

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

免疫组化双标实验报告 (石蜡切片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	常州市中威电子仪器有限公司	TSJ-SD
包埋机	常州市中威电子仪器有限公司	BMJ-A
病理切片机	赛默飞世尔科技有限公司	SHANDON FINESSE 325
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	常州市中威电子仪器有限公司	PHY-III
防脱载玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0510
正置显微镜	奥林巴斯有限公司	CX-31
成像系统	日本滨松光子学株式会社	NanoZoomer®S360
移液枪	大龙兴创实验仪器(北京)股份公 司	YE169AA0033229
组化笔	福州迈新生物技术开发有限公司	PEN-0002

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
环保透明剂	同声科技	
环保封片剂	同声科技	
10× 柠檬酸抗原修 复液 (pH6.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
10× EDTA 抗原修 复液 (pH9.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
30%H ₂ O ₂	国药集团化学试剂有限公司	10011218
正常山羊血清	武汉博士德生物工程有限公司	AR1009

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

名称	厂家	货号
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
苏木素染液	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP022
苏木素分化液	湖北百奥斯生物科技有限公司	
苏木素返蓝液	湖北百奥斯生物科技有限公司	
DAB 显色试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司	DAB4033
红色显色试剂盒	上海茹创生物科技有限公司	RCF040

3、抗体信息

(1) 一抗信息

名称	公司	货号	浓度	修复方式	孵育条件

(2) 二抗信息

名称	公司	货号	浓度	孵育条件

注：一抗及二抗信息根据具体实验条件填写。

二、实验步骤

1、石蜡切片脱蜡至水：依次于环保脱蜡剂(1)、环保脱蜡剂(2)、环保脱蜡剂(3)中分别脱蜡 10 分钟，然后经无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇各 5 分钟。蒸馏水洗 3 次，每次 3 分钟，然后浸洗。

2、抗原修复：根据实验条件选择合适的修复液及修复方式。

(1) 高温高压修复 (EDTA, pH9.0)：在高压锅中加入 EDTA (pH9.0) 抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

时 1 分 30 秒，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(2) 高温高压修复（柠檬酸，pH6.0）：在高压锅中加入柠檬酸（pH6.0）抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 2 分钟，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(3) 微波修复：在修复盒内加入抗原修复液（EDTA pH9.0 或柠檬酸 pH6.0），将脱蜡水化后的组织切片放入修复盒内，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子，将装有待修复切片的修复盒放入微波炉内，调整微波炉的功率至高火档位，时间设置为 3 分钟。第一轮修复结束后，将修复盒从微波炉内取出，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，再重复第一轮的修复操作，进行第二轮与第三轮修复（每次修复后冷却间隔时间约为 1 小时）。三次修复完成冷却后，再将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

3、阻断内源性过氧化物酶：浸洗完成后，将已修复完成的切片浸泡于 3% H_2O_2 中，室温避光阻断 30 分钟，蒸馏水浸洗。

4、画圈：组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。

5、封闭：滴加与二抗来源一致的 10%血清，室温孵育 30 分钟。

6、孵育第一个一抗：甩去血清，用 10%血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）一抗工作液，4°C孵育过夜。

7、孵育二抗：第二天从冰箱拿出切片，置于室温放置 15 分钟（复温），用 TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。用 TBST 稀释二抗原液，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）二抗工作液，37°C孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

8、DAB 显色：除去 TBST，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）新鲜配制的 DAB 工作液，镜下观察，计时，自来水冲洗切片终止显色。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

9、抗原修复：在高压锅中加入 EDTA (pH9.0) 抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 1 分 30 秒，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30℃，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

10、阻断内源性过氧化物酶：浸洗完成后，将已修复完成的切片浸泡于 3% H_2O_2 中，室温避光阻断 30 分钟，蒸馏水浸洗。

11、画圈：组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。

12、封闭：滴加与二抗来源一致的 10%血清，室温孵育 30 分钟。

13、孵育第二个一抗：甩去血清，用 10%血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）一抗工作液，4℃孵育过夜。

14、孵育二抗：第三天从冰箱拿出切片，置于室温放置 15 分钟（复温），用 TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。用 TBST 稀释二抗原液，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）二抗工作液，37℃孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

15、红色显色：除去 TBST，在圈内滴加解冻的 TY 反应液反应 20 分钟，TBST 冲洗 3 次，每次 3 分钟。之后滴加新鲜配制的红色显色工作液（PB:CU:红色原:AC=860:40:1:100），室温避光孵育 15 分钟，显微镜下控制显色时间，阳性为红色，自来水冲洗切片终止显色。

16、染核：苏木素染核 1 分钟，洗净，盐酸酒精分化 1-2 秒，洗净，返蓝液返蓝数秒后洗净，于显微镜下观察细胞核着色情况。

17、封片：用环保封片剂封片，晾干。于常温干燥阴凉处保存。

18、镜检：显微镜下镜检，图像采集分析。

三、结果判读

DAB 显色的阳性表达为深棕褐色，AEC 显色的阳性表达为红色或粉红色，苏木素染细胞核呈蓝色。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

四、注意事项

- 1、DAB 显色尽量不要过深，过深会影响红色显色效果。
- 2、双染的两个抗原尽量表达位置不同，（如标记不同细胞或者不同表达位置），不适用于两个抗原的共定位（不同于荧光的共定位）。
- 3、红色显色抗原所对应的一抗抗体浓度适当提高一些，组化二抗应使用高敏多聚二抗。