

免疫组化操作规程

（一）仪器设备

(1) 18cm 不锈钢高压锅和电炉；(2) 医用微波炉；(3) 水浴箱；(4) 冰箱 (-18℃-4℃)；(5) 湿盒；(6) 耐高温塑料切片架；(7) 可调微量移液器；(8) 定时器；(9) pH 计。

（二）试剂

(1) PBS(磷酸盐缓冲液, pH7.2~7.4): NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na₂HPO₄ 4.3mmol/L, KH₂PO₄ 1.4mmol/L。

(2) 柠檬酸盐缓冲液 (CB, pH6.0, 0.01mol/L, 1000ml 配制):
柠檬酸三钠 3g, 柠檬酸 0.4g。

(3) 酶消化液: a、0.1%胰蛋白酶液: 用 0.1%CaCl₂(pH7.8) 配制; b、0.4%胃蛋白酶液: 用 0.1N 的 HCl 配制。

（三）操作流程

1 脱蜡和水化

脱蜡前, 将组织芯片放在 60℃恒温箱中烘烤 30 分钟。

- (1) 置于二甲苯 I 中浸泡 10 分钟, 在二甲苯 II 中再浸泡 10 分钟;
- (2) 无水乙醇 I 中浸泡 5 分钟, 在无水乙醇 II 中再浸泡 5 分钟;
- (3) 95%乙醇中浸泡 5 分钟;
- (4) 85%乙醇中浸泡 5 分钟;
- (5) 70%乙醇中浸泡 5 分钟;
- (6) 蒸馏水中浸泡 5 分钟。

2 抗原修复

用于福尔马林固定的石蜡包埋组织芯片。

(1) 抗原热修复

A 高温高压热修复： 取一定量的 0.01M 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 于压力锅中。大火加热至沸腾；将脱蜡水化后的组织芯片置于耐高温塑料切片架上，放入已沸腾的缓冲液中。盖上锅盖，扣上压力阀，继续加热至喷气，从喷气开始计时，1-2 分钟后，压力锅离开热源，冷却至室温，取出玻片，先用蒸馏水洗两次后用 PBS 洗 5 分钟。

B 微波热修复： 取一定量的 0.01M 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 于微波盒中，微波加热至沸腾；将脱蜡水化后的组织芯片置于耐高温塑料切片架上，放入已沸腾的缓冲液中，中高档继续处理 10-15 分钟；取出微波盒冷却至室温，取出玻片，先用蒸馏水洗两次后用 PBS 洗 5 分钟。

C 酶消化方法： 常用 0.1% 胰蛋白酶和 0.4% 胃蛋白酶液。胰蛋白酶使用前预热至 37℃，切片也预热至 37℃，消化时间约为 5~30 分钟；胃蛋白酶消化 37℃ 时间为 10-30 分钟。

3 免疫组织化学染色

SP 法

(1) 脱蜡、水化；

(2) 蒸馏水中 5 分钟；

(3) 用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H₂O₂，室温封闭 10 分钟，

蒸馏水洗 1 次；

- (4) 抗原修复;
- (5) PBS 洗 5 分钟;
- (6) 滴加正常山羊血清封闭液,室温 10 分钟;
- (7) 甩去多余液体,滴加 I 抗, 37℃1 小时或者 4℃过夜 (4℃过夜后在 37℃复温 45 分钟);
- (8) PBS 洗 2 次各 5 分钟;
- (9) 滴加生物素化 II 抗; (孵育条件参见所用试剂盒)
- (10) PBS 洗 2 次各 5 分钟;
- (11) 滴加酶标抗体; (孵育条件参见所用试剂盒)
- (12) PBS 洗 2 次各 5 分钟;
- (13) DAB 显色 5~10 分钟, 在显微镜下掌握染色程度;
- (14) 蒸馏水洗终止染色, 苏木素复染、盐酸酒精分化;
- (15) 脱水、透明、封片、镜检。

SABC 法

- (1) 脱蜡、水化;
- (2) 蒸馏水中 5 分钟;
- (3) 用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 , 室温封闭 5~10 分钟, 蒸馏水洗 1 次;
- (4) 抗原修复;
- (5) PBS 洗 5 分钟;
- (6) 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 10-20 分钟。甩去多余液体;

(7) 滴加 I 抗,37℃1 小时或者 4℃过夜; (4℃过夜后在 37℃复温 30 分钟)

(8) PBS 洗 2 次每次 5 分钟;

(9) 滴加生物素化二抗; (孵育条件参见所用试剂盒)

(10) PBC 洗 2 次每次 5 分钟;

(11) 滴加试剂 SABC; (孵育条件参见所用试剂盒)

(12) PBS 洗 2 次每次 5 分钟;

(13) DAB 显色: DAB 显色试剂盒或者自配显色剂显色; (镜下掌握显色程度)

(14) 蒸馏水洗终止染色, 苏木素复染、盐酸酒精分化;

(15) 脱水、透明、封片、镜检。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn