



虹和超视界

多重免疫荧光染色试剂盒-三标四色（多重荧光免疫组化法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：多重免疫荧光染色试剂盒-三标四色（多重荧光免疫组化法）

英文名称：IRISKit® HyperView mTSA Kit

【包装规格】

试剂瓶编号	试剂名称	装瓶量	数量
#1	EDTA Antigen Retrieving Buffer	40.0mL	1
#2-1	B-Quenching Buffer A	7.0mL	1
#2-2	B-Quenching Buffer B	5.0mL	1
#3	Ab Dilution Buffer	0.5mL	1
#4-1	TSA-HRP (R)	4.0mL	0~3
#4-2	TSA-HRP (M)	4.0mL	0~3
#4-3	TSA-HRP (Rat)	4.0mL	0~3
#5	TSA Diluent	0.5mL	1
#6-1	Cyclic-480	20.0μL	1
#6-2	Cyclic-550	20.0μL	1
#6-3	Cyclic-630	20.0μL	1
#7	DAPI	100.0μL	1
#8-1	Citrate Antigen Retrieving Buffer	40.0mL	2
#8-2	1x Ab Stripping Buffer	10.0mL	1
#9	Mounting Medium	10.0mL	1

注：编号为[#4-1]、[#4-2]、[#4-3]的试剂瓶，总计数量为3，具体组合参见试剂盒规格，如有疑问请联系客服咨询。

【预期用途】

用于实现在同一组织切片上多个靶标蛋白共同染色，从而通过荧光图像分析挖掘组织微环境中的复杂信息，如定量分析、共表达确定细胞分型、空间关系分析等。

【反应原理】



首先一抗识别目标蛋白抗原表位，继而带有HRP的二抗与一抗结合，加入携带非活性酪胺底物的荧光基团，该荧光基团在HRP和过氧化氢的催化作用下被激活，从而识别目标蛋白上的酪氨酸残基并与之紧密结合，因此在目标蛋白上产生了高密度的共价结合的酪胺标记。在染色完成后，去除非共价结合抗体，再进行下一个抗体染色。该方法不受抗体种属的限制，只需要每轮染色更换不同的酪胺荧光基团来标记不同的抗原，从而实现多重荧光免疫染色。

【存储条件及有效期】

4℃保存，有效期6个月。启用后注意保存，切勿污染。若荧光染料的颜色发生变化，即表示失效。

【注意事项】

- 1.对于抗体、显色试剂，先使用低速离心机短时间混匀后取用。
- 2.显色试剂日常使用时请提前取出，恢复至室温（21~25℃）后正常使用，室温（21~25℃）避光保存不超过3天。
- 3.实验过程中如果需要暂停实验，可以停留在PBS溶液洗涤步骤，将切片放入PBS溶液中暂存，这种方式适用于在一周内完成的多色免疫荧光实验；如果需要长时间暂停实验，可以使用[#9]封片后放入4℃冰箱冷藏储存。
- 4.提供的[#1]根据说明书比例稀释后，按照抗原修复一次需要200mL，可做10次抗原修复，请合理安排抗原修复次数。
- 5.在实验过程中，为了保证试剂的充分反应和实验的可重复性，请不要在低于20℃的环境温度下进行实验操作。同时，避免切片所处溶液温度的快速升高或者降低，减少对切片的损伤。
- 6.请严格按照使用说明书里的时间孵育抗体和显色液，长时间的反应会增加非特异着色。
- 7.搭配试剂盒使用的冰冻切片需满足样本要求中对冰冻切片的描述，液氮冷冻法生成的冰冻切片无法搭配本试剂盒使用。

【样本要求】

1.石蜡切片：

要求使用黏附载玻片，并且保持组织完整、厚薄均匀、无褶皱、无刀痕。

常规切片厚度为3~5 μm。短时间可室温（21~25℃）保存，长时间可冷藏（2~8℃）保存。

2.冰冻切片：

需冰冻切片的组织应提前经过4%多聚甲醛固定，梯度蔗糖溶液脱水，OCT包埋，再进行切片。

冰冻切片要求使用黏附载玻片，并且保持组织完整、厚薄均匀、无褶皱、无刀痕。

常规切片厚度为8 μm。冷冻（-80℃）保存。

3.细胞爬片：

鉴于细胞爬片的特殊性，具体要求和详细操作请见附件：细胞爬片的TSA染色方案。

【使用方法】

一、使用前准备

1.1 需自备设备、试剂、耗材清单：

1.1.1 设备清单：

实验室通风柜、烘箱、恒温水浴锅、恒温摇床、微波炉、振荡器。

1.1.2 试剂清单：

二甲苯（≥600mL）、无水乙醇（≥600mL）、95%乙醇（≥200mL）、85%乙醇（≥200mL）、75%乙醇（≥200mL）、1×PBS溶液（以下简称PBS溶液）。

