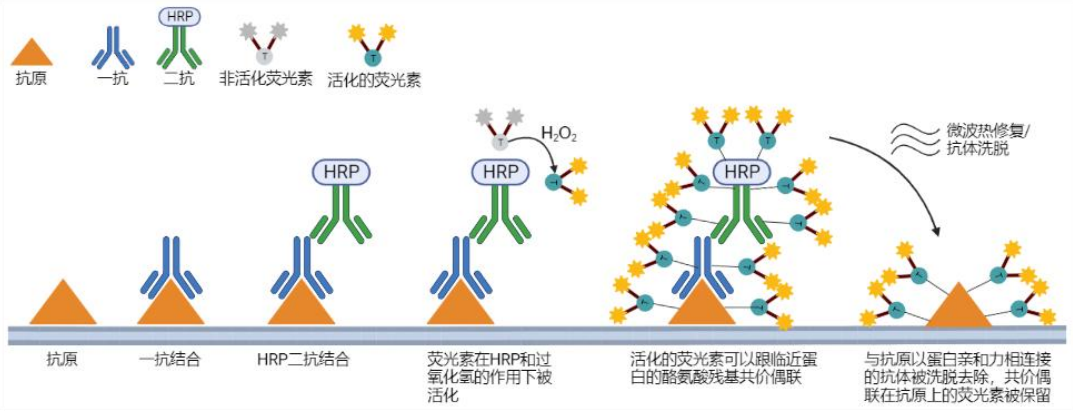
（类器官样本）

背景介绍

组织微环境中有复杂的细胞组成，这些细胞的表型、状态、丰度、分布都有着重要的生物学意义和临床价值。借助抗体染色可以将其在组织原位上呈现出来。免疫组化染色是一种研究组织形态和原位蛋白表达的常见技术，常规 IHC 检测只能展示单一指标，难以呈现复杂的组织微环境中的细胞组成、状态和关系，而这些信息对疾病的诊断和治疗至关重要！

酪氨信号放大技术原理：类似常规免疫组化的 DAB 显色方法，TSA 技术同样采用 HRP 标记的二抗，HRP 催化加入体系的荧光素底物，生产活化荧光底物，活化底物可与抗原上的酪氨酸共价结合，使样品上稳定的共价结合荧光素。之后用热修复法洗去非共价结合的抗体，换下一种一抗来第二轮孵育，换另一种荧光素底物，如此往复就可实现多重标记。

原理图



建议操作步骤：

1、样本准备：

类器官收集

收集生长至较大尺寸类器官：96孔板，生长密度较大时，使用移液枪取半孔以上，清洗1至3遍，洗去大部分基质胶，离心沉淀，弃除大部分上清。

1）称量0.2至0.4g琼脂糖，加入至烧杯或者小试剂瓶内；

2）加入10mL左右PBS；

3）微波炉高火融化，每隔5s暂停打开，观察，重复数次至琼脂糖融化完全；

4）取约200uL融化琼脂糖，加入至600uL EP管内；

5）在盛有琼脂糖的小EP管内插入一小PCR管，使琼脂糖形成一圆尖底凹槽，室温或者4℃冰箱静置数分钟，至琼脂糖凝固，轻轻转动小PCR管，取出PCR管，可看到琼脂糖内形成一个深圆尖底槽。

类器官固定

1）将类器官轻轻吸出转移至一固定槽底部；

2）轻轻加入PBS至高于琼脂糖槽的边缘；

3）盖上盖子，水平离心机1000 rpm，离心5min；

4）轻轻吸出除底部类器官沉淀外的PBS上清；

5）加入融化的琼脂糖液体200μL；

6）室温静置至琼脂糖完全凝固；

7）剪去固定管的底部和盖子，置于2 mL EP管内，加入多聚甲醛至差不多装满整个EP管，置于4℃冰箱过夜。

类器官包埋

1）脱水：取出已凝固的含有类器官沉淀的琼脂糖块，在梯度乙醇中脱水，70%、80%、90%、95%乙醇各1h，100%乙醇30min，待其凝固。

2）融蜡：提前4h左右打开烘箱，65℃溶蜡。

3）透明：将脱水完成后的琼脂糖块转移至组织包埋盒中（二甲苯处理前需一直浸泡在无水乙醇中），将包埋盒转移至二甲苯中5min处理两次。

注：因二甲苯有毒性，需在通风良好区域进行操作，取出时尽量沥尽残留二甲苯。

4）浸蜡：透明化处理完成后立即转入已经融化的蜡缸中，60℃浸蜡2h后，更换新的蜡缸再次浸蜡2h。

5）包埋：包埋在冰盒上进行，将融好的纯蜡倒入蜡盒三分之一处，将琼脂块放置于中间位置，然后再滴蜡包埋直到倒满。待蜡块完全凝固后，小心脱下模具。

2、烤片：60℃烤片30min。

3、脱蜡、水化：二甲苯（5min）——二甲苯（5min）——二甲苯（5min）——100%乙醇（5min）——100%乙醇（5min）——95%乙醇（3min）——85%乙醇（3min）——75%乙醇（3min）——去离子水（5min）。

