

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%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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