

## 石蜡切片 tunel+免疫荧光双标实验报告

## 一、实验器材及试剂

## 1. 实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	俊杰电子有限公司	JJ-12J
包埋机	俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徕卡仪器有限公司	RM2016
冻台	俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	上海慧泰仪器制造有限公司	DHG-9140A
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
微波炉	美的微波电器制造有限公司	MM823LA6-NS
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）	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
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
柠檬酸（PH6.0）抗原修复液	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
BSA	BioFROXX 货号 E22811C238
一抗	客户提供
二抗	壮志生物
Tunel 试剂盒	罗氏
抗荧光淬灭剂	博士德
DAPI	MCE HY-D0814

## 二、实验步骤

1. 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 20min-二甲苯 II 20min-无水乙醇 I 5min-

无水乙醇 II 5min-75%酒精 5min, 自来水洗;

2. **抗原修复:** 组织切片置于盛有柠檬酸 (PH6.0) 抗原修复液的高压锅内进行抗原修复, 喷气计时 2.5min, 自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min;
3. **灭活:** 0.3% 甲醇过氧化氢灭活 15min, PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 6min;
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 PBS 按一定比例配好的一抗, 两种一抗 (不同种属来源) 按一定的稀释比例混合, 滴加到组织上, 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与一抗相应种属标记的按一定比例配好的二抗覆盖组织, 室温孵育 120min。 (两种不同颜色二抗 (cy3+cy5), 按照一定的比例混合孵育);
7. **加 tunel 反应液:** 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 tunel 反应液, 避光孵育 60min。
8. **DAPI 染核:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 8min, 滴加 DAPI, 室温孵育 10min, 之后玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 6min;
9. **封片:** 抗荧光淬灭剂封片;
10. **镜检拍照:** 切片于荧光显微镜下观察并采集图像。 (DAPI 紫外激发波长 330-380nm, 发射波长 420nm, 发蓝光; tunel (绿光) 激发波长 465-495nm, 发射波长 515-555 nm, 发绿光; CY3 激发波长 510-560, 发射波长 590nm, 发红光, CY5 激发波长 608-648nm, 发射波长 672-712, CY5 原本为正红色, 为了与 CY3 区分开, 设定为粉色光)。

**三、染色结果判读:** DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色, 目的蛋白为红色和粉红色, tunel 呈绿色。