



石蜡切片荧光六标染色实验报告

1. 实验器材及试剂

1.1 实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	意大利迪佩斯 (DIPATH)	Donatello
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司	RM2016
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江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
冰箱	青岛海尔股份有限公司	BCD-192TGN
载玻片	上海希柏徠生物科技有限公司	G6012
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
微波炉	格兰仕微波炉电器有限公司	P70D20TL-P4
避光湿盒	上海希柏徠生物科技有限公司	SIB-20F
抗原修复盒	上海希柏徠生物科技有限公司	WGXFHA0008
钟摆摇床	上海希柏徠生物科技有限公司	SYC-Z100
涡旋混合器	上海希柏徠生物科技有限公司	MV-100
掌上离心机	上海希柏徠生物科技有限公司	MS6000
移液器	上海希柏徠生物科技有限公司	SPIP
组化笔	上海希柏徠生物科技有限公司	G6100
正置荧光显微镜	日本尼康	NIKON ECLIPSE C1
扫描仪	3DHISTECH	Pannoramic MIDI





1.2 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	100092183
环保型脱蜡液	上海希柏徕生物科技有限公司	G1128
柠檬酸抗原修复液 (PH6.0)	上海希柏徕生物科技有限公司	G1202
EDTA 抗原修复液 (PH9.0)	上海希柏徕生物科技有限公司	G1203
EDTA 抗原修复液 (PH8.0)	上海希柏徕生物科技有限公司	G1206
PBS 缓冲液	上海希柏徕生物科技有限公司	G0002
组织自发荧光淬灭剂	上海希柏徕生物科技有限公司	G1221
牛血清白蛋白 BSA	上海希柏徕生物科技有限公司	GC305010
兔血清	上海希柏徕生物科技有限公司	G1209
3%过氧化氢消毒液	安捷高科	
DAPI 染色试剂	上海希柏徕生物科技有限公司	G1012
抗荧光淬灭封片剂	上海希柏徕生物科技有限公司	G1401
无菌 PBS	上海希柏徕生物科技有限公司	G4250
TBST	上海希柏徕生物科技有限公司	G0004
免疫染色抗体洗脱液	上海希柏徕生物科技有限公司	G1266

1.3 抗体信息及修复条件

抗原修复条件	一抗名称	一抗货号	一抗厂家	一抗种属	一抗稀释比	对应的二抗名称	对应的TSA

(备注: 抗体加样顺序按照抗体书写顺序, 二抗及 TSA 货号, 厂家及稀释比见下方附表)

2. 实验步骤

2.1 石蜡切片脱蜡至水: 依次将石蜡切片放入环保型脱蜡液 (G1128) I 10min-环保型脱蜡液 (G1128) II 10min-环保型脱蜡液 (G1128) III 10min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-无水乙醇 III 5min-蒸馏水洗。



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术, 光谱成像, 自动化采集及智能分析的全套解决方案!

