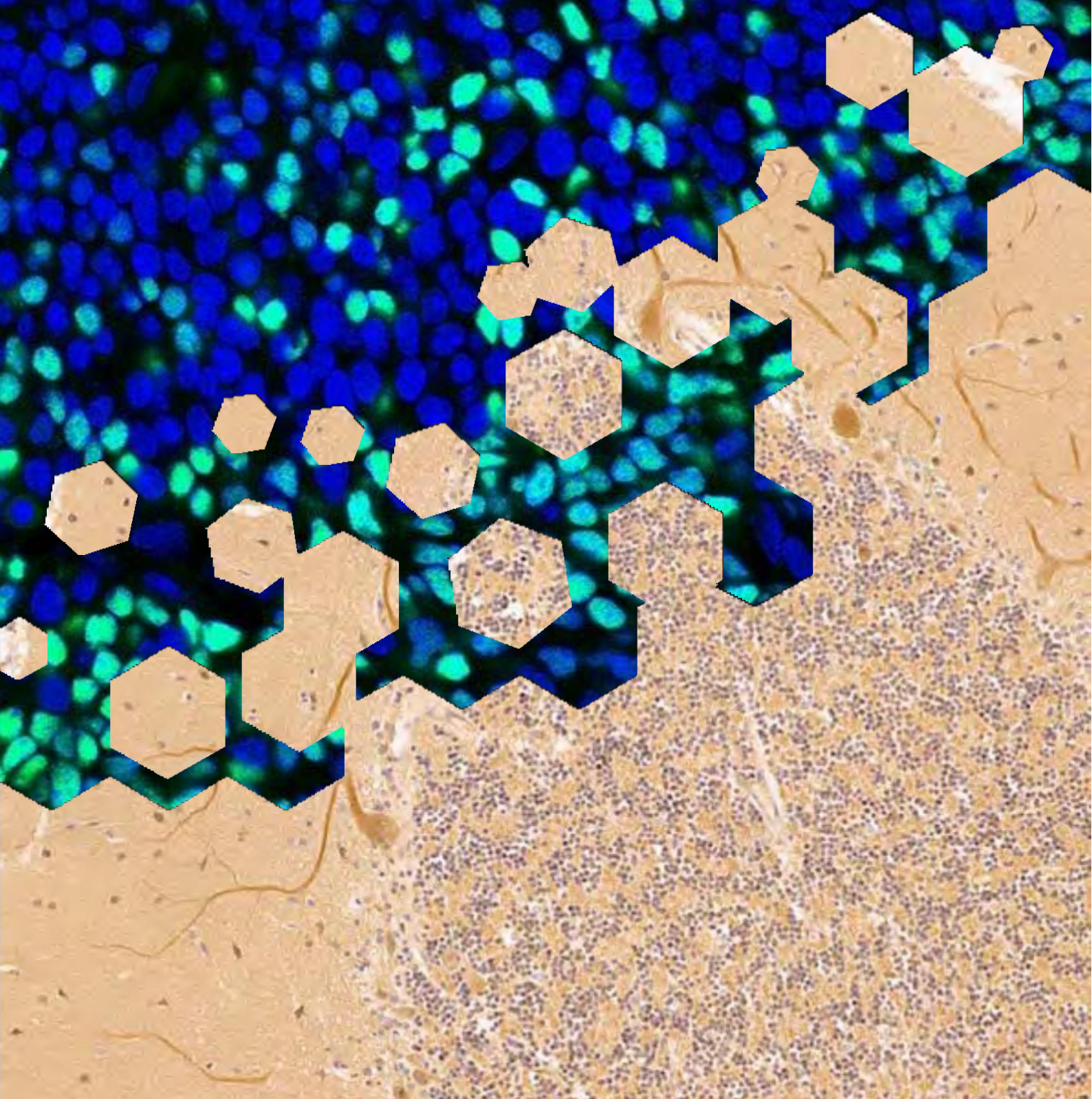


abcam

免疫组化应用指南



目录

简介	4
组织处理、固定和切片	5
抗原修复	7
封闭	9
阻断内源性酶	10
- 过氧化物酶封闭	10
- 碱性磷酸酶封闭	10
一抗	11
- 直接检测与间接检测	11
- 选择一抗	11
- 抗体特异性	11
- 经 IHC 验证	12
- 克隆性	12
检测和信号放大系统	13
- 显色与荧光检测	13
- 酶和显色剂	14
多色 IHC	16
复染	17
IHC 的对照	19
- 抗原（组织）对照	19
- 试剂对照	19
IHC 实验疑难解答	20
- 无染色	20
- 高背景	21
- 非特异性染色	22
- 组织形态不清晰或受损	22

简介

免疫组化（IHC）利用抗体检测组织切片中蛋白和其他抗原的定位。抗体-抗原的相互作用通过酶底物显色检测或通过荧光染料进行荧光检测。

虽然IHC在定量方面不如蛋白质印迹或ELISA,但是它可以提供完整组织背景下蛋白定位的宝贵信息。蛋白表达谱对病理学家具有极大价值,也可作为重要的诊断工具。

IHC实验成功的关键在于稳定、优化且可重复的染色方案,而该方案应使用优质的特异性试剂。

IHC 资源

www.abcam.com/IHC-kits-and-reagents
www.abcam.com/IHC-primary-antibodies
www.abcam.com/IHC-secondary-antibodies

