

冰冻切片免疫荧光染色实验报告

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
冰切机	沈阳德誉电子仪器有限公司	SYD-K2040
OCT 包埋剂	樱花	4583
载玻片	陕西依科生物技术服务有限公司	YK116
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	福州迈新	PEN-0002
正置显微镜	日本尼康	ci-s
成像系统	日本尼康	Ds-Fi3
扫描仪（白光）	日本滨松	NanoZoomer-SQ
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

2. 主要实验试剂

试剂	厂家
固定液	陕西依科生物技术服务有限公司
DAPI	MCE
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司
BSA	BioFROXX
一抗	客户提供
二抗	壮志生物
抗荧光淬灭剂	博士德

二、免疫荧光染色实验原理及步骤

实验原理 免疫学的基本反应是抗原-抗体反应。由于抗原抗体反应具有高度的特异性，所以当抗原抗体发生反应时，只要知道其中的一个因素，就可以查出另一个因素。免疫荧光技术就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体（或抗原）上，与其相应的抗原（或抗体）结合后，在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。

免疫荧光染色实验步骤：

1. **复温，水洗：**将切片从-20℃拿出来复温 30min，蒸馏水洗两次，每次 8min；

2. **固定:** 将切片至于4%的多聚甲醛中固定15min, 用PBS洗3次, 每次5min;
3. **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5%BSA, 室温封闭1h;
4. **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, 切片平放于湿盒内4℃ 孵育过夜 (湿盒内加少量水防止抗体蒸发);
5. **复温:** 湿盒从4℃拿出来复温1h, 将玻片置于PBS (PH7.4) 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次8min;
6. **加二抗:** 切片稍甩干后在圈内滴加与种属对应的二抗, 覆盖组织, 室温避光孵育2h, 将玻片置于PBS (PH7.4) 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次8min;
7. **DAPI染核:** 滴加DAPI, 室温避光孵育10min, 之后将玻片置于PBS (PH7.4) 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次6min;
8. **封片:** 抗荧光淬灭剂封片;
9. **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; FITC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、染色结果判读: 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。