IHC-P（石蜡切片免疫组化）步骤

一、脱蜡

1) 切片脱蜡至水：先将切片置于二甲苯中 20 min，3 次。然后依次在 100%，95%，85%和 75%乙醇浸泡，每次浸泡 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min 1 次；

(注意：脱蜡必须彻底，否则会影响抗体结合；整个水化过程中，务必保持切片湿润，切勿干燥，否则会产生严重的非特异性背景染色。)

二、抗原修复

2) 热修复抗原：将切片浸入柠檬酸修钠抗原修复液中（AWI0206），微波炉加热至沸腾后断电，低火煮 20min 后，冷却 20min 后拿出，继续冷却至室温。冷却后 0.01M PBS（pH7.2~7.6）洗涤 3 min x 3 次；

(注意：由于固定过程会掩盖抗原，需要通过加热（如微波修复、高压修复）或酶解（如胰蛋白酶）的方法暴露抗原决定簇。常用的修复液包括 pH 6.0 的柠檬酸钠抗原修复液和 pH 9.0 的 EDTA（AWI0152）缓冲液。）

3) 阻断内源性酶：将切片放入 3%双氧水，室温浸泡 10 min 以灭活内源性酶，防止内源性酶和后续的检测系统发生非特异性反应。PBS 冲洗 3 min x 3 次；

三、免疫组织化学染色

4) 封闭：取出片子，甩干，擦净水分，滴加与二抗同源的血清（如山羊血清），室温孵育 10-30min，封闭组织中带电荷的基团，以减少抗体的非特异性结合。

5) 孵育一抗：吸水纸吸去多余液体（此时注意不要干片），滴加适量稀释（通用型抗体稀释液：AWT0199）后的一抗，室温湿盒孵育 1h 或者 4℃过夜。

6) PBS 冲洗 5 min x 3 次；

7) 孵育二抗：甩干，擦净水分，滴加适量（50ul~100ul）HRP 标记的二抗（AWI0722，AWI0723）37℃孵育 30 min，PBS 冲洗 5 min x 3 次；

8) DAB 显色：甩干，擦净，滴加预制好的显色剂 DAB（AWB0175）工作液 50~100 μL，室温孵育 0.5~5 min， 镜下观察控制反应时间直至显色至预期深浅。（DAB 工作液现配现用）

9) 甩干，擦净，蒸馏水洗涤 3 次，1min/次；

10) 复染：苏木素（AWI0009）复染 5~10 min，蒸馏水冲洗，PBS 返蓝；使细胞核呈现蓝色，以便于观察目标蛋白的定位（胞核、胞浆或胞膜）。

11) 脱水，透明：各级酒精（70%，80%，95%，100%）脱水，每级浸泡 5 min。取出后置于二甲苯透明 10 min，2 次

12) 从二甲苯中取出切片，中性树胶封片、显微镜观察。