组织处理、固定和切片

组织固定可保存抗原，防止采集的组织自溶和坏死。组织包埋可在切片过程中对组织提供支撑，使切片更坚实。

准备IHC实验的第一步是决定如何制备组织切片。最常见的方法是石蜡包埋。也可以选择冰冻切片和漂片——每种方法都有各自的优势和局限性（见表1）。

样本固定是组织处理的关键步骤，也是阻止抗原、细胞和组织降解的关键。10%的福尔马林缓冲溶液以及4%的甲醛（或多聚甲醛）是典型的固定剂——两种溶液几乎相同；福尔马林是40%的甲醛溶液。

收集样本后，快速、彻底地固定或冷冻样本非常关键，取材时务必确保样本不会大到无法完全固定或快速冷冻。

表1. IHC石蜡切片vs冰冻切片vs漂片。

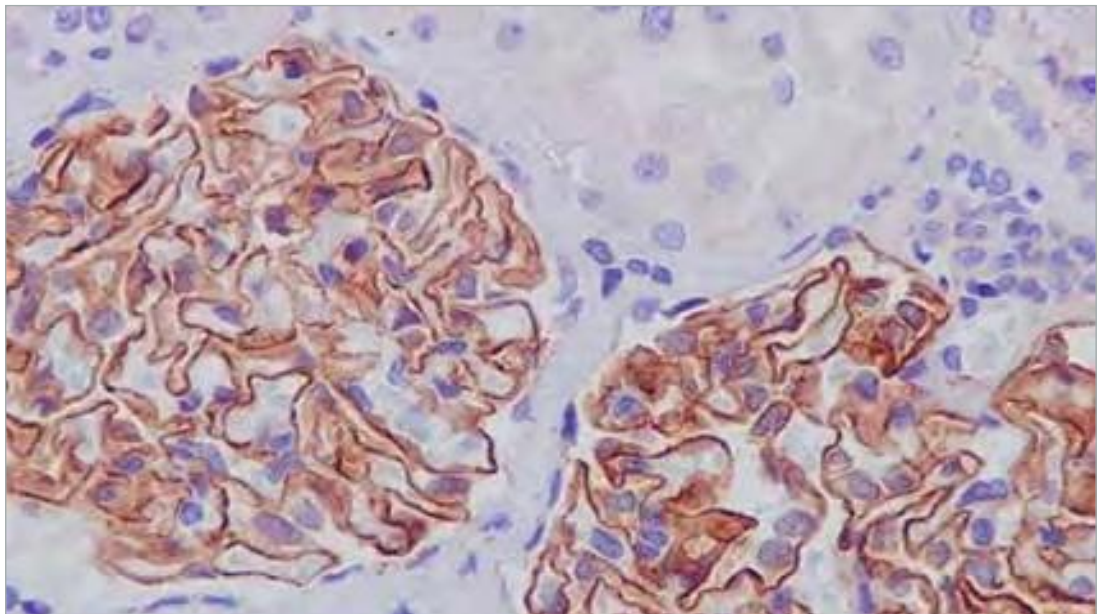
	石蜡包埋组织	冰冻组织	漂片
固定	包埋前：甲醛	切片前或切片后：甲醛、甲醇、乙醇或丙酮	切片前：甲醛
包埋/冷冻	组织脱水、透明化处理 后，加入石蜡（预热到 60°C），放置过夜。	将组织浸没在液氮、异戊 烷中冷冻或将样本埋入干 冰中冰冻。 检测磷酸化等翻译后修饰 时，常使用速冻方式	不需要包埋
切片	切片机	冰冻切片机	振动切片机
储存	室温下储存多年。	-80°C下储存1年（-190°C 下储存时间更长）。	置于冷冻保护剂中，在- 20°C下储存，或者4°C 下 在PBS+叠氮化物中短期 储存。
优势	容易操作，不会损坏切 片。	保留酶的功能和抗原性。 实验流程简短（通常不需 要冗长的固定步骤）。	更厚的切片（> 25 μm）： 可以更好地分析组织的3D 结构。
局限性	过度固定会掩盖抗原表 位，进而增加抗原修复的 需求。 处理时间长：在梯度酒精 和二甲苯中逐步脱水，以 便于石蜡渗透。	如果没有快速冷冻组织， 可能会形成冰晶，从而破 坏组织结构。 冰冻切片通常比石蜡切片 厚，可能会导致分辨率 低、图像差。 可能需要阻断内源活性 酶。	难以对微小结构和单个细 胞的成像。 可能需要额外的组织透明 化方法（如 CLARITY），以减少光散 射并对较厚的切片进行成 像。

抗原修复

对甲醛固定的组织切片进行抗原修复，以暴露抗原位点，从而使抗体结合。

甲醛固定会导致蛋白交联（亚甲基桥），从而掩盖抗原表位，限制抗原-抗体的结合。抗原修复方法（见表2）则会破坏这些亚甲基桥，暴露出抗原表位，允许其与抗体结合。

冷冻组织切片通常不够牢固，进行抗原修复时会损坏切片。人们一般会避免使用甲醛固定剂固定冷冻切片（或者在使用时大大减少固定时间），从而省去或减少抗原修复需求。



使用 ZO1(紧密连接蛋白)抗体[EPR19945-296] (ab221547)对人肾脏组织进行IHC标记。使用pH 9.0的Tris/EDTA缓冲液 (ab93684) 进行热抗原修复。

