

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

免疫组化实验报告 (冰冻切片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
冰冻切片机	赛默飞世尔科技有限公司	HM525NX
防脱载玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0510
正置显微镜	奥林巴斯有限公司	CX-31
成像系统	日本滨松光子学株式会社	NanoZoomer®S360
移液枪	大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司	YE169AA0033229
组化笔	福州迈新生物技术开发有限公司	PEN-0002

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
OCT 包埋剂	日本樱花	4583
环保封片剂	同声科技	
30% H_2O_2	国药集团化学试剂有限公司	10011218
正常山羊血清	武汉博士德生物工程有限公司	AR1009
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
苏木素染液	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP022
苏木素分化液	湖北百奥斯生物科技有限公司	
苏木素返蓝液	湖北百奥斯生物科技有限公司	
DAB 显色试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司	DAB4033

3、抗体信息

(1) 一抗信息

名称	公司	货号	浓度	孵育条件

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

(2) 二抗信息

名称	公司	货号	浓度	孵育条件

注：一抗及二抗信息根据具体实验条件填写。

二、实验步骤

- 1、冰冻切片固定：**冰冻切片室温晾干，常规固定，于蒸馏水洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- 2、抗原修复：**冰冻切片常规不修复，特殊情况可选择性的进行抗原修复。
- 3、画圈：**组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。
- 4、破膜：**用 0.1% Triton®X-100 破膜 15 分钟。TBST 洗 3 次，每次 5 分钟。
- 5、阻断内源性过氧化物酶：**将切片浸泡于 3% H₂O₂ 中，室温避光阻断 20 分钟，蒸馏水浸洗后，浸泡于 TBST 中。
- 6、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10% 血清，室温孵育 30 分钟。
- 7、孵育一抗：**甩去血清，用 10% 血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100μl（视组织大小而定）一抗工作液，4℃孵育过夜。
- 8、孵育二抗：**第二天从冰箱拿出切片，置于室温放置 15 分钟（复温），用 TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。用 TBST 稀释二抗原液，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100μl（视组织大小而定）二抗工作液，37℃孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。
- 9、DAB 显色：**甩去 TBST，每张切片滴加 50ul--100ul（视组织大小而定）新鲜配制的 DAB 显色液，用计时器计时并在镜下观察显色情况，用自来水清洗终止显色反应并记录显色时间。
- 10、染核：**苏木素染核 1 分钟，洗净，盐酸酒精分化 1-2 秒，洗净，返蓝液返蓝数秒后洗净，于显微镜下观察细胞核着色情况。
- 11、干燥：**将染核的片子依次浸泡于两缸无水酒精中，每缸浸泡 2min，然后将

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

切片置于室温自然晾干或者 37℃ 恒温箱内烘干。

12、封片：用环保型封片剂（或中性树脂胶）封片，放于阴凉干燥处保存。

13、镜检：显微镜下镜检，图像采集分析。

三、结果判读

DAB 显出的阳性表达为深棕褐色，苏木素染细胞核呈蓝色。

百奥斯生物 | 长衍病理