

免疫组织化学-石蜡切片操作步骤



1. 组织取样

1. 材料必须新鲜，组织取样动作要迅速轻柔，避免自溶和撕扯带来的机械损伤，同时要尽量避免化学损伤和热损伤。避免组织风干，若不能立刻进行固定，先使用生理盐水浸润过的纱布包裹组织。
2. 尽量缩短取材到固定的时间，建议控制在1小时内。穿刺或切除后的实体肿瘤（如乳腺癌组织）应在1小时内进行固定，消化系统肿瘤（如胃癌样本）要求在30分钟内固定。
3. 如果实验允许，同时取阳性和阴性组织对照。阳性对照组织可以验证IHC实验流程的有

效性和排除假阴性，阴性对照组织可以检查是否存在非特异性结合和去除假阳性。

2. 固定

1. 使用锋利的刀、剪切取组织块，组织块的厚度约为 0.2-0.3cm，大小 1.5cm×1.5cm×0.3cm 为宜。若不能立刻进行固定，先使用生理盐水浸润过的纱布包裹组织。
2. 取好的组织（1 小时内），放入含 10 倍体积的 4%PFA，室温固定 18-24 小时。
3. 组织固定后，流水冲洗数小时或过夜。使用含苦味酸固定液固定的需用酒精多次浸洗。使用酒精或酒精混合液固定的组织，可不洗涤。
4. 采用梯度乙醇脱水，即从较低浓度乙醇开始，逐渐替换到无水乙醇。从 30%或 50%乙醇开始，依次经 70%、80%、95%乙醇进行脱水，各 1-2 小时；再放入无水乙醇 I、无水乙醇 II 脱水，各 30 分钟-1 小时。如不能及时进行各级脱水，组织可以放在 70%酒精中保存。脱水过程必须彻底。
5. 无水乙醇和二甲苯等量混合液浸渍 15-30 分钟，再放入二甲苯 I、二甲苯 II 浸渍，各 15 分钟（至透明为止）。透明剂的浸渍时间根据组织块大小及组织部位进行调整。

3. 浸蜡与包埋

1. 二甲苯和石蜡等量混合液浸泡 1-2 小时，再放入石蜡 I、石蜡 II 浸蜡，各 1-2 小时。浸蜡应在高于石蜡（56-58℃）熔点 3℃的恒温箱（60℃）中进行，以利于石蜡浸入组织内。
2. 根据组织大小和厚度，选择合适的包埋底模，揭开包埋盒上盖，在底模中加入少量熔化的石蜡，将样本放置在底模上，与底模接触的面即为切面。
3. 底模转移到冷冻台，将样本固定，用镊子轻轻按压样本，保证切面处于同一平面，注意居中包埋。
4. 放置组织包埋盒，继续加蜡，观察包埋盒下方是否有气泡，若有气泡，可将包埋盒掀起排出气泡。
5. 在冷冻台上冷冻数分钟脱模，将包埋盒四周多余的蜡刮干净即可。包埋后的蜡块应质地均匀、无气泡，组织位于蜡块中心且距边缘>2mm。

4. 切片

1. 包埋好的蜡块，夹在切片机的夹物台上，调整切片厚度为 10-20um 进行粗修，粗修时可以用旧刀片。
2. 经过粗修后的蜡块置于冰盘或冰箱内冷冻 30 分钟左右，蜡块温度不宜过低。
3. 切片前更换新的刀片，冷冻好的蜡块开始进行切片，调整切片厚度为 3-5μm。
4. 先缓慢转动切片机，使蜡块慢慢接近刀座，快切到蜡块时，再快速转动切片机，直到带出蜡带。摇转速度不可太急，通常以 40-50r/min 为宜。
5. 切成的蜡带到 20-30cm 长时，用毛笔轻轻将蜡带挑起，在凉水中展开，小镊子轻轻地将连在一起的切片分开。
6. 打开水浴锅，使水温维持在 40-45℃。
7. 用洁净的载玻片将分开的切片捞起，放至水浴锅中，使之充分展开。

8. 另取洁净的载玻片，快速捞起展开的切片，使其位于切片 1/3 处，另一端（磨边，粗糙的一端）磨面上标记或贴上标签，放于切片架上。
将切片置于烤片机或 65℃烘箱内烤片 1-2 小时。

5. 脱蜡水化

1. 将切片依次置于二甲苯 I、二甲苯 II 中浸泡，每次 20 分钟。以溶解和去除切片上的石蜡。也可以根据脱蜡情况，适当调整脱蜡时间。
2. 将切片依次置于无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇、80% 乙醇和 70% 乙醇中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
3. 在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。

