

免疫组化操作步骤（石蜡切片）—三步法

A. 所需溶液和试剂

1. 磷酸盐缓冲液 (C01-01001): 0.1M 1X PBS (PH7.4)
2. 固定液: 4%多聚甲醛溶液 (无甲醇) (C01-06002)
3. 抗体稀释液(C-0007): 1% BSA, 0.03% Proclin300 的 0.1M PBS
4. 抗原修复液 (C02-02001): 柠檬酸钠缓冲液
5. SP 免疫组化检测试剂盒(兔) (SP-0023)
6. DAB kit (20×) (C02-04001):二氨基联苯胺/DAB 染色试剂盒
7. 中性树胶封片剂(C02-05001)

B. 操作步骤

1. 60℃烤片 2 小时
2. 脱蜡。二甲苯脱蜡 15 分钟，三次
3. 水化。依次经过无水乙醇、95%、90%、80%、70%，各 5 分钟，蒸馏水（或自来水）5 分钟
4. PBS（洗液 C01-01001）洗 5 分钟，三次
5. 抗原修复。枸橼酸缓冲液（修复液，C02-02001）（约 92-95℃）煮沸（沸水浴）修复 15 分钟，自然凉至室温。PBS 洗 5 分钟，三次
6. 3%双氧水（包含在 SP-0023 中）封闭 20 分钟，PBS 洗 5 分钟，三次
7. 正常山羊血清（包含在 SP-0023 中）封闭，37℃ 20 分钟
8. 一抗孵育，4℃过夜。（抗体稀释液 C-0007）
9. 复温 20 分钟，PBS 洗 5 分钟，三次
10. 二抗孵育，37℃ 20 分钟（二抗为生物素标记的羊抗兔 IgG，包含在 SP-0023 中），PBS 洗 5 分钟，三次
11. 三抗孵育，37℃ 20 分钟（三抗为辣根酶标记的链酶亲和素，包含在 SP-0023

- 中), PBS 洗 5 分钟, 三次
12. DAB (显色剂 C02-04001) 显色, 镜下观察结果, 适时终止
 13. 苏木素复染 5 分钟, 自来水冲洗片刻, 1%的盐酸酒精 (75%) 溶液分化 30 秒, 自来水冲洗 5 分钟蓝化
 14. 脱水。依次经过 70%、80%、90%、95%、无水乙醇, 各 5 分钟, 二甲苯 15 分钟, 三次
 15. 封片, 中性树胶 (C02-05001) 封片
 16. 图像分析软件 3DHISTECH Pannoramic SCAN 数字扫描