

石蜡切片免疫荧光实验报告

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
抗荧光淬灭剂	博士德
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 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与种属对应的二抗, 覆盖组织, 室温孵育 120min。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. **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。