

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

免疫荧光三标实验报告 (冰冻切片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
冰冻切片机	赛默飞世尔科技有限公司	HM525NX
防脱载玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0510
荧光显微镜	奥林巴斯有限公司	BX53
成像系统	3D HISTECH	Pannoramic SCAN II
移液枪	大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司	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
OCT 包埋剂	日本樱花	4583
Triton® X-100 破膜液	BioFroxx	1139ML100
正常驴血清	AntGene	ANT051
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
DAPI 溶液	Solarbio	C0060
荧光封片剂	Southern Biotech	0100-01

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

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	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、冰冻切片固定：**冰冻切片室温晾干，常规固定，于蒸馏水洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- 2、抗原修复：**冰冻切片常规不修复，特殊情况可选择性的进行抗原修复。
- 3、画圈：**组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。
- 4、破膜：**用 0.1% Triton®X-100 破膜 15 分钟。TBST 洗 3 次，每次 5 分钟。
- 5、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10% 血清，37°C 孵育 30 分钟。
- 6、孵育一抗：**甩去血清，分别取 3 种一抗原液，用 10% 血清稀释，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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。分别取 3 种二抗原液，用 TBST 稀释，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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、染核：**除去 TBST，每张切片滴加 50-100 $\mu$ l（视组织大小而定）DAPI 工作液（用 DAPI 原液 1:500 配制），避光染核 5 分钟后，用 TBST 冲洗。
- 9、封片：**用荧光封片剂封片，4°C 避光保存。
- 10、镜检：**显微镜下镜检，图像采集分析。

## 三、结果判读

DAPI 通道细胞核为蓝色，488 通道阳性为绿色，555 通道阳性为橙红色，594 通道阳性为红色，647 通道阳性为紫红色。