表 2.抗原修复的主要方法。

	热诱导的抗原表位修复	蛋白水解酶诱导的抗原表位修复
优势	抗原表位的修复更温和，参数更可控。适用于较难修复的抗原表位。	
pH	通常使用 pH 6 的缓冲液，但碱性缓冲pH值通常为7.4。液也在广泛使用。必须通过实验确定最佳 pH 值。	
温度	约95°C。	通常为37°C。
孵育时间	10-20分钟。	10-15分钟。
缓冲液组分	取决于靶抗原所需的pH值。 常用的缓冲液包括柠檬酸钠、EDTA和Tris-EDTA。	酶（如胃蛋白酶、蛋白酶K或胰蛋白酶）的中性缓冲液。
注意事项	微波炉加热可能会导致抗原修复不均 酶修复有时会破坏切片的形态 - 浓度匀。剧烈沸腾会导致脱片（组织与载玻片分离）。片分离）。	

抗原修复资源

www.abcam.com/antigen-retrieval-buffers
www.abcam.com/antigen-retrieval-protocol

封闭

用血清或BSA封闭，防止抗体的非特异性结合，并降低背景和潜在的假阳性结果。

使用血清或BSA进行封闭对于防止抗体与组织或Fc受体（与抗体恒定区（Fc）结合的受体）发生非特异性结合至关重要。

二抗种属来源的血清是很好的封闭试剂。使用牛血清白蛋白（BSA）或酪蛋白，可用于阻断非特异性抗体结合。

我们建议在使用基于亲和素/生物素的检测系统时，阻断内源性生物素，因为内源性生物素存在于许多组织中，特别是肾脏、肝脏和大脑中。先用亲和素与组织孵育，阻断内源生物素，然后用外源生物素孵育，以阻断亲和素分子上额外的生物素结合位点。

如果使用与样本相同种属来源的一抗，则应采用抗该种属的二抗的F(ab)片段进行封闭（例如在小鼠组织上使用小鼠抗体，使用 Goat F(ab) Anti-Mouse IgG H&L）。F(ab)片段结合组织切片中的任何内源性抗体并使其饱和，阻断二抗的结合。但是，这种方法不能完全阻断，还是会留下一些背景。

封闭资源

www.abcam.com/normal-serums
www.abcam.com/blocking-reagent-kits

阻断内源性酶

使用酶检测方法，需阻断内源性酶，以免混淆您的结果。由于过氧化氢等试剂处理会破坏抗原表位并影响抗体结合，建议您在一抗孵育后阻断内源性酶。如果您的抗体是HRP直标一抗，那么在加入一抗之前，需要先完成阻断处理。

显色检测法通常使用二抗上偶联的酶来显示抗体位置。如果组织样本中存在内源性活性酶，开始检测前必须阻断内源性酶，这一步至关重要。

过氧化物酶封闭

使用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体进行检测时，内源性过氧化物酶活性可能会导致非特异性或高背景染色。一抗孵育前，用3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 底物孵育组织，检查内源性过氧化物酶活性。如果组织变成棕色，表明存在内源性过氧化物酶（通常在红细胞中发现），需要进行阻断步骤。过氧化氢 (H₂O₂) 是最常用的过氧化物酶封闭试剂。

碱性磷酸酶封闭

使用碱性磷酸酶 (AP) 偶联抗体进行检测时，内源性AP 会导致高背景染色。用5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐/氯化硝基四氮唑蓝 (BCIP/NBT) 孵育组织后，可检测组织中的内源性 AP。如果观察到蓝色，则表明存在内源性AP，需要进行阻断。可用的AP抑制剂包括盐酸左旋咪唑、盐酸噻咪唑等。

一抗

IHC实验的关键在于一抗的选择，因为免疫染色的成功依赖于与靶抗原特异性结合的一抗。

直接检测与间接检测

选择一抗之前，您需要考虑使用直接检测法还是间接检测法。可以用直标一抗进行检测（直接法），也可以使用带标记的二抗来检测（间接法）。

直接检测

- 适用于研究高表达的抗原
- 无需使用二抗，没有额外的孵育步骤，也消除了二抗可能带来的背景染色
- 增加了多重染色实验设计的灵活性

间接检测

- 适用于所有抗原
- 可用多种方法进行信号放大（将在以下章节讨论）
- 需要额外的阻断步骤和对照

石蜡切片、冰冻切片和漂片的免疫染色方案

www.abcam.com/IHC-protocol

选择一抗

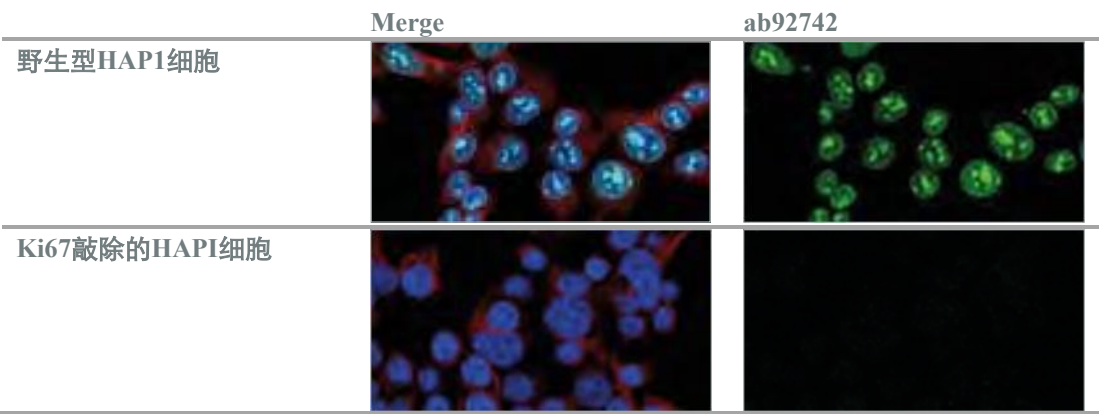
需要考虑的要点：一抗来源于什么种属？一抗是否能与目的蛋白结合？是否曾有实验证实这个一抗在该应用中有效？

