

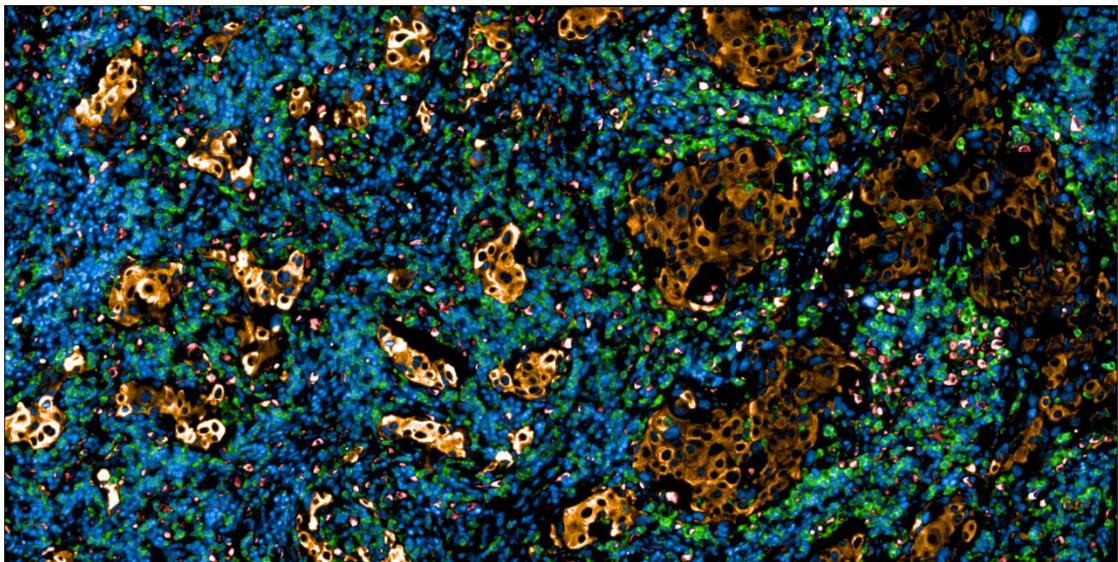
多重荧光免疫组化染色试剂盒

多重荧光免疫组化染色技术简介：免疫组化染色是一种研究组织形态和原位蛋白表达的常见技术、随着免疫治疗的崛起，越来越多肿瘤微环境种的标志物被发现与疾病治疗、进展密切相关、对这些标志物进行同时染色标记、并研究它们之间的共定位、表达量和距离关系成为肿瘤免疫研究的普遍需求。

酪氨信号放大技术原理：类似常规免疫组化的 DAB 显色法，TSA 技术同样采用 HRP 标记的二抗，HRP 催化加入体系的荧光素底物，生成活化荧光底物，活化底物可与抗原上的酪氨酸共价结合，使样品上稳定地共价结合荧光素。之后用热修复法洗去非共价结合的抗体，再换下一种一抗进行第二轮孵育、换另一种荧光素底物，如此往复就可实现多重标记。此类型试剂盒的优点之一是荧光信号比传统免疫荧光强 10 倍以上，第二也是更重要的，可以使用同一种属的一抗实现多重标记。染色过程如下：



本试剂盒染色效果：



多重荧光免疫组化染色试剂盒 4 色

使用说明书

【试剂盒主要组成成分】

主要组成成分	浓度	储存条件	10 片试剂盒	50 片试剂盒	100 片试剂盒
TSA 488	200×母液	-20℃	10ul	50ul	100ul
TSA 555	200×母液	-20℃	10ul	50ul	100ul
TSA 647	200×母液	-20℃	10ul	50ul	100ul
DAPI	100×母液	-20℃	50ul	50ul	50ul
信号放大反应液	1×稀释液	2-8℃	3ml	15ml	30ml
Polymer HRP 标记二抗	1×稀释液	2-8℃	3ml	15ml	30ml

注：染料的稀释比例需根据具体实验进行调整，一般按 1:200 的比例稀释。

【储存条件及有效期】

母液需-20℃储存，荧光染料需避光保存，稀释液 2-8℃保存。

【样本实验要求】

- 1.可用于人的 FFPE 样本检测。
- 2.福尔马林固定的蜡块或玻片，大块组织或 TMA 都可以，封蜡不能有明显的破损。
- 3.玻片样本，组织需要紧贴玻片，避免褶皱，玻片不能有破损、划伤或污渍。
- 4.切片厚度为 4um 左右，使用防脱载玻片。样本应置于玻片正面、中央。

【检验方法】

1.所需材料：

1000W 以上可调功率的微波炉，至少有 5 个以上的挡位，移液器、恒温干燥箱、免疫组化笔、微波修复杯、染色缸、计时器、孵育湿盒、盖玻片、通风橱、洗瓶、荧光显微镜。

