ttt

**冰冻切片油红O染色**

**测量分析**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，IP/COIP检测，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，电镜检测，免疫荧光，免疫组化，tunel，原位杂交染色，全景扫描，分析阅片等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，肝功，肾功，血糖，血脂，无机离子，尿常规，凝血检测，血常规等生化检测。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

**注意事项**

一、本报告未加盖本公司公章无效。

二、报告齐缝章不完整无效。

三、报告无批准人签字无效。

四、本报告涂改或缺页无效。

五、未经本公司书面允许，不得部分复制本报告（全文复制除外）。

六、若对检验报告有异议，应于收到报告之日起十五日内向本公司提出，逾期不予受理。

七、本公司只对本次检测样品负责，其检验检测数据、结果仅证明样品所检验检测项目的符合性。

八、不得使用本报告进行不当宣传。

九、本报告书一式两份，一份本公司存档，一份交委托单位。

检验机构：成都奥创生物科技有限公司

目录

[一、 实验简介 7](#_Toc28133)

[二、 实验仪器 7](#_Toc17889)

[三、 实验步骤 8](#_Toc15460)

[四、 结果分析 9](#_Toc4328)

[五、 参考文献 10](#_Toc4324)

# 实验简介

油红O对脂滴的染色机制一般认为是物理学上的溶液作用或吸附作用，借溶液作用使脂质染色，即油红O先溶于60%异丙醇中，然后切片浸入油红O染液中时，油红O在组织脂质的溶解度较60%异丙醇中的溶解度高，所以在染色时油红O从60%异丙醇中转移入脂质中使脂滴显示红色。

# 实验仪器、试剂耗材

3.1仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 冰冻切片机 | 达科为 | CT520 |
| 切片刀 | epredia | MX35 ULTRA |
| 分析软件 | Media Cybernetics, Inc.,Rockville, MD, USA | Image-pro plus 6.0 |
| 扫描仪 | 3D-HISTECH | Pannoramic MIDI II |

3.2试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| 油红O | 合肥巴斯夫生物科技有限公司 | Y0205-25G |
| 异丙醇 | 成都市科隆化学品有限公司 | 05.0010836A |
| 苏木素染液 | 赛维尔生物科技有限公司 | BL700B |
| 甘油明胶 | biosharp | BL1210A |
| 盐酸 | 成都市科隆化学品有限公司 | 05.001.1337A |
| 无水乙醇（AR） | |  | | --- | | 成都市科隆化学品有限公司 | | 05.001.0170A |
| 氨水 | |  | | --- | | 成都市科隆化学品有限公司 | | 05.001.2528A |

3.3耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| 粘附性载玻片 | 江苏世泰 | 80312/80302 |
| 显微镜盖玻片 | 江苏世泰 | 80340-1630 |

# 实验步骤

3.1组织保存

3.1 .1固定样本。剖取新鲜组织立即投入组织固定液内或者组织对应的特殊固定液内固定24h以上，常温保存运输。将组织从固定液取出用手术刀将目的部位组织修切平整。

3.1.2新鲜组织。剖取新鲜组织用滤纸或纱布吸干组织表面水份，液氮速冻15s转入-80°冰箱保存，干冰运输，保证样本到达实验室前全程在干冰内，组织不冻融。将组织从干冰内或-80°冰箱取出用手术刀将目的部位组织修切平整。

3.2 脱水。将修切好的固定组织放于15%的蔗糖溶液内4℃冰箱脱水沉底后转入30%的蔗糖溶液内4℃冰箱脱水沉底。新鲜组织无需脱水处理。

3.3 OCT包埋。将脱好水的组织取出用滤纸将表面水稍吸干后切面朝上放于包埋台上，组织周围滴上OCT包埋剂，将包埋台放在速冻台上快速冷冻包埋，OCT变白变硬后即可进行切片。新鲜组织直接冰冻切片则不需要固定脱水，直接用手术刀将目的部位组织修平整OCT包埋剂包埋切片。

