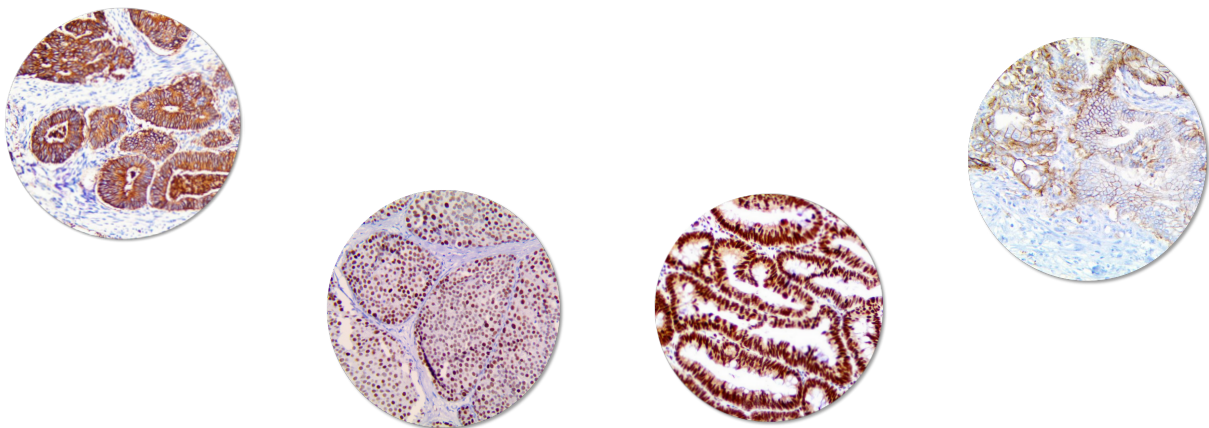
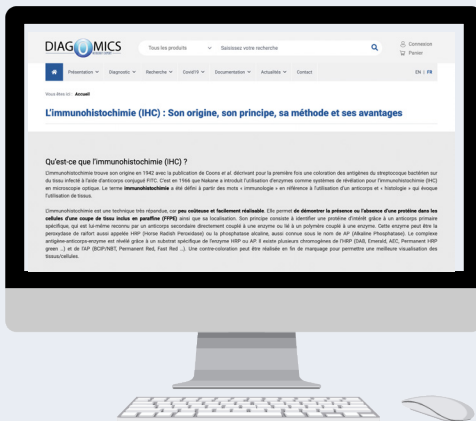


# GUIDE D'INSTRUCTION D'IHC



# Protocole de l'IHC

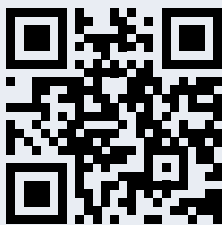
Consultez notre article sur l'IHC  
sur notre site internet  
[www.diagomics.com](http://www.diagomics.com)



## POUR PLUS D'INFORMATIONS

[info@diagomics.com](mailto:info@diagomics.com)

