

IHC Checklist

使用【IHC 實驗檢查清單】時，請於確實做到的部分打 ，沒有實施的部分打 ，以便後續排查原因。

關鍵控制點	具體操作注意事項	完成?	
實驗基本訊息確認	目標蛋白質資訊確認	查尋文獻或 UniProt 確認目標蛋白質在細胞中的座落位置 (細胞核、細胞質、細胞膜、胞外)	<input type="checkbox"/>
	組織切片資訊確認	查尋文獻或 UniProt 確認目標蛋白質會在此組織表現	<input type="checkbox"/>
		查尋文獻確認切片是否需要經過特殊處理才能有效偵測得到目標蛋白質	<input type="checkbox"/>
		組織切片類型為 <input type="checkbox"/> 石蠟切片 <input type="checkbox"/> 冷凍切片 <input type="checkbox"/> 浮動切片，厚度為 _____ μm	<input type="checkbox"/>
實驗設計確認	確認已設立陽性對照 _____ 陰性對照 _____ 和不加一抗只加二抗的對照組	<input type="checkbox"/>	
	蛋白質表現量較低時，確認染色步驟中有使用到二級抗體，以達到訊號放大效果	<input type="checkbox"/>	
樣本固定	避免目標蛋白質降解	組織樣本為新鮮採集，且離開活體後有立即浸泡在樣本固定液或液態氮中	<input type="checkbox"/>
	選擇合適的樣本固定液	冷凍切片避免使用交聯試劑類固定液或縮短交聯試劑固定時間，以免後續需要抗原修復	<input type="checkbox"/>
		有機溶劑類樣本固定液不適用於跨膜蛋白質檢測	<input type="checkbox"/>
樣本固定條件	樣本固定液 <input type="checkbox"/> 交聯試劑類(如福馬林) <input type="checkbox"/> 有機溶劑類(如甲醇) 作用溫度 _____ $^{\circ}\text{C}$ 反應時間 _____	<input type="checkbox"/>	
抗原修復	選擇合適的抗原修復方法	參照抗體說明書或文獻選擇適合的抗原修復方法 冷凍切片應使用酵素/蛋白水解誘導抗原修復法 (PIER)	<input type="checkbox"/>
	抗原修復條件	<input type="checkbox"/> 使用酵素/蛋白水解誘導抗原修復法 (PIER)，酵素為 <input type="radio"/> Pepsin <input type="radio"/> Proteinase K <input type="radio"/> Trypsin 酵素濃度 _____ 作用溫度 _____ $^{\circ}\text{C}$ 反應時間 _____	<input type="checkbox"/>
		<input type="checkbox"/> 使用熱誘導抗原修復法 (HIER)，熱源為 <input type="radio"/> 高壓鍋 <input type="radio"/> 微波爐 <input type="radio"/> 水浴槽 <input type="radio"/> 其他 _____ 修復液 <input type="radio"/> pH 6 Citrate <input type="radio"/> pH 9 Tris-EDTA <input type="radio"/> 其他 _____ 作用溫度 _____ $^{\circ}\text{C}$ 反應時間 _____	<input type="checkbox"/>
阻斷	選擇合適的阻斷液	參照抗體說明書或文獻選擇適合的阻斷液	<input type="checkbox"/>
		若後續會使用 HRP 酵素呈色劑 (如 DAB)，以 0.3% H_2O_2 抑制內源性過氧化酶活性	<input type="checkbox"/>
		若後續會使用 AP 酵素呈色劑 (如 BCIP/NBT)，以 0.24 mg/ml Levamisole 抑制內源性磷酸酶活性	<input type="checkbox"/>
		使用 ABC (avidin-biotin complex) 檢測法時，以含有大量 Avidin 的阻斷液封閉內源性 Biotin	<input type="checkbox"/>
阻斷條件	使用 <input type="checkbox"/> 5%-10% 血清 <input type="checkbox"/> 5% BSA <input type="checkbox"/> 其他 _____ 作用溫度 _____ $^{\circ}\text{C}$ 反應時間 _____	<input type="checkbox"/>	
抗體反應	選擇合適的抗體	選用 IHC 實驗驗證抗體	<input type="checkbox"/>
		偵測微量蛋白質時，使用帶有微聚合物的二級抗體進行實驗	<input type="checkbox"/>
		進行多重染色時，使用預吸附二級抗體以預防高背景值問題	<input type="checkbox"/>
適當的抗體濃度	參照抗體說明書或文獻進行優化測試，一抗稀釋比例 _____，二抗稀釋比例 _____	<input type="checkbox"/>	
使用新鮮配製的抗體	抗體為新鮮配製，沒有重複使用	<input type="checkbox"/>	
呈色	酵素呈色注意事項	呈色劑為新鮮配製，並優化測試呈色劑最佳作用濃度與反應時間	<input type="checkbox"/>
	螢光染色注意事項	切片隨時保持避光，並儘快完成影像擷取	<input type="checkbox"/>
封片	以適量封片膠妥善封片	將封片膠均勻完整覆蓋所有組織區域，不可太少或過量，也注意不要產生氣泡	<input type="checkbox"/>
	選擇合適的封片膠	水溶性封片膠適用於所有類型的檢測試劑，例如 AEC, BCIP/NBT, DAB, Fast Red ...	<input type="checkbox"/>
		油性封片膠適用於 DAB 呈色劑或 H&E 染色 螢光染色應選擇螢光實驗專用的水溶性封片膠	<input type="checkbox"/>