免疫组化 (IHC) 实验方案——石蜡切片

*本方案为通用方案，仅供参考

免疫组织化学（IHC）是基于抗原 - 抗体特异性结合，对组织切片中靶蛋白进行定性、定位与半定量的核心技术，广泛用于病理诊断与基础研究。根据组织类型，主要分为石蜡切片和冰冻切片。

● 实验方案

标本固定：将新鲜组织切成小块（1.5 cm × 1.5 cm × 0.3 cm左右），固定于4%多聚甲醛(或福尔马林)过夜，一般固定时间不超过48h。

目的：
①防止标本从玻片上脱落；
②除去防碍抗原-抗体结合的类脂，使抗原抗体结合物易于获得良好的染色结果；
③固定的标本易于保存。
固定剂的选择一般用4%多聚甲醛，但睾丸组织、眼组织可能要选用Bouin's液或mDF液效果较好。

脱水、石蜡包埋和制片：

脱水：为了减少组织材料的急剧收缩，按照低浓度到高浓度递增的顺序进行，经70%、85%、95%直至纯酒精(无水乙醇)，每次时间为1小时，充分脱水。固定后的组织材料需除去留在组织内的固定液及其结晶沉淀，否则会影响后期的染色效果。

透明：样本在透明剂浸渍过程称透明，常用的透明剂是二甲苯，二甲苯是石蜡的溶剂。纯酒精不能与石蜡相溶，还需用能与酒精和石蜡相溶的溶剂，替换出组织内的酒精，将脱水后的组织块移入二甲苯中，透明20min左右，组织呈半透明状即可，切勿过度透明，会变脆易碎。

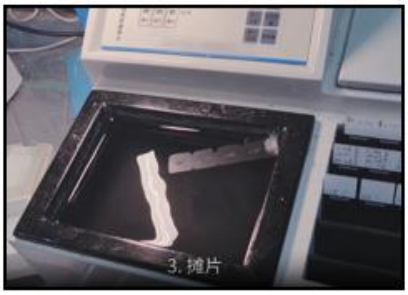
浸蜡：先把组织材料块放在熔化的石蜡和二甲苯的等量混合液浸渍1h。先后移入2个熔化的石蜡液中浸渍1小时左右。

包埋：以少许热蜡液将其底部迅速贴附于包埋盒内上，然后置于速冻台，让石蜡固定。

切片：切片刀的锐利与否、蜡块硬度是否适当都直接影响切片质量，可将蜡块至于冷水中改变蜡块硬度。通常切片厚度为3-5um，用毛笔轻托轻放在37 度水浴中展片。

贴片：一般使用恒温水浴锅，温度控制在37-40℃左右，有利于石蜡切片的展开。

切片



摊片

烤片：切片上组织充分展开后捞片，后置入60℃烘箱内进行烤片（烤片时间视组织类型而定，一般组织30min即可，骨组织等要延长时间至1h），之后便可以进行脱蜡。

脱蜡、水化：按照二甲苯（5min）——二甲苯（5min）——二甲苯（5min）——100%乙醇（5min）——100%乙醇（5min）——95%乙醇（3min）——85%乙醇（3min）——75%乙醇（3min）——去离子水（5min)。若脱蜡和水化不全易出现局灶性反应和浸洗不全而产生非特异性背景着色。

抗原修复：将脱蜡好的切片置入抗原修复液（根据一抗说明书要求选择用柠檬酸钠或者EDTA），在高压锅内进行高温抗原修复，高压锅加热至饱压，然后继续加热5min，关闭电

源，10min后取出染色盒，室温冷却30min；或者微波修复抗原，将脱蜡水合后的玻片置于修复杯中，用抗原修复液1×工作液浸没，将修复杯置于微波炉内高火煮沸。低火维持15min（注意补液，防止蒸发过度导致干片）。取出室温自然冷却至室温。

> 由于组织中部分抗原在甲醛或多聚甲醛固定过程中，发生蛋白之间交联和醛基的封闭作用，从而失去抗原性；通过抗原修复，使得细胞内抗原决定族重新暴露，提高抗原阳性检出率。常用的修复方法从强到弱一般分为高压修复、微波修复、胰酶修复三种。

细胞通透（染胞浆胞核指标需要）：石蜡切片4um左右可以不通透，因为细胞已经被切开了，对于>10um的厚切片，用0.1%左右的Triton X-100，通透5-10min，目的是使抗体能够充分地进入胞内进行结合反应。

灭活内源性过氧化物酶和生物素：将组织切片画上阻水圈，置入PBST中清洗3次，每次3分钟，每切片加100μL（用量以浸没样本区域为准，可灵活调节） 3% H2O2，室温下孵育10min，PBST浸洗3min×3次，目的是去除内源性的过氧化物酶。

血清封闭：每张切片加100μL（用量以浸没样本区域为准，可灵活调节）5%山羊血清封闭液，室温孵育30min，除去封闭液。目的是对非特异性蛋白进行结合，起到封闭作用，减少非特异染色。

抗体孵育：100ul一抗室温保湿孵育1h或4度过夜，PBST浸洗3min，洗3次；倒掉PBST加100ul二抗，孵育30min-1h，PBST浸洗3min，洗3次。

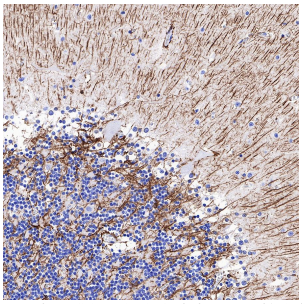
> 切片清洗（浸洗、冲洗和漂洗）注意：
> ①单独冲洗，防止交叉反应造成污染。
> ②温柔冲洗，防止切片的脱落，一般用浸洗方式；
> ③冲洗的时间要足够，才能彻底洗去结合的物质。

DAB显色：加100ul DAB显色液，显色5min，用自来水终止显色反应背景的深浅和特异性染色的深浅均可以由DAB孵育条件决定。DAB显色时间不是固定的，主要由显微镜下控制显色时间，到出现特异性染色较强而本底着色较浅时即可冲洗；

> DAB显色时间很短（如几秒或几十秒）就出现很深的棕褐色，这很可能说明你的抗体浓度过高或抗体孵育时间过长，需要下调抗体浓度或缩短你的抗体孵育时间；
> 此外，若很短时间就出现背景很深，还有可能你前面的封闭非特异性蛋白不全，需要延长封闭时间；
> DAB显色时间很长（如超过十几分钟）才出现阳性染色，一方面可能说明你的抗体浓度过低或孵育时间过短（最好一抗4度过夜）另一方面就是封闭时间过长。

复染：苏木素复染3min（肿瘤只需要1min）,流水振洗，1%盐酸酒精中分化1s，自来水稍洗，自来水反蓝5min（或2%氨水蓝化1-2s）,目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位，经常用苏木素复染（胞核染料）。

脱水、透明、封片：为了长期保存，我们一般用中性树胶等封片，避免产生气泡，方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液，然后盖上盖玻片，封片完毕60℃烘烤20min。



GFAP在石蜡包埋的人小脑中显示阳性染色