+33 (0)5 34 25 97 47



7 Avenue Didier Daurat -  
BP30044 - 31702 Blagnac Cedex  
[www.diagomics.com](http://www.diagomics.com)

1

Préparation

2

Chauffage et déparaffinage

3

Prétraitement

4

Anticorps primaires

5

Détection

6

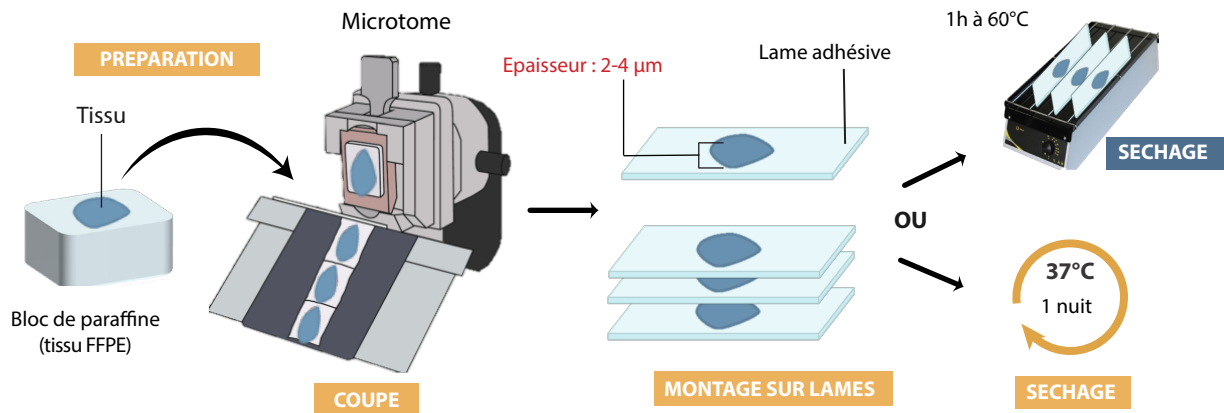
Contre-coloration

7

Montage



## PROTOCOLE : Préparation



- **Préparation du bloc de paraffine avec le tissu**, pour être par la suite coupé à l'aide d'un microtome (épaisseur de 2-4 µm) et monté sur des lames adhésives;
- **Séchage** pendant une nuit à 37°C ou pendant 1 heure à 60°C;
- **Préparation d'une série d'alcools décroissants** sous une hotte d'extraction;
- Solutions préparées au moins 1 fois/ semaine (par exemple après 200 sections);  
L'éthanol dénaturé (≥ 99,8%) ou alternativement l'isopropanol est dilué avec de l'eau déminéralisée 96:4 pour 96%, 80:20 pour 80% et 70:30 pour 70%.

**Remarque** : La hotte doit être mise en marche dès l'ouverture des couvercles des cuvettes contenant le xylène ou l'éthanol.



## PROTOCOLE : Chauffage et déparaffinage

Cette étape de déparaffinage sur les tissus montés sur les lames sert à **enlever la paraffine**, elle sera suivie par un **blocage des peroxydases endogènes** afin de réduire les colorations de fond non spécifiques.

- 1** **Chauffez la lame** sur une plaque chauffante (10 min à 60°C) ou dans un incubateur (1h30 ou 2h30 à 58°C).
- 2** Plongez la lame dans du **xylène** (par exemple 3x10 min sous la hotte).
- 3** Plongez la lame dans une **série d'alcools décroissants** (sous la hotte par exemple 3 x 100% d'alcool pendant 2 min et 1 x 96%, 80% et 70%).
- 4** Placez la **lame dans du H2O2 à 3% ou dans du bloquant de peroxyde** (par exemple 1 x 10 min sous la hotte).

## PROTOCOLE : Prétraitement

Cette étape sert à **démasquer les épitopes**, elle est réalisée conformément aux informations figurant dans la fiche technique/ le mode d'emploi de l'anticorps. Dans le cas de PIER (étape 5b), l'application d'une **bordure hydrophobe** peut être effectuée à l'aide du stylo PAP avant le chauffage et dans le cas de HIER (étape 5a) après ce dernier.

### 5a HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) :

Placez la lame dans le **tampon de prétraitement** dans la **Pressure cooker (BioSB)**; vous pouvez également préchauffer un bain marie ou un cuiseur à vapeur avec le tampon de prétraitement et placez la lame dans le tampon chaud (environ 96°C) pendant 30 à 40 min, puis laissez refroidir pendant 10 min.



### 5b PIER (Protease Induced Epitope Retrieval) :

Déposez l'enzyme sur l'ensemble des sections, selon la taille de la section 3 à 4 gouttes suffiront, soit 150-200 µL et **incubez la lame** dans une chambre humide (5 min, RT).

A noter : Parmi les anticorps que nous commercialisons, trois d'entre eux fonctionnent mieux avec la digestion enzymatique : EGFR, Neuroblastome et Collagène IV (BioSB).

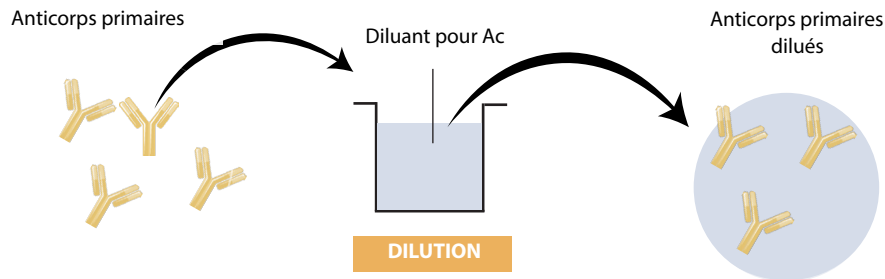
**6** Rincez la lame avec de l'eau du robinet (au moins 2 min).