1.1.3 耗材清单：

1套组合式染色缸（含9个原装染色缸），且至少额外配套1个染色缸及染色架；一次性5mL无菌注射器、0.22 μm的有机系过滤器。

1.2 石蜡切片脱蜡至水前期准备：

将适量二甲苯依次倒入前三个染色缸（二甲苯-1、二甲苯-1'、二甲苯-1''）。

将适量无水乙醇依次倒入中间三个染色缸（无水乙醇-1、无水乙醇-1'、无水乙醇-1''）。

将适量95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇依次倒入后三个染色缸。

注：1）-1、-1'、-1'' 用作区分不同容器，其内试剂成分相同。

2）用于脱蜡至水的9个染色缸，每个染色缸的溶液量≥200mL。

3）1套组合式染色缸（含9个原装染色缸）请放置于实验室通风柜内使用。

二、样本预处理

2.1 切片烤片：

将石蜡/冰冻切片放置于温度设置为65℃的烘箱烘烤过夜（<16h）。

2.2 切片复水（根据切片类别，选择a/b中的一种）：

a）石蜡切片脱蜡至水：

将切片依次放入放置二甲苯-1、二甲苯-1'、二甲苯-1'' 的染色缸，各浸泡5min。

后续依次将切片放入放置无水乙醇-1、无水乙醇-1'、无水乙醇-1''，95%乙醇，85%乙醇，75%乙醇的染色缸，各浸泡3min。

最后将切片放入放置纯化水的染色缸，依次更换纯化水，洗涤3次，每次3min。

b）冰冻切片复水：

待冰冻切片恢复至室温（21~25℃）后，将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

2.3 抗原修复：

将[#1]以[#1]：纯化水为1：49的比例稀释，倒入染色缸。

将切片放入染色缸中，使用微波炉最大功率加热 $3 \pm 1\text{min}$ ，加热到染色缸里的试剂出现小气泡后转入提前预热至 95°C 的恒温水浴锅中，温度保持 95°C 放置30min。

拿出染色缸，自然冷却至室温（ $21\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

2.4 阻断内源性过氧化物酶：

2.4.1 无光淬系统（LUMINIRIS®）用户：

使用免疫组化笔在组织周围画上阻水圈，保证后续添加的试剂能够完全均匀覆盖组织，防止干片。

依次将画好阻水圈的切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量内源性过氧化物酶阻断剂（[#2-1]：[#2-2]=7:5）完全均匀覆盖组织，室温（ $21\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）避光孵育10min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

2.4.2 拥有荧光淬灭系统（LUMINIRIS®）用户：

具体操作按照虹和®荧光淬灭试剂盒（145mL）使用说明书执行。

三、顺序染色

（3.1）第一个指标染色：

3.1.1 一抗孵育：

将[#3]以[#3]：PBS溶液为1：49的比例稀释，得到[#3-稀释后]。

用配制好的[#3-稀释后]将抗体稀释到各个一抗对应的浓度后，依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量稀释后的一抗完全均匀覆盖组织， $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 避光振荡孵育20min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

3.1.2 二抗孵育：

根据一抗的种属选择对应种属的[#4-1]/[#4-2]/[#4-3]，依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量[#4-1]/[#4-2]/[#4-3]完全均匀覆盖组织， $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 避光振荡孵育20min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

3.1.3 TSA显色反应：

将[#5]以[#5]：PBS溶液为1：299的比例稀释，颠倒混匀3次左右，得到[#5-稀释后]。

继续将[#6-1]以[#6-1]: [#5-稀释后]为1: 250~1: 500的比例稀释, 得到[#6-1-稀释后]。

依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内, 滴加适量[#6-1-稀释后]完全均匀覆盖组织, 室温 (21~25℃) 避光孵育5~10min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸, 依次更换PBS溶液, 洗涤3次, 每次2min。