地址: 上海市奉贤区平庄西路1599号
电话: 18062456473/18621529881

邮箱: maliwenlin@163.com
微信: XBL-FuHao



- 2.2 抗原修复：修复条件详见上表。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 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min (修复液种类和修复条件根据组织来确定，优先推荐 G1202 PH 6.0 柠檬酸修复液)。
- 2.3 画圈，双氧水封闭：切片稍甩干后用免疫组化笔 (G6100) 在组织周围画圈 (防止试剂流走)，切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 滴加 3% 双氧水溶液，室温避光孵育 25 min 左右，封闭内源性过氧化物酶。将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.4 血清封闭：切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 滴加血清室温封闭 30min。一抗是山羊来源用 10% 兔血清封闭 (G1209)，一抗其它来源的用 3% BSA (GC305006) 封闭。
- 2.5 加第一种一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用无菌 PBS (G4250) 按一定比例配好的一抗，切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 内 4° C 孵育过夜 (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- 2.6 加对应种属 HRP 标记二抗：将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后平放于避光湿盒 (SIB-20F) 在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温孵育 50min。
- 2.7 加对应的 TSA：将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 在圈内滴加对应的 tsa，避光室温孵育 10min。孵育完后，将玻片置于 TBST (G0004) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.8 抗体洗脱：切片稍甩干后，滴加免疫染色抗体洗脱液 ([G1266](#)) 铺满整个组织，室温孵育 5min 后去除抗体洗脱液，再次滴加足量的免疫染色抗体洗脱液完全覆盖组织，37° C 孵育 30 min，孵育完成后将玻片置于 TBST (G0004) 中在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.9 血清封闭：切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 滴加血清室温封闭 30min。一抗是山羊来源用 10% 兔血清封闭 (G1209)，一抗其它来源的用 3% BSA (GC305006) 封闭。
- 2.10 加第二种一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用无菌 PBS (G4250) 按一定比例配好的一抗，切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 内 4° C 孵育过夜 (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- 2.11 加对应种属 HRP 标记二抗：将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 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 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温孵育 50min。
- 2.12 加对应的 TSA：将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 在圈内滴加对应的 tsa，避光室温孵育 10min。孵育完后，将玻片置于 TBST (G0004) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.13 抗体洗脱：切片稍甩干后，滴加免疫染色抗体洗脱液 ([G1266](#)) 铺满整个组织，室温孵育 5min 后去除抗体洗脱液，再次滴加足量的免疫染色抗体洗脱液完全覆盖组织，37° C 孵育 30 min，孵育完成后将玻片置于 TBST (G0004) 中在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
- 2.14 血清封闭：切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 滴加血清室温封闭 30min。一抗是山羊来源用 10% 兔血清封闭 (G1209)，一抗其它来源的用 3% BSA (GC305006) 封闭。
- 2.15 加第三种一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用无菌 PBS (G4250) 按一定比例配好的一抗，切片平放于避光湿盒 (SIB-20F) 内 4° C 孵育过夜 (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- 2.16 对应的 HRP 标记的二抗：将玻片置于 PH7.4 PBS (G0002) 中在钟摆摇床 (SYC-Z100)





上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温孵育 50min。

2.17 加对应的 TSA：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内滴加对应的 tsa，避光室温孵育 10min。孵育完后，将玻片置于 TBST（G0004）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.18 抗体洗脱：切片稍甩干后，滴加免疫染色抗体洗脱液（G1266）铺满整个组织，室温孵育 5min 后去除抗体洗脱液，再次滴加足量的免疫染色抗体洗脱液完全覆盖组织，37° C 孵育 30 min，孵育完成后将玻片置于 TBST（G0004）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.19 血清封闭：切片平放于避光湿盒（SIB-20F）滴加血清室温封闭 30min。一抗是山羊来源用 10%兔血清封闭（G1209），一抗其它来源的用 3%BSA（GC305006）封闭。

2.20 加第四种一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用无菌 PBS（G4250）按一定比例配好的一抗，切片平放于避光湿盒（SIB-20F）内 4° C 孵育过夜（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

2.21 加对应种属 HRP 标记二抗：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）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 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温孵育 50min。

2.22 加对应的 TSA：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内滴加对应的 tsa，避光室温孵育 10min。孵育完后，将玻片置于 TBST（G0004）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.23 抗体洗脱：切片稍甩干后，滴加免疫染色抗体洗脱液（G1266）铺满整个组织，室温孵育 5min 后去除抗体洗脱液，再次滴加足量的免疫染色抗体洗脱液完全覆盖组织，37° C 孵育 30 min，孵育完成后将玻片置于 TBST（G0004）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.24 血清封闭：切片平放于避光湿盒（SIB-20F）滴加血清室温封闭 30min。一抗是山羊来源用 10%兔血清封闭（G1209），一抗其它来源的用 3%BSA（GC305006）封闭。

2.25 加第五种一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用无菌 PBS（G4250）按一定比例配好的一抗，切片平放于避光湿盒（SIB-20F）内 4° C 孵育过夜（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

2.26 加对应种属 HRP 标记二抗：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）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 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温孵育 50min。

2.27 加对应的 TSA：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内滴加对应的 tsa，避光室温孵育 10min。孵育完后，将玻片置于 TBST（G0004）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.28 DAPI 复染细胞核：切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内滴加 DAPI 染液（G1012），避光室温孵育 10min。将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

2.29 自发荧光淬灭：切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒（SIB-20F）在圈内加入自发荧光淬灭剂（G1221）5min，流水冲洗 10min。

2.30 封片：将玻片置于 PH7.4 PBS（G0002）中在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术，光谱成像，自动化采集及智能分析的全套解决方案！

