



## 石蜡切片免疫荧光实验报告

### 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	上海徠卡仪器有限公司	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	Servicebio	
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	Gene tech	GT1001
扫描仪	3DHISTECH	Pannoramic MIDI

#### 2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号	稀释比
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		
EDTA (PH8.0)抗原修复液	Servicebio	G1206	
EDTA(PH9.0)抗原修复液	Servicebio	G1203	
柠檬酸 (PH6.0)抗原修复液	Servicebio	G1202	
PBS 缓冲液	Servicebio	G0002	
自发荧光淬灭剂	Servicebio	G1221	
BSA	Servicebio	G5001	
荧光二抗 CY3 山羊抗兔	Servicebio	GB21303	
荧光二抗 CY3 山羊抗小鼠	Servicebio	GB21301	
DAPI	Servicebio	G1012	
抗荧光淬灭封片剂	Servicebio	G1401	

## 2.1 抗体信息及修复条件

抗原修复条件	一抗名称	一抗货号	一抗厂家	一抗稀释比	对应的二抗名称	二抗对应的稀释比	对应的 TSA

## 二、实验步骤

- 1、石蜡切片脱蜡至水：**依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-85%酒精 5min-75%酒精 5min-蒸馏水洗。
- 2、抗原修复：**组织切片置于盛满柠檬酸钠抗原修复缓冲液（PH6.0）的修复盒中于微波炉内进行抗原修复(修复方式见上表)，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。（修复液和修复条件根据组织来确定）
- 3、血清封闭：**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈，滴加 BSA（一抗是山羊来源用 10%驴血清封闭，一抗其它来源的用 3%BSA 封闭），封闭 30min。
- 4、加第一种一抗：**去掉封闭液，滴加配好的一抗，平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。
- 5、加对应的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后滴加对应的 HRP 标记二抗，室温孵育 50min。
- 6、加对应的 tsa 染料（此步是常规染法则不加 TSA 染料）：**孵育完后，玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA，避光室温孵育 10min。孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。
- 7、抗原修复：**组织切片置于盛满柠檬酸钠抗原修复缓冲液（PH6.0）的修复盒中于微波炉内进行抗原修复(修复方式见上表)，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。（修复液和修复条件根据组织来确定）
- 8、血清封闭：**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈，滴加 BSA（一抗是山羊来源用 10%驴血清封闭，一抗其它来源的用 3%BSA 封闭），封闭 30min。
- 9、加第二种一抗：**去掉封闭液，滴加配好的一抗，平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。
- 10、加对应的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后滴加对应的 HRP 标记二抗，室温孵育 50min。
- 11、加对应的 tsa 染料（此步是常规染法则不加 TSA 染料）：**孵育完后，玻片置于 PBS（PH7.4）



中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA，避光室温孵育 10min。孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5min。

**12、DAPI 复染细胞核：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。

**13、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。

**14、镜检拍照：**切片于荧光显微镜下观察并采集图像。（DAPI 紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm，发蓝光；488 激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm，发绿光；CY3 激发波长 510-560，发射波长 590nm，发红光

### 三、结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为相应荧光素标记的红光或者绿光。

**实验结果仅供科研用途，不可用于临床诊断！**