荧光显微镜下观察是否有特异着色, 确定特异着色后再进行下一指标染色。

3.1.4 抗体洗脱 (根据需求, 选择a/b中的1种):

a) 高温洗脱:

将[#8-1]以[#8-1]: 纯化水为1: 49的比例稀释, 混匀后倒入染色缸。

将切片放入染色缸中, 使用微波炉最大功率加热 3 ± 1 min, 加热到染色缸里的试剂出现小气泡后转入提前预热至95℃的恒温水浴锅中, 保持95℃以上放置10~15min。

拿出染色缸放置于振荡器, 自然冷却至室温 (21~25℃)。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸, 依次更换PBS溶液, 洗涤3次, 每次2min。

注: 抗体洗脱首选此方法。

b) 温和洗脱:

依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内, 滴加适量的[#8-2]完全均匀覆盖组织, 室温 (21~25℃) 避光孵育10min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸, 依次更换PBS溶液, 洗涤3次, 每次2min。

注: 本方法仅适用于以下场景: 洗脱后标记的抗体, 与此前标记的抗体(不含高温洗脱步骤前标记的抗体)的种属来源需完全不同。

(3.2) 第二个指标染色:

3.2.1 TSA染色差异:

其中第3.1.3步的荧光分子更换为[#6-2], 将[#6-2]以[#6-2]: [#5-稀释后]为1: 250~1: 500的范围比例稀释, 显色时间为5~10min。

其余步骤同第一个指标的3.1.1~3.1.4步。

(3.3) 第三个指标染色:

3.3.1 TSA染色差异:

其中第3.1.3步的荧光分子更换为[#6-3], 将[#6-3]以[#6-3]: [#5-稀释后]为1: 250~1: 500的范围比例稀释,

显色时间为5~10min。

其余步骤同第一个指标的3.1.1~3.1.3步。

注：该指标为最后一个指标，不需要进行抗体洗脱。

（3.4）核染色：

3.4.1 细胞核染色：

将[#7]以[#7]：PBS溶液为1：49的比例稀释，得到[#7-稀释后]。

依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量[#7-稀释后]完全均匀覆盖组织，室温（21~25℃）避光孵育5min。

将切片放入放置PBS溶液的染色缸，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次2min。

荧光显微镜下观察是否有特异着色，确定特异着色后再进行封片。

（3.5）封片：

3.5.1 水溶性封片：

用胶头滴管吸取[#9]，滴加一滴[#9]完全均匀覆盖组织，用镊子夹取规格适合的干净盖玻片，轻轻覆盖组织，避免产生气泡。

四、显微成像

4.1 成像波长参考：

将切片置于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像，成像波长设置请参考下表。

通道	激发光	发射光
DAPI	361-389	430-490
Cyclic-480	465-495	512-558
Cyclic-550	540-560	575-595
Cyclic-630	620-640	> 665

附件：

细胞爬片的TSA染色方案

【注意事项】

- 1.对于抗体和样本，在准备过程请在严格无菌条件下进行；细胞培养过程中注意细胞无污染、无聚集。
- 2.所用溶液均需提前预热至37℃，避免温度变化导致细胞形态变化。
- 3.细胞密度不高于80%~85%。
- 4.染色顺序建议由低丰度到高丰度，核蛋白优先，胞浆蛋白随后，骨架蛋白和膜蛋白最后。

【样本要求】

贴壁细胞，生长状态良好且无污染。

【使用方法】

一、使用前准备

1.1 需自备设备、试剂、耗材清单：

1.1.1 设备清单：

生物安全柜、振荡器、恒温摇床

1.1.2 试剂清单：

75%乙醇、4%PFA固定液、0.01M PBS溶液（以下全文统称PBS溶液）、PBST溶液：0.3% tritonX-100，0.01M PBS溶液稀释

1.1.3 耗材清单：

细胞培养板

1.2 细胞爬片前期准备：

将细胞爬片放入75%乙醇中，确保完全浸没，浸泡至少30分钟。

取出爬片，放在无菌环境中晾干，避免污染。

二、样本预处理

2.1 细胞接种：

选取洁净、无污染的生物安全柜进行操作,将经过前期处理的细胞爬片入细胞培养板，接种目标细胞，放入37℃二氧化碳细胞培养箱中十字摇匀培养。

2.2 细胞生长：

待细胞长至70%~85%时，向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，清洗3次，每次5min，去除残留的培养