**7** Placez la lame dans un **tampon de lavage** (par défaut : tampon de lavage TRIS).



## PROTOCOLE : Anticorps primaires

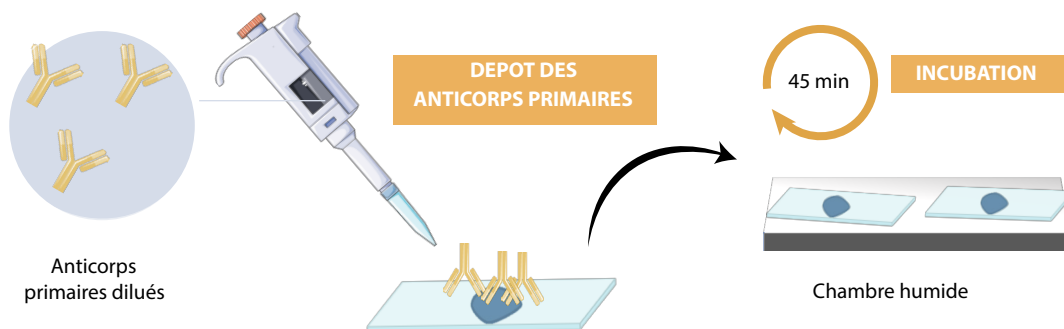
Au cours de cette étape l'anticorps est lié à l'antigène selon les étapes suivantes :



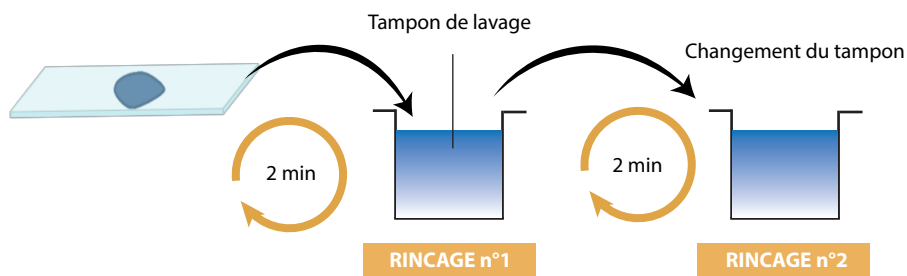
L'**anticorps primaire** est **dilué** selon les informations contenues dans la fiche technique/le mode d'emploi dans le diluant pour anticorps. Si le **diluant pour anticorps contient déjà une solution de blocage**, l'étape de blocage (habituellement nécessaire) pour réduire la liaison non spécifique est omise.

**8** **Facultatif** : Appliquez une **barrière hydrophobe autour des sections** sur la lame avec un **stylo PAP**.  
Si la solution bloquante n'est pas présente dans le diluent, déposez la solution de blocage (par exemple dans du sérum de chèvre, du BSA, du bloquant commercial...) et incubez 10 à 30 min à RT ou ON à 4°C.

**9** Déposez ou pipettez la **solution d'anticorps primaires** (notez la dilution) **sur les sections** jusqu'à ce que la section soit complètement couverte (selon la taille de la section, 3-4 gouttes ou 150-200 µl). Ceci s'applique également à toutes les étapes suivantes. **Incubez** la lame dans une **chambre de coloration/chambre humide** (45 min, RT, le temps d'incubation peut varier selon les anticorps).



- 10** Lavez la lame deux fois dans un **tampon de lavage** dans une **cuvette** remplie de tampon de lavage, rincez pendant 2 min, changez de tampon de lavage, rincez pendant 2 min.

