石蜡切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
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	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009218
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023428
柠檬酸（PH6.0)抗原修复液	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2430
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司	BF002
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	YK2210
中性树胶	陕西依科生物技术服务有限公司	YK1557
BSA	BioFROXX	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. **石蜡切片脱蜡至水：**依次将切片放入二甲苯Ⅰ20min-二甲苯Ⅱ20min-无水乙醇Ⅰ5min-无水乙醇Ⅱ5min-75%酒精 5min，自来水洗；
2. **抗原修复：**组织切片置于盛满柠檬酸（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. **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. **加生物素二抗：**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；
7. **加链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶** 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；
8. **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；

9. **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；

10. **脱水封片：**将切片依次放入 75%酒精 6min-85%酒精 6min --无水乙醇Ⅰ6min -无水乙醇Ⅱ6min -二甲苯Ⅰ7min -二甲苯Ⅱ7min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片；

11. 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。