

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 (细胞爬片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
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
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
Triton® X-100 破膜液	BioFroxx	1139ML100
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

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	公司	货号	浓度	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、细胞爬片固定：**未经固定的细胞用 4%多聚甲醛固定 10 分钟。已固定的细胞室温放置 10 分钟，蒸馏水洗。用组化笔在爬片边缘画圈。
- 2、破膜：**用 0.1%Triton®X-100 破膜 15 分钟，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。
- 3、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10%血清，室温孵育 30 分钟。
- 4、孵育一抗：**去除血清，用 TBST 稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张爬片滴加 50-100μl（视细胞爬片大小而定）一抗工作液，4℃孵育过夜。
- 5、孵育二抗：**第二天从冰箱拿出爬片，置于室温放置 15 分钟（复温），用 TBST 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，每张爬片滴加 50-100μl（视细胞爬片大小而定）二抗工作液，37℃孵育 45 分钟。TBST 浸洗 3 次，每次 3 分钟。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、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。
- 9、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。

10、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。

四、注意事项

- 1、冲洗时不应直接将 TBST 对准爬片，应将喷壶嘴对准孔板壁让水顺板壁流下，避免将爬片上的细胞冲洗掉。
- 2、实验过程中注意做好标记，在培养皿侧面画上标记，避免将爬片弄混，每个孔的爬片、孔板与孔板盖都应做好标记。