

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

免疫荧光双标实验报告 (TSA 法 石蜡切片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	常州市中威电子仪器有限公司	TSJ-SD
包埋机	常州市中威电子仪器有限公司	BMJ-A
病理切片机	赛默飞世尔科技有限公司	SHANDON FINESSE 325
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	常州市中威电子仪器有限公司	PHY-III
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
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
环保透明剂	同声科技	
10× 柠檬酸抗原修 复液 (pH6.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
10× EDTA 抗原修 复液 (pH9.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
30% H_2O_2	国药集团化学试剂有限公司	10011218
正常驴血清	AntGene	ANT051
正常山羊血清	武汉博士德生物工程有限公司	AR1009

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	厂家	货号
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
洗脱液	湖北百奥斯生物科技有限公司	
430-Tyramide	湖北百奥斯生物科技有限公司	
FITC-Tyramide	湖北百奥斯生物科技有限公司	
Cy3-Tyramide	湖北百奥斯生物科技有限公司	
Cy5-Tyramide	湖北百奥斯生物科技有限公司	
Cy7-Tyramide	湖北百奥斯生物科技有限公司	
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

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、石蜡切片脱蜡至水：依次于环保脱蜡剂(1)、环保脱蜡剂(2)、环保脱蜡剂(3)中分别脱蜡 10 分钟，然后经无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇各 5 分钟。蒸馏水洗 3 次，每次 3 分钟，然后浸洗。

2、抗原修复：根据实验条件选择合适的修复液及修复方式。

(1) 高温高压修复 (EDTA, pH9.0)：在高压锅中加入 EDTA (pH9.0) 抗原修

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

复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 1 分 30 秒，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(2) 高温高压修复（柠檬酸，pH6.0）：在高压锅中加入柠檬酸（pH6.0）抗原修复液，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子放电磁炉上加热至沸腾（电磁炉为 2100 瓦）。将脱蜡水化后的组织切片放入已沸腾的缓冲液中，盖紧盖子，稍停等气嘴顶起，加限压阀（调整电磁炉功率为 1200 瓦），待高压锅喷气后严格计时 2 分钟，然后停火。冷水冲淋高压锅，气压下降后打开锅盖，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

(3) 微波修复：在修复盒内加入抗原修复液（EDTA pH9.0 或柠檬酸 pH6.0），将脱蜡水化后的组织切片放入修复盒内，修复液的体积应浸过切片。虚盖盖子，将装有待修复切片的修复盒放入微波炉内，调整微波炉的功率至高火档位，时间设置为 3 分钟。第一轮修复结束后，将修复盒从微波炉内取出，待修复液自然冷却至室温（25-30°C，约 1 小时）后，再重复第一轮的修复操作，进行第二轮与第三轮修复（每次修复后冷却间隔时间约为 1 小时）。三次修复完成冷却后，再将切片从修复液中取出，蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 分钟。

3、阻断内源性过氧化物酶：浸洗完成后，将已修复完成的切片浸泡于 3% H_2O_2 中，室温避光阻断 30 分钟，蒸馏水浸洗。

4、画圈：组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。

5、封闭：滴加与二抗来源一致的 10%血清，37°C 孵育 30 分钟。

6、孵育第一种一抗：甩去血清，用 10%血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ 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。用 TBST 稀释二抗原液，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）二抗工作液，37°C 孵育 45 分钟。

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

TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

8、TSA 染色：甩去 TBST，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）酪胺盐工作液，避光室温孵育 10 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

9、洗脱：将切片置于盛满洗脱液的修复盒中，洗脱液应浸过切片，水浴 42 $^{\circ}$ C 洗脱 20 分钟。洗脱完成后，将切片从洗脱液中取出，TBST 浸洗 3 次，每次 3 分钟。

10、封闭：滴加与二抗来源一致的 10% 血清，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

11、孵育第二种一抗：甩去血清，用 10% 血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）一抗工作液，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

12、孵育二抗：第三天从冰箱拿出切片，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。用 TBST 稀释二抗原液，配制成二抗工作液，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）二抗工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

13、TSA 染色：甩去 TBST，每张切片滴加 50-100 μ l（视组织大小而定）酪胺盐工作液，避光室温孵育 10 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。

14、染核：除去 TBST，每张切片滴加 50-100 μ 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。

15、封片：用荧光封片剂封片，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

16、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，430 通道阳性为青色，FITC 通道为绿色，Cy3 通道阳性为橙红色，Cy5 通道阳性为紫红色，Cy7 通道为近红外。