

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

免疫组化双标实验报告 (石蜡切片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	常州市中威电子仪器有限公司	TSJ-SD
包埋机	常州市中威电子仪器有限公司	BMJ-A
病理切片机	赛默飞世尔科技有限公司	SHANDON FINESSE 325
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	常州市中威电子仪器有限公司	PHY-III
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
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
环保透明剂	同声科技	
环保封片剂	同声科技	
10× 柠檬酸抗原修 复液 (pH6.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
10× EDTA 抗原修 复液 (pH9.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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

**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**

名称	厂家	货号
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
红色显色试剂盒	上海茹创生物科技有限公司	RCF040

### 3、抗体信息

#### (1) 一抗信息

名称	公司	货号	浓度	修复方式	孵育条件

#### (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、石蜡切片脱蜡至水：**依次于环保脱蜡剂(1)、环保脱蜡剂(2)、环保脱蜡剂(3)中分别脱蜡 10 分钟，然后经无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇各 5 分钟。蒸馏水洗 3 次，每次 3 分钟，然后浸洗。

**2、抗原修复：**根据实验条件选择合适的修复液及修复方式。

(1) 高温高压修复 (EDTA, pH9.0)：在高压锅中加入 EDTA (pH9.0) 抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计

**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**

---

时 1 分 30 秒，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(2) 高温高压修复（柠檬酸，pH6.0）：在高压锅中加入柠檬酸（pH6.0）抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 2 分钟，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(3) 微波修复：在修复盒内加入抗原修复液（EDTA pH9.0 或柠檬酸 pH6.0），将脱蜡水化后的组织切片放入修复盒内，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子，将装有待修复切片的修复盒放入微波炉内，调整微波炉的功率至高火档位，时间设置为 3 分钟。第一轮修复结束后，将修复盒从微波炉内取出，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，再重复第一轮的修复操作，进行第二轮与第三轮修复（每次修复后冷却间隔时间约为 1 小时）。三次修复完成冷却后，再将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

**3、阻断内源性过氧化物酶：**浸洗完成后，将已修复完成的切片浸泡于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中，室温避光阻断 30 分钟，蒸馏水浸洗。

**4、画圈：**组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。

**5、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10% 血清，室温孵育 30 分钟。

**6、孵育第一个一抗：**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°C 孵育过夜。

**7、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°C 孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

**8、DAB 显色：**除去 TBST，每张切片滴加 50-100μl（视组织大小而定）新鲜配制的 DAB 工作液，镜下观察，计时，自来水冲洗切片终止显色。

**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**

---

**9、抗原修复：**在高压锅中加入 EDTA (pH9.0) 抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 1 分 30 秒，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30℃，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

**10、阻断内源性过氧化物酶：**浸洗完成后，将已修复完成的切片浸泡于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中，室温避光阻断 30 分钟，蒸馏水浸洗。

**11、画圈：**组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。

**12、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10% 血清，室温孵育 30 分钟。

**13、孵育第二个一抗：**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。

**14、孵育二抗：**第三天从冰箱拿出切片，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。

**15、红色显色：**除去 TBST，在圈内滴加解冻的 TY 反应液反应 20 分钟，TBST 冲洗 3 次，每次 3 分钟。之后滴加新鲜配制的红色显色工作液（PB:CU:红色原:AC=860:40:1:100），室温避光孵育 15 分钟，显微镜下控制显色时间，阳性为红色，自来水冲洗切片终止显色。

**16、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。

**17、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，然后将切片置于室温自然晾干或者 37℃恒温箱内烘干。

**18、封片：**用环保封片剂封片，晾干。于常温干燥阴凉处保存。

**19、镜检：**显微镜下镜检，图像采集分析。

### 三、结果判读

DAB 显色的阳性表达为深棕褐色，AEC 显色的阳性表达为红色或粉红色，苏木

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

---

素染细胞核呈蓝色。

#### 四、注意事项

- 1、DAB 显色尽量不要过深，过深会影响红色显色效果。
- 2、双染的两个抗原尽量表达位置不同，（如标记不同细胞或者不同表达位置），不适用于两个抗原的共定位（不同于荧光的共定位）。
- 3、红色显色抗原所对应的一抗抗体浓度适当提高一些，组化二抗应使用高敏多聚二抗。

百奥斯生物 | 长衍病理