抗体的特异性

抗体特异性最确凿的证明是，当组织或细胞中目的蛋白已被敲除，该抗体不会有着色。

其他指标包括有

- 信噪比：抗体可能结合正确的蛋白，但也会有一定的背景染色，因此应拒绝信噪比低的抗体
 - 如果无法进行 KO 验证，并且您仅能依靠定位来确定抗体的特异性，则信噪比尤其重要
- 染色模式与目的蛋白在阳性对照的细胞或组织中已知的定位一致
- 在已知不表达该蛋白的组织或细胞中不着色
- WB 中仅看到单一条带



在野生型细胞（上图）和Ki67敲除的HAP1细胞（下图）中进行Ki67的ICC染色。绿色代表Ki67抗体[EPR3610] (ab92742)，二抗是抗兔IgG (Alexa Fluor® 488) (ab150081)，红色代表 α -tubulin抗体(Alexa Fluor® 594) (ab195889)，蓝色代表DAPI标记的核DNA。

经IHC验证

在WB实验中能够识别靶蛋白的抗体并不一定能在IHC实验中识别抗原；抗原在IHC中很可能以天然形式（三级结构3D）存在。优先考虑能够有效应用于IHC的抗体，即在抗体说明书或文献中验证过IHC的抗体。

克隆性

抗体的克隆性取决于抗体来自不同的B细胞（多克隆抗体）还是同一个亲代克隆的相同的B细胞（单克隆抗体）。这两种抗体有各自的优点和局限性。

表 3.多抗与单抗的优点和局限性。

	多抗	单抗
优势	- 信号可能更强，因为结合靶蛋白的多个表位。 - 对抗原的微小变化（例如多态性、糖基化异质性或轻微变性）耐受性更强。 - 在更广泛的 pH 值和缓冲液组分范围内更稳定。	- 特异性检测抗原上的特定或确定表位，降低与其它蛋白的交叉反应。 - 均一性高（尤其是重组抗体），如果实验条件保持不变，单抗产生的结果可重复性更高。
局限性	- 批次间差异较大。 - 可能发生交叉反应并产生非特异性信号*。 - 在检测抗原的特异性结构域方面不及单克隆抗体有效。	- 单克隆抗体靶向的抗原表位可能无法在不同种属间共享，限制了单抗的灵活性。 - 比多抗更难耐受化学处理导致的抗原表位丧失。 - 对实验条件（即 pH 值和缓冲液组分）的变化敏感。

*抗原/表位亲和和纯化增强了多克隆抗体（作为群体）的特异性，特别是在抗原较短（如一个多肽）的情况下。

检测和信号放大系统

对于间接检测法，二抗是成功显示一抗分布的关键。

与使用直标一抗不同，使用二抗和相关检测系统能够扩增信号，因为不止一个二抗分子与单个一抗结合。

酶显色与荧光检测

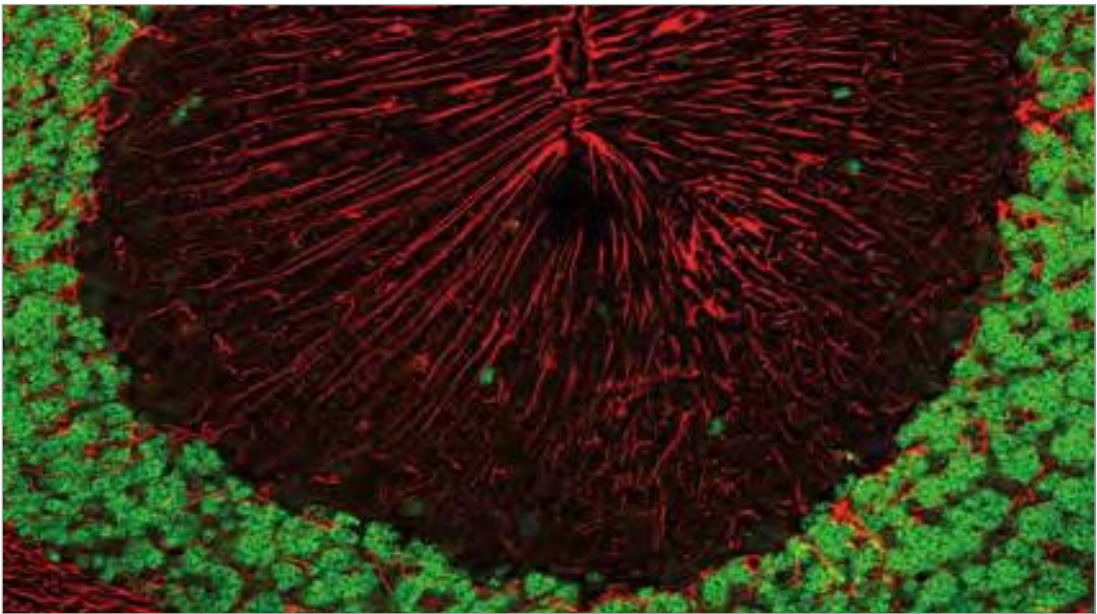
您可以选择酶显色法，使用酶标记的二抗（如HRP、AP），也可以选择荧光法（免疫荧光），使用荧光染料标记的二抗（如FITC、R-PE、Alexa-Fluor®）进行检测。

