

免疫组织化学标准操作流程 (石蜡切片——非磷酸化项目检测)

一、实验仪器及试剂

1、实验器材

微波炉、4℃冰箱、恒温恒湿箱、烘箱、光学显微镜、移液器、孵育湿盒、抗原修复盒。

2、实验试剂

① 缓冲液：0.01M pH7.2 PBS；0.01M pH7.2 PBST

试剂名称	1*PBS/L	试剂名称	1*PBST/L
NaH ₂ PO ₄	0.23g	1*PBS 溶液	1L
Na ₂ HPO ₄	1.15g	Tween 20 溶液	0.001L
NaCl	8.5g	用稀 HCl 溶液和 NaOH 溶液调 pH 值	

② 修复液（可选）：0.01M pH7.2 PBS 修复液；0.01M pH9.0 Tris-EDTA 修复液；0.01M pH6.0 柠檬酸修复液

③ 封闭液：5%空白山羊血清

④ 3%过氧化氢（需新鲜配制，30% H₂O₂ 与 dH₂O 体积比 1:9）

⑤ EnVision Systems 检测体系, HRP 显色系统：HRP RABBIT/MOUSE 及配套 DAB 显色液；

⑥ 脱蜡液、无水乙醇（分析纯）、去离子水（dH₂O）、Mayer's 苏木素、中性树胶封片剂。

二、实验步骤

1. 水化/脱蜡：

(1) 烤片：将石蜡切片按同一朝向放置在切片架上，将其放入 55℃ 的恒温箱中烤片 30 分钟；同时将脱蜡液 1 缸一起放入 55℃ 的恒温箱中；

(2) 脱蜡至水：将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液 1 缸中,再一起从恒温箱中取出置于常温，5 分钟后，将切片取出浸入到常温脱蜡液 2 缸中，并按照脱蜡液 2、脱蜡液 3、无水乙醇 1、无水乙醇 2、无水乙醇 3 的顺序依次将石蜡切片放入缸中，每缸 5 分钟；用流水清洗切片 5 分钟。

注意：流水清洗时水流不能直接对着切片；操作过程中需一直保持切片处于湿润状态。

2. 灭活：

将切片完全浸入到 3%双氧水溶液中，室温，孵育 10 分钟；完成后流水清洗 5 分钟。

注意：内源性酶含量高的组织，可以延长灭活时间至 15-20 分钟；双氧水需新鲜配制，可提前 5-10 分钟配制 3%的双氧水。

3. 抗原修复：

将切片浸入盛有修复液（一般情况下用 0.01M pH7.2 PBS 修复液）的修复盒中，将抗原修复盒盖斜盖在修复盒上；整体放入微波炉中，高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；再高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；随后中低火加热 1 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟，然后将切片连同抗原修复盒拿出缓慢冷却至室温。

注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开微波炉门；修复完成后不可快速冷却；修复液可根据实验需求自行换用 0.01M pH9.0 Tris-EDTA 修复液或 0.01M pH6.0 柠檬酸修复液。

4. 染色：

- (1) 封闭：待修复液温度降至室温后，从修复盒中取出切片；用缓冲液 PBS 清洗切片 2 次，每次 3 分钟；去除切片上的缓冲液；在组织切片上滴加 5%空白山羊血清封闭液；将切片水平放置在底部呈有水的孵育湿盒中，于 37℃恒温孵育 30 分钟；
- (2) 一抗孵育：去除封闭液，在组织切片上滴加用缓冲液 PBS 稀释的一抗，水平放置于孵育湿盒中，于 4℃孵育过夜；
- (3) 复温：将孵育湿盒取出室温复温 15-30 分钟，去除抗体工作液，用缓冲液 PBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；
- (4) 二抗孵育：在组织切片上滴加二抗工作液后水平放置于孵育湿盒中，于 37℃恒温孵育 1h；
- (5) 去除切片上的溶液，用缓冲液 PBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；
- (6) 显色：显色前 5 分钟，配置 DAB 显色工作液，C 液:B 液体积比 1:100，充分混匀；在组织切片上滴加显色工作液，显微镜下密切观察颜色变化情况，通常 10-60 秒即可得到合适的染色强度；将切片浸入大量 dH₂O 中即可终止显色；
- (7) 复染、返蓝：将切片浸入 Mayer's 苏木素中复染切片，用流水清洗 10 分钟。

注意：染色过程中需一直保持切片处于湿润状态；染色过程中所有试剂使用过程中均需保证完全覆盖切片上组织。

5. 脱水、封片：

- (1) 脱水：将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡 1 次，10 秒；高温（55℃-60℃）下完全干燥；
- (1) 封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片。