

荧光和显色免疫组织化学

显色检测

在显色检测中，抗体表位结合可用一种酶与二级抗体或者检测系统（例如ABC方法）结合来可视化。这种酶，辣根过氧化物酶（HRP）或者碱性磷酸酶（AP），可催化其各自的显示底物转化为抗体结合位点的有颜色的沉淀物。

SYSY的参考实验方案采用以3,3'-二氨基联苯胺（DAB）为显色底物，HRP为基础的显色检测。DAB非常稳定，已染色的切片可持续稳定数年。许多细胞（例如红细胞、粒细胞、神经细胞）拥有内源过氧化物酶，需要被阻断来减弱背景染色。SYSY在初级抗体孵化之前使用一个3% H₂O₂阻断步骤来压制内源过氧化物酶。然而，一些表位可被高浓度的过氧化氢酶破坏，导致抗体-抗原结合减少甚至不结合。在这种情况下，3% H₂O₂阻断步骤可在初级抗体孵化之后进行。

当用碱性磷酸酶（AP）或者荧光检测时，则不需要3% H₂O₂阻断步骤。

DAB染色的载玻切片可被脱水、清理，并参照我们SYSY的参考实验方案用有机封固剂封存。用有机封固剂封存的切片通常比用水封材料封存的切片拥有更好的光学性能。

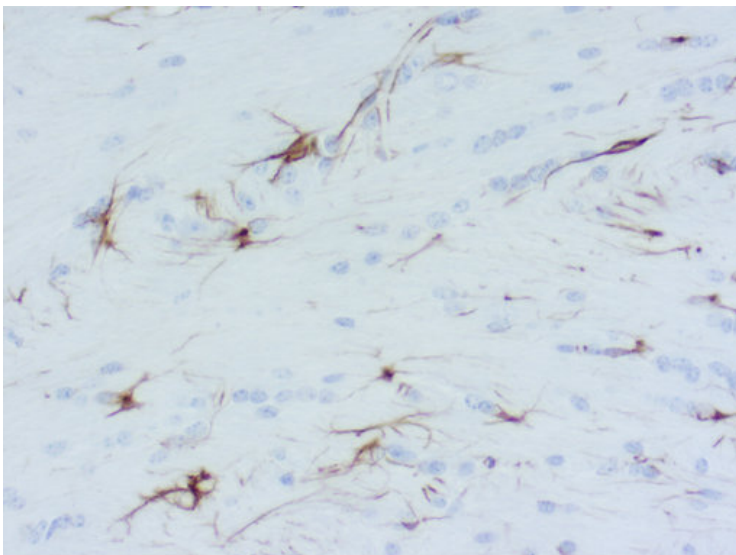
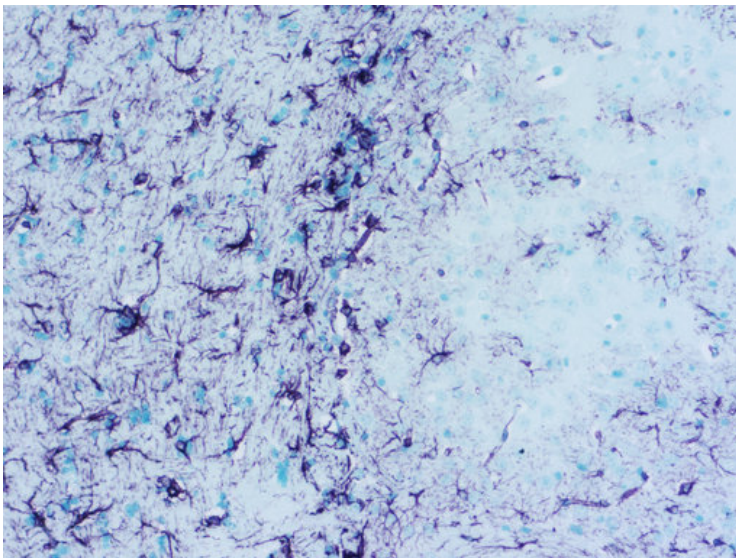