3.4冰冻切片。将包埋台固定于切片机上，先粗切将组织面修切平整后即可开始切片，切片厚度6-10μm，将干净的载玻片平放于切出的组织片上方即可将组织贴于载玻片上。片子写好标签后-20℃保存备用。

3.5工作液配置。配置油红工作液。

3.6染色

3.6.1取出冰冻切片(切好的片子一般放置-20C保存)，常温晾干;

3.6.2轻轻取出切片，停留3s 后依次浸入2缸蒸留水中浸洗，各 10s；

3.6.3轻轻取出切片后浸入装有60%异丙醇的微波修复盒中浸染 2min;

3.6.4轻轻取出切片停留 3s 后浸入装有油红。工作液的微波修复盒中加盖浸染8min;

3.6.5轻轻取出切片，停留3s 后依次浸入两缸60%异丙醇分化，各3s、5s;

3.6.6切片依次轻轻浸入2缸蒸馏水中浸洗，各 10s;

3.6.7轻轻取出切片，停留 3s 后浸入苏木素染液染色 3min，轻轻取出切片，停留2s后浸入3缸蒸馏水浸洗，各 5s、10s、30s;

3.6.8轻轻取出切片，浸入1%盐酸乙醇(以60%乙醇为溶剂配制 1%盐酸乙醇)分化约1-2s(当盐酸乙醇使用一段时间后，可适当延长分化时间),将切片轻轻依次浸入2缸蒸馏水中浸洗，各 10s，将切片轻轻浸入0.5%氨水水溶液返蓝 1s，将切片轻轻浸入2缸自来水中浸洗，各 5s、10s，镜检染色效果;(此步骤中的蒸馏水全部用1L 塑料量杯盛装，使用过的蒸馏水不能再次使用;若细胞核着色过深，严重影响脂滴的观察时，可用 1%盐酸乙醇再次快速分化 1s，水洗，返蓝等常规操作，至细胞核着色清晰即可)

3.6.9染好色的切片浸泡在盛装自来水的微波修复盒中，等待封片;每次取出一张切片，用滤纸快速擦干组织周边多余水分，巴氏吸管吸取甘油明胶滴加适量(-般在半滴至一滴半之间)在切片边缘，盖玻片轻轻封固，一次性完成封片，不能来回抬压盖玻片挤压组织，脂滴移位严重;(当组织比较大时，滴加的甘油明胶量可适当增加，防止封片过程中产生气泡;当组织是主动脉瓣或者纯脂肪时，巴氏吸管吸取的甘油明胶需要轻轻滴加在组织上，防止封片过程中产生气泡)

3.7镜检。

# 结果分析

4.1图像采集

采用数字切片扫描仪/显微镜进行图像采集。每张切片先于低倍下观察全部组织，再分别选取3个视野采集400倍显微图像。苏木素染细胞核为蓝色，油红O染色呈红色。所有采图结果见附件。

**表1.染色图例**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| **（切片编号）\_400x1** | **（切片编号）xxx\_400x2** | **（切片编号）xxx\_400x3** |

4.2光密度测量

采用Image-ProPlus图像分析系统测定所采集全部图像积分光密度（IOD）表示；每例样本的积分光密度为3张图像的平均值。原始结果见附件。

**表2.积分光密度结果**

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 油红O |
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |

4.3结果分析

应用GraphPad Prism9统计分析软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA），数据以平均数±标准差（±SD）表示，并作图。

**表3.分析结果（平均数±标准差）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分组 | 数量（只） | 油红O |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |
| 4 |  |  |
| 5 |  |  |

**表4.分析结果（单因素方差分析）**

|  |
| --- |
| CHO |
| 油红O |

# 参考文献

1.Yasushi Horai;Tetsuhiro Kakimoto;Kana Takemoto;Masaharu Tanaka.Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software.2017

2.崔巍.王硕仁.朱陵群.平均光密度值分析法和阳性染色面积分析法在免疫荧光图像分析中的对比研究.2008.09

3.李枫.图像分析中光密度参数物理意义的正确理解和使用.