

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

**免疫荧光三标实验报告 (TSA 法 冰冻切片)**

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
冰冻切片机	赛默飞世尔科技有限公司	HM525NX
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
OCT 包埋剂	日本樱花	4583
Triton® X-100 破膜液	BioFroxx	1139ML100
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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
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

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
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

- 冰冻切片固定：**冰冻切片室温晾干，常规固定，于蒸馏水洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- 抗原修复：**冰冻切片常规不修复，特殊情况可选择性的进行抗原修复。
- 画圈：**组化笔画圈后，将切片置于 TBST 中。
- 破膜：**用 0.1% Triton®X-100 破膜 15 分钟。TBST 洗 3 次，每次 5 分钟。
- 阻断内源性过氧化物酶：**将切片浸泡于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中，室温避光阻断 20 分钟，蒸馏水浸洗后，浸泡于 TBST 中。
- 封闭：**滴加与二抗来源一致的 10% 血清，37°C 孵育 30 分钟。
- 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 50-100μl（视组织大小而定）一抗工作液，4°C 孵育过夜。
- 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 50-100μl（视组织大小而定）二抗工作液，37°C 孵育 45 分钟。

**湖北百奥斯 (Bioosci) 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。

**9、TSA 染色：**甩去 TBST，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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。

**10、洗脱：**切片上滴加洗脱液，于烘箱内 37 $^{\circ}$ C 洗脱 45 分钟。洗脱完后，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

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

**12、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 $\mu$ l（视组织大小而定）一抗工作液，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

**13、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 $\mu$ 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。

**14、TSA 染色：**甩去 TBST，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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。

**15、洗脱：**切片上滴加洗脱液，于烘箱内 37 $^{\circ}$ C 洗脱 45 分钟。洗脱完后，TBST 浸洗 3 次，每次 5 分钟。

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

**17、孵育第三种一抗：**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 $\mu$ l（视组织大小而定）一抗工作液，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

**18、孵育二抗：**第四天从冰箱拿出切片，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 $\mu$ 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。

**19、TSA 染色：**甩去 TBST，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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。

**20、染核：**除去 TBST，每张切片滴加 50-100 $\mu$ 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。

**21、封片：**用荧光封片剂封片，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

**22、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。

百奥斯生物 | 长衍病理