图 1：用 ImmPACT VIP（紫色）为HRP 底物进行显色检测。复染色：甲基绿（浅绿）。

图 2：用 DAB（棕色）为HRP 底物进行显色检测。复染色：苏木精（蓝色）。

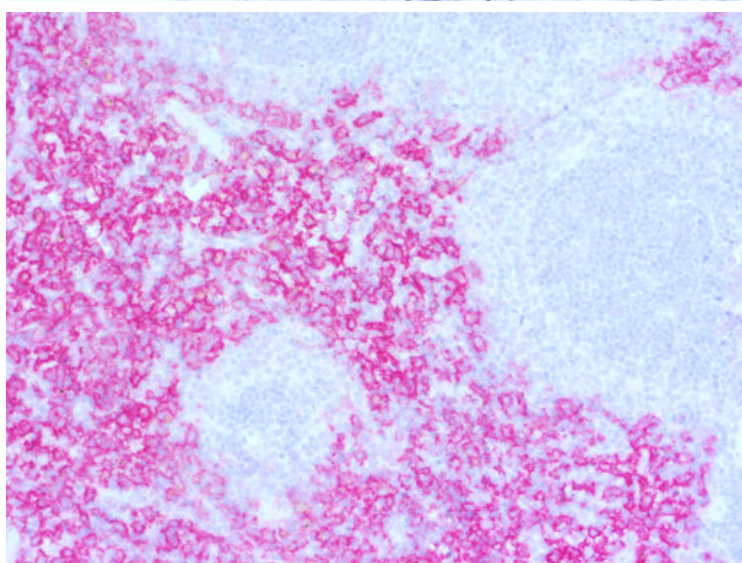
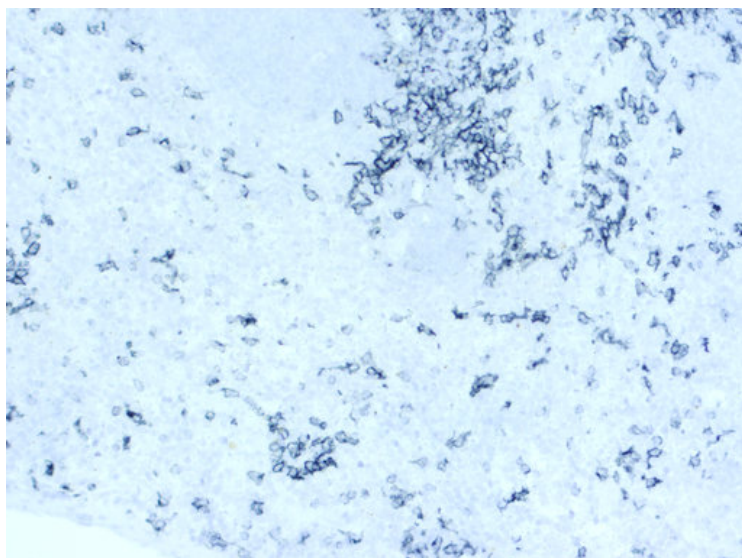


图 3：用 ImmPACT SG（灰色）为 HRP 底物进行显色检测。复染色：苏木精（蓝色）。

图 4：用 ImmPACT AP RED（红色）为 AP 底物进行显色检测。复染色：苏木精（蓝色）。

荧光检测

在免疫荧光中，荧光团结合的二级抗体被用来定位抗原-抗体复合物。荧光检测允许更容易的多路复用，特别是对于共定位目标，当高丰度和低丰度的目标必须在一张幻灯片上显示时，这样有更高的动态范围。然而，许多 FFPE 组织，特别是脾脏和肾脏，具有高度组织自体荧光，使得绿色和红色通道荧光团的试验结果很难解释。