**肿瘤研究所免疫组织化学染色手工试验步骤**

**一、脱蜡和水化**

石蜡切片烤片后置于新鲜的二甲苯中，浸泡5分钟×4次；梯度酒精100%乙醇3分钟，95%乙醇3分钟，85%乙醇3分钟，自来水冲洗1分钟。

**二、抗原修复**

配制新鲜的抗原修复液，加入不锈钢高压锅中，将不锈钢锅在电磁炉上大功率加热抗原修复液（EDTA修复液 pH9.0或枸橼酸盐修复液 pH6.0）至沸腾，将切片置于耐高温染片架上，放入已沸腾的相应修复液中，盖上锅盖，继续加热喷气后，计时2.5分钟，用自来水冲淋不锈钢锅外壁使之冷却，待锅中液体冷却至室温后取出切片，蒸馏水冲洗。

**三、阻断内源性过氧化物酶**

（1）将玻片放入内源性过氧化物酶阻断剂中，室温下孵有10分钟；

（2）PBS溶液冲洗3分钟×3次。

**四、加一抗**

（1）除去PBS溶液，滴加适量的一抗，室温下孵育60分钟；

（2）PBS溶液冲洗3分钟×3次。

**五、加酶标聚合物（二抗）**

（1）除去PBS溶液，滴加适量的相应二抗，室温下孵育15分钟：

（2）PBS溶液冲洗3分钟×3次。

**六、显色**

除去PBS溶液，滴加适量新鲜配制的DAB显色液，孵育3-5分钟，光镜观察染色结果一般不超过10钟。

**七、复染**

自来水冲洗，苏木素染色孵育10-30秒（根据苏木素实际染色能力可适当调整），自来水冲洗，盐酸酒精适当分化，流水返蓝2分钟。

**八、脱水、透明、封片**

（1）85%乙醇10秒，95%乙醇10秒，100%乙醇10秒。

（2）二甲苯透明（干封无需二甲苯透明，干燥后直接封片）

（3）中性树胶和盖玻片封片

**九、视频链接地址**

<https://mp.weixin.qq.com/s/YsFqyCOZLN2qSGCS0KvePw>