2.所需试剂：

灭菌去离子水、二甲苯、乙醇(100%、90%、70%)、抗原修复液酸性或碱性抗原修复液、3%双氧水、封闭/抗体稀释液、TBST 或 PBST。

3.试剂准备：

- 1) TBST 洗液: 25 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (v/v)。
- 2) 抗原修复液: 抗原修复液用蒸馏水稀释至合适浓度, 制成免疫组化抗原修复缓冲工作液。
- 3) 抗体稀释液: 可做抗体稀释和封闭使用, 即用型。
- 4) 一抗工作液: 用抗体稀释液按照抗体说明书要求稀释。
- 5) 二抗工作液: 二抗工作液为即用型。本试剂盒的二抗为羊抗鼠/兔二抗。
- 6) TSA 荧光染料染色工作液: TSA 系列单色荧光染料为 200x 母液, 使用前按 1:200 稀释, 配好的工作液 4℃ 保存, 仅限当天使用。

4. 检测设备:

荧光显微镜或荧光全片扫描设备, TSA 系列荧光染料适用的激发和发射滤光片应符合下表中的建议。

TSA 荧光染料名	波长	
	激发 Excitation	发射 Emission
TSA 488	490	515
TSA 555	555	565
TSA647	642	662
DAPI	360	460

【多重荧光免疫组化染色 step-by-step, FFPE 样本, 手工染色步骤】

注意: 本实验操作大约需耗时 6h, 如需中途停止可选择以下步骤:

* 抗原修复处理后, 在修复液中室温冷却。

* 4℃ 封闭。

* 4℃ 一抗孵育。

1. 样品脱蜡准备:

a) 温箱设置到 60℃, 烤片 0.5h 以上。

b) 新鲜二甲苯浸片 10min, 重复 2 次。

c) 梯度乙醇浸片: 100%3min; 100%3min; 95%3min; 75%3min。

d) 灭菌水洗片 1min, 重复 3 次。

2. 多重荧光免疫组化染色步骤:

第一轮 C1:

C1.1 抗原修复：把 1×抗原修复液倒入修复杯中，微波炉高火加热 3min。将脱蜡后的玻片放置于修复杯中，低火继续加热 15min 后冷却至室温。

注：进行该步骤前建议不放样品进行一次预实验，检测 15min 后液面是否高于样品，避免干片。抗原修复液不能重复使用。

C1.2 灭活：去除玻片上残存洗液，用免疫组化笔把组织圈起来，1×TBST 浸洗玻片，滴加 3%双氧水浸没样本，室温灭活 10min。

C1.3 清洗：1×TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

C1.4 一抗孵育：用抗体稀释液按照说明书浓度稀释一抗，加一抗工作液，使其完全覆盖样本、室温孵育 30min 或者更长的时间（需针对不同抗体做优化调整）。用 1×TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

C1.5 二抗孵育：去除玻片上的洗液，滴加 HRP 二抗工作液，浸没样本区域。室温孵育 10min，用 1×TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

C1.6 荧光染色信号放大：去除玻片上的洗液，滴加 1 × TSA 荧光染料染色工作液，浸没样本区域。室温孵育 10min，用 1×TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。重复 C1.1—C1.6 操作，进行后续多轮染色。

每轮染色结束后可用荧光显微镜确认染色情况，注意用 TBST 覆盖玻片，防止干片。

3、封片：

滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡，长期保存请用透明指甲油对盖玻片边缘进行密封。

4、成像：

选用合适的成像设备按照【检验设备】的条件设置成像设备对染色后的组织片在荧光显微镜下观察并进行判读。

【多重荧光免疫组化染色 step-by-step，FFPE 样本，仪器染色步骤】

1、烤片与脱蜡

60℃烤片 30 min，脱蜡液 42℃孵育 30 s 后，30℃继续孵育 1min。

2、抗原修复

EDTA 修复液 100℃下孵育 20 min。

3、荧光染色

过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min，清洗液洗两次；

- 一抗溶液室温孵育 20 min，清洗液洗四次；
- 二抗溶液孵育 10 min，清洗液洗四次；
- 荧光染液孵育 10 min，清洗液洗四次。
- 4、重复 2、3 步骤进行循环染色。
- 5、取出玻片 DAPI 室温染色 10 min。
- 6、封片：滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡，长期保存请用透明指甲油对盖玻片边缘进行密封。
- 7、成像： 选用合适的成像设备按照【检验设备】的条件设置成像设备对染色后的组织片在荧光显微镜下观察并进行判读。

【使用说明】

- 1、染色过程中，需设置组织阳性对照和试剂阴性对照同时进行。
- 2、阳性信号定位不正确即为假阳性，包括着色不匀、背景染色、边缘效应。组织的某些特定成分也会导致假阳性。
- 3、如果信号太强或者背景偏高请减少荧光信号放大步骤（C1.6）的反应时间至 1-3 分钟，或降低一抗浓度，或减少一抗孵育时间。
- 4、抗原修复方法不当或一抗失效，均可能导致假阴性结果。
- 5、如需进行冰冻切片样本实验，无需做第一步抗原修复，并需使用特殊的冰冻切片抗体洗脱液，详情请咨询百道医疗科技有限公司。

【注意事项】

- 1、本试剂盒只用于免疫组化，不做其他用途。
- 2、本试剂盒仅限专业人员使用。
- 3、应使用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
- 4、请在实际有效期内使用。
- 5、若将本试剂盒的染色组分与其他公司的产品混合使用，在染色过程中可能会出现异常情况。
- 6、为了防止可能出现的假阴性、假阳性结果，实验过程需设置阳性对照和阴性对照同时进行。