



## 石蜡切片免疫组化实验步骤

### 一、脱蜡和水化

1. 将切片依次浸入二甲苯 I 10 min, 二甲苯 II (10 min)。
2. 再次浸入无水乙醇 I (5 min) - 无水乙醇 II (5 min) -95% 酒精 (5 min) -80% 酒精 (5 min) -70% 酒精 (5 min), 然后去离子水冲洗 2 次, 每次 2 min。

### 二、抗原修复 ( 可选 )

3. 将组织切片放入修复盒, 然后加入适量 0.01M 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 或 EDTA 修复液 (pH 9.0), 液面要浸没组织。
4. 微波中档修复 10 min (液体沸腾时开始计时), 此过程中勿使组织干片。
5. 将修复盒从微波炉中拿出, 自然冷却降温, 当修复液降至室温后取出玻片, PBS (pH 7.4) 冲洗 3 遍, 每次 3 min (冲洗过程中切勿对着组织冲洗, 以免弄破组织)。

### 三、灭活

6. 将配制好的 3% 的过氧化氢 (去离子水稀释 30% 过氧化氢) 滴加于切片组织上以阻断内源性过氧化物酶, 室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。

### 四、抗体孵育

7. 吸水纸吸干 PBS, 在玻片上滴加 5% 的正常血清 (与二抗种属来源一致或相似), 37°C 封闭 30 min。
8. 用吸水纸擦干玻片组织周围的液体, 用油性笔在组织周围画圈, 然后滴加稀释好的一抗, 如果做阴性对照实验, 就在对照组的组织上滴加 PBS。加完一抗后于 4°C 湿盒中孵育过夜。(抗体的最佳稀释比应预先通过实验确定, 时间控制在 15h 以上)。
9. PBS 冲洗切片 3 次, 每次 3 min, 吸水纸擦干切片后滴加辣根过氧化物酶标记二抗, 37°C 孵育 30 min。

### 五、信号检测

10. PBS 冲洗切片 4 次, 每次 3 min, 甩去 PBS 液体后吸水纸擦干切片, 每张切片滴加新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下观察, 阳性信号为棕黄色或棕褐色, 时间要控制好, 切勿显色过深。用自来水冲洗切片终止显色。
11. Harris 苏木素复染, 一般 30s-1 min 左右, 水洗后用 1% 的盐酸酒精分化, 再用自来水冲洗返蓝。(染核, 可选)

### 六、脱水固定封片

12. 将切片置于水中冲洗后, 将切片依次放入: 70% 酒精 -80% 酒精 -90% 酒精 -95% 酒精 - 无水乙醇 I - 无水乙醇 II - 二甲苯 I - 二甲苯 II 中脱水透明, 每个试剂中放置 2 min, 最后在通风橱中风干切片。
13. 将中性树胶滴在组织旁边, 再用盖玻片盖上。先放平一侧, 然后轻轻放下另一侧, 以免产生气泡, 封好的切片平躺置于通风橱中晾干。
14. 晾干的切片可以在显微镜下观察或采集图像。