

【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)	1.0mL	0~3
#4-2	TSA-HRP (M)	1.0mL	0~3
#5	TSA Diluent	0.5mL	1
#6-1	Cyclic-480	10.0μL	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]和[#4-2]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其紧密结合，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. 请提前准备一次性 5mL 无菌注射器、0.22 μm 的有机系过滤器备用。
3. 请在拿到试剂盒后，及时取出 [6-1]、[6-2]、[6-3]，根据实验用量所需进行分装，放置于-20℃冰箱冷冻保存。日常使用时请提前取出，恢复至室温后正常使用，常温避光保存不超过 3 天。
4. 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℃冰箱储存。
5. 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，可以做 10 次抗原修复，请合理安排抗原修复的次数。
6. 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。
7. 请严格按照 Protocol 里面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。

【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。-80℃冷冻保存。

【使用方法】**一、使用前准备**

1.1 需自备试剂和耗材：二甲苯（≥600mL）、无水乙醇（≥600mL）、95%乙醇（≥200mL）、85%乙醇（≥200mL）、75%乙醇（≥200mL）、PBS 溶液；至少 10 个染色缸。

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°C 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°C) 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°C 的恒温水浴锅中，温度保持 95°C 放置 30Min。

●拿出染色缸，常温自然冷却至室温。

●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 无光淬机 (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平铺于保湿盒内，滴加适量内源性过氧化氢酶阻断剂 ([#2-1]：[#2-2]=7:5) 完全均匀覆盖组织，常温避光孵育 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 有光淬机 (LUMINIRIS®) 用户

●具体操作按照虹和®荧光淬灭试剂盒 300mL 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：

a) 配制一抗稀释液：将[#3]以[#3]：PBS 溶液为 1：49 的比例稀释，得到一抗稀释液。

b) 稀释和孵育一抗：

●用配制好的一抗稀释液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°C±2°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:

- 在每次使用[#4-1]/[#4-2]之前, 预先使用一次性 5mL 无菌注射器配套规格为 0.22 μm 的有机系过滤器进行过滤。
- 根据一抗的种属选择对应种属的[#4-1]/[#4-2], 将[#4-1]/[#4-2]以[#4-1]/[#4-2]: PBS 溶液为 1: 3 的比例稀释。
- 依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内, 滴加适量稀释后的[#4-1]/[#4-2]完全均匀覆盖组织, 28°C \pm 2°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: 2000 的比例稀释。
- 依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内, 滴加适量稀释后的[#6-1]完全均匀覆盖组织, 常温避光孵育 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。首选该方式, 具体操作如下:

- 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 \pm 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°C 的恒温水浴锅中, 保持 95°C 以上放置 10-15Min。
- 拿出染色缸放置于振荡器, 常温自然冷却至室温。
- 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。

b) 温和洗脱当染色遇到异种属抗体时, 可选择滴加水浴预热至 60°C 的[#8-2], 具体方式如下:

- 下一个抗体与此次抗体种属来源不同 (例如此次抗体的种属是兔, 下一个抗体的种属是鼠, 相反亦可), 依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内, 滴加适量的 60°C 预热的[#8-2]完全均匀覆盖组织, 28°C \pm 2°C 避光孵育 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。
- 为保证实验效果, b 方法不能连续使用, 三标染色中最多使用一次。

(3.2) 第二个指标染色

同第一个指标的 3.1.1~3.1.4 步。

3.2.1 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: 500 的比例稀释, 显色时间为 5-10Min。

(3.3) 第三个指标染色

同第一个指标的 3.1.1~3.1.3 步。

3.3.1 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 1：500 的比例稀释，显色时间为 5-10Min。

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。
- 依次将切片正面朝上平铺于保湿盒内，滴加适量稀释后的 [#7] 完全均匀覆盖组织，常温避光孵育 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 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 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