虹和®CmTSA

多重免疫荧光染色试剂盒-三标四色（免疫组织化学法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：虹和®CmTSA 多重免疫荧光染色试剂盒-三标四色（免疫组织化学法）

英文名称：IRISKit® CmTSA 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	Integrated Reaction Reagent	15.0mL	1
#3	Ab Dilution Buffer	50.0mL	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
#5-1	Cyclic-480	20.0μL	1
#5-2	Cyclic-550	20.0μL	1
#5-3	Cyclic-630	20.0μL	1
#6	DAPI	100.0μL	1
#7	Gentle Antibody Elution Reagent	12.0mL	1
#8	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，若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 12 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：请在拿到试剂盒后拿出[#7]放置于-20℃冷冻避光保存。

【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[#8]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和显色试剂，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 3~5μm。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%多聚甲醛固定液固定，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 8μm。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）、磷酸缓冲盐溶液（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。

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±1min，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，温度保持 95℃放置 30min。

●拿出染色缸置于振荡器，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。

2.4 阻断内源性过氧化物酶：

2.4.1 无荧光淬灭系统（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[#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。

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：

●根据不同一抗的稀释比例，使用[#3]将不同一抗按比例完成稀释，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，放置于恒温摇床 28℃±2℃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，放置于恒温摇床 28℃±2℃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[#2]以[#2]：PBS 溶液为 1：299 的比例稀释，颠倒混匀 3 次左右，得到[#2-稀释后]。
●继续将[#5-1]以#[5-1]：[#2-稀释后]为 1：250~1：500 的比例稀释，得到[#5-1-稀释后]。
●依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量[#5-1-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：

●依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量的[#7]完全均匀覆盖组织，室温（21~25℃）避光孵育 8min。
●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 5min。

（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[#5-2]，将[#5-2]以[#5-2]：[#2-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[#5-3]，将[#5-3]以[#5-3]：[#2-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[#6]以[#6]：PBS 溶液为 1：49 的比例稀释，得到[#6-稀释后]。
●依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量[#6-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[#8]，滴加一滴[#8]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。
5. 此染色方案因只给到了不同种属抗体之间的抗体洗脱方式，所以仅适用于不同种属抗体的染色。

【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%多聚甲醛固定液、磷酸缓冲盐溶液（以下简称 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%多聚甲醛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：

●向孔内加入适量[#2]，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：

●向孔内加入[#3]，4℃孵育 1h 或室温（21~25℃）封闭 20min。

三、顺序染色

（3.1）第一个指标染色 ：

3.1.1 一抗孵育：

●根据不同一抗的稀释比例，使用[#3]将不同一抗完成稀释，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（＜16h）或放置于恒温摇床 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：

●将[#2]以[#2]：PBS 溶液为 1：299 的比例稀释，颠倒混匀 3 次左右，得到[#2-稀释后]。

●继续将[#5-1]以#[5-1]：[#2-稀释后]为 1：250~1：500 的比例稀释，得到[#5-1-稀释后]。

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

●向孔内加入 PBS 溶液，依次更换 PBS 溶液，洗涤 3 次，每次 5min。

●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：

●向孔内滴加适量的[#7]完全均匀覆盖组织，将细胞培养板放置于恒温摇床，室温（21~25℃）孵育 8min。

●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：

●其中第 3.1.3 步的荧光分子更换为[#5-2]，将[#5-2]以[#5-2]：[#2-稀释后]为 1：250~1：500 的比例稀释，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[#5-3]，将[#5-3]以[#5-3]：[#2-稀释后]为 1：250~1：500 的比例稀释，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[#6]以[#6]：PBS 溶液为 1：49 的比例稀释，得到[#6-稀释后]。

●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。

●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[#8]，滴加一滴[#8]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

微信扫码 添加客服

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