酶显色法

- 生物素化二抗和链霉亲和素-HRP能进一步放大信号。或者，您也可以使用更先进的HRP-聚合物二抗。
- 一些沉淀物具有光稳定性（HRP/DAB具有很好的光稳定性，但HRP/AEC在光照下褪色），所以切片有可能储存多年。
- 仅需要标准明场显微镜。
- 酶/显色剂沉淀物的沉积区域比荧光源光子更宽，可能影响个人解读结果的能力。
- 该过程通常耗时较长，因为它的孵育和封闭步骤比荧光方法要多 — 但是，情况并非总是如此，具体取决于您使用哪种信号放大系统。
- 由于酶的放大作用，定量一般比较困难。

荧光法

- 可在不同波长下激发多个荧光团，同时显示多个抗原（多通道检测）。
- 图像质量更好，分辨率更高。
- 用酪胺染料标记HRP抗体，可以将荧光染料沉积在抗体染色部位，从而放大信号。
- 更适合于信号定量。
- 对自发荧光敏感，特别是甲醛固定。
- 更快的实验步骤。
- 需要更昂贵的成像设备。
- 随着时间推移，荧光基团的稳定性降低。



石蜡包埋小鼠小脑组织切片中NeuN的荧光IHC图像。绿色代表NeuN抗体[EPR12763] (ab177487),二抗是山羊抗兔 IgG Alexa Fluor®488 (ab150097),红色代表GFAP抗体 (ab4674),二抗是山羊抗鸡IgY Alexa Fluor®594 (ab150176)。图片来自英国伦敦国王学院的Carl Hobbs。

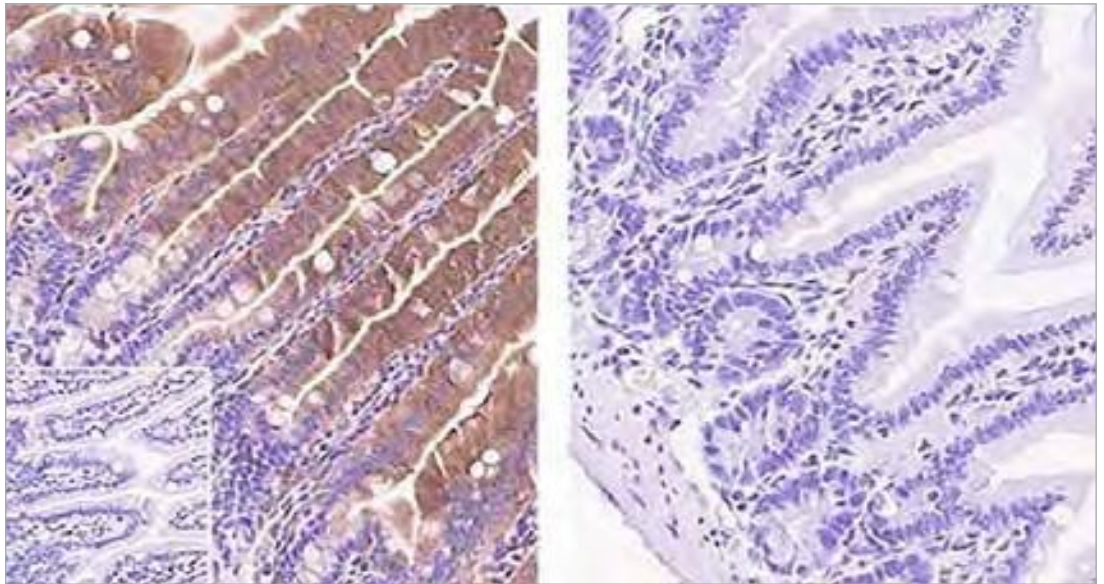
酶和显色剂

酶显色检测中需要考虑的因素还有酶和显色底物的选择。每种检测酶都有几种不同的显色剂(见表 4)。HRP-DAB是最常用的显色剂组合。

显色剂的一个优点是，您可以将其与有机封片剂一起使用，有机封片剂的折光率往往更好，获得的图像更清晰。但是，水性封片剂的使用更为方便，因为无需对切片进行脱水。

表 4.用于免疫组化的常用酶和底物/显色剂。

酶	色原/底物	颜色	封片剂	优势	不足
HRP	DAB	棕色	有机/水溶性	深色；永久	组织中内源性过氧化酶活性可能导致假阳性染色
	DAB + 镍增强剂	黑色	有机/水溶性	深色；永久	
	AEC	红色	水溶性	深色；双重染色与蓝色形成鲜明对比	
AP	BCIP/NBT	蓝色/黑色	有机	深色	组织内源性 AP 活性可能导致假阳性
	固红	红色	水溶性		
	永固红	红色	有机/水溶性		



使用GSDMD抗体[EPR20859] (ab219800)和微聚合物IHC检测试剂盒中的HRP-聚合物偶联二抗对石蜡包埋的野生型小鼠小肠组织 (A) 和GSDMD KO小鼠小肠组织 (B) 进行IHC染色。组织样本由北京生命科学研究所 (NIBS) Feng Shao博士友情提供。

