

## 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

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
<b>一抗</b>		
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		

### 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°C 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。



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。