6. 抗原修复

1. 柠檬酸盐（PH6.0）修复液：将切片浸入 1×柠檬酸盐修复液，再放入微波炉中加热直至沸腾，继续保持亚沸腾温度（95-98℃）10 分钟，在实验台上冷却切片 30 分钟。
2. Tris-EDTA（PH9.0）修复液：将切片浸入 Tris-EDTA（PH9.0）修复液中，再放入微波炉中加热至沸腾，继续保持亚沸腾温度（95-98℃）18 分钟，在实验台上冷却切片 30 分钟。
3. EDTA（PH8.0）修复液：将切片浸入 1×EDTA 修复液，再放入微波炉中加热直至沸腾；继续保持亚沸腾温度（95° -98° ）15 分钟。无需冷却。
4. 胃蛋白酶：37° C 消化 10 分钟。

7. 封闭

1. 先用免疫组化笔在切片上画圈，不要碰到或太靠近组织。
2. 用洗涤缓冲液 TBS 冲洗切片 2 次，持续 5 分钟。画圈后及时冲洗，避免干片。
3. 甩干，滴加 3 % 过氧化氢，室温孵育 10 分钟（荧光检测可跳过此步）。
4. 用洗涤缓冲液 TBS 溶液冲洗 3 次，每次 5 分钟。。
5. 在每个切片上滴加 100-400 μl 封闭液（含 10%正常血清及 1%BSA 的 TBS 溶液），室温封闭 1-2 小时。如果用荧光抗体检测，封闭液可换成含 10%正常血清+1%BSA+0.3M 甘氨酸的 TBS 溶液。
6. 甩干，除去切片上的液体（请勿冲洗），然后使用纸巾擦拭玻片周围（注意不要干片）。

8. 一抗孵育

1. 进行初次实验时，根据抗体说明书选择合适的抗体稀释比，用适当的抗体稀释液（用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释）稀释一抗。
2. 取 100-400 μl 稀释好的一抗，均匀滴加在封闭好的切片上，放入湿盒，室温孵育 1 小时或 4℃孵育过夜。

9. 二抗孵育

1. 根据抗体说明书选择合适的稀释比，用适当的抗体稀释液（用含 1% BSA 的 TBS 溶液稀释）稀释 HRP 二抗。
2. 取出切片，将切片放入洗涤缓冲液 TBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。
3. 甩干、擦净，取 100-400 μ l 稀释好的二抗，均匀滴加在切片上，放入湿盒，室温孵育 1 小时（荧光二抗需避光）。

10. 染色

1. 将切片在洗涤缓冲液 TBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡。（如荧光检测，需避光，即可进行核复染）
2. 甩干，配制 DAB 染色工作液，A 液和 B 液按 20: 1 体积比混匀。滴加 50-100 μ l 完全覆盖切片组织（根据组织大小调整用量），孵育 3-10 分钟，显色时间不固定。
3. 镜下观察，控制显色时间，观察到出现特异性染色，即可用去离子水冲洗，终止显色。

11. 复染和封片

11.1. 酶显色染色复染步骤

1. 甩干、擦净，将切片置于苏木素染色液中，室温孵育 2-5 分钟，用去离子水将其从切片上清洗干净。
2. 将切片置于分化液 1-2 秒，用去离子水清洗切片 2 分钟。
3. 将切片置于返蓝液中 2-5 分钟，至样本呈蓝色。如果染色过浅可重复染色，如果染色过深可使用盐酸进行分化。
4. 取出切片，在去离子水中清洗切片 2 次，每次 5 分钟。
5. 脱水：切片依次置于 70% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中，各浸泡 1 次，每次 5 分钟。然后将切片分别置于二甲苯 I、二甲苯 II 中各浸泡 1 次，每次 5 分钟。
6. 从二甲苯中取出切片，室温晾干后，用中性树胶封片，显微镜下镜检。

11.2. 荧光染色复染步骤

1. 在切片上滴加 50-100 μ l 的 DAPI-TBS，放于湿盒中室温孵育 5-10 分钟（避光）。
2. 将切片在 TBS 中漂洗 2 次，每次 5 分钟，并轻轻震荡（避光）。
3. 向盖玻片上滴加一滴水性封片剂，确定样品在盖玻片和载玻片之间。
4. 用指甲油密封盖玻片防止变干，并移至荧光显微镜下观察。