检测和信号放大资源

www.abcam.com/IHC-detection-kits
www.abcam.com/secondary-antibodies
www.abcam.com/chromogen-kits

多色IHC

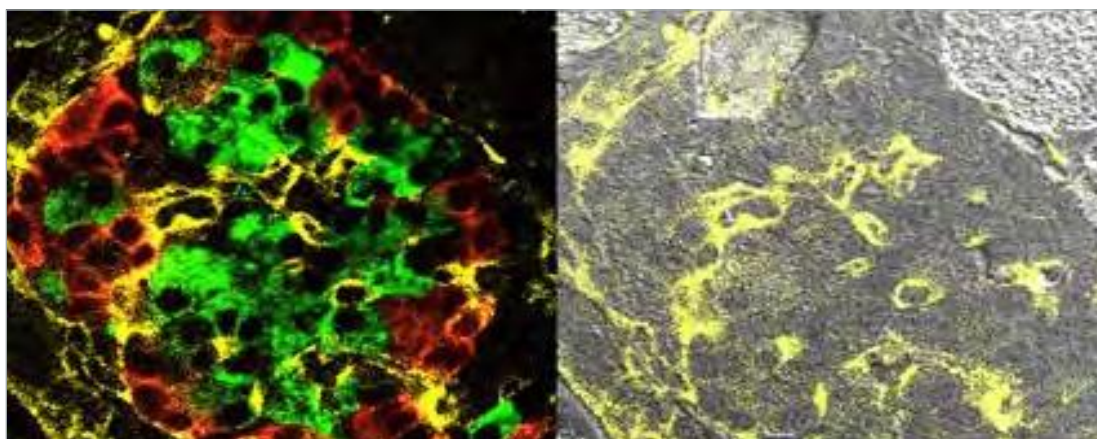
使用多色免疫组化 (mIHC) 可在单个组织切片中对多种标记物进行免疫染色。

传统的酶显色mIHC要求使用不同种属或不同种型的抗体。之后需要使用特异性二抗，并且每种标志物使用不同的显色剂。但是，很难在切片上区分两种以上的显色剂，尤其是在显色剂光谱重叠的时候。

荧光mIHC可以轻松检测三种或者更多的标志物。荧光mIHC可以使用荧光直标一抗，但是由于荧光二抗具有信号放大效果，同时直标一抗存在局限性，所以荧光mIHC中更常使用荧光二抗。受限于可用的荧光滤光片配置，以及对不同种属来源的一抗或者非同种型一抗的需求，大多数荧光mIHC只能检测三种标志物（加一种复染）。

增加标志物数量的常用方法是：a) 使用光谱分离显微镜，区分更多的荧光染料；和b) 使用酪胺信号放大系统和其抗体分步剥离染色法。还有其他方法例如质谱成像。

mIHC可以通过一个组织切片生成大量数据，从而有效减少所需的组织量，并且有利于更好地理解不同标记物之间的关系。



使用IV型胶原（黄色）、胰岛素（绿色）和胰高血糖素（红色）一抗以及Cy2、Cy5和Texas red标记二抗对小鼠新生胰腺进行多色荧光IHC染色。图像由Miller K et al. PLoS One 4(11): e7739提供。

多色 IHC 资源

www.abcam.com/alexa-fluor-secondary-antibodies
www.abcam.com/dye-conjugated-primary-antibodies

复染

对特定形态或结构进行复染，有助于抗的定位。

进行IHC检测时，使用复染可以让您判定抗体显色位置与组织内细胞结构之间的关系。

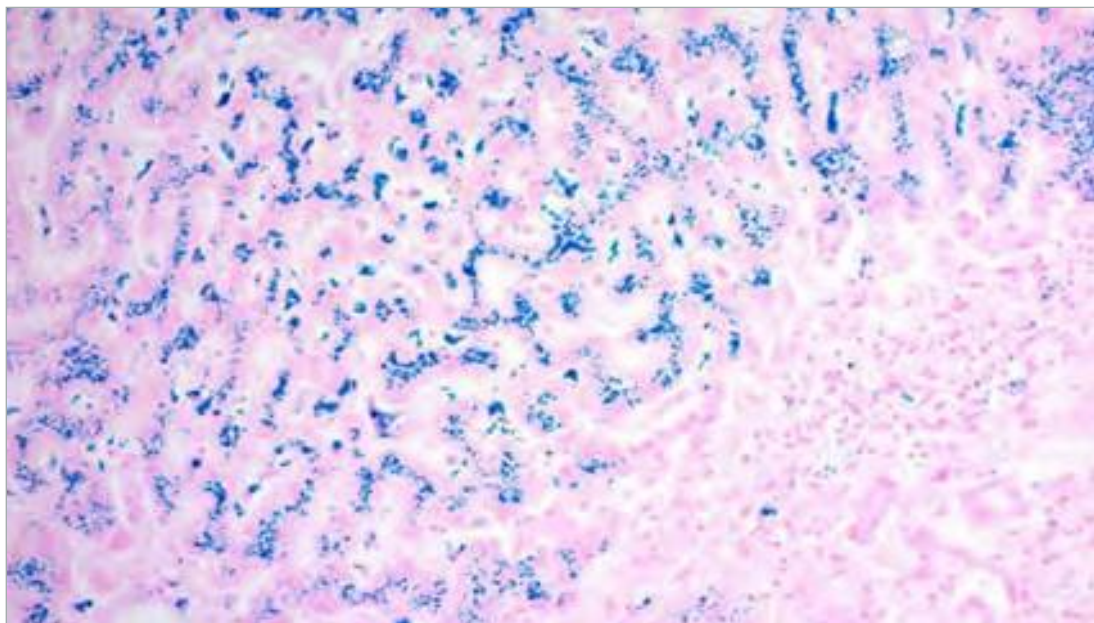
IHC显色法最常用的复染剂是苏木精，它可以将细胞核染成蓝色，与HRP-DAB的棕色形成对比。苏木精需要用弱碱性溶液返蓝（大多数地区使用自来水即可，但是仍需进行预实验确定）。

