

上海瑞雨生物科技有限公司

TSA 荧光多标检测操作流程

【原理】

TSA 主要原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应(酪胺盐在 HRP 催化 H2O2 下形成共价键结合位点), 产生大量的酶促产物, 该产物能与周围的蛋白残基(包括色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基)结合, 这样在抗原-抗体结合部位就有大量的生物素沉积, 与随后加入的 Streptavidin—HRP/荧光基团结合, 经几次这样的循环放大, 可以结合大量的酶分子 or 荧光基团, 结果使其检测信号得到几何级放大

【试剂及材料】

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	上海徠卡仪器有限公司	TP1020
包埋机	天津天利航空机电有限公司	BMJ-IB
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司	RM2235
冻台	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	上海三发科学仪器有限公司	DHG-9960A
粘附载玻片	江苏世泰实验器材有限公司	188105
盖玻片 (24*32mm)	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
刀片	日本羽毛牌	R35
正置光学显微镜	日本尼康	Nikon Eclipse Ci-L
成像系统	日本尼康	Nikon DS-Fi2

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	10019318
氯化钾	国药集团化学试剂有限公司	10016318
磷酸二氢钾	国药集团化学试剂有限公司	10017618
磷酸氢二钠, 无水	国药集团化学试剂有限公司	2004061933
BSA	Sigma	B2064
Tris-base	Sigma	648310
EDTA	Sigma	E9884
DAPI	abcam	

上海瑞雨生物科技有限公司

3、一抗及二抗信息

试剂名称	厂家	货号	稀释比
CD8	abcam	ab245118	1:1000
a-sma	abcam	ab7817	1:1000
CD68	abcam	ab283654	1:2000
Epcam	abcam	ab223582	1:600
LDHA	CST	3582	1:800
PLA2	abcam	ab23705	1:800
CD31	abcam	ab182981	1:4000
二抗信息（试剂盒里面包含二抗及 DAB 显色系统）			
山羊抗兔	abcam	ab150077	1:200

2、主要实验试剂：

TSA 试剂盒			
CF 488 Tyramide	runnerbio	Bry-880488	即用型
CF 594 Tyramide	runnerbio	Bry-880594	即用型
cy3 Tyramide	runnerbio	Bry-880530	即用型
AF 647 Tyramide	runnerbio	Bry-880647	即用型
CF 754 Tyramide	runnerbio	Bry-880754	即用型
CF 480 Tyramide	runnerbio	Bry-880480	即用型

3、组织样本类型：人肿瘤，组织芯片

【操作流程】

- 1) 石蜡切片考片 62℃烤片 1h。
- 2) 切片脱蜡：组织芯片置于二甲苯中浸泡 20 分钟，更换二甲苯后再浸泡 20 分钟，更换二甲苯后再浸泡 20 分钟；
- 3) 水化：
 - a) 无水乙醇中浸泡 1min；
 - b) 无水乙醇中浸泡 1min；
 - c) 95%乙醇中浸泡 1min；
 - d) 95%乙醇中浸泡 1min；
 - e) 70%乙醇中浸泡 1min；
 - f) 自来水水洗 5 分钟；
 - g) 蒸馏水清洗一下；
- 4) 每片加入一滴或是 100ul 的过氧化氢阻断溶液室温下孵育 10min，以阻断内源性过氧化物酶的活性。
- 5) PBS 洗涤 3 次，每次 5min；

地址：上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 幢 417 室
网站：www.runnerbio.com

电话：15502149508（陈）

上海瑞雨生物科技有限公司

- 6) 热抗原修复 (1mmol Tris-EDTA PH=9.0) :
 - a) 将洗涤的片子放入到塑料的架子上面, 置于电高压锅中 10min, 室温自然冷却。
- 7) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 8) 除去 PBS, 每张片子加 100ul 的 5% 的 BSA 封闭液, 室温孵育 20min.
- 9) 去除血清, 每张片子加入 100ul 的第一种 LDHA(另一对多标 PLA2) 液稀释的一抗, 4℃ 过夜反应;
- 10) 第二天去除湿盒, 常温下放置 1h 或是 37℃ 放置 30min;
- 11) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 12) 除去 PBS 每张片子加入 100ul 标记的二抗, 37℃ 下孵育 30min;
- 13) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 14) 除去 PBS, 每张片子加入 50ul 的 CF 594 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;
- 15) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 16) 重复操作步骤 6-13(此时修复方法柠檬酸修复液微波修复 10min)。在第 9 步的时候加入 EPCAM 一抗 100ul;
- 17) 除去 PBS, 每张片子加入 100ul 的 CF 488 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;
- 18) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 19) 重复操作步骤 6-13(此时修复方法柠檬酸修复液微波修复 10min)。在第 9 步的时候加入 CD8 一抗 100ul;
- 20) 除去 PBS, 每张片子加入 50ul 的 AF 647 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;
- 21) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 22) 重复操作步骤 6-13(此时修复方法柠檬酸修复液微波修复 10min)。在第 9 步的时候加入 CD68 一抗 100ul;
- 23) 除去 PBS, 每张片子加入 50ul 的 cy3 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;
- 24) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 25) 重复操作步骤 6-13(此时修复方法柠檬酸修复液微波修复 10min)。在第 9 步的时候加入 a-sma 一抗 100ul;
- 26) 除去 PBS, 每张片子加入 50ul 的 CF 754 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;
- 27) PBS 洗涤 3 次, 每次 5min;
- 28) 重复操作步骤 6-13(此时修复方法柠檬酸修复液微波修复 10min)。在第 9 步的时候加入 CD31 一抗 100ul;
- 29) 除去 PBS, 每张片子加入 50ul 的 CF 480 Tyramide 酪胺转换试剂, 室温下孵育 10min;

上海瑞雨生物科技有限公司

30) 除去 PBS 每张片子加入 100ul 的防荧光淬灭封片剂（含 DAPI），Digital Slide Scanners 机器扫描。

【备注】

- 1: 建议先组化验证抗体是否工作以及表达量。
- 2: 第一次使用此染料，建议先测试 5min，镜检看下染色效果，以适当加减染料孵育时间。