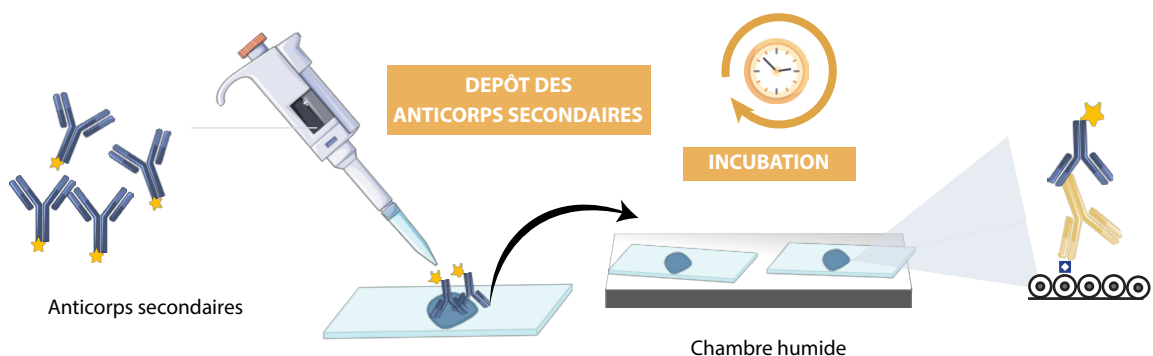


## PROTOCOLE : Détection

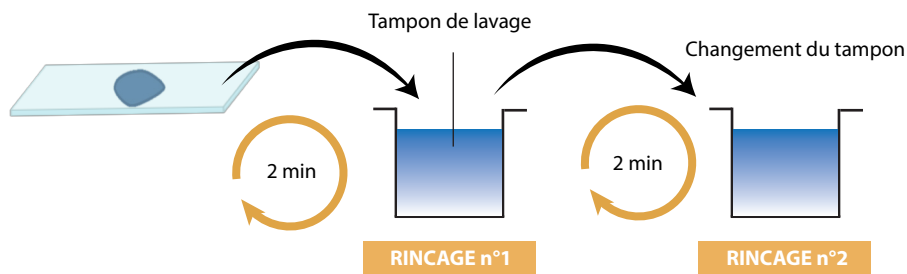
Les étapes suivantes sont conçues pour **détecter la liaison anticorps-antigène en utilisant un système de détection approprié**. En règle générale, les systèmes polymères en deux étapes sont utilisés conformément à la fiche technique/aux instructions d'utilisation. En ce qui concerne **l'amplification du signal**, vous pouvez vous référer au protocole du système de détection. Dans une étape ultérieure, **on ajoute le chromogène correspondant** (comme par exemple le Permanent AP Red ou DAB) qui va être **catalysé par l'enzyme** (AP, phosphatase alcaline ou HRP, peroxydase de raifort) **ce qui va produire un précipité coloré, visible**.

- 11** Enlevez l'excès de **tampon de lavage** de la lame.

- 12** Appliquez au goutte-à-goutte ou à la pipette la **solution de détection** sur les sections et **placez la lame dans une chambre de coloration/chambre humide** (avec un temps qui varie en fonction du système de détection, RT).

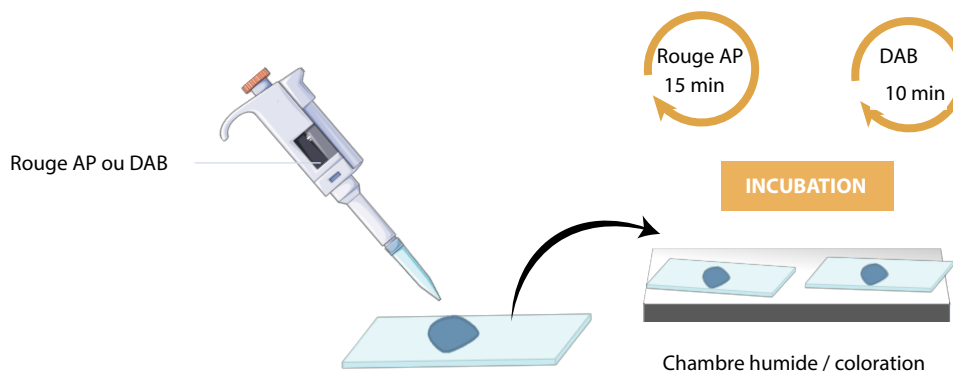


- 13** Lavez la lame deux fois dans un **tampon de lavage** dans une cuvette remplie de tampon de lavage, rincez pendant 2 min, changez de tampon de lavage, rincez pendant 2 min.



- 14** Enlevez l'excès de tampon de lavage de la lame.

- 15** Versez ou pipettez le **chromogène** (comme dans la fiche technique/instructions d'utilisation) sur les sections et placez la lame dans la **chambre de coloration/chambre humide** (DAB 10 min, rouge AP permanent 15 min, RT).