在荧光IHC中，最常用的复染剂是蓝色核染料DAPI。

在这两种情况下，一定要选择一种与您的染色系统兼容并且不会干扰报告标签信号的复染剂。

表 5.常用复染剂及其靶标。

类型	染料	靶标	颜色
显色法	苏木精	细胞核	蓝色至紫色
显色法	核固红（Kernechtrot）	核酸	红色
显色法	甲基绿	核酸	绿色
荧光法	DRAQ5™	核酸	红色
荧光法	DRAQ7™	核酸	红色
荧光法	核黄（Hoechst S769121）	核酸	黄色/蓝色
荧光法	核绿 DCS1	核酸	绿色
荧光法	Hoechst 染色	核酸	蓝色
荧光法	DAPI	核酸	蓝色
荧光法	碘化丙啶	核酸	红色



化学染色剂，如上图中使用的铁染色试剂盒 (ab150674) (蓝色：铁染色；粉红色：核固红) 也可用于识别组织的特异性特征，有时也用于复染。

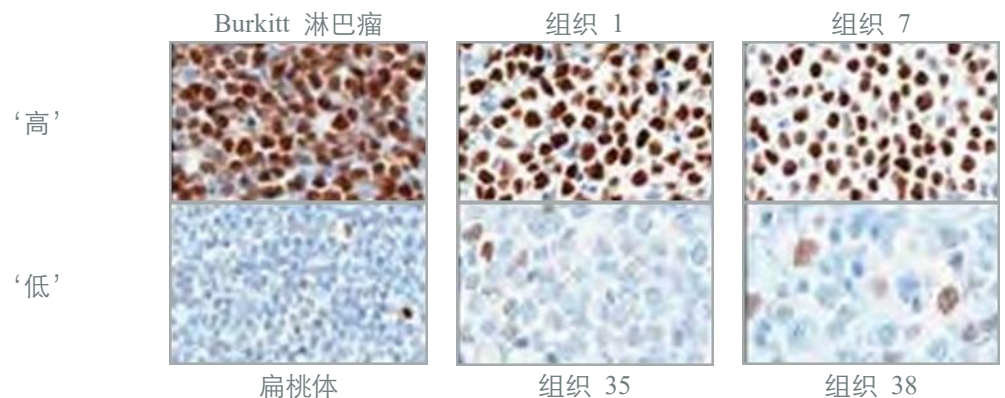
IHC的对照

您可通过使用适当的对照来确认染色模式的有效性，并排除假阳性或假阴性。

您应纳入几种不同的阳性和阴性对照，并保留详细的实验记录，以确保效能一致。

抗原（组织）对照

- **阳性对照**：已知表达靶抗原的组织切片。
- **阴性对照**：已知不表达靶抗原的组织切片。
- **内源性组织背景对照**：未使用一抗的组织切片。某些组织的固有特性可能导致背景染色，影响结果分析。比如某些组织有内源性荧光分子，可能会与荧光 IHC 过程中的阳性染色混淆。应使用显微镜检查组织，确保没有内源性背景。



Kluk MJ等人使用c-Myc抗体[Y69](ab32072) 对特定的肿瘤和反应性组织进行 IHC 染色。PLoS One (2012) 7(4): e33813。确认MYC易位的Burkitt淋巴瘤为阳性对照（高值），阴性对照（低值）为健康扁桃体。

试剂对照

- **无一抗对照**：组织单独与抗体稀释液孵育，不与一抗孵育，然后与二抗和检测试剂孵育。
- **同型对照**：用与一抗浓度相同的同型对照抗体孵育组织，然后用二抗和检测试剂孵育。此对照可验证所观察到的染色并非由抗体与组织的非特异性相互作用引起。
- **阳性试剂对照**：用已知有效的抗体和染色系统（包括抗原修复）孵育组织。此对照可以确保实验方法和试剂符合预期。

IHC实验疑难解答

下面是您在IHC实验过程中可能遇到的一些常见问题，其可能的原因和解决方法。

无染色

一抗和二抗不兼容。

- 使用抗一抗种属来源的二抗（例如，如果一抗是兔来源的，则使用抗兔的二抗）。确认二抗是否识别一抗的亚型。

没有足够的一抗与目的蛋白结合。

- 使用更高浓度的抗体。
- 4°C下长时间孵育（如过夜孵育）。

抗体可能不适用于IHC，因为其可能无法识别蛋白的天然（3D）形式。

- 查看抗体使用说明书，确认抗体是否经过IHC验证以及验证的IHC类型（福尔马林或PFA固定、冰冻切片等）。在ICC或IP中成功使用抗体也能说明抗体可以识别天然形式的蛋白。
- 在天然（非变性）WB中检测抗体，以确保其仍然有效。

