石蜡切片免疫荧光双标（异源）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
BSA	BioFROXX	EZ2811C238
一抗	客户提供	
二抗	陕西依科生物技术服务有限公司	
抗荧光淬灭剂	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2256
DAPI	MCE	HY-D0814

二、免疫荧光染色实验原理及步骤

实验原理 免疫学的基本反应是抗原-抗体反应。由于抗原抗体反应具有高度的特异性，所以当抗原抗体发生反应时，只要知道其中的一个因素，就可以查出另一个因素。免疫荧光技术就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体（或抗原）上，与其相应的抗原（或抗

体）结合后，在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。

免疫荧光染色实验步骤

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，按照一定的比例混合孵育）；
7. **DAPI 染核：**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；
8. **封片：**抗荧光淬灭剂封片；
9. **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；FITC 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）。

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，阳性表达为相应荧光素标记的红光或者绿光。