

细胞爬片免疫组化实验报告

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
载玻片	陕西依科生物技术服务有限公司	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
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

2. 主要实验试剂

试剂	厂家
无水乙醇	天津天力化学试剂有限公司 批号：20220609
二甲苯	天津天力化学试剂有限公司 批号：20221008
TritonX100	陕西依科生物技术服务有限公司
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司 BF002
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
中性树脂	陕西依科生物技术服务有限公司 YK1557
BSA	BioFROXX 货号 EZ2811C238
一抗	客户提供
二抗	福州迈新免疫组化试剂盒 KIT9730
DAB 显色剂	福州迈新 DAB-1031

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. **细胞固定**: 细胞爬片弃掉培养基, PBS 洗 2 遍, 4%多聚甲醛固定 15min, PBS 洗 2 次, 5min/次;
2. **通透**: 细胞爬片加细胞通透液 0.3%TritonX-100 15min, PBS 洗 3 次, 每次 5min;
3. **BSA 或者血清封闭**:在孔内滴加用 5%BSA, 室温封闭 1h;
4. **加一抗**: 用组化笔在载玻片上画圈 (防止抗体流走), 圈内滴加稀释好的一抗, 把爬片拿出倒扣在玻片上, 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);
5. **加生物素二抗**: 爬片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 8min; 爬片稍甩干后在圈内滴加生物素偶联的二抗, 室温孵育 50min;
6. **加链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶** 之后爬片置于 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链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶, 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。