ttt

**Masson染色测量分析报告**

**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、 样本信息 5](#_Toc5931)

[二、 实验简介 5](#_Toc25992)

[三、 实验仪器 5](#_Toc17260)

[四、 实验步骤 6](#_Toc7734)

[五、 图像采集 7](#_Toc11697)

1. **实验简介**

Masson三色染色又称马松染色，是结缔组织染色中最经典的一种方法，是胶原纤维染色权威而经典的技术方法。所谓三色染色通常是指染胞核和能选择性的显示胶原纤维和肌纤维。该法染色原理与阴离子染料分子的大小和组织的渗透有关：分子的大小由分子量来体现，小分子量易穿透结构致密、渗透性低的组织，而大分子量则只能进入结构疏松的、渗透性高的组织。然而，淡绿或苯胺蓝的分子量很大，因此Masson染色后肌纤维呈红色，胶原纤维呈绿色或蓝色，主要用于区分胶原纤维和肌纤维。

1. **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 |
| 正置光学显微镜 | Leica | DM500 |
| 数字切片扫描仪 | 3D-HISTECH | Pannoramic MIDI II |

3.2试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 品牌 | 货号 |
| 无水乙醇（AR） | 成都科隆 | 05.001.0170A |
| 二甲苯（AR） | 成都科隆 | 05.001.0586A |
| 冰醋酸 | 成都市科隆化学品有限公司 | / |
| 重铬酸钾 | 郑州派尼化学试剂厂 | 7778-50-9 |
| 丽春红2R | 阿拉丁 | [P104989-25g](https://www.aladdin-e.com/zh_cn/p104989.html) |
| 酸性品红BS | 阿拉丁 | [A104916-100g](https://www.aladdin-e.com/zh_cn/a104916.html) |
| 磷钼酸 | 天津奥普升化工有限公司 | / |
| 苯胺蓝，酸溶 | 阿拉丁 | A111200-100g |
| 中性树胶 | 上海懿洋 | YSQN41-91 |
| 正丁醇 | 成都科隆 | 05.001.0886A |

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 |

1. **实验步骤**

3.1组织固定。新鲜组织用固定液固定24h以上。将组织修平整，放于脱水盒内。

3.2组织脱水。将脱水盒放进组织脱水机依次脱水，75%酒精4h，85%酒精2h，90%酒精2h，95%酒精1h，无水乙醇I 30mins，无水乙醇II 30mins，醇苯5-10mins，二甲苯I 10mins，二甲苯II 10mins，蜡I 1h，蜡II 1h，蜡III 1h。

3.3组织包埋。将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋，贴上标签。

3.4石蜡切片。使用石蜡切片机切片，厚3μm。切片在摊片机40℃ 温水展平，烘箱60℃ 烤片。

3.5脱蜡至水。将切片依次放入二甲苯Ⅰ 15mins，二甲苯Ⅱ 15mins，二甲苯Ⅲ 15mins，无水乙醇Ⅰ 5mins，无水乙醇Ⅱ 5mins，95%酒精5mins，85%酒精5mins，75%酒精5mins，纯水5mins。

3.6重铬酸钾染色。切片进入2.5%重铬酸钾液中室温浸泡过夜（约15个小时）,自来水洗30 s至组织上黄色褪去即可。

3.7丽春红酸性品红染色。稍稍沥干切片上的多余水分，切片入丽春红酸性品红液浸染6 mins，此时组织呈现亮红色，如果红色过浅可适当延长染色时间，自来水冲洗至流下的水为无色。

3.8磷钼酸染色。切片稍微沥干水分（不能干片），入磷钼酸水溶液浸泡约1mins。此步为分化作用，分化到胶原纤维呈浅红色，纤维呈红色即可，可根据染色深浅需要自行分化的时间，一般1-2mins。

3.9苯胺蓝染色。磷钼酸之后不用水洗，直接入苯胺蓝染液染6-30S。

3.10分化。切片经连续三至五缸1%冰醋酸漂洗分化，毎缸8S左右。

3.11透明封片。切片经连续三缸无水乙醇依次脱水约3s，5s，5s，经二甲苯透明5mins，中性树胶封片。

3.12镜检。

1. **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。胶原纤维呈蓝色；肌纤维、纤维素和红细胞呈红色。所有采图结果见附件。

**表1.染色图例**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| **（切片编号）\_40.0x1** | **（切片编号）xxx\_40.0x2** | **（切片编号）xxx\_40.0x3** |

4.2面积测量

采用Image-ProPlus图像分析系统测定所采集全部图像面积和胶原阳性面积，并计算每张图像的CVF值；每例样本的平均CVF值为3张图像的平均值。原始结果见附件。

**2.平均CVF结果**

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

1. **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.