# 多重荧光免疫组化（mIHC）实验protocol

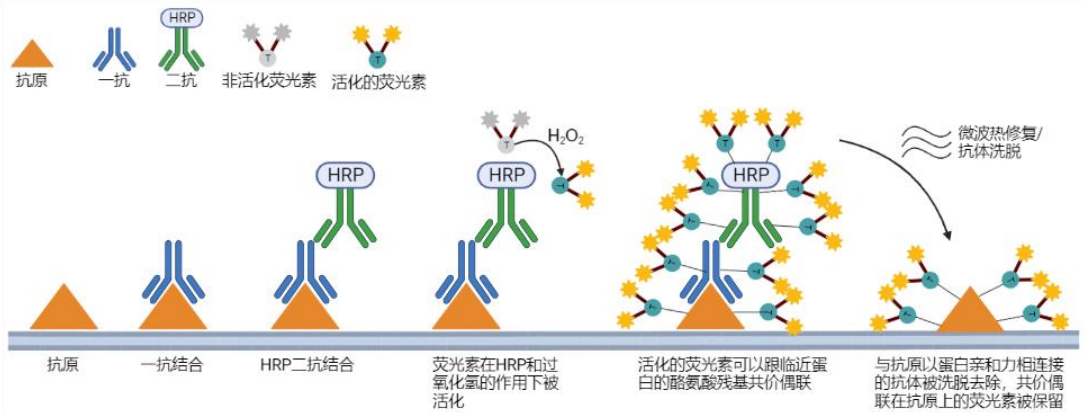
## （细胞样本）

**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：**制备细胞样本（细胞爬片、细胞涂片等），建议直接使用腔室载玻片进行细胞培养，方便后续检测。完成制备后，用PBS简单漂洗（2×2min）；

**2、细胞固定：**用4%多聚甲醛常温固定10-20min，PBS洗涤3×5min；

**3、淬灭内源性过氧化物酶：**滴加3% $H_2O_2$，室温下孵育10-30min，PBS洗涤3×5min；

**4、细胞通透（胞膜指标省略此步）：**滴加含1-0.25% Triton X-100的PBS溶液，室温下处理10min，PBS洗涤3×5min；

**5、封闭：**滴加封闭液（5%二抗同来源封闭血清或BSA），室温孵育30min；

**6、一抗孵育：**弃封闭液，滴加稀释好的一抗工作液，于避光湿盒内4°C孵育过夜或37℃ 1-2h（湿盒中可加少量水，防止抗体孵育过程干片），PBS漂洗3×5min；

**7、二抗孵育：**滴加与一抗相应种属的HRP二抗覆盖组织，避光室温孵育20-50min，PBS漂洗3×5min；

**8、染料孵育：**滴加现配的1*TSA染料工作液（使用信号放大液按1:100稀释），反应1-10min，PBS漂洗3×5min；

**9、抗体洗脱：**抗体洗脱液37℃预热，甩去PBS后，滴加洗脱液浸润整个爬片，洗脱时间可控制在15-30min（洗脱难度：结构性膜蛋白和细胞骨架蛋白＞胞浆蛋白＞胞核蛋白），PBS漂洗3×5min；

10、重复进行步骤[5→9]，直到完成所有指标染色；

11、滴加1*DAPI工作液到样品上，浸没样本区域，室温孵育10min，PBS漂洗3×5min；

12、滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡；
13、扫描成像，数据分析。

## 注意事项：

1、若某些抗体难以洗脱，建议降低一抗稀释比例，或将该靶点排到最后一轮进行染色；
2、抗体洗脱液在使用时要根据实际情况调整孵育时间和洗脱温度，若时间太长有可能损伤抗原靶点以及细胞核形态；
3、若既有膜指标又有胞内指标，可先做膜指标，再做胞内指标，在进行胞内指标染色之前再进行打孔，若一开始就打孔，可能影响胞膜指标的染色；
4、由于细胞样本可能存在的脱片问题，可在开始多色实验之前先模拟多次抗体洗脱的过程，多次使用抗体洗脱液洗脱与PBS漂洗，观察细胞脱落情况，若明场不便观察，可染一下DAPI再观察；
5、上述操作步骤并不一定适合所有样本和抗体，需要根据实际情况调整实验细节。

### 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 |