

免疫组化+PAS 石蜡切片实验报告

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）。

PAS 染色法又名：过碘酸雪夫染色在组织学上，主要用来检测组织中的糖类。其染色原理是过碘酸把糖类相邻两个碳上的羟基氧化成醛基，再用 Schiff 试剂和醛基反应使呈现紫红色。二者顺次染色即可。

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
微波炉	美的	M1-L213B
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



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
显微镜	NIKON	ECLIPSE E100
组化笔	Gene tech	GT1001
移液枪	Dragon	KE003068
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
PBS 缓冲液	杭州浩克生物技术有限公司	HK0002
抗原修复液柠檬酸(6.0)	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0001
BSA 牛血清白蛋白	杭州浩克生物技术有限公司	HKW2084
DAB 显色剂	Proteintech	PR30010
一抗:		
二抗: 超敏兔鼠通用二抗	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0029
苏木素染液	杭州浩克生物技术有限公司	HK1024
盐酸分化液	国药集团化学试剂有限公司	10011018
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
PAS 染液	杭州浩克生物技术有限公司	HK1028



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. 抗原修复:** 组织切片置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液 (PH 6.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复, 中火 8min 至沸腾停火 8min 再转中低火 7min, 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。
- 3. 画圈:** 用组化专用的组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 3-4 毫米的小圈, 然后加入足量的 PBS 保证后续依次加入的封闭血清, 一抗, 二抗, 以及显色剂能完全覆盖组织, 而不沿着玻片流走。
- 4. 阻断内源性过氧化物酶:** 切片加上试剂盒内的内源性过氧化物酶, 每张切片 50-100u1 室温孵育 25 min, 将玻片置 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。
- 5. 血清封闭:** 在组化圈内滴加 3%BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min。
- 6. 加一抗:** 轻轻甩掉封闭液, 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。
- 7. 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与一抗相应种属的二抗 (HRP 标记) 覆盖组织, 室温孵育 50 min。
- 8. 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。切片稍甩干后在圈内滴加 (稀释液和浓缩液 1000:50 配制) 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, 纯水冲洗切片终止显色。
- 9. 高碘酸氧化:** 0.5%高碘酸水溶液氧化 10min。流水冲洗数分钟蒸馏水换洗两次。
- 10. 雪夫试剂染色:** 切片入雪夫试剂暗处浸染 15~30min。 流水冲洗 10min。



11. 复染细胞核：苏木素染色 1-2min 左右，自来水洗，苏木素分化液分化 2 秒，自来水冲洗，苏木素返蓝液返蓝 15-30s，流水冲洗。

12. 脱水封片：将切片依次放入 75%酒精 5min-85%酒精 5min --无水乙醇 I 5min -无水乙醇 II 5min -二甲苯 I 5min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树脂封片。

13. 显微镜镜检：图像采集分析。

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，糖原和中性粘液物质为红色，细胞核蓝色。

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。