

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

免疫荧光单标实验报告 (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 |
| 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   |

3、抗体信息

湖北省武汉市江宁区江兴路18号2号楼第5、6层

Tel: 400 118 0100

Website: [www.biossci.com](http://www.biossci.com)

Fax: +86-027-87382710

E-mail: [support@biossci.com](mailto:support@biossci.com)

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

(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℃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℃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℃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、染核：**除去 TBST，每张爬片滴加 50-100μl（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。
- 8、封片：**用荧光封片剂封片，4℃避光保存。
- 9、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。