

石蜡切片免疫组化步骤（新手必读）

实验共分两天来做效果最佳

第一天

1、脱水

(1)、65℃烤箱干烤 30min。（具体时间视切片大小多少可调整，一般不要超过 1h，否则容易脱片）

(2)、二甲苯 I 中 15min，之后二甲苯 II 中 15min。

(3)、在无水乙醇 I，无水乙醇 II，95%酒精，80%酒精，70%酒精中分别浸泡各 5min。（2、3 这两步都是跑缸的，实验室应该有专门的缸，直接放里面就行了）

(4)、双蒸水浸泡 5min

2、微波修复抗原：将切片浸入 pH6.0，0.01M 枸橼酸修复液中（配制方法见步骤末尾），电炉或微波炉加热至 92 至 98℃，持续 15min（注意不要煮沸）。冷却后（不能人工降温，不能在冷却前将切片从热水中取出）进行下一步。

对于这一步，首先配制好抗原修复液（根据你的抗原在胞质还是胞核表达而不同，胞质的选用枸橼酸修复液，胞核的选用 EDTA 修复，EDTA 在此暂不做详细说明），接着将双蒸水中浸泡后的切片放入修复液中，拿至微波炉加热修复，在此我仅述我们的修复过程以供参考。

修复液盒子外面另外放一盛水的盒子，防止修复液沸腾蒸发，首先高火烤 8 分钟（具体时间视切片多少调整），发现修复液沸腾后立刻停止，如果未沸腾再继续延长烤时间，结束后等待 1min，接着中火烤 1min30s，停 1 分钟，再中火烤 1min30s，停 1 分钟，如此循环共计 30 分钟，结束后将整个装有抗原修复液和切片的盒子摆到阴凉处自然晾干，晾干后再进行下一步。

3、室温下 PBS 洗涤 5min×3 次。（切片全部浸泡在玻璃缸中加入 PBS 液放入摇床，5min 后取出倾去液体，重新加 PBS，如此洗涤 3 次）

4、3%双氧水室温孵育 15min，以消除内源性过氧化物酶的活性。

5、室温下 PBS 洗涤 5min×3 次。（见第 3 步说明）

6、封闭：滴加正常羊血清封闭液（A 试剂），37℃ 孵育 30min（具体时间长短视情况而定，时间太长可能导致特异性抗体也被封闭，做不出结果来）。甩去多余的液体，不冲洗。

7、滴加适当稀释的一抗（抗体用 PBS 稀释，具体稀释浓度见抗体说明书，一般刚开始做的时候多试验几个浓度，如 1:50, 1:100, 1:150 等，以寻找出效果最好的抗体稀释浓度），4℃ 过夜，我们一般是将切片摆到底下盛有水的湿盒中放入 4℃ 冰箱过夜。（举例 1:100 稀释方法：99 μL 的 PBS 中加入 1 μL 的抗体。）

第二天

8、取出昨天过夜的湿盒，37 度复温 30min，PBST 冲洗 5min×3 次。

9、滴加生物素标记山羊抗小鼠/兔 IgG（B 试剂），37 °C 孵育 30 min。

10、PBST 冲洗 5min×3 次。

11、滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液（C 试剂），37 °C 孵育 30 min。

12、PBST 冲洗，5min×3 次。

13、DAB 显色：滴加显色液，室温显色，镜下控制反应时间，一般在 3 至 10min 之间。反应至显微镜下可见棕褐色颗粒为止，蒸馏水终止反应，并用蒸馏水洗涤。显色前先准备好双蒸水，切片从显微镜上拿下来后直接入水中。

14、苏木素复染。4min 后流水冲洗。（苏木素复染时间一般 3min 即可，视具体情况而定）

15、分化：1%盐酸酒精（实验室有专门的缸，不用自备）中浸泡，之后流水冲洗。

（分化时间一般为 1-2s，即将切片迅速浸入盐酸酒精中后迅速提起）

16、蓝化：氨水中浸泡 30s~1min，之后流水冲洗。我们的蓝化直接是将切片浸入水中浸泡 10min 就可以了。

17、脱水：分别在 70%酒精、80%酒精、95%酒精、无水乙醇 I，无水乙醇 II 各

3min。(这些实验室有专门的缸,不用自备)

18、透明:二甲苯 I,二甲苯 II 中浸泡各 10min,晾干。(同上)

19、中性树脂封片,显微镜观察。(封片可干封也可湿封,湿封即浸泡完二甲苯 II 之后不晾干,切片从二甲苯中捞出后迅速滴加树脂盖上盖玻片)

各种液体配制方法:

抗原修复液中涉及到的液体:

A 液——枸橼酸(柠檬酸) 5.2525g+双蒸水 250ML (易长毛,长毛后需重配)

B 液——枸橼酸钠(柠檬酸钠) 14.705g+双蒸水 500ML

抗原修复液——A 液 4.5ML+B 液 20.5ML+双蒸水 225ML

3%双氧水——90ML 双蒸水+30%双氧水 10ML

PBS——磷酸氢二钠 14.5g+氯化钠 40g+□□1g+磷酸二氢钾 1g+双蒸水 5L

PBST——PBS 2L+ (Tween-20) 1ML

DAB 显色剂(配制时请关灯避光)——1ML 双蒸馏水加入 DAB 显色试剂盒中的 A 液一滴后混匀,再加入 B 液、C 液各一滴混匀即刻,避光保存,30min 内使用。