

Immunohistochemistry (IHC)

标准操作规程 (SOP)

● 规格: 5 IHC Tests/试剂盒 或 10 IHC Tests/试剂盒

● 效期: 见试剂盒标签

试剂盒组分

Components	Quantity/ 5 Tests	Quantity/ 10 Tests	Storage Temp.
抗原修复液	60 mL	120 mL	2~8°C
Goat anti-mouse IgG, (HRP-conjugated)	550 μL	1.1 mL	≤-20°C
Goat anti-rabbit IgG, (HRP-conjugated)	550 μL	1.1 mL	≤-20°C

* 备注: 以单次实验做一个抗体为例定制用量。

* 备注: 另外部分试剂和溶液需自行准备, ①可参照公开配方自行配制: TBST、TBS 等;

②自行购买或准备: 免疫组化笔、玻片、二甲苯、无水乙醇、3% 过氧化氢溶液、DAB 底物液、苏木素溶液、分化液、一抗等;

③以上自行购买物料中一抗可联系酶联生物销售咨询购买;

④试剂盒组 2 和 3 分别是酶标山羊抗小鼠二抗和酶标山羊抗兔二抗, 需要根据一抗的性质选择使用。

试剂配制

1.1X TBS (按5L配置量)

组分	用量
Tris	30.25 g
NaCl	43.8 g
去离子水4.5 L溶解; HCL调整PH至7.5	
去离子水定容至5 L	

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

2. 1X TBST (按10L配置量)

组分	用量
Tris	60.5 g
NaCl	87.6 g
去离子水	9 L
HCL调整PH至7.5	
吐温-20	20 mL
去离子水定容至10 L	

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

3. 95%乙醇、80%乙醇及70%乙醇

使用无水乙醇和去离子水, 按体积比进行混合, 混匀即可。

(例: 95 mL 无水乙醇 + 5 mL 去离子水 = 95% 乙醇)

实验操作

1、烤片：

- 将组织切片放在 70°C 烘箱中烘烤 50 min。

2、脱蜡至水：

- 取出组织切片，放入二甲苯内浸泡 5 min，然后取出切片放入下一缸二甲苯内浸泡 5 min，共重复 5 次操作。
- 取出组织切片，依次放入无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇各 2 min。
- 使用流动去离子水清洗切片至玻片上不挂水滴。

3、抗原修复：

- 将抗原修复液加热至沸腾状态，放入切片后关紧盖子至排气阀喷气出现后计时 3 min。
- 待冷却后取出切片，使用流动去离子水清洗切片。

4、灭活内源性过氧化物酶：

- 将 3% 过氧化氢溶液平衡至室温，把玻片放入 3% 过氧化氢溶液内 30 min。
- 去离子水清洗切片玻片。
- 使用免疫组化笔沿组织画圈，距组织边缘 2 mm 左右。
- 对切片进行清洗。
 1. 使用去离子水水洗两次；
 2. 1X TBST 浸泡 2 min；
 3. 1X TBS 浸泡 2 min (本项需要重复 2 次)。

5、孵育一抗：

- 待一抗平衡至室温，组织上滴加一抗，使一抗完全覆盖组织，室温孵育 60 min。
- 弃去一抗并对切片进行清洗：
 1. 使用去离子水水洗两次；
 2. 1X TBST 浸泡 2 min；
 3. 1X TBS 浸泡 2 min (本项需要重复 2 次)。

6、孵育二抗：

- 待二抗平衡至室温，组织上滴加二抗，使二抗完全覆盖组织，室温孵育 30 min。
- 弃去二抗并使用去离子水水洗：
 1. 使用去离子水洗两次；
 2. 1X TBST 浸泡 2 min；
 3. 1X TBS 浸泡 2 min (本项需要重复 2 次)。

7、将组织显色并进行复染、分化：

- 待 DAB 底物液平衡至室温，组织上滴加底物液，使底物液完全覆盖组织显色 3-5 min，进行染色。
- 将染色中的组织放入去离子水中终止显色，并清洗 5 次以上。
- 清洗后将切片放入苏木素复染 2 min。
- 使用去离子水清洗干净。
- 将切片放入分化液快速分化，放入时间为 1 s。
- 使用去离子水清洗干净。

8、脱水透明：

- 将切片依次放入 70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇，每缸浸泡 2 min。
- 将切片放入二甲苯浸泡 1 min，共重复 5 次操作。
- 将切片封片。

注意事项：

- 实验操作需要在室温环境下进行。
- 说明书提供的稀释比为参考值，客户可根据自身需求设置不同比例的稀释比以达到最佳实验结果。
- DAB 底物液需用现配。