地址：上海市奉贤区平庄西路1599号
电话：18062456473/18621529881

邮箱：maliwenlin@163.com
微信：XBL-FuHao



每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂（G1401）封片。

2. 31 采集图像:各种荧光素颜色及激发与发射波长见下表,可进行对应波长的光谱或荧光滤片成像。推荐在我司进行切片全景扫描。

TSA 试剂盒 荧光染料类型	货号	激发波长 /nm	发射波长 /nm	荧光 双标	荧光 三标	荧光 四标	荧光 五标	荧光 六标
DAPI	G1012	359	457	√	√	√	√	√
iF440-Tyramide	G1250	434	480			√	√	√
iF488-Tyramide	G1231	491	516	√	√	√	√	√
iF546-Tyramide	G1251	541	557				√	√
iF555-Tyramide	G1233	557	570	√	√	√		
iF594-Tyramide	G1242	588	604				√	√
iF647-Tyramide	G1232	656	670		√	√		√
iF700-Tyramide	G1252	690	713				√	
iF750-Tyramide	G1258	757	779					√
希柏徠TSA 试剂盒光谱数据及希柏徠扫描仪推荐搭配方式								

3. 技术原理介绍:

免疫荧光五标即利用酪胺信号放大（TSA, Tyramide signal amplification）即 TSA 技术,在同一张切片上对五种蛋白同时进行标记,从而可实现对多种蛋白空间定位,定性及半定量分析。

TSA 技术主要原理为荧光标记的酪胺在二抗上偶联的 HRP 与 H₂O₂ 的作用下变为活化的酪胺并附着在靶标周围的蛋白酪氨酸残基上,此结合是共价结合。而一抗与靶标、二抗与一抗之间是非共价结合。通过免疫染色抗体洗脱液处理,非共价结合的一抗二抗被打断并洗脱掉,而共价结合的荧光酪胺依然附着在靶标周围,将靶标通过荧光标记显示出来。在检测第二个靶标时,相当于全新的一轮标记,无需考虑第二轮的抗体是否与第一轮抗体产生交叉反应。只需改变不同种类荧光染料标记 TSA 即可实现多个靶标的标记。通过多次重复免疫标记,使用不同的荧光酪胺实现双重或多重荧光染色。

附表

二抗及 TSA 名称	货号	厂家	稀释比
CY3 标记山羊抗兔 IgG	GB21303	XBL	1:300
CY3 标记山羊抗小鼠 IgG	GB21301	XBL	1:300
CY3 标记山羊抗大鼠 IgG	GB21302	XBL	1:300
CY3 标记驴抗山羊 IgG	GB21404	XBL	1:300
CY3 标记驴抗小鼠 IgG	GB21401	XBL	1:300
CY3 标记驴抗兔 IgG	GB21403	XBL	1:300



希柏徠生物致力于组织原位多标分析技术,光谱成像,自动化采集及智能分析的全套解决方案!

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com
微信:XBL-FuHao



上海希柏徕生物科技有限公司

Shanghai Ciberlife Biotechnology Co., Ltd.

Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG	GB25303	XBL	1:400
Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG	GB25301	XBL	1:400
CY5 标记山羊抗小鼠 IgG	GB27301	XBL	1:400
CY5 标记山羊抗兔 IgG	GB27303	XBL	1:400
HRP 标记兔抗山羊 IgG	GB23204	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	GB23301	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗大鼠 IgG	GB23302	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗兔 IgG	GB23303	XBL	1:500
HRP 标记驴抗山羊 IgG	GB23404	XBL	1:500
FITC 标记驴抗山羊 IgG	GB22404	XBL	1:200
FITC 标记山羊抗大鼠 IgG	GB22302	XBL	1:200
FITC 标记驴抗兔 IgG	GB22403	XBL	1:200
FITC 标记驴抗小鼠 IgG	GB22401	XBL	1:200
Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG	111-585-003	Jackson	1:400
Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG	115-585-003	Jackson	1:400
iF440-Tyramide	G1250	XBL	1:500
iF488-Tyramide	G1231	XBL	1:500
iF546-Tyramide	G1251	XBL	1:500
iF555-Tyramide	G1233	XBL	1:500
iF594-Tyramide	G1242	XBL	1:500
iF647-Tyramide	G1232	XBL	1:500
iF700-Tyramide	G1252	XBL	1:800
iF750-Tyramide	G1258	XBL	1:500

仅供科研用途，不可用于临床诊断！



希柏徕生物致力于组织原位多标分析技术，光谱成像，自动化采集及智能分析的全套解决方案！

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com
微信:XBL-FuHao