ttt

**免疫组化-石蜡**

**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

目录

[一、 实验简介 5](#_Toc9940)

[二、 实验仪器、试剂耗材 5](#_Toc25315)

[三、 实验步骤 6](#_Toc9751)

[四、 结果分析 7](#_Toc26960)

[五、 参考文献 8](#_Toc10307)

# 实验简介

免疫组化是免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)的简称，它是利用抗原抗体的特异性反应来定位组织和细胞中某种化学成分的一种组织化学方法。免疫组化能将形态学改变与功能和代谢变化结合起来，一方面保持了传统形态学对组织和细胞的观察客观、仔细的优点；另一方面克服了传统免疫学反应只能定性和定量，而不能定位的缺点。免疫组化技术以其特异性强、灵敏度高、定位准确等特点，已被广泛地应用于生物学和医学研究的许多领域。对疾病尤其是肿瘤的诊断、鉴别诊断及发病机制的研究提供了强有力的手段。

组织或细胞中凡是能作为抗原或半抗原，如蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、磷脂、受体、酶、激素、核酸及病原体等都可用相应的特异性抗体进行检测。最常用的是组织的石蜡切片、冰冻切片，再者就是活细胞爬片，将组织或细胞固定于载玻片上，进而进行实验。

# 实验仪器、试剂耗材

3.1仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 品牌 | 型号 |
| 组织脱水机 | 武汉俊杰电子 | JT-12S |
| 石蜡包埋机 | 武汉俊杰电子 | JB-L5 |
| 病理切片机 | 上海徕卡仪器 | RM2016 |
| 冻台 | 武汉俊杰电子 | JB-L5 |
| 组织摊片机 | 武汉俊杰电子 | JK-5/6 |
| 烤箱 | 绍兴泸越 | 101-3B |
| 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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 品牌 | 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 | / | / |
| 组化试剂盒DAB显色剂 | 中杉金桥 | ZLI-9018 |

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 |
| 组织包埋盒 | 江苏世泰 | 22022 |
| 病理刀片 | epredia | MX35 ULTRA |

# 实验步骤

3.1石蜡切片脱蜡至水，春夏秋：二甲苯I 10mins-二甲苯II 10mins-二甲苯III 10mins-无水乙醇I 5mins-无水乙醇II 5mins-95%乙醇 5mins-85%乙醇 5mins-75%乙醇 5mins-纯水 5mins。冬天：二甲苯每缸时间延长至15mins。

3.2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8mins至沸，停火8mins保温再转中低火7mins。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5mins。

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，20mins，取出后将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5mins，

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5mins。

3.3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30mins。

3.4孵育一抗，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）

3.5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5mins。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（HRP标记）覆盖组织，室温孵育50mins，玻片置于PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5mins。

3.6DAB显色，切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的DAB显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。

3.7复染细胞核，苏木素复染15s左右，自来水洗，1%的盐酸水分化数秒，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。

3.8脱水封片，将切片依次放入75%酒精5mins-85%酒精5mins-无水乙醇Ⅰ 5mins-无水乙醇Ⅱ 5mins-二甲苯Ⅰ 5mins-二甲苯Ⅱ 5mins-二甲苯Ⅲ 5mins ，中性树胶封片。

3.9镜检。

**表1.抗体列表**

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

# 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，DAB显出的阳性表达为棕黄色。所有采图结果见附件。

**表2.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的积分光密度（IOD）；每例样本的平均IOD为3张图像的平均IOD的平均值。原始结果见附件。

**表3.积分光密度结果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 指标名称 | 编号 | 指标名称 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

# 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.