

免疫组化实验报告

一、实验材料

1. 临床标本

肺癌及癌旁组织

2. 主要试剂

切片石蜡（北京索莱宝科技有限公司，YA0011）

醇苯（苯甲醇，国药集团化学试剂有限公司，30020618）

PBS 溶液（0.01M，自行配制）

二甲苯（国药集团化学试剂有限公司，10023418）

无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，10009218）

1×EDTA 抗原修复液（北京索莱宝科技有限公司，C1033）

H₂O₂（国药集团化学试剂有限公司，1001218）

BSA（北京索莱宝科技有限公司，A8020）

抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒（Dako Denmark A/S，K5007）

苏木素染色剂（北京索莱宝科技有限公司，G1140）

中性树胶（北京索莱宝科技有限公司，G8590）

3. 主要仪器

组织脱水机（上海徕卡仪器有限公司，ASP300）

全自动包埋机（上海徕卡仪器有限公司，EG1140H）

石蜡切片机（上海徕卡仪器有限公司，RM2235）

摊片机（上海徕卡仪器有限公司，HI1210）

烤片机（上海徕卡仪器有限公司，HI1220）

烘箱（上海福玛实验设备有限公司，DGX-9003B）

微波炉（格兰仕微波炉电器有限公司，P70D20P-TF）

光学显微镜（日本奥林巴斯，BX51）

二、实验方法

1. 组织脱水包埋

(1) 所有组织固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上后，将其从固定液中取出，在通风橱内将组织修平整，将修好的组织放于标有对应的标签脱水盒内。

(2) 将脱水盒放进吊篮中于脱水机内依次通过梯度酒精进行脱水，程序设置为：75% 酒精 4 h → 85% 酒精 2 h → 90% 酒精 2 h → 95% 酒精 1 h → 无水乙醇 30 min → 无水乙醇 30 min → 醇苯 10 min → 二甲苯 I 10 min → 二甲苯 II 10 min → 石蜡 I 1 h → 石蜡 II 1 h → 石蜡 III 1 h。

(3) 将融化的石蜡放入包埋框，在石蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出，按照包埋要求放入包埋框并贴上对应的标签。置于 -20°C 冷冻台冷却，蜡块凝固后将其从包埋框中取出并修整。

2. 石蜡切片

(1) 将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片，切片厚度 4 μm。
(2) 将切片漂浮于摊片机温水 (40°C) 上使组织展平。
(3) 用载玻片将组织切片捞起，并放于 60°C 烤片机上烤片，待水烤干后取出常温保存备用。

3. 切片脱蜡水化

(1) 脱蜡前将切片置于 60°C 烘箱中烘烤 20 min。
(2) 将切片浸于新鲜的二甲苯中 5 min，重复 3 次。
(3) 将切片浸于无水乙醇中 5 min，重复 2 次。
(4) 将切片依次浸于 95% 乙醇 5 min → 85% 乙醇 5 min → 75% 乙醇 5 min。
(5) 用 PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。

4. 抗原修复

(1) 将 1×EDTA 抗原修复液微波加热至沸腾后，把切片浸入后调至低火，计时 15 min。
(2) 取出切片自然冷却后，使用 PBS 洗 3 次，每次 5 min，吸水纸擦干玻片。

