



## 冰冻切片免疫组化实验报告

### 1. 实验器材及试剂

#### 1.1. 实验器材

| 名称        | 厂家            | 型号            |
|-----------|---------------|---------------|
| 冰冻切片机     | 赛默飞世尔科技公司     | CRYOSTAR NX50 |
| 载玻片       | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G6012         |
| 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(钟摆式) | 上海希柏徕生物科技有限公司 | DS-2S100      |
| 涡旋混匀仪     | 上海希柏徕生物科技有限公司 | MV-100        |
| 掌上离心机     | 上海希柏徕生物科技有限公司 | D1008E        |
| 移液枪       | 上海希柏徕生物科技有限公司 |               |
| 组化笔       | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G6100         |
| 显微镜       | 尼康仪器有限公司      | E100          |

#### 1.2. 主要实验试剂

| 试剂                              | 厂家            | 货号          |
|---------------------------------|---------------|-------------|
| OCT 包埋剂                         | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G6059-110ML |
| 二甲苯                             | 国药集团化学试剂有限公司  | 10023418    |
| 正丁醇                             | 国药集团化学试剂有限公司  | 100052190   |
| 盐酸                              | 国药集团化学试剂有限公司  | 10011028    |
| 20×柠檬酸抗原修复液<br>(pH 6.0)         | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1202       |
| 20×Tris-EDTA 抗原修复<br>液 (pH 9.0) | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1203       |
| 20×Tris-EDTA 抗原修复<br>液 (pH 8.0) | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1206       |
| PBS 缓冲液                         | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G0002       |



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术，光谱成像，自动化采集及智能分析的全套解决方案！

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号  
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com  
微信:XBL-FuHao



|              |               |          |
|--------------|---------------|----------|
| 通用型组织固定液（中性） | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1101    |
| 3%过氧化氢消毒液    | 安捷高科          |          |
| 牛血清白蛋白 BSA   | 上海希柏徕生物科技有限公司 | GC305010 |
| 正常兔血清（浓缩型）   | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1209    |
| 苏木素染液        | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1004    |
| 苏木素分化液       | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1039    |
| 苏木素返蓝液       | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1040    |
| 甘油明胶封片胶      | 上海希柏徕生物科技有限公司 | G1402    |
| AEC 显色剂      | 北京索莱宝科技有限公司   | A2010    |

### 1.3. 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 | 一抗种属 | 一抗稀释比 | 对应的二抗名称 |
|--------|------|------|------|------|-------|---------|
|        |      |      |      |      |       |         |
|        |      |      |      |      |       |         |
|        |      |      |      |      |       |         |

（备注：抗体加样顺序按照抗体书写顺序，二抗货号，厂家及稀释比见下方附表）

## 2. 实验步骤

- 2.1 冰冻切片固定：冰冻切片室温晾干，37℃烘箱烘烤 10-20min，置于甲醇固定 20min，于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.2 抗原修复：修复见上表，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。
- 2.3 阻断内源性过氧化物酶：切片放入 3%双氧水溶液，室温避光孵育 25min，将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.4 血清封闭：切片甩干后用组化笔在组织周围画圈，在圈内滴加用 3%BSA 或者 10%正常兔血清均匀覆盖组织，室温封闭 30min。（一抗是山羊来源用 10%正常兔血清封闭，一抗其它来源的用 3%BSA 封闭）
- 2.5 加一抗：甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的一抗，切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。
- 2.6 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。
- 2.7AEC 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新鲜配制的 AEC 显色液,避光孵育 10-25min,阳性为红色,自来水冲洗切片终止显色。
- 2.8 复染细胞核:苏木素复染 3min 左右,自来水洗,苏木素分化液分化数秒,自来水冲洗,苏木素返蓝液返蓝,流水冲洗。
- 2.9 封片:核镜检完毕后,将片子置于纯水中,稍微晾干后,用甘油明胶封片,自然风干
- 2.10 镜检:置于白光显微镜下进行结果判读。

### 3. 实验结果判读

苏木素染细胞核为蓝色,AEC 显出的阳性表达为红色。

附表

| 二抗及 TSA 名称                  | 货号      | 厂家  | 稀释比   |
|-----------------------------|---------|-----|-------|
| CY3 标记山羊抗兔 IgG              | GB21303 | XBL | 1:300 |
| CY3 标记山羊抗小鼠 IgG             | GB21301 | XBL | 1:300 |
| CY3 标记山羊抗大鼠 IgG             | GB21302 | XBL | 1:300 |
| CY3 标记驴抗山羊 IgG              | GB21404 | XBL | 1:300 |
| CY3 标记驴抗小鼠 IgG              | GB21401 | XBL | 1:300 |
| CY3 标记驴抗兔 IgG               | GB21403 | XBL | 1:300 |
| Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG  | GB25303 | XBL | 1:400 |
| Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG | GB25301 | XBL | 1:400 |
| CY5 标记山羊抗小鼠 IgG             | GB27301 | XBL | 1:400 |
| CY5 标记山羊抗兔 IgG              | GB27303 | XBL | 1:400 |
| HRP 标记的兔抗山羊 IgG             | GB23204 | XBL | 1:200 |
| HRP 标记山羊抗小鼠 IgG             | GB23301 | XBL | 1:200 |
| HRP 标记山羊抗大鼠 IgG             | GB23302 | XBL | 1:200 |
| HRP 标记山羊抗兔二抗                | GB23303 | XBL | 1:200 |
| HRP 标记驴抗山羊二抗                | GB23404 | XBL | 1:200 |
| FITC 标记驴抗山羊 IgG             | GB22404 | XBL | 1:200 |
| FITC 标记山羊抗大鼠 IgG            | GB22302 | XBL | 1:200 |
| FITC 标记驴抗兔 IgG              | GB22403 | XBL | 1:200 |



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术,光谱成像,自动化采集及智能分析的全套解决方案!

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号  
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com  
微信:XBL-FuHao



# 上海希柏徕生物科技有限公司

Shanghai Ciberlife Biotechnology Co., Ltd.

|                             |             |         |       |
|-----------------------------|-------------|---------|-------|
| FITC 标记驴抗小鼠 IgG             | GB22401     | XBL     | 1:200 |
| Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG  | 111-585-003 | Jackson | 1:400 |
| Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG | 115-585-003 | Jackson | 1:400 |
| CY3-Tyramide                | G1223       | XBL     | 1:500 |
| iF488-Tyramide              | G1231       | XBL     | 1:500 |
| iF647-Tyramide              | G1232       | XBL     | 1:400 |
| FITC-Tyramide               | G1222       | XBL     | 1:500 |

仅供科研用途，不可用于临床诊断！



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术，光谱成像，自动化采集及智能分析的全套解决方案！

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号  
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com  
微信:XBL-FuHao