

免疫组织化学 (IHC)

溶液和试剂配制

1. PBS缓冲液：用PBS粉末和ddH₂O配成。室温保存。
2. PBST缓冲液：按1 mL Tween-20/1L PBS缓冲液的比例，向PBS缓冲液中加入Tween-20，搅拌混匀配成。室温保存。
3. 柠檬酸缓冲液：取0.1M柠檬酸溶液54 mL和0.1M 柠檬酸钠溶液46 mL，加ddH₂O至1L，pH调至6.0。室温保存。
4. 封闭液：即10%山羊血清溶液。按1 mL山羊血清/9 mL PBS缓冲液的比例，将山羊血清和PBS缓冲液混匀配成。-20℃存储。

实验操作流程

A. 烤片：

将石蜡组织切片于65℃烤3 h，以去除水分，增强组织粘附性，防止脱片。

B. 脱蜡复水：

- 1、将烤完的切片快速放进第一道二甲苯溶液中浸泡10 min。
- 2、将切片放进第二道二甲苯溶液中浸泡10 min。
- 3、将切片放进无水乙醇中浸泡5 min。
- 4、将切片放进85%乙醇中浸泡5 min。
- 5、将切片放进70%乙醇中浸泡5 min。
- 6、将切片放在流水中冲洗，直至切片表面由雾蒙蒙的变为清亮。操作时避免水流直接冲洗组织，应让水流从切片侧片经过，以防组织破损。
- 7、用PBS洗涤切片3次，每次5min。

C. 抗原修复：

- 1、将柠檬酸缓冲液在高压锅中加热直至高压锅均匀出汽，视为加热足够。
- 2、将切片放进滚烫的柠檬酸缓冲液中加热，待高压锅均匀出汽后，继续加热2min，以修复组织抗原。
- 3、待高压锅自然放汽，取出装有切片的罐子，冷水给罐身缓慢降温，避免快速降温导致组织脱片。

D. 消除内源性过氧化物酶：

- 1、将切片置于3%的过氧化氢溶液中浸泡10min，以消除组织中的内源性过氧化物。
- 2、用PBS洗涤切片3次，每次5min。

E. 封闭：

- 1、用免疫组化笔对组织画圈。画圈后立即滴加PBST溶液，防止组织变干。
- 2、甩干PBST溶液，向组织上滴加封闭液，每张图片加100-300 μL，室温封闭1h。

F. 一抗孵育：

- 1、用封闭液配制一抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站）。



- 2、甩去封闭液，向组织上滴加一抗稀释液，4℃孵育过夜，或室温孵育2-3h。
- 3、用PBS洗涤3次，每次5 min (若在4℃孵育，应在孵育完成后先将切片置于室温复温40 min，再洗涤，以避免组织脱落)。

G.二抗孵育：

- 1、将能识别一抗种属的HRP偶联二抗工作液提前从4℃取出，恢复至室温。
- 2、将二抗滴加到组织上，室温孵育30 min。
- 3、用PBS洗涤3次，每次5 min。

H.显色：

配制DAB工作液，滴加100-300 μL到组织上，显色1-3 min。DAB显色时，应持续观察切片颜色，当组织呈现棕黄色并颜色深度适中时，立即将切片放进纯水中，以终止显色。

I.苏木素染色：

- 1、将切片放进苏木素染液中染色，不同苏木素所需染色时间在数秒至数分钟之间，建议先染几秒，再根据染色效果调整时间。
- 2、染色后迅速将切片放在流水下冲洗，以去除残余染料(避免水流直接冲洗组织)。

J.脱水透明：

- 1、将切片放进70%乙醇中浸泡3 min。
- 2、将切片放进85%乙醇中浸泡3 min。
- 3、将切片放进无水乙醇中浸泡3 min。
- 4、将切片放进第一道二甲苯溶液中浸泡2min。
- 5、将切片放进第二道二甲苯溶液中浸泡2min。

K.封片：

- 1、待切片表面水渍晾干，向组织上滴加中性树胶以封片(操作时避免产生气泡)。
- 2、显微镜下观察组织染色，并拍照记录实验结果。

实验注意事项

1. 在用二甲苯对组织脱蜡时，浸泡时间需根据室温和二甲苯的新旧程度而调整。室温越高，二甲苯越新，浸泡时间越短。操作时以组织上无石蜡残留为准。
2. 常用的抗原修复方法包括柠檬酸热修复法、EDTA热修复法和蛋白酶修复法。柠檬酸法修复后组织背景较干净，但对于部分核抗原可能修复不充分，导致免疫信号弱或无信号，此时可选用EDTA修复法。但EDTA法强修复有时也可能导致组织背景染色增加。对于细胞外基质丰富、固定时间过长、交联程度高的组织，以及其他对热修复不敏感的组织，还可以选用酶消化修复法。具体操作时，应根据抗原性质、组织固定情况和抗体特性来选择最合适的抗原修复方法。
3. 对于内源性过氧化物酶含量高的组织，可以适当延长3%过氧化氢的孵育时间，或增加过氧化氢溶液的浓度。

实验相关产品推荐

1. 抗体网站：<https://www.targetmol.cn/all-antibodies>
2. Tween 20, T9526

