ttt

**免疫荧光三标-冰切实验**

**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，COIP,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，CBA多因子检测，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，免疫荧光，免疫组化,TUNEL，原位杂交染色,组织芯片，全景扫描等。

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，动物饲养，取材，手术。

**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、 样本信息 10](#_Toc30007)

[二、 实验简介 10](#_Toc18509)

[三、 实验仪器、试剂耗材 10](#_Toc11832)

[四、 实验步骤 11](#_Toc24439)

[五、 染色结果 13](#_Toc14486)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验简介

免疫荧光技术（Immunofluorescence technique ）又称[荧光抗体技术](https://baike.baidu.com/item/%E8%8D%A7%E5%85%89%E6%8A%97%E4%BD%93%E6%8A%80%E6%9C%AF/3713874?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)，是标记免疫技术中发展最早的一种。它是在[免疫学](https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E5%AD%A6/1299517?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)、[生物化学](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%8C%96%E5%AD%A6/466073?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)和[显微镜技术](https://baike.baidu.com/item/%E6%98%BE%E5%BE%AE%E9%95%9C%E6%8A%80%E6%9C%AF/2004225?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)的基础上建立起来的一项技术。很早以来就有一些学者试图将抗体分子与一些示踪物质结合，利用[抗原抗体反应](https://baike.baidu.com/item/%E6%8A%97%E5%8E%9F%E6%8A%97%E4%BD%93%E5%8F%8D%E5%BA%94/3715776?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)进行[组织](https://baike.baidu.com/item/%E7%BB%84%E7%BB%87/5105513?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)或细胞内[抗原物质](https://baike.baidu.com/item/%E6%8A%97%E5%8E%9F%E7%89%A9%E8%B4%A8/3271541?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/%E5%85%8D%E7%96%AB%E8%8D%A7%E5%85%89/_blank)的定位。

可用于研究细胞分子的定位，表达和功能，以及疾病的发生机制和诊断，用于检测细菌，病毒等微生物中的特定蛋白质，从而为疾病的诊断和治疗提供帮助。

# 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 | Thermo | Cryotome E |
| 微波炉 | 格兰仕微波炉电器有限公司 | P70D20TL-P4 |
| 脱色摇床 | 谷歌生物 | TSY-B |
| 涡旋混合器 | 谷歌生物 | MX-F |
| 掌上离心机 | 谷歌生物 | D1008E |
| 移液枪 | Dragon | KE0003087/KA0056573 |
| 组化笔 | Gene tech | GT1001 |
| 冰箱 | 青岛海尔股份有限公司 | BCD-192TGN |
| 荧光生物显微镜 | 广州市明美光电技术有限公司 | MF23-M |

3.2试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **厂家** | **货号** |
| OCT包埋剂 | 达科为 | CT520 |
| 无水乙醇（AR） | 成都科隆 | 05.001.0170A |
| 二甲苯（AR） | 成都科隆 | 05.001.0586A |
| EDTA（PH8.0)抗原修复液 | biosharp | BL618A |
| EDTA(PH9.0)抗原修复液 | biosharp | BL617A |
| 柠檬酸（PH6.0)抗原修复液 | biosharp | BL604A |
| 胰蛋白酶修复5X | bioss | C-0012 |
| PBS缓冲液 | servicebio | G0002 |
| 4%多聚甲醛 | biosharp | BL539A |
| 山羊血清 | 索莱宝 | SL038 |
| 一抗： | / | / |
| 二抗： | biosharp | / |
| DAPI | biosharp | BS097-10mg |
| 自发荧光淬灭剂B液 | / | / |

3.3耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **厂家** | **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 |
| 病理刀片 | epredia | MX35 ULTRA |

# 实验步骤

4.1冰冻切片固定，确定是新鲜组织冰切还是固定组织冰切，新鲜组织冰切不需要修复，固定组织冰切需要修复。冰冻切片室温晾干，置于4%多聚甲醛固定15min，于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.2抗原修复，确定是新鲜组织冰切还是固定组织冰切，新鲜组织冰切不需要修复，固定组织冰切需要修复。组织切片置于Tris-EDTA抗原修复缓冲液（PH9）/枸橼酸缓冲液(PH6)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复，中火8min至沸，停火8min保温再转中低火7min。自然冷却后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

胰蛋白酶修复：将切片画好组化圈平放于湿盒内（湿盒内加少量水防止抗体蒸发），加入配制好的胰蛋白酶修复液，放入37℃烘箱，20min，取出后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min，

高压PH6修复：将切片放入盛有枸橼酸缓冲液(PH6)修复液的高压锅中，修复液淹没切片，盖上锅盖加热至沸，根据切片组织和表达位置选择修复时间，关火自然冷却后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.3血清封闭，切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加5%山羊血清均匀覆盖组织，室温封闭30min。

4.4孵育第一个一抗，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°C孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 稀释比 | 品牌 | 货号 |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |

4.5孵育二抗，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二抗，室温50min,将玻片置于盛有PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.6TSA标记，向组织上滴加50-100ul TSA-FITC/CY3染色工作液，室温避光孵育10min，玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。

4.7抗原修复，组织切片置于Tris-EDTA抗原修复缓冲液（PH9）/枸橼酸缓冲液(PH6)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复，中火8min至沸，停火8min保温再转中低火7min。自然冷却后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

胰蛋白酶修复：将切片画好组化圈平放于湿盒内（湿盒内加少量水防止抗体蒸发），加入配制好的胰蛋白酶修复液，放入37℃烘箱，20min，取出后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

高压PH6修复：将切片放入盛有枸橼酸缓冲液(PH6)修复液的高压锅中，修复液淹没切片，盖上锅盖加热至沸，根据切片组织和表达位置选择修复时间，关火自然冷却后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.8血清封闭，切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加5%山羊血清均匀覆盖组织，室温封闭30min。

4.9孵育第二个和第三个一抗（异源一抗混合），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°C孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 稀释比 | 品牌 | 货号 |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |
| / | / | / | / |

4.10孵育二抗，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二抗，室温50min,将玻片置于盛有PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4.11孵育第二个和第三个二抗（异源二抗混合），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组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗（CY3/FITC标记）覆盖组织，室温孵育50min，避光，将玻片置于盛有PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 稀释比 | 品牌 | 货号 |
| / | / | / | / |

4.12DAPI复染细胞核，玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加DAPI染液，避光室温孵育5min。玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤4次，每次5min。

4.13免疫标记后的自发荧光淬灭；滴加组织自发荧光淬灭剂B液覆盖组织室温避光孵育5 min，流水冲洗3min。

4.14封片；切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

4.15镜检。

# 染色结果

切片于荧光显微镜下观察并采集图像。（DAPI紫外激发波长330-380nm，发射波长420nm，发蓝光；FITC激发波长465-495nm，发射波长515-555 nm，发绿光。CY3激发波长510-560，发射波长590nm，发红光。）