

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 细胞爬片)**

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
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)股份有限公司	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
Triton® X-100 破膜液	BioFroxx	1139ML100
10×柠檬酸抗原修复液 (pH6.0)	湖北百奥斯生物科技有限公司	
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
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
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

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

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、细胞爬片固定：**未经固定的细胞用 4%多聚甲醛固定 10 分钟。已固定的细胞室温放置 10 分钟，蒸馏水洗。用组化笔在爬片边缘画圈。
- 2、破膜：**用 0.1%Triton®X-100 破膜 15 分钟。TBST 洗 3 次，每次 5 分钟。
- 3、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10%血清，37°C孵育 30 分钟。
- 4、孵育一抗：**除去血清，用 10%血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张爬片滴加 50-100µl（视细胞爬片大小而定）一抗工作液，4°C孵育过夜。
- 5、孵育二抗：**第二天从冰箱拿出爬片，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，每张爬片滴加 50-100µl（视细胞爬片大小而定）二抗工作液，37°C孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。
- 6、TSA 染色：**除去 TBST，每张爬片滴加 50-100µl（视细胞爬片大小而定）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。
- 7、洗脱：**于爬片上滴加柠檬酸抗原修复液（pH6.0），烘箱内 60°C洗脱 1 小时。洗脱完后，TBST 浸洗 3 次，每次 5 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

---

- 8、**封闭**：滴加与二抗来源一致的 10%血清，37°C 孵育 30 分钟。
- 9、**孵育第二种一抗**：除去血清，用 10%血清稀释一抗原液，配制成一抗工作液，每张爬片滴加 50-100 $\mu$ l（视细胞爬片大小而定）一抗工作液，4°C 孵育过夜。
- 10、**孵育二抗**：第三天从冰箱拿出爬片，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，每张爬片滴加 50-100 $\mu$ l（视细胞爬片大小而定）二抗工作液，37°C 孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。
- 11、**TSA 染色**：除去 TBST，每张爬片滴加 50-100 $\mu$ l（视细胞爬片大小而定）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。
- 12、**染核**：除去 TBST，每张爬片滴加 50-100 $\mu$ l（视细胞爬片大小而定）DAPI 工作液（用 DAPI 原液 1:500 配制），避光染核 5 分钟后，用 TBST 冲洗。
- 13、**封片**：用荧光封片剂封片，4°C 避光保存。
- 14、**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。

### 四、注意事项

- 1、冲洗时不应直接将 TBST 对准爬片，应将喷壶嘴对准孔板壁让水顺板壁流下，避免将爬片上的细胞冲洗掉。
- 2、实验过程中注意做好标记，在培养皿侧面画上标记，避免将爬片弄混，每个孔的爬片、孔板与孔板盖都应做好标记。