

骨组织石蜡切片抗酒石酸酸性磷酸酶（Trap）染色实验报告

一、实验原理

TRAP 染色实验的基本原理是应用偶氮耦联免疫组化分析法，抗酒石酸酸性磷酸酶活性部位显示红色反应。使用试剂盒，以萘酚二磷酸盐为底物，偶氮副品红为显色剂，TRAP 在酒石酸钾钠存在条件下可将萘酚 AS-BI 磷酸盐水解为萘酚 AS-BI，与显色剂结合形成红色沉淀。

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
盖玻片	江苏汇达医疗器械有限公司	710510
显微镜	NIKON	ECLIPSE E100
载玻片	海门市神鹰实验仪器厂	188109
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
TRAP 染液套装	杭州浩克生物技术有限公司	HK1050
苏木素	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
中性树胶	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 12min-二甲苯II 12min -无水乙醇I 6min- 95%酒精 6min- 85%酒精 6min，自来水洗 2min。

2. 配制 TRAP 工作液：

(1) 取 50 μ L 副品红溶液与 50 μ L 亚硝酸钠溶液在洁净离心管中混匀，得到六偶氮副品红溶液；

(2) 向第 1 步的 100 μ L 六偶氮副品红溶液中加入 100 μ L LAS-BI 磷酸盐底物溶液，吹吸数次充分；

(3) 吸取 1.8 mL 反应缓冲液加入到第 2 步的混合液中充分混匀；

(4) 第 3 步的混合液经针式滤器过滤（0.45 μ m 水系滤膜）即得到 TRAP 工作液。

注意：务必按照所属顺序配制工作液。每个组织点大约需要 200-300 μ L 工作液，根据使用量配制，现配现用，避免浪费。

3. 孵育染色：将切片用组画笔化圈后放在（加有一定量的防止切片蒸干的纯水）湿盒中，用蒸馏水 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，倾去蒸馏水，将切片重新放置在湿盒中，并滴加过滤好的现配的 trap 孵育液放于 37 $^{\circ}$ C 烤箱孵育 20min。



-
4. **苏木素染色：**倾去染液，水洗后，苏木素染液复染核 15s，分化液分化，返蓝液返蓝。
 5. **脱水封片：**将切片依次放入 75%酒精 4min-85%酒精 4min -95%酒精 4min -无水乙醇 4min -二甲苯I4min -二甲苯II4min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树脂封片。
 6. **显微镜镜检：**图像采集分析。

四、结果判读

破骨细胞胞浆呈酒红色，核浅蓝色。

五、注意事项

1. 工作液配制过程中需充分溶解，现配现用。
2. 染液应保存在 4°C，使用前先复常温。