

## 冰冻切片免疫组化染色实验报告

## 一、实验器材及试剂

## 1. 实验器材

名称	厂家	型号
冰切机	沈阳德誉电子仪器有限公司	SYD-K2040
OCT 包埋剂	樱花	4583
载玻片	陕西依科生物技术有限公司	YK116
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	福州迈新	PEN-0002
正置显微镜	日本尼康	ci-s
成像系统	日本尼康	Ds-Fi3
扫描仪（白光）	日本滨松	NanoZoomer-SQ
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

## 2. 主要实验试剂

试剂	厂家
固定液	陕西依科生物技术服务有限公司
过氧化氢溶液	国药集团化学试剂有限公司 10011218
苏木素染液	陕西依科生物技术服务有限公司 YK0943
分化液	陕西依科生物技术服务有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司
BSA	BioFROXX
一抗	客户提供
二抗	福州迈新免疫组化试剂盒 KIT9730
中性树胶	陕西依科生物技术服务有限公司

## 二、免疫组化染色实验原理及步骤

**实验原理** 抗体和抗原之间的结合具有高度的特异性，免疫组织化学正是利用了这一原理。先将组织或细胞中的某种化学物质提取出来，以此作为抗原或半抗原，通过免疫动物后获得特异性的抗体，再以此抗体去探测组织或细胞中的同类的抗原物质。由于抗原与抗体的复合物是无色的，因此还必须借助于组织化学的方法将抗原抗体结合的部位显示出来，以其达到对组织或细胞中的未知抗原进行定性，定位或定量的研究。

**免疫组化染色实验步骤:**

1. **复温, 水洗:** 将切片从-20℃拿出来复温 30min, 蒸馏水洗两次, 每次 8min;
2. **固定:** 将切片至于4%的多聚甲醛中固定15min, 用PBS洗3次, 每次5min;
3. **阻断内源性过氧化物酶** 切片放入 0.3%甲醇过氧化氢溶液, 室温避光孵育 20 min, 将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min;
4. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内滴加用 5%BSA, 室温封闭 1h;
5. **加一抗:** 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加按一定比例配好的一抗, 切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜 (湿盒内加少量水防止抗体蒸发);
6. **加二抗:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 8min; 切片稍甩干后在圈内滴加生物素偶联的二抗, 覆盖组织, 室温孵育 50min; 之后玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 8min; 切片稍甩干后在圈内滴加 HRP 标记的链霉卵白素的三抗, 覆盖组织, 室温孵育 50min; 之后玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 8min;
7. **DAB 显色:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min; 切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色时间, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色;
8. **复染细胞核:** Harris 苏木素复染 3min 左右, 自来水洗, 分化液分化数秒, 自来水冲洗, 流水返蓝;
9. **脱水封片:** 将切片依次放入 75%酒精 6min-85%酒精 6min --无水乙醇 I 6min -无水乙醇 II 6min -二甲苯 I 7min -二甲苯 II 7min 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树脂胶封片;
10. 显微镜镜检, 图像采集分析。

三、**染色结果判读:** 苏木素染细胞核为蓝色, DAB 显出的阳性表达为棕黄色。