石蜡切片五标六色免疫荧光实验报告

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	俊杰电子有限公司	JJ-12J
包埋机	俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徕卡仪器有限公司	RM2016
冻台	俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	上海慧泰仪器制造有限公司	DHG-9140A
载玻片	陕西依科生物技术服务有限公司	YK116
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
微波炉	美的微波电器制造有限公司	MM823LA6-NS
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	福州迈新	PEN-0002
正置显微镜	日本尼康	ci-s
扫描仪（白光）	日本滨松	NanoZoomer-SQ
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

2. 主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009218
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023428
抗原修复液柠檬酸（PH6.0)	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2430
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司	BF002
BSA	BioFROXX	EZ2811C238
一抗	客户提供	
多重免疫荧光（五标六色试剂盒）	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2336
抗荧光淬灭剂	陕西依科生物技术服务有限公司	YK2256
DAPI	MCE	HY-D0814

二、同源免疫荧光染色技术原理及实验步骤

技术原理

主要原理是基于酪胺信号放大(TSA,Tyramide signal amplification),以下简称 TSA 技术。TSA 技术主要原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应(即荧光标记的酪胺盐在 HRP 催化 H2O2 下形 成共价键结合位点），产生大量的酶促反应，该产物能与周围的蛋白残基（包括色氨酸、组氨酸、酪 氨酸残基）结合，在抗原-抗体结合部位形成大量的荧光素沉积，实现信号放大。还可以通过多次重复免疫标记，使用不同的荧光酪胺实现多重荧光染色。

实验步骤

1. **石蜡切片脱蜡至水：**依次将切片放入二甲苯Ⅰ20min-二甲苯Ⅱ20min-无水乙醇Ⅰ5min-无水乙醇Ⅱ5min-75%酒精 5min，自来水洗；
2. **抗原修复:** 组织切片置于盛有抗原修复液的高压锅内进行抗原修复,喷气计时 2.5min，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. **灭活:** 0.3%甲醇过氧化氢灭活 15min，PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 6min；
4. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5%BSA，室温封闭 1h；
5. **加一抗** 轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
6. **加对应 HRP 标记的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属标记的 HRP 二抗覆盖组织，室温孵育 50min；
7. **加对应的 tsa 染料：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA，避光室温孵育 10min. 孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床 上洗涤 3 次，每次 8min；
8. **抗体洗脱：**组织切片置于盛有抗原修复液的高压锅内进行抗原修复，（修复液要与第一次的一致）喷气计时 2.5min， 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；
9. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5%BSA，室温封闭 1h；
10. **加第二种一抗:** 轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的第二种一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；

11. **加对应 HRP 标记的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属标记的 HRP 二抗覆盖组织，室温孵育 50min；
12. **加对应的 tsa 染料：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA(和第一次标记的荧光颜色要区分开），避光室温孵育 10min. 孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min；
13. **抗体洗脱：**组织切片置于盛有抗原修复液的高压锅内进行抗原修复，（修复液要与第一次的一致）喷气计时 2.5min， 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；
14. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5%BSA，室温封闭 1h
15. **加第三种一抗：**轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的第二种一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
16. **加对应 HRP 标记的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属标记的 HRP 二抗覆盖组织，室温孵育 50min；
17. **加对应的 tsa 染料：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA(和前两次标记的荧光颜色要区分开），避光室温孵育 10min. 孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min；
18. **抗体洗脱：**组织切片置于盛有抗原修复液的高压锅内进行抗原修复，（修复液要与第一次的一致）喷气计时 2.5min， 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；
19. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5%BSA，室温封闭 1h
20. **加第四种一抗：**轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的第二种一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
21. **加对应 HRP 标记的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属标记的 HRP 二抗覆盖组织，室温孵育 50min；

22. **加对应的 tsa 染料：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA(和前两次标记的荧光颜色要区分开），避光室温孵育 10min. 孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min；
23. **抗体洗脱：**组织切片置于盛有抗原修复液的高压锅内进行抗原修复，（修复液要与第一次的一致）喷气计时 2.5min， 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；
24. **BSA 或者血清封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5%BSA，室温封闭 1h
25. **加第五种一抗：**轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的第二种一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
26. **加对应 HRP 标记的二抗：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属标记的 HRP 二抗覆盖组织，室温孵育 50min；
27. **加对应的 tsa 染料：**玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA(和前两次标记的荧光颜色要区分开），避光室温孵育 10min. 孵育完后，玻片置于 PBS 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 8min；
28. **DAPI 染核:**滴加DAPI，室温孵育 10min，之后玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 6min；
29. **封片：**抗荧光淬灭剂封片；
30. **镜检拍照：**切片于荧光显微镜下观察并采集图像。（DAPI 紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm，发蓝光；TYR-480（天蓝色）激发波长 450，发射波长 480；TYR-520（绿色 FITC）激发波长 490，发射波长 520;TYR-570(红色 cy3）激发波长 550，发射波长 570；TYR-620（黄色 594）激发波长 590，发射波长 620；TYR-690（粉色 cy5.5）激发波长 630，发射波长 690）。

三、**染色结果判读：**DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为相应荧光素标记的颜色。

染料	激发波长	发射波长
DAPI 蓝色	350	420
TYR-480	450	480
TYR-520绿色	490	520
TYR-570红色	550	570
TYR-620	590	620
TYR-690	630	690