



## 细胞爬片四标实验报告

### 1. 实验器材及试剂

#### 1.1 实验器材

| 名称      | 厂家            | 型号               |
|---------|---------------|------------------|
| 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        |
| 脱色摇床    | 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       |
|-------------|---------------|----------|
| PBS 缓冲液     | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G0002    |
| 破膜液         | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G1204    |
| 牛血清白蛋白 BSA  | 上海希柏徠生物科技有限公司 | GC305010 |
| 兔血清         | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G1209    |
| 3% $H_2O_2$ | 安捷高科          |          |
| DAPI 染色试剂   | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G1012    |
| 抗荧光淬灭封片剂    | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G1401    |
| 无菌 PBS      | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G4250    |
| TBST        | 上海希柏徠生物科技有限公司 | G0004    |
| 免疫染色抗体洗脱液   | 上海希柏徠生物科技有限公司 | 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)



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



## 2. 实验步骤

**2.1 细胞破膜:** 经过固定后的细胞爬片, 先轻轻去除孔板中的固定液, 然后加入 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。去除孔板中的 PBS 后每孔加入约 500  $\mu$ L 的破膜液 ([G1204](#)), 室温孵育 20 min。之后用 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。(如果是膜蛋白染色, 则不做破膜处理)

**2.2 双氧水封闭:** 去除孔板中的 PBS 后每孔加入约 500  $\mu$ L 的 3% 双氧水溶液, 室温避光孵育 25 min, 之后用 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.3 画圈, 血清封闭:** 去除孔板中的 PBS, 将爬片稍甩干后用组化笔沿着爬片边缘画圈 (防止试剂流失), 画完圈待圈干后用 PBS (G4250) 润洗一遍, 之后向圈内滴加 3% BSA 或血清室温封闭 30 min, 具体根据一抗及二抗种属决定封闭试剂。

**2.4 加第一种一抗:** 轻轻甩掉封闭血清后, 向细胞孔板里滴加按一定比例配制好的一抗, 细胞培养板平放于湿盒内 4°C 孵育过夜。(湿盒底部加少量水防止抗体蒸发)

**2.5 加对应的 HRP 标记的二抗:** 去除爬片中的一抗后, 用 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。去除 PBS 后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖细胞, 室温孵育 50 min。

**2.6 加对应的 TSA:** 爬片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA, 避光室温孵育 10 min。孵育完后, 爬片置于 TBST 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.7 抗体洗脱:** 将孔板中的 PBS 去除干净后将恢复至室温的抗体洗脱液铺满整个爬片, 室温孵育 5 min 后去除抗体洗脱液, 再次滴加足量的抗体洗脱液完全覆盖细胞, 37°C 孵育 30 min, 孵育完成后去除抗体洗脱液, 之后用 TBST ([G2150](#)) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.8 加第二种一抗:** 滴加 PBS 按一定比例配好的一抗, 4°C 孵育过夜。

**2.9 加对应的 HRP 标记的二抗:** 去除爬片中的一抗后, 用 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。去除 PBS 后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖细胞, 室温孵育 50 min。

**2.10 加对应的 TSA:** 爬片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA, 避光室温孵育 10 min。孵育完后, 爬片置于 TBST 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.11 抗体洗脱:** 将孔板中的 PBS 去除干净后将恢复至室温的抗体洗脱液铺满整个爬片, 室温孵育 5 min 后去除抗体洗脱液, 再次滴加足量的抗体洗脱液完全覆盖细胞, 37°C 孵育 30 min, 孵育完成后去除抗体洗脱液, 之后用 TBST ([G2150](#)) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.12 加第三种一抗:** 滴加 PBS 按一定比例配好的一抗, 4°C 孵育过夜。

**2.13 加对应的 HRP 标记的二抗:** 去除爬片中的一抗后, 用 PBS (G4250) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。去除 PBS 后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖细胞, 室温孵育 50 min。

**2.14 加对应的 TSA:** 爬片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA, 避光室温孵育 10 min。孵育完后, 爬片置于 TBST 中在脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 5 min。

**2.15 抗体洗脱:** 将孔板中的 PBS 去除干净后将恢复至室温的抗体洗脱液铺满整个爬片, 室温孵育 5 min 后去除抗体洗脱液, 再次滴加足量的抗体洗脱液完全覆盖细胞, 37°C 孵育 30 min, 孵育完成后去除抗体洗脱液, 之后用 TBST ([G2150](#)) 在钟摆摇床 ([SYC-Z100](#)) 上晃





动洗涤 3 次，每次 5 min。

**2.16** 加第四种一抗：滴加 PBS 按一定比例配好的一抗，4°C 孵育过夜。

**2.17** 加对应的 HRP 标记的二抗：去除爬片中的一抗后，用 PBS（G4250）在钟摆摇床（SYC-Z100）上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。去除 PBS 后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗覆盖细胞，室温孵育 50 min。（此步骤也可以加荧光二抗，荧光二抗孵育完成后，不需要孵育 TSA，直接进入 DAPI 染核步骤）

**2.18** 加对应的 TSA：爬片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 TSA，避光室温孵育 10 min。孵育完后，爬片置于 TBST 中在脱色摇床上洗涤 3 次，每次 5 min。

**2.19** DAPI 复染细胞核：爬片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10 min。

**2.20** 封片：爬片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。爬片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

**2.21** 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<br>荧光染料类型           | 货号    | 激发波长<br>/nm | 发射波长<br>/nm | 荧光<br>双标 | 荧光<br>三标 | 荧光<br>四标 | 荧光<br>五标 | 荧光<br>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 |       |             |             |          |          |          |          |          |

## 技术原理介绍：

免疫荧光四标即利用酪胺信号放大（TSA，Tyramide signal amplification）即 TSA 技术，在同一张切片上对四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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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的抗体产生交叉反应。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。





# 上海希柏徠生物科技有限公司

Shanghai Ciberlife Biotechnology Co., Ltd.

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  |
| 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