

IHC 实验标准操作流程

一、实验仪器及试剂

1、 实验仪器

仪器名称	品牌	型号
微波炉	格兰仕	P70D20TL-D4
高压锅	苏泊尔	YW183FA1
电磁炉	美的	C22-Star201
4℃展示柜	澳柯玛	SC-187 (NE)
恒温恒湿箱	武汉瑞华仪器	DHP600
普通光学显微镜	尼康	E200

孵育湿盒、移液器、烘箱、阻水笔、抗原修复盒等。

2、 实验试剂

2.1 缓冲液：0.01M PBS pH7.2±0.2；0.01M pH7.2 PBST

试剂名称	1*PBS/L	试剂名称	1*PBST/L
KH ₂ PO ₄	0.07g	1*PBS 溶液	1L
Na ₂ HPO ₄	0.45g	Tween 20 溶液	0.001L
NaCl	7.89g		
KCl	0.10g	用稀 HCl 溶液和 2M NaOH 溶液调 pH 值	

2.2 抗原修复液：

① pH6.0 0.01M 柠檬酸修复液（1L）：

C₆H₈O₇·H₂O 0.4g；NaC₆H₅O₇·2H₂O 3g；pH6.0；

② pH7.0 0.01M PBS 修复液（1L）：

KH₂PO₄ 0.07g；NaCl 7.89g；Na₂HPO₄ 0.45g；KCl 0.10g；pH7.2-7.4；

③ pH8.0 0.05M Tris-EDTA 修复液（1L）：

C₄H₁₁NO₃ 6.05g；C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O 0.29g；用稀 HCl 调至 pH8.0；

④ pH9.0 0.01M Tris-EDTA 修复液（1L）：

C₄H₁₁NO₃ 1.21g；C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O 0.37g；pH9.0。

2.3 封闭液：5%空白山羊血清

2.4 抗体稀释液：1X PBS / 5% 正常血清 / 0.3% Triton™ X-100

2.5 3%过氧化氢（需新鲜配制，30% H₂O₂ 与 dH₂O 体积比 1:9）

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

2.7 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

1.1 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;

1.2 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. 内源性过氧化物酶灭活

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

3.1 微波热修复: 将切片浸入盛有修复液的修复盒中, 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。待修复液温度降至室温后, 用缓冲液 PBS 洗涤 3 次, 每次 1min。

3.2 高压热修复: 在高压锅中, 加入抗原修复液, 高火预热; 待修复液沸腾后将切片置于其中, 并完全浸泡组织, 盖好锅盖, 扣上压力阀, 高火继续加热; 待限压阀开始转动喷气后调至中火, 同时开始计时 2 分钟; 计时结束后离开热源, 自然降压后将高压锅移入冷水中缓慢冷却。待修复液温度降至室温后, 用缓冲液 PBS 洗涤 3 次, 每次 1min。

注意:

① 修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开仪器或中断运行程序；修复完成后不可快速冷却。

② 初次检测优先使用 pH6.0 柠檬酸修复液高压热修复的修复方式；对于初次检测结果显示为阴性结果，若 WB 检测结果有条带，排除样本问题，细胞核和细胞膜定位选择 pH8.0 Tris-EDTA 修复液高压热修复的修复方式；细胞质定位的选择 pH7.0 PBS 修复液的旧微波热修复的修复方式；混合定位的按主要定位选择相应的次要修复方式，分别进行复检时的抗原修复。

4. 染色：

4.1 封闭：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，于常温孵育 20 分钟；

4.2 一抗孵育：去除封闭液，在组织切片上滴加用抗体稀释液工作液稀释的一抗，水平放置于孵育湿盒中，于 4℃孵育过夜（也可 37℃，孵育 2 小时）；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；

4.3 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；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 3 分钟；用蒸馏水洗涤 2 次，每次 3 分钟；

4.4 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液工作液，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；切片入流水清洗 10 分钟；

4.5 复染、返蓝：将稍沥干的切片浸入 Mayer's 苏木素中复染切片，用流水清洗 10 分钟。

注意：染色过程 4.1-4.4 步骤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；流水清洗时需避免流水直接对着组织，或水流过大，会造成切片掉片。

5. 脱水、封片、镜检：

5.1 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；

5.2 封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片。

5.3 普通光学显微镜下观察实验结果。