

## IHC-P 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、实验试剂

- (1) 缓冲液：0.01M PBS pH7.2±0.2; 0.01M pH7.2 PBST;
- (2) 修复液（可选）：  
pH6.0 0.01M 柠檬酸修复液（1L）：1.9mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>•H<sub>2</sub>O, 10mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O, pH 6.0;  
pH9.0 0.01M Tris-EDTA 修复液（1L）：10mM C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, 1.0 mM C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>•2H<sub>2</sub>O, pH 9.0。
- (3) 3%过氧化氢（需新鲜配制，30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 dH<sub>2</sub>O 体积比 1:9）；
- (4) 抗体稀释液：1X PBS + 5% 正常山羊血清 + 0.3% Triton™ X-100;
- (5) EnVision Systems 检测体系, HRP 显色系统：HRP RABBIT/MOUSE 及配套 DAB 显色液;
- (6) 环保脱蜡液、无水乙醇（分析纯）、去离子水（dH<sub>2</sub>O）、苏木素、中性树胶封片剂。

### 二、实验步骤

#### 1. 脱蜡、水化：

（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、95%乙醇、85%乙醇的顺序依次将石蜡切片放入缸中，脱蜡液每缸 5 分钟，乙醇每缸 3 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 5 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 10-15 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（可选）：

（1）方法一，低 pH 值高压热修复：在高压锅中，加入 pH6.0 柠檬酸抗原修复液，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 3.5 分钟；计时结束后离开热源，自来水冲洗（约 15s），安全阀降落后开盖，待修复液温度降至室温后，用缓冲液 PBST 洗涤 3 次，每次 1min。

（2）方法二，高 pH 值高压热修复：在高压锅中，加入 pH9.0 EDTA 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，自来水冲洗（约 15s），安全阀降落后开盖，待修复液温度降至室温后，用缓冲液 PBST 洗涤 3 次，每次 1min。

注意：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；修复液可根据实验需求自行选用修复液；修复时间可根据组织前处理状态适当调整。

### 4. 染色：

（1）擦干组织周围水分，用免疫组化疏水笔在组织周围划圈，PBST 洗涤 2 次，每次 1min。

（2）一抗孵育：甩干组织周围水分，在组织切片上滴加已稀释的一抗，水平放置于孵育湿盒中，于室温（25℃）孵育 1.5 小时；

（3）洗涤：去除抗体工作液，用缓冲液 PBST 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

（4）二抗孵育：甩干组织周围水分，在组织切片上滴加二抗工作液，水平放置于孵育湿盒中，于室温（25℃）孵育 30 分钟；

（5）洗涤：去除切片上的二抗工作液，用缓冲液 PBST 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，DAB 底物：DAB 缓冲液 体积比 1:20，充分混匀；在组织切片上滴加显色工作液，室温（25℃）孵育 8 分钟；

（7）洗涤：将切片浸入大量 dH<sub>2</sub>O 中即可终止显色，流水冲洗 2 分钟；

（8）复染：将切片浸入苏木素中浸泡 3 分钟，再用流水清洗 2 分钟；

（9）返蓝：将切片浸入温热（约 50℃）pH9.0 EDTA 修复液中浸泡 2min，再用流水清洗 2 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；不同二抗及检测系统敏感性不同，因此对应一抗最佳稀释比可能会有差异；不同厂家苏木素复染程序略有不同。

#### **5. 脱水、透明、封片：**

（1）脱水：将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡 2 次，每次 1 分钟；高温（55℃-60℃）下完全干燥；

（2）封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片。

#### **6. 信号检测：**

在显微镜下观察和捕捉染色切片的图像。