一抗/二抗/信号放大试剂盒可能因储存不当、稀释不当或多次反复冻融而失去活性。

- 设置阳性对照，以确保这些试剂仍然有效。

该蛋白不存在于目标组织中。

- 设置文献中或抗体供应商推荐的阳性对照。

目的蛋白在组织中含量并不丰富。

- 采用信号放大步骤，将信号最大化。

二抗未避光保存（进行荧光检测时）。

- 始终避免二抗暴露于光照中。

脱蜡可能不充分。

- 延长切片的脱蜡时间，使用新配制的二甲苯。

固定步骤可能会改变抗体识别的抗原表位。

- 使用不同的抗原修复方法来暴露抗原表位（包括使用pH值为6或9的缓冲液进行热抗原修复、酶抗原修复等）。
- 缩短切片固定时间。

抗体不能穿透蛋白所定位的细胞核（核蛋白）。

- 向封闭缓冲液和抗体稀释液中加入强效通透剂（如 Triton™ X-100）。

PBS 缓冲液被细菌污染，细菌会破坏目的蛋白上的磷酸基团（磷酸化蛋白）

- 在 PBS 抗体储存缓冲液中加入 0.01% 叠氮化物或使用新配制的无菌 PBS。

透化作用破坏了膜，去除了膜蛋白（膜蛋白）。

- 使用更温和的表面活性剂（例如，使用Tween® 20 代替Triton™ X-100）。
- 从缓冲液中去除通透剂。

高背景

没有对非特异性结合进行封闭或封闭不充分。

- 延长封闭时间，并考虑更换封闭试剂。如果使用血清，我们推荐使用二抗种属的 10% 正常血清封闭1小时。或者，尝试采用商品化的封闭缓冲液，或使用样本种属免疫球蛋白预吸附的二抗。

一抗浓度可能过高。

- 测试抗体的最佳浓度，梯度稀释抗体，并在4°C下孵育。

孵育温度可能过高。

- 4°C下孵育切片。

二抗可能存在非特异性结合。

- 使用不加一抗的二抗对照。
- 如果在单独使用二抗时观察到着色，则应更换二抗，或使用样本种属免疫球蛋白预吸附的二抗。

组织洗涤不充分；仍然存在固定剂。

- 各个步骤之间，用PBS或TBS充分洗涤组织。添加表面活性剂，例如0.1% Triton。

内源性过氧化物酶具有活性。

- 使用酶抑制剂，即对 AP 使用左旋咪唑 (2 mM)，或对过氧化物酶使用 H_2O_2 (0.3% v/v)。

固定步骤导致自发荧光（如果使用荧光检测）。

- 福尔马林/PFA 通常会在绿色光谱中产生自发荧光，因此可以尝试使用红色光谱范围内的荧光基团。
- 如果有可用的红外检测系统，则使用红外范围内的荧光基团。

信号放大过多（间接检测技术）。

- 缩短信号放大试剂孵育时间，稀释二抗或信号放大试剂。

底物过多（酶检测）。

- 进一步稀释底物，或缩短底物孵育时间。

色原与组织样品中存在的PBS反应（酶检测）。

- 先使用Tris缓冲液洗涤切片，再与底物一起孵育，然后在Tris缓冲液中洗涤切片/细胞（特别注意，仅适用于AP）。

非特异性染色

一抗/二抗浓度可能过高。

- 尝试降低抗体浓度和/或缩短孵育时间。与不表达靶蛋白的组织的信号强度进行比较。

内源性过氧化物酶具有活性。

- 使用酶抑制剂，即对 AP 使用左旋咪唑(2 mM)，或对过氧化物酶使用H₂O₂(0.3% v/v)。

使用与染色组织相同种属来源的一抗（例如在小鼠组织上使用小鼠一抗）。应用二抗时，由于二抗是靶向组织种属的，与组织中的免疫球蛋白或蛋白的Fc片段结合。

- 使用种属来源与组织切片不同的一抗，或用 F(ab) 片段二抗封闭。
- 使用 Mouse on Mouse Polymer IHC Kit (ab269452)。

切片/细胞已干燥。

- 保持切片/细胞高度湿润，勿让其变干。

组织形态不清晰或受损

抗原修复方法可能过于苛刻。

- 改变抗原修复步骤或尝试不同的抗原修复方法。

组织可能未充分固定。

- 延长固定时间。
- 提高固定剂与组织的比例。
- 切割更小块的组织，进行更有效的固定（浸泡固定）。

组织切片从载玻片上脱落（冰冻切片）。

- 延长固定时间。
- 尝试更换固定剂。
- 使用新鲜制备的载玻片。

组织切片撕裂或折叠，或切片下方可见气泡。

- 使用锋利的刀片重新切片。
- 研究不受影响的组织区域。使用 PAP 笔 (ab2601) 定位试剂。

组织形态难以分辨。

- 将组织切片切的更薄。
- 冰晶可能破坏切片形态 - 重新切片，快速冷冻（冷冻切片）。

组织自溶。

- 延长固定时间。
- 增加固定剂相对于组织的比例。
- 尝试使用交联固定剂。

Alexa Fluor®是 Molecular Probes,Inc（Thermo Fisher Scientific 旗下公司）的注册商标。

DABCO®是 Air Products and Chemicals Inc.的注册商标。

Tween®是 ICI Americas,Inc.旗下业务部门 Uniqema 的注册商标。

