



免疫组化试剂盒实验操作步骤

仪器、设备

移液器、免疫组化笔、微波炉或高压锅、计时器、孵育湿盒、染色架、盖玻片、光学显微镜、洗瓶等。

溶液配制

PBS 溶液配制；EDTA 组织抗原修复液及 DAB 显色液使用详见本说明书操作步骤。

实验温度

15-28°C

实验步骤

1. 脱蜡水化

- 1) 石蜡切片置于新鲜的二甲苯中，浸泡 15 min ×2 次；
- 2) 去除多余的液体后，置无水乙醇中，浸泡 3 min ×2 次；
- 3) 去除多余的液体后，置 95% 乙醇中，浸泡 3 min；
- 4) 去除多余的液体后，置 85% 乙醇中，浸泡 3 min；
- 5) 自来水冲洗 1 min；
- 6) PBS 溶液冲洗 3 min ×3 次。

2. 加热 EDTA 抗原修复液（试剂 1，采用微波进行抗原修复）

- 1) 将脱蜡水化后的组织切片置于烧杯（或修复盒）中的耐高温塑料切片架上；
- 2) 加适量的修复液 1× EDTA 抗原修复液，（溶液 1，用纯净水稀释 20 倍后）于烧杯中，液面要浸过切片组织一定高度；
- 3) 微波炉先用高档加热使液体沸腾，当加热至沸腾时调到中档，此时开始计时，修复时间一般为 20 min，此过程中勿使组织干片（修复液要足量）；
- 4) 将烧杯从微波炉中拿出，放入冷水中冷却降温；
- 5) 当修复液降至室温后取出玻片，用 PBS (PH7.4) 冲洗 3 min ×3 次。

注意：

- 1) 抗原修复时，修复液务必保证切片始终浸泡在液体内部，一般情况：修复液的量为 800 mL/1 架 -1500 mL/3 架；
- 2) 取出玻片，用 PBS 冲洗，切勿对着组织冲洗，以免弄破组织。

3. 阻断内源性过氧化物酶

- 1) 用吸水纸擦干玻片，免疫组画笔在组织周围画圈；
- 2) 将 3% 的过氧化氢（试剂 2），滴加 100 μL 到切片组织上以阻断内源性过氧化物酶，室温孵育 15 min；
- 3) PBS 冲洗 3 min ×3 次。



4. 封闭

用吸水纸擦干玻片，滴加正常山羊血清（试剂 3），室温封闭 15 min，以减少非特异性染色。

5. 一抗孵育

- 1) 用吸水纸擦干玻片组织周围的液体；
- 2) 滴加单克隆抗体（试剂 4）100 μL ，如果做阴性对照实验，就在对照组的组织上滴加 PBS 作为阴性对照，置于湿盒中室温孵育 1h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

6. 复温

- 1) 样本 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜从冰箱拿出后需在室温下孵育 15 min 复温（抗体孵育为 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜选用此步骤，如室温孵育直接进入下一步清洗）；
- 2) PBS 冲洗 3 min \times 3 次。

7. 加聚合物辅助剂（试剂 5）

- 1) 吸水纸擦干切片后滴加试剂 5（Polymer Helper），室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min；
- 2) PBS 冲洗 3 min \times 3 次。

8. 二抗孵育

- 1) 吸水纸擦干切片后滴加试剂 6（Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG），室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min；
- 2) PBS 冲洗 3 min \times 4 次。

9. 显色

- 1) 甩去 PBS 液，吸水纸擦干切片；
- 2) 每张切片滴加新鲜配制的 DAB 显色液 100 μL （试剂 7：试剂 8=1:49 比例配置），孵育 3-5 min，光学显微镜下观察染色结果，切勿显色过深；
- 3) 显色后用自来水冲洗切片终止显色。

10. 复染

加 100 μL 的苏木素（试剂 9）复染，孵育 30 s-1 min 左右，自来水冲洗 5 min。

注意：

依据作用的苏木素染色液强度和孵育时间长短，对比染色结果导致细胞核呈现淡蓝到深蓝颜色的反应，而过染或者不足都可能影响正确结果的判断。

- 1) 将切片放入 70% 酒精，浸泡 2 min；



11. 脱水、透明、封片

- 1) 将切片放入 70% 酒精，浸泡 2 min；
- 2) 将切片放入 80% 酒精，浸泡 2 min；
- 3) 将切片放入 90% 酒精，浸泡 2 min；
- 4) 将切片放入 95% 酒精，浸泡 2 min；
- 5) 将切片放入无水乙醇，浸泡 2 min × 2 次；
- 6) 将切片放入二甲苯，浸泡 2 min × 2 次；
- 7) 通风橱中风干切片；
- 8) 滴加中性树胶，盖玻片封片。

结果判断：

1. 免疫组化检测结果需在光学显微镜下对染色后的切片进行观察并判断。

- 1) 免疫组化染色结果必须建立在组织阳性对照、试剂阴性对照试验成立的基础上，染色结果的判读：阳性 (+) / 阴性 (—)。
- 2) 阴性染色结果是组织内预期细胞中未见棕黄色着色。

注意：在每一次染色过程中，必须使用阳性对照样本和空白对照试验，否则结果不可采用。

2. 组织阳性对照和试剂阴性对照试验成立的基础上，受检组织切片中出现阳性染色表示组织切片上存有目标抗原。
3. 组织阳性对照和试剂阴性对照试验成立的基础上，受检组织切片中未出现阳性染色表示组织切片上存有目标抗原的可能性低。
4. 如果组织阳性对照和试剂阴性对照试验均为阴性结果，表明试剂失效或试验操作错误，应重新实验。