基、细胞碎片、杂质等。

注：细胞密度过低或过高易造成染色过程中细胞脱落，并且密度过高会导致细胞形态发生变化。

2.3 组织固定：

向孔内加入适量的4%PFA固定液完全覆盖样本，常温固定5~15 min。

将细胞培养板放置于振荡器，向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，振荡清洗3次，每次5min。

2.4 组织打孔：

向孔内加入PBST溶液，室温（21~25℃）孵育5~10min。

将细胞培养板放置于振荡器，向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，振荡清洗3次，每次5min。

2.5 阻断内源性过氧化物酶：

向孔内加入[#5]，室温（21~25℃）孵育5~15 min，直至无气泡产生。

将细胞培养板放置于振荡器，向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，振荡清洗3次，每次5min。

注：时间作为参考，若产生气泡较多，建议更换液体并延长孵育时间。

2.6 封闭：

将[#3]以[#3]：PBS溶液为1：49的比例稀释，得到[#3-稀释后]。

向孔内加入[#3-稀释后]，4℃孵育1h或常温封闭20min。

三、顺序染色

（3.1）第一个指标染色：

3.1.1 一抗孵育：

将[#3]以[#3]：PBS溶液为1：49的比例稀释，得到[#3-稀释后]。

用配制好的[#3-稀释后]将抗体稀释到各个一抗对应的浓度后，向孔内滴加适量稀释后的一抗完全均匀覆盖组织，4℃孵育过夜或37℃孵育1h。

向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次5min。

3.1.2 二抗孵育：

根据一抗的种属选择对应种属的[#4-1]/[#4-2]/[#4-3]，向孔内滴加适量[#4-1]/[#4-2]/[#4-3]完全均匀覆盖组织，室温（21~25℃）孵育20min。

向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次5min。

3.1.3 TSA显色反应：

l将[#5]以[#5]：PBS溶液为1：299的比例稀释，颠倒混匀3次左右，得到[#5-稀释后]。

l继续将[#6-1]以[#6-1]：[#5-稀释后]为1：250~500的比例稀释，得到[#6-1-稀释后]。

l向孔内滴加适量[#6-1-稀释后]完全均匀覆盖组织，室温（21~25℃）孵育5~15min。

l向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次5min。

l荧光显微镜下观察是否有特异着色，确定特异着色后再进行下一指标染色。

3.1.4 温和抗体洗脱：

l向孔内滴加适量的[#8-2]完全均匀覆盖组织，将细胞培养板放置于恒温摇床，60℃孵育20min。

l向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次5min。

（3.2）第二个指标染色：

3.2.1 TSA染色差异：

l其中第3.1.3步的荧光分子更换为[#6-2]，将[#6-2]以[#6-2]：[#5-稀释后]为1：250~500的比例稀释，显色时间为5~10min。

l其余步骤同第一个指标的3.1.1~3.1.4步。

（3.3）第三个指标染色：

3.3.1 TSA染色差异：

l其中第3.1.3步的荧光分子更换为[#6-3]，将[#6-3]以[#6-3]：[#5-稀释后]为1：250~500的比例稀释，显色时间为5~10min。

l其余步骤同第一个指标的3.1.1~3.1.3步。

注：该指标为最后一个指标，不需要进行抗体洗脱。

（3.4）核染色：

3.4.1 细胞核染色：

l将[#7]以[#7]：PBS溶液为1：49的比例稀释，得到[#7-稀释后]。

l向孔内滴加适量[#7-稀释后]完全均匀覆盖组织，室温（21~25℃）避光孵育5~10min。

l向孔内加入PBS溶液，依次更换PBS溶液，洗涤3次，每次5min。

(3.5) 封片:

3.5.1 水溶性封片:

取出细胞爬片，用胶头滴管吸取[#9]，滴加一滴[#9]完全均匀覆盖组织，避免产生气泡。

四、显微成像

4.1 成像波长参考:

参考主文件-使用说明书对此部分的描述。

成都明虹天成生物科技有限公司

Chengdu LUMINIRIS Biotech Co., Ltd



明虹 LUMINIRIS

明虹 LUMINIRIS

虹光视极 明智知理

SEE MOST KNOW BEST

客服电话：400-855-1179

客服微信：LUMINIRIS

客服邮箱：info@LUMINIRIS.cn

公司地址：成都市高新区德商国际A座

公司官网：luminiris.cn