

## 石蜡切片免疫组化双标实验报告

### 一、实验原理

免疫组化，是应用免疫学基本原理——抗原抗体反应，即抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂（荧光素、酶、金属离子、同位素）显色来确定组织细胞内抗原（多肽和蛋白质），对其进行定位、定性及定量的研究，称为免疫组织化学技术（IHC）或免疫细胞化学技术（ICC）。

双染原理：一抗识别抗原，hrp 标记二抗识别一抗，hrp 催化中间体 TY 永久性标记抗原且实现信号放大，红色色原特异性识别 TY 产物（共价结合），从而实现了红色信号的累积，完成了红色显色。常规免疫组化染色用 DAB，形成棕色物质。DAB 棕色+红色，形成了独特的组化双染颜色。

### 二、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	JT-12S
生物组织自动包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
石蜡包埋机（冷台）	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
转轮式切片机	徕卡显微系统上海有限公司	HistoCoreBIOCUT
组织摊片机	武汉俊杰电子有限公司	JK-5
烤箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司	GFL125
微波炉	美的	M1-L213B
盖玻片	江苏汇达医疗器械有限公司	710510



载玻片	海门市神鹰实验仪器厂	188109
脱色摇床	武汉赛维尔生物科技有限公司	SYC-Z100
涡旋仪	武汉赛维尔生物科技有限公司	MX-F
掌上离心机	武汉赛维尔生物科技有限公司	DS-S 100
显微镜	NIKON	ECLIPSE E100
组化笔	Gene tech	GT1001
移液枪	Dragon	KE003068
江丰扫描仪	宁波江丰生物信息技术有限公司	KF-PRO-120

## 2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	杭州宏达化工仪器有限公司	SJ003614
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
PBS 缓冲液	杭州浩克生物技术有限公司	HK0002
抗原修复液 EDTA(9.0)	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0004
BSA 牛血清白蛋白	杭州浩克生物技术有限公司	HKW2084
DAB 显色剂	Proteintech	PR30010
一抗: xxx 红+xxx 棕		
二抗: HRP 超敏山羊抗兔鼠	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0029
通用二抗		
组化红色显色试剂盒	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0007
苏木素染液	杭州浩克生物技术有限公司	HK2053
苏木素分化液	杭州浩克生物技术有限公司	HK2054
苏木素返蓝液	杭州浩克生物技术有限公司	HK2055
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司	10004160

### 三、实验步骤

- 1. 石蜡切片脱蜡至水:** 依次将切片放入二甲苯I 12 min—二甲苯II 12min—无水乙醇 I 6min—95%酒精 6 min—85%酒精 6 min—自来水洗 2min。
- 2. 抗原修复:** 组织切片置于盛满抗原修复液 (EDTA9.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复, 中火 8min 至沸腾停火 8min 再转中低火 7min, 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。
- 3. 阻断内源性过氧化物酶:** 切片加上 3%的双氧水, 室温避光孵育 25min, 将玻片置 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。
- 4. 画圈:** 用组化专用的组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 3-4 毫米的小圈, 然后加入足量的 PBS 保证后续依次加入的封闭血清, 一抗, 二抗, 以及显色剂能完全覆盖组织, 而不沿着玻片流走。
- 5. 血清封闭:** 在组化圈内滴加 3%BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min 以上。
- 6. 加一抗:** 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加按一定比例配好的一抗, 切片平放于湿盒 4°过夜孵育。(湿盒内加少量水防止抗体蒸发)
- 7. 加二抗:** 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与一抗相应种属的二抗 (HRP 标记) 覆盖组织, 室温孵育 50 min。
- 8. 显色:** 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解冻的 TY 反应液反应 20min, 然后 PBS 洗三次, 之后加入红色显色液工作液 (PB:CU:红色色原: AC=860:40:1:100), 显微镜下控制显色时间, 阳性为红色, 纯水冲洗切片终止显色。(时间较长 15min 左右), 再重复 2-7 的操作步骤。
- 9. 抗原修复:** 组织切片置于盛满抗原修复液 EDTA(9.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复, 中火 8min 至沸腾停火 8min 再转中低火 7min, 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。

10. **阻断内源性过氧化物酶:** 切片加上 3%的双氧水，室温孵育 25min，将玻片置 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
11. **画圈:** 用组化专用的组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 3-4 毫米的小圈，然后加入足量的 PBS 保证后续依次加入的封闭血清，一抗，二抗，以及显色剂能完全覆盖组织，而不沿着玻片流走。
12. **血清封闭:** 在组化圈内滴加 3%BSA 均匀覆盖组织，室温封闭 30min。
13. **加一抗:** 轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加按一定比例配好的一抗，切片平放于湿盒 4°过夜孵育。
14. **加二抗:** 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与一抗相应种属的二抗 (HRP 标记) 覆盖组织，室温孵育 50min。
15. **DAB 显色:** 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 (稀释液和浓缩液 1000:50 配制) 新鲜配制的 DAB 显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，纯水冲洗切片终止显色。
16. **复染细胞核:** 苏木素染色 2-3mins 左右，自来水洗，苏木素分化液分化 2 秒，自来水冲洗，苏木素返蓝液返蓝 15-30s，流水冲洗。
17. **脱水封片:** 将切片依次放入 75%酒精 4 min-85%酒精 4 min -95%酒精 4 min -无水乙醇 4 min -二甲苯I 4 min -二甲苯II 4 min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。
18. 显微镜镜检，图像采集分析。



#### 四、结果判读

苏木素染出细胞核为蓝色，DAB 显出的阳性表达为棕黄色，红色显色试剂呈粉红色。

#### 五、注意事项

1. 注意切片脱蜡是否彻底；
2. 实验过程中切片勿干片；
3. 实验操作中小心枪头挂伤组织。