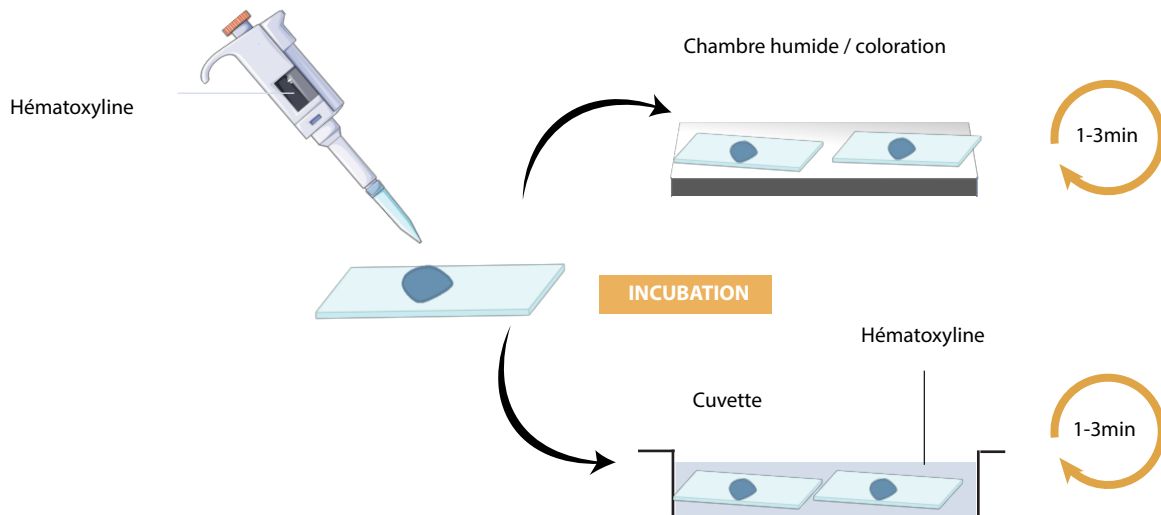
- 16** Rincez soigneusement la lame avec de l'**eau du robinet** (au moins 2 minutes, à température ambiante).



## PROTOCOLE : Contre-coloration

Cette étape sert à **visualiser la structure du tissu avec de l'hématoxyline/haemalaun**. L'hématoxyline est diluée au 1:5 avec de l'eau distillée (jusqu'au 1:10) et, si nécessaire, filtrée avant utilisation.

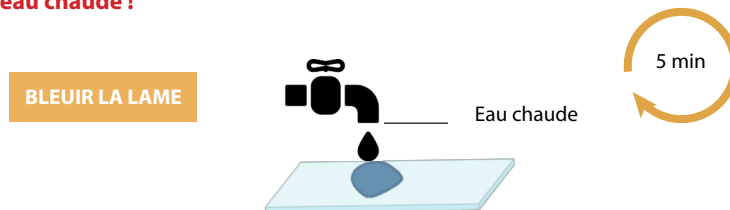
- 17** Déposez ou pipettez l'hématoxyline (respectez la dilution requise) sur les sections et placez la lame dans la chambre de coloration/chambre humide, ou placez la lame dans une cuvette avec l'hématoxyline (jusqu'à l'intensité désirée pendant 1-3 min, RT).



- 18** Lavez brièvement la lame avec de l'eau distillée.

- 19** Bleuir la lame avec de l'eau chaude du robinet (en général environ 5 min ; jusqu'à ce que la teinte violette ait changé en couleur bleue).

**Exception pour l'utilisation de l'AP Rouge, bleuir seulement dans l'eau froide, ne pas utiliser d'eau chaude !**



## PROCOLE : Montage

Afin de stabiliser le marquage et stocker les lames, les sections sont recouvertes d'une lamelle à l'aide d'un milieu de montage (permanent ou aqueux, selon le chromogène).

- 20** Si vous utilisez un montage permanent, déshydratez la section en réalisant par exemple des bains ascendants d'alcools (70%, 80%, 96% sous hotte).

- 21** Plongez les lames dans du xylène (2 x 1 min, sous la hotte).

- 22** Montez la section avec une lamelle en utilisant le milieu de montage.