

三标四色多重荧光染色试剂盒产品说明书

【产品名称】三标四色多重荧光染色试剂盒

【产品货号】AFIHC024

【包装规格】100T/盒

【预期用途】在石蜡组织切片进行免疫荧光染色，为医师提供诊断的辅助信息

【检验原理】酪胺信号放大(TSA, Tyramide signal amplification)技术是一类利用辣根过氧化物酶(HRP)对靶蛋白进行标记的酶学检测方法，类似常规免疫组化的DAB显色方法，TSA技术同样采用多聚HRP标记的二抗，同样有对应的“显色”步骤(HRP催化加入反应体系的酪胺荧光素底物，产生活化荧光底物，活化底物可与抗原上的酪氨酸等残基共价结合，使样品上稳定的共价结合酪胺荧光素。之后用热修复法洗去非共价结合的一抗-二抗-HRP复合物，重复下一种一抗-HRP二抗来第二轮孵育，换另一种酪胺荧光素底物，如此往复可实现多重标记。TSA详细原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应(酪胺盐在HRP催化 H_2O_2 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荧光素沉积，结果使其检测信号得到10-100倍增强。简单来说，用这种方法做多重免疫荧光是利用二抗上带有的HRP(而不是直接偶联荧光素)，来催化后续添加入体系的非活性荧光素。荧光素在HRP和过氧化氢的作用下被活化，跟临近蛋白的酪氨酸残基共价偶联，使得蛋白样品与荧光素稳定结合。然后微波或煮沸或者水浴等热修复处理，前一轮非共价结合的抗体被洗掉，共价结合的荧光素稳定共价结合在样本切片蛋白上。再换一个一抗来第二轮孵育，周而复始。等到所有抗体孵育结束，荧光素都结合好后，最后去检测结果。由于每次体系中都只有单一抗体孵育，因此无需担心抗体交叉反应，以及一抗二抗种属匹配问题，大大减少了实验设计时不同种属抗体选择匹配的限制。也就是说，如果用TSA技术，同一张片子上所有的靶标都可以选用特异性高的兔单克隆抗体。搭配同一支抗兔的多聚HRP二抗就可以进行实验，而且信号放大的倍数大大增强。本公司开发的试剂盒具体酪胺荧光染料为以下其中一种或者多种：TYR-480，TYR-520，TYR-570，TYR-620，TYR-690，TYR-780。此试剂盒中的荧光染料可单独或配合使用。

【主要组成成分】

组分名称	100T/盒	保存条件
TYR-520 荧光染料(即用型)	5ml	2-8℃、避光保存
TYR-570 荧光染料(即用型)	5ml	2-8℃、避光保存
TYR-690 荧光染料(即用型)	5ml	2-8℃、避光保存
Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗	15mL	2-8℃、避光保存
抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)	10mL	2-8℃、避光保存
抗体稀释液	30mL	2-8℃、避光保存
过氧化物酶封闭液	30mL	2-8℃、避光保存

【储存条件及有效期】

- 1、各组分按各自储存条件保存，有效期为12个月，应避免强光照射。
- 2、试剂盒生产日期及有效期见产品外包装标签。
- 3、试剂盒在泡沫箱中放入冰袋，箱体密封后，可在常温下运输且时间不超过一周。



【仪器要求】 荧光显微镜或者荧光数字切片扫描仪需要有如下滤光片通道。

染料	激发波长	发射波长
DAPI 核染料	350	420
TYR-480 荧光染料	450	480
TYR-520 荧光染料	490	520
TYR-570 荧光染料	550	570
TYR-620 荧光染料	590	620
TYR-690 荧光染料	630	690
TYR-780 荧光染料	750	780

【样本要求】 石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞爬片（冰冻切片、细胞爬片需要配合 AFIHC038 抗体洗脱液使用）

【检验方法】

一、手工检验步骤

1、样本准备：

- 1) 石蜡切片：依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-95%乙醇 5min-85%乙醇 5min-75%乙醇 5min，蒸馏水洗。
- 2) 冰冻切片：冰冻切片固定 10-30min，PBS 洗 5min，重复 3 次，滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 20min（检测膜表达蛋白可省略此步），PBS 洗三次，每次 5 min。
- 3) 细胞爬片或者细胞涂片：细胞样本固定 10-30min，PBS 洗 5min 重复 3 次，滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 20min（检测膜表达蛋白可省略此步），PBS 洗三次，每次 5 min。

2、抗原修复： 组织切片置于盛满 pH9.0 EDTA 碱性抗原修复液或者 pH6.0 柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内中火 8min，停火 8min，转中低火 7min 进行抗原修复，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。（也可以用高温高压蒸汽 1-2min 或 100℃ 水浴 20min 等其他热修复方法）。自然冷却后将玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。（注：冰冻切片/细胞爬片可省略此步骤，骨组织等容易脱片的样本建议用酶修复或者水浴修复等温和的修复方法）

3、阻断内源性过氧化物酶： 切片滴加过氧化物酶封闭液溶液，室温避光孵育 15 min，将玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

4、非特异性靶点封闭： 切片稍甩干后用免疫组化笔在组织周围画圈（防止封闭液及抗体流走），在圈内滴加用封闭用正常山羊血清（或者其他封闭液 3%BSA 溶液，也可直接用试剂盒中抗体稀释液）均匀覆盖组织，室温封闭 30min。

