



冰冻切片超氧化物阴离子荧光探针(ROS)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	武汉俊杰电子有限公司	JJ-12J
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徕卡仪器有限公司	RM2016
冻台	武汉俊杰电子有限公司	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	上海一恒科学仪器有限公司	DHG-9140A
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司	
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
微波炉	格兰仕微波炉电器有限公司	P70D20TL-P4
脱色摇床	Servicebio	TSY-B
涡旋混合器	Servicebio	MX-F
掌上离心机	Servicebio	D1008E
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	BIOSHARP	BC004
扫描仪	3DHISTECH	Pannoramic MIDI

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
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	
PBS 缓冲液	Servicebio	G0002
蛋白酶 K	Servicebio	G1205
破膜液	Servicebio	G1204
超氧化物阴离子荧光探针	碧云天	s0063



二、实验步骤

- 1、**冰冻切片固定**：冰冻切片需要在多聚甲醛里面常温固定 20min，然后晾干后置入纯水中，新鲜组织的冰切可以不固定直接做，但是这样的组织形可能会比较差
- 2、**加反应液**：按片子数量和组织大小取超氧化物阴离子荧光探针试剂盒内适量试剂：反应液按 1:2.5 比例混合，加到圈内覆盖组织，切片平放于湿盒内，37℃恒温箱孵育 30min，湿盒内加少量水保持湿度
- 3、**DAPI 复染细胞核**：切片用 PBS（PH7.4）洗涤 3 次，每次 5min。去除 PBS 后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 7min
- 4、**封片**：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- 5、**镜检拍照**：切片于倒置荧光显微镜下观察并采集图像。（紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm；FITC 绿光激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm；CY3 红光激发波长 510-560，发射波长 590nm）

三、结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，试剂盒为 cy3 标记，活细胞的标记为红色

实验结果仅供科研用途，不可用于临床诊断！