

常见问题 – 为什么我有高背景或者非特异性染色？

初级/次级抗体浓度可能会过高

SYSY参考实验方案中推荐的初级和二级抗体浓度可提供好的染色结果。然而，IHC-P染色结果及其受抗原修复条件的影响（缓冲液成分、pH、时间、方法），初级和二级抗体孵育时间、阻断溶液、二级系统和组织类型。因此，初级和二级的最优浓度必须单独决定。SYSY推荐为每一个组织类型用滴定法测量初级和二级抗体。

显色法检测时内源酶干扰

组织例如肾脏或者肝脏包含大量的内源过氧化物酶，这会在基于HRP的抗体检测中产生假阳性染色。使用3% H₂O₂可阻断内源过氧化物酶活性。某些抗原可被高浓度过氧化物酶破坏。在这种情况下，可在初级抗体孵育之后进行H₂O₂阻断。

内源AP存在于例如肠管、肾脏和淋巴组织中，可在进行基于AP的抗体检测时用1 mM左旋咪唑阻断。

SYSY推荐在染色方案中通过省略初级和二级抗体（以及适用时的ABC系统）来检测内源性酶活性。

使用ABC方法时的内源性生物素

某些组织（例如肾脏、肝脏）包含大量内源性生物素。特别是当使用以Tris-EDTA或EDTA为主要成分的抗原修复缓冲液时，ABC方法会引起高背景和/或假阳性染色。因此SYSY推荐使用亲和素-生物素阻断步骤。如果背景问题继续存在，可以考虑尝试基于聚合物的检测系统来代替ABC方法。

SYSY推荐当使用ABC方法时，通过只孵育仅有的亲和素-生物素复合物，省略染色实验方案中的初级抗体和生物素化的二级抗体来检测内源性生物素。

切片变干

不要让切片变干。使用腐殖化空间进行抗体孵育。

二级抗体会引起背景染色

在大鼠而不是小鼠中生成针对小鼠蛋白的单克隆HistoSure抗体可避免代表性的“小鼠对小鼠”问题。然而，在对小鼠组织使用抗-大鼠二级抗体时，需要进行小鼠预先吸附。

其它的二级抗体也能产生意外的非特异性染色。SYSY推荐在实验方案中通过省略初级抗体来检测二级抗体的假定交叉反应。同样，对次要试剂也要进行批次间比较！

阻断不充分

SYSY在参考实验方案中使用无血清蛋白阻断和来自安捷伦科技公司的抗体稀释液（它具有附加的阻断效应）。在使用替代阻断剂时，可优化阻断条件。当用正常血清来阻断时，使用来自宿主的二级抗体正常血清。

组织切片太厚

组织切片需切的更薄。FFPE组织切片厚度应该在2.5 - 5 μM之间。