5. 封闭内源性过氧化物酶

(1) 将切片放入 3% 过氧化氢溶液中，室温下孵育 10 min，以阻断内源性过氧化物酶。

(2) PBS 洗 3 次，每次 5 min，擦干水分。

6. 抗体杂交

(1) 切片滴加 5% BSA 覆盖组织，室温封闭 20 min。

(2) 去除 BSA 液，每张切片滴加 50 μ l 稀释的抗体 A (稀释比 1:1000) 覆盖组织，4°C 过夜孵育。

(3) 切片从 4°C 取出后，室温下放置 45 min 复温，PBS 洗 3 次，每次 5 min。

(4) 去除 PBS，每张切片加 50~100 μ l 二抗，室温孵育 30 min。

(5) PBS 洗 3 次，每次 5 min。

(6) 去除 PBS，每张切片加 50~100 μ l 新鲜配制 DAB 溶液，显微镜下观察显色。

(7) 显色完全后，用蒸馏水冲洗终止显色。

7. 苏木素复染

(1) 切片放入苏木素中复染，显微镜观察控制染色时间。

(2) 将染好的切片放入 1% 盐酸酒精分化 (1 s)，自来水冲洗。

8. 脱水透明

(1) 将切片依次浸入 75% 酒精 10 min，85% 酒精 10 min，95% 酒精 10 min，100% 酒精 10 min，脱水。

(2) 取出切片放入二甲苯 5 min，重复 3 次。

9. 封片

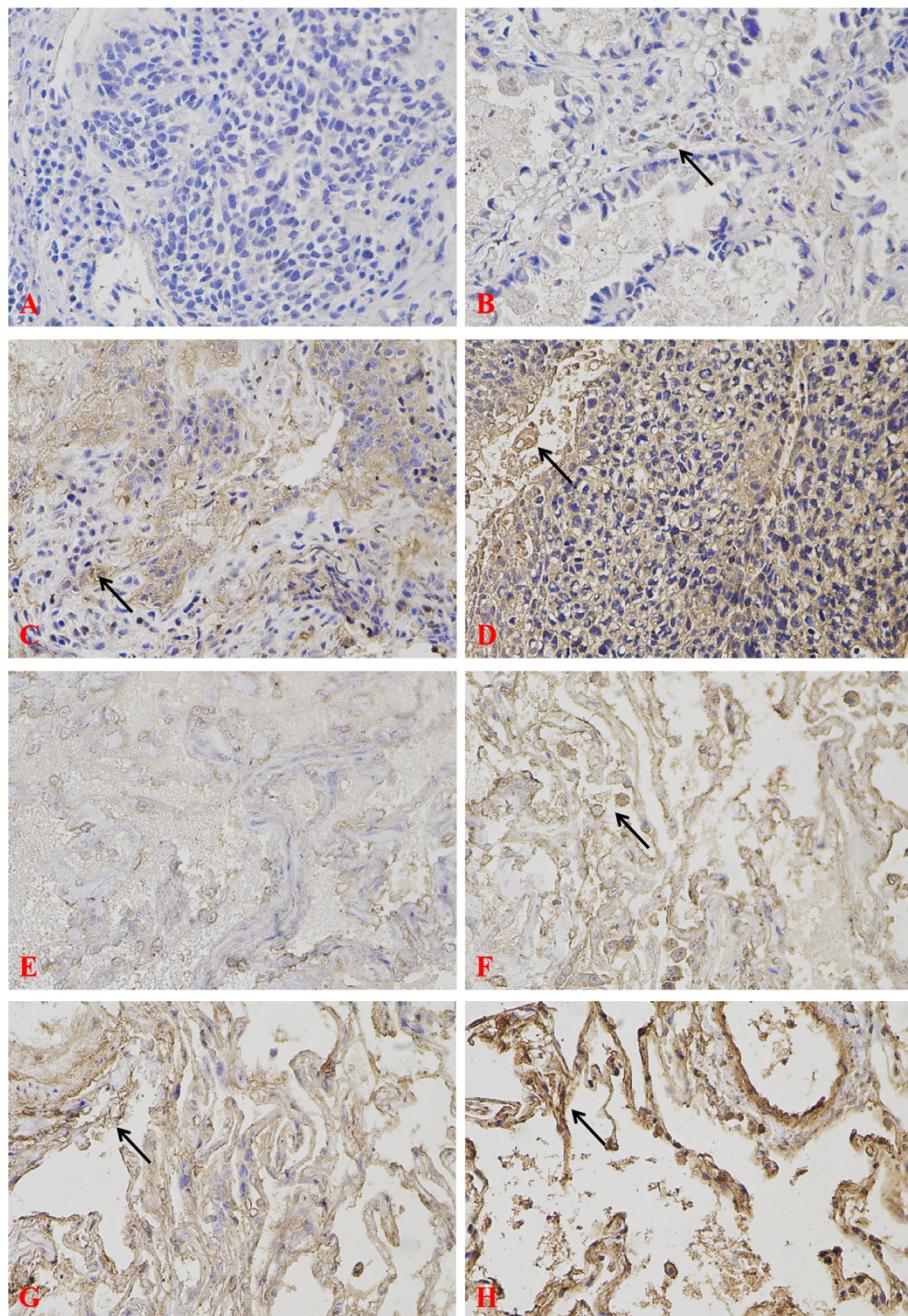
(1) 切片通风橱风干。

(2) 中性树胶封片，轻压盖玻片赶出气泡，自然风干后常温保存。

10. 拍照及图像分析

光学显微镜下拍照，采集图像，运用 Image J 软件进行 IOD 值分析。

三、实验结果



A: C 组 Protein A 阴性表达；B: C 组 Protein A 阳性表达（弱）；C: C 组 Protein A 阳性表达（中）；

D: C 组 Protein A 阳性表达（强）；E: N 组 Protein A 阳性表达（弱）；F: N 组 Protein A 阳性表达（弱）；

G: N 组 Protein A 阳性表达（中）； H: N 组 Protein A 阳性表达（强）。

图 1 肺癌及癌旁组织中 Protein A 表达情况（200×, n=20）

