

免疫细胞化学实验报告

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）。

二、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
烤箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司	GFL125
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
组化笔	Gene tech	GT1001
移液枪	Dragon	KE003068
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
显微镜	NIKON	ECLIPSE E100

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
PBS 缓冲液	杭州浩克生物技术有限公司	HK0002
BSA 牛血清白蛋白	杭州浩克生物技术有限公司	HKW2084
一抗:		
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		
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
DAB 显色剂	Proteintech	PR30010
破膜液	杭州浩克生物技术有限公司	HK1224
江丰扫描仪	宁波江丰生物信息技术有限公司	KF-PRO-120

三、实验步骤

- 1. 细胞固定:** 4%多聚甲醛固定 30min, 换掉固定液 PBS 洗 3 次, 每次 5min。留一部分 PBS 保持湿润。(多为客户送样前固定好)
- 2. 细胞破膜:** 爬片稍甩干后用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置画圈(防止抗体流走), 加 50-100ul 破膜工作液, 室温孵育 10min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。(破膜为非必须项)。



3. **血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用 3%BSA，室温封闭 30min 以上。
4. **加一抗:** 轻轻甩掉封闭液，在细胞孔板里滴加 PBS 按一定比例配好的一抗，细胞培养板平放于湿盒内 4°C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）
5. **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。稍甩干后在圈内滴加组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗（HRP 标记）覆盖组织，室温孵育 50min。
6. **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。稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。
7. **复染细胞核:** 苏木素复染 2-3min 左右，自来水洗，1%的盐酸酒精分化 2 秒，自来水冲洗，氨水返蓝 15-30s，流水冲洗。
8. **脱水封片:** 将玻片依次放入 75%酒精 4min-85%酒精 4min - -无水乙醇 I 4min -无水乙醇 II 4min 中脱水，将玻片从酒精中拿出来吹风机吹干后将有细胞的一面朝下用中性树胶封固在载玻片上。

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。

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；
4. 注意细胞需要足够数量。