

石蜡切片荧光 tunel+免疫荧光 TSA 双标实验报告

一、实验原理

酪酰胺信号放大(TSA)技术是一类利用辣根过氧化酶(HRP)对靶蛋白进行标记的酶学检测方法,类似常规免疫组化的 DAB 显色方法。TSA 技术同样采用 HRP 标记的二抗,同样有对应的"显色"步骤 HRP 催化加入反应体系的酪胺荧光素底物,产生活化荧光底物,活化底物可与抗原上的酪氨酸等残基共价结合,使样品上稳定的共价结合酪胺荧光素。之后用热修复法洗去非共价结合的一抗-二抗-HRP 复合物,重复下一种一抗-hrp 二抗来进行第二轮孵育,如此往复就可实现多重标记。

当细胞凋亡时,染色体 DNA 双链断裂而产生大量的粘性 3'-OH 末端,可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下,将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'-末端,从而可进行凋亡细胞的检测 (TUNEL 法)。二者顺序标记的结果。

二、实验器材及试剂

1、实验器材

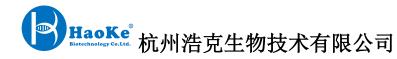
名称	厂家	型号
脱水机	武汉俊杰电子有限公司	JT-12S
生物组织自动包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
转轮式切片机	徕卡显微系统上海有限公司	HistoCoreBIOCUT
石蜡包埋机 (冷台)	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	武汉俊杰电子有限公司	JK-5
烤箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司	GFL125

地址:浙江省杭州市凤起路 43 号 308

电话: 13968143408

网址: www.haokebio.com

邮箱: 2235184086@qq.com



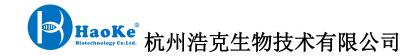
盖玻片	江苏汇达医疗器械有限公司	710510
载玻片	海门市神鹰实验仪器厂	188109
微波炉	美的	M1-L213B
脱色摇床	武汉赛维尔生物科技有限公司	SYC-Z100
涡旋仪	武汉赛维尔生物科技有限公司	MX-F2
掌上离心机	武汉赛维尔生物科技有限公司	DS-S 100
移液枪	Dragon	KE003068
组化笔	Gene tech	GT1001
荧光显微镜	NIKON	ECLIPSE C1
3D 扫描仪	3D HISTECH	Pannoramic SCAN

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	杭州宏达化工仪器有限公司	SJ003614
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
PBS 缓冲液	杭州浩克生物技术有限公司	HK0002
BSA 牛血清白蛋白	杭州浩克生物技术有限公司	HKW2084
Flare570 红	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0015
DAPI	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0005
抗荧光淬灭封片剂	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0007-1
AF488Tunel 试剂盒	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0010
EDTA 修复液(PH8.0)	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0003
<mark>一抗</mark>		
二抗: HRP 超敏山羊抗兔鼠	杭州浩克生物技术有限公司	HKI0029
通用二抗		11X10027

地址: 浙江省杭州市凤起路 43 号 308 网址: www.haokebio.com

电话: 13968143408 邮箱: 2235184086@qq.com



三、实验步骤

- 1. 石蜡切片脱蜡至水: 依次将切片放入二甲苯I 12 min—二甲苯II 12min—无水乙醇 I 6min—95%酒精 6 min—85%酒精 6 min—蒸馏水洗(冬天脱蜡时间稍微延长)。
- 2. 抗原修复: 组织切片置于盛满 EDTA 修复液 (PH8.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,中火 8min 停火 8min 中低火 7min,此过程中应防止缓冲液过度蒸发,切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次 5min。
- 3. 阻断内源性过氧化物酶: 切片加上 3%的双氧水,室温孵育 25min,将玻片置 PBS (PH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。
- 4. 血清封闭: 在组化圈内滴加 3%BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min 以上。
- 5. **画圈:**用组化专用的组化笔沿着组织外围轮廓画一个与组织间隔 3-4 毫米的小圈,然后加入足量的 PBS 保证后续依次加入的封闭血清,一抗,二抗,以及显色剂能完全覆盖组织,而不沿着玻片流走。
- **6. 加一抗:** 切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈(防止抗体流走),在圈内滴加按一定比例稀的抗体覆盖组织。切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。
- 7. 加二抗: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗覆盖组织,避光室温孵育 50min。
- **8. 信号放大:** 将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。 滴加相对应颜色 Flare 信号放大试剂,3-5min.将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。
- 9. **修复**:组织切片置于盛满 EDTA 修复液(PH8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,中火 8min 停火 8min 中低火 7min,此过程中应防止缓冲液过度蒸发,切勿干片。自然冷却后将玻片置于纯水中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。

地址: 浙江省杭州市凤起路 43 号 308 网址: www.haokebio.com

电话: 13968143408 邮箱: 2235184086@qq.com



- **10.** 加试剂 tunel 工作液:按片子数量和组织大小取 tunel 试剂盒内适量试剂 TdT 酶和反应液试剂 1:50 混合,加到圈内覆盖组织,切片平放于湿盒内,37℃恒温箱孵育 1.5 小时,湿盒内加少量水保持湿度。
- **11. DAPI 复染细胞核:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 8min。
- **12. 封片:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- **13. 镜检拍照**:切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像,根据对应波长选择相应通道。

四、结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,如试剂盒为 488 标记,阳性凋亡细胞核为绿色,一抗标记的阳性细胞为红色。(具体荧光通道参考下表)。

Flare 染料	激发波长	发射波长
DAPI 蓝色	350	420
Flare480 青绿	450	480
Flare520 绿	490	520
Flare570 红	550	570
Flare620 橙	590	620
Flare690 粉	630	690
Flare780 红外	750	780

五、注意事项

1. 实验过程中切片勿干片;

2. 实验操作中小心枪头挂伤组织;

3. 做 tunel 之前需要洗脱上一轮的一抗二抗建议使用加热修复。

地址:浙江省杭州市凤起路 43 号 308 网址:www.haokebio.com

电话: 13968143408 邮箱: 2235184086@qq.com