

# IHC - Protocol

组织固定：在脱蜡之前，将切片 70°C 恒温箱中烘烤 60min。

1、石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 10min-二甲苯 II 10min-无水乙醇 5min-95%酒精 5min-85%酒精 5min-70%酒精 5min-PBS 浸泡 5min,清洗 3 次。

2、抗原修复：组织插在染色架上，置于盛满柠檬酸缓冲液(pH=6.0)的高压锅内，(要使修复液淹没切片)，等开始喷气时计时 2min，断电，然后将高压锅移至冷水下冲至室温，取出切片，自然冷却，PBS 洗 5min×3 次。

3、阻断内源性过氧化物酶：切片放入 0.3%过氧化氢甲醇溶液 (0.5mL3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+4.5mL 甲醇)，处理 15 min，PBS 洗 5min×3 次。

4、加一抗：切片稍甩干后，在圈内滴加用 3%BSA 按一定比例稀释好的一抗 (1 : 50-200) 覆盖组织。切片平放于湿盒内 37°C 孵育 1.5h，PBS 洗 5min×3 次。

5、加二抗：切片稍甩干后在圈内滴加二抗 (1:500-1:2000 稀释)，室温孵育 1h，PBS 洗 5min×5 次。

6、DAB 显色：切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。

7、复染细胞核：放入苏木素复染 3-5min，自来水洗。

8、分化：放入分化液 (75%乙醇 100mL+1mL 浓盐酸)，几秒后立刻取出，自来水冲洗。

9、脱水封片：将切片依次放入 70%酒精 5min-85%酒精 5min -95%酒精 5min -无水乙醇 5min -二甲苯Ⅱ10min -二甲苯 I 10min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树脂封片。

10、观察或拍照：显微镜下观察或拍照。