5、孵育特异性一抗： 轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗 X，切片平放于避光湿盒内 4° C 孵育过夜或者 37℃ 孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；

6、孵育 Polymer-HRP 二抗： 玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干在圈内滴加与一抗相应种属的 Polymer-HRP 二抗覆盖组织（注：试剂盒标配为 Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗，做小鼠的样本，为了避免小鼠组织样本自身的免疫球蛋白结合二抗所照成的非特异性背景染色，建议一抗选用兔来源的抗体搭配 Polymer-HRP 抗兔二抗试剂（货号：AFIHC003）使用），避光室温孵育 30min，PBS 洗三次，每次 5 min。



- 7、**TSA 荧光染料染色：**切片直接滴加 50 μ l TSA-XXX 荧光染料（即用型）均匀覆盖组织室温反应 1-15min（最佳时间 5min-10min），PBS 洗三次，每次 5 min。（预实验可先染 1min 洗干净荧光染料后显微镜下观察染色效果，如果阳性弱继续滴加荧光染料加强染色强度直至合适强度后继续进行下一步）。
- 8、**抗体洗脱：**石蜡切片置于抗原修复液中 100 $^{\circ}$ C 水浴 25-40min（根据不同抗体亲和力灵活调整时间）；冰冻切片/细胞爬片/骨组织等容易脱片的样本建议用滴加适量 37 $^{\circ}$ C 预热至完全溶解的 mIHC 专用抗体洗脱液（货号：AFIHC038）覆盖样本，37 $^{\circ}$ C 放置 5-20 min，弃去洗脱液，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本 37 $^{\circ}$ C 放置 5-20 min，弃洗脱液，PBS 洗三次，每次 5 min；（注：石蜡切片可用热修复洗脱，不建议使用抗体洗脱液洗脱；冰冻切片/细胞爬片/骨组织等容易脱片的样本需用抗体洗脱液进行洗脱）
- 9、**重复 3-8 步骤**（换用另外一种 TYR-XXX 荧光染料）---第二轮标记
- 10、**重复 3-7 步骤**（换用另外一种 TYR-XXX 荧光染料）---第三轮标记
- 11、**DAPI 复染细胞核及封片：**切片甩干后，滴一滴抗荧光淬灭封片剂（含 DAPI）于样本上，轻轻盖上盖玻片，尽量避免气泡，等待 5 min 左右即可观察。
- 12、**镜检拍照：**切片于荧光显微镜/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。

二、仪器检验步骤

仪器程序按手工的步骤进行设置，把试剂盒中各组分加入仪器相应的试剂瓶中，然后把样本放进仪器进行检测。

【阳性判断值或参考区间】

该试剂盒为染色试剂，无特定参考区间。

【检验结果的解释】

染色结果必须建立在阳性对照和空白对照实验成立的基础上：阳性：显示对应荧光为抗原部位，阴性：无对应荧光染色为非靶抗原部位。

【检验方法的局限性】

- 1、实验操作任一环节的不规范操作都可能影响最终的实验结果。
- 2、专业的操作人员、经过认证的实验室将有助于实现检测过程的标准化，从而减少各种外界因素造成的染色偏差。
- 3、在测试中如出现阴性结果，表示未检测出抗原，而不是经测定的细胞或者组织中不存在该抗原。

【产品性能指标】

1、外观

- 1.1 本产品外观应整洁，完好无损。
- 1.2 目测，产品应为无杂质、无沉淀。

2、净含量

其净含量不低于标示量。

3、pH 值

过氧化物酶封闭液应呈酸性 pH 值应在 3.0-4.0 之间；其它成分呈中性 pH 值应在 7.0-7.4 之间。

【注意事项】

- 1、本试剂仅用于科学研究，不用于临床诊断。
- 2、开始实验前，应仔细阅读此说明书。
- 3、本试剂仅限有专业经验或经专业培训的人员使用。
- 4、避免试剂接触眼睛和粘膜，如接触到敏感区域，立即用大量清水冲洗。
- 5、试剂盒除了手工操作进行检测，也可在全自动多色免疫荧光染色仪上使用。



【参考文献】

- 1、Wang Y, Zhou X, Yao L, Hu Q, Liu H, Zhao G, et al. Capsaicin Enhanced the Efficacy of Photodynamic Therapy Against Osteosarcoma via a Pro - Death Strategy by Inducing Ferroptosis and Alleviating Hypoxia. Small 2024
- 2、Chen Y, Wen H, Li Y, Han Y, Tan J, Guo C, et al. A multi-omics analysis reveals CLSPN is associated with prognosis, immune microenvironment and drug resistance in cancers. Biol Proced Online 2023.
- 3、Luan X, Lei T, Fang J, Liu X, Fu H, Li Y, et al. Blockade of C5a receptor unleashes tumor-associated macrophage antitumor response and enhances CXCL9-dependent CD8+ T cell activity. Mol Ther 2024

【基本信息】

生产企业名称/售后服务单位名称：湖南艾方生物科技有限公司
备案地址：长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
生产地址：长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
官方网址：www.afantibody.cn

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

2024. 10. 08