4、抗原修复：取200ml抗原修复液，加入染色盒中，将组织切片置于染色盒内耐高温塑料切片架上，置于高压锅内加热至饱压，然后继续加热5min，关闭电源，10min后取出染色盒，室温冷却30min，画上阻水圈，置入PBST浸洗3次，每次3min。

5、阻断内源性过氧化物酶：每切片加100μL3% H2O2，室温下孵育10min，PBST浸洗3min×3次。

6、封闭：除去PBST液，每张切片加100μL 5% 山羊血清封闭液，室温孵育30min，除去封闭液。

7、一抗孵育：每张切片加100μL一抗工作液，室温保湿孵育1h，PBST浸洗3min×3次。

8、二抗孵育：除去PBST，每张切片加100μL二抗，室温保湿孵育15min，PBST浸洗3次，每次3min。

9、染料孵育：除去PBST，每张切片加100μL现配的1*染料工作液（使用信号放大液按1:100稀释），孵育10min后，置入PBST内洗涤，室温浸片洗涤3次，每次3min。

10、抗体洗脱：抗体洗脱液（abs994）37℃ 预热，滴加少量抗体洗脱液覆盖样本，室温放置3~5min；弃去洗脱液，再次滴加足量的洗脱液覆盖样本，37° C 孵育20min；PBST浸洗3次，每次3min。

11、重复步骤（6）-（10），直至所有目标抗体染色完成。

12、核染：滴加1*DAPI工作液到样品上，浸没样本区域，室温孵育10min后，用1*PBST浸洗玻片3次，每次2min。

13、封片：滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡。

14、扫描成像，数据分析。

染料信息表格

染料名称	波长		相似荧光染料	推荐颜色设置
	激发波长	发射波长		
DAPI	360	461	DAPI	
TSA单色荧光染料480	430	480	Opal480	
TSA单色荧光染料520	490	520	FITC/AF488/Opal520	
TSA单色荧光染料540	520	540	AF514/Opal540	
TSA单色荧光染料570	550	570	CY3/AF555/Opal570	
TSA单色荧光染料620	590	620	AF594/Opal620	
TSA单色荧光染料650	640	660	AF610/Opal650	
TSA单色荧光染料700	682	702	AF680/CY5.5/Opal690	
TSA单色荧光染料770	740	780	Opal780	

更多相关产品

分类	货号	产品名称	规格
固定	abs9179	4%多聚甲醛（通用型组织固定液）	500mL
包埋（冰冻样本）	abs9756	OCT包埋剂	110mL
抗原修复（石蜡切片）	abs9342	Tris-EDTA抗原修复液（10×，pH9.0）	100mL
	abs9248	柠檬酸钠抗原修复液（50×）	100mL
抗体洗脱（无法采用热修复进行洗脱的样本，如细胞、冰冻、骨组织等）	abs994	抗体洗脱液（mIHC专用）	30mL
细胞通透（胞内指标需要）	abs9149	曲拉通X-100	100mL
淬灭内源性过氧化物酶	abs9333	过氧化物酶封闭液（H2O2法）	100mL
封闭（二抗同来源血清）	abs933	山羊血清	50mL
	abs9157	牛血清白蛋白	100g
一抗	abs1	组化抗体	
	abs9299	一抗二抗稀释液	100mL
缓冲液	abs952	TBST(10×)	500mL×2
	abs9340	PBST(1×,pH7.4)	500mL

货号	产品名称	规格
abs50015	七色多重荧光免疫组化染色试剂盒(鼠兔通用二抗)	20T/100T
abs50037	七色多重荧光免疫组化染色试剂盒(plus)(鼠兔通用二抗)	20T/100T
abs50031	七色多重荧光免疫组化染色试剂盒(抗兔二抗)	20T/100T
abs50038	七色多重荧光免疫组化染色试剂盒(plus)(抗兔二抗)	20T/100T
abs50014	六色多重荧光免疫组化染色试剂盒(鼠兔通用二抗)	20T/100T
abs50049	六色多重荧光免疫组化染色试剂盒(plus)(鼠兔通用二抗)	20T/100T
abs50030	六色多重荧光免疫组化染色试剂盒(抗兔二抗)	20T/100T
abs50048	六色多重荧光免疫组化染色试剂盒(plus)(抗兔二抗)	20T/100T
abs50013	五色多重荧光免疫组化染色试剂盒(鼠兔通用二抗	20T/100T
abs50029	五色多重荧光免疫组化染色试剂盒(抗兔二抗)	20T/100T
abs50012	四色多重荧光免疫组化染色试剂盒(鼠兔通用二抗)	20T/100T
abs50028	四色多重荧光免疫组化染色试剂盒(抗兔二抗)	20T/100T
abs50086	双色多重荧光免疫组化染色试剂盒（抗兔二抗）	100T
abs50087	双色多重荧光免疫组化染色试剂盒（鼠兔通用二抗）	100T
abs50088	三色多重荧光免疫组化染色试剂盒（抗兔二抗）	100T
abs50089	三色多重荧光免疫组化染色试剂盒（鼠兔通用二抗）	100T
abs50083	肺癌肿瘤微环境多重荧光免疫组化检测试剂盒（I）	20T

abs50084	肺癌肿瘤微环境多重荧光免疫组化检测试剂盒（II）	20T
abs994	抗体洗脱液(mIHC专用)	30mL
abs9860	组织自发荧光淬灭剂	20mL