

## Pheno多色免疫荧光检测试剂盒——3色

### 产品说明书

【产品名称】Pheno多色免疫荧光检测试剂盒——3色

【产品规格】50T/20T

【预期用途】主要用于福尔马林固定石蜡包埋组织切片、TMA芯片的荧光法免疫组化染色。

【检测原理】本试剂盒采用多色免疫荧光染色技术，将抗原、抗体特异性结合与酪胺信号放大技术（TSA）相结合，通过一抗结合抗原后，在二抗上连接HRP，催化标记了荧光素的TSA分子，产生大量的酶促产物，该产物能与抗原周围的蛋白残基结合，在原位上标记蛋白表达。利用不同的荧光染料标记，通过多轮染色实现在同一个组织或细胞样本中进行原位多靶点染色。

【组成成分】

试剂盒组分	20T (PVB-2012)		50T (PVB-2013)		储存条件
	货号	数量	货号	数量	
PVB 过氧化氢	PVB-3018-003	1 瓶	PVB-3018-005	1 瓶	2-8 °C
10×封闭液	PVB-3019-007	1 瓶	PVB-3019-005	1 瓶	2-8 °C
10×一抗稀释液	PVB-3020-007	1 瓶	PVB-3020-005	1 瓶	2-8 °C
HRP 标记二抗鼠兔混合型	PVB-3021-009	1 瓶	PVB-3021-010	1 瓶	2-8 °C
TSA 荧光染料-PVB520	PVB-3033-004	1 瓶	PVB-3033-005	1 瓶	2-8 °C
TSA 荧光染料-PVB570	PVB-3034-004	1 瓶	PVB-3034-005	1 瓶	2-8 °C
1×TSA 荧光染料稀释液-A	PVB-3030-009	1 瓶	PVB-3030-010	1 瓶	2-8 °C
1×TSA 荧光染料稀释液-B	PVB-3031-009	1 瓶	PVB-3031-010	1 瓶	2-8 °C
荧光染料-PVB DAPI	PVB-3017-006	1 瓶	PVB-3017-007	1 瓶	2-8 °C
抗荧光淬灭封片剂	PVB-3022-001	1 瓶	PVB-3022-002	1 瓶	2-8 °C
试剂盒组分	货号	规格	货号	规格	储存条件
50× 抗原修复液	PVB-3023-001	1 瓶	PVB-3023-001	1 瓶	室温保存 (15-30 °C)
10× 清洗缓冲液	PVB-3024-001	2 袋	PVB-3024-001	2 袋	室温保存 (15-30 °C)

**重要提示!** 1×TSA荧光染料稀释液工作液需使用1×TSA荧光染料稀释液-A和1×TSA荧光染料稀释液-B按1:1混合。TSA荧光染料-PVB 染料一旦使用1×TSA荧光染料稀释液工作液制备成1×TSA荧光染料，应在5天内完成使用。超过一周后稀释过的染料不建议继续使用。TSA荧光染料每次使用后，请使用封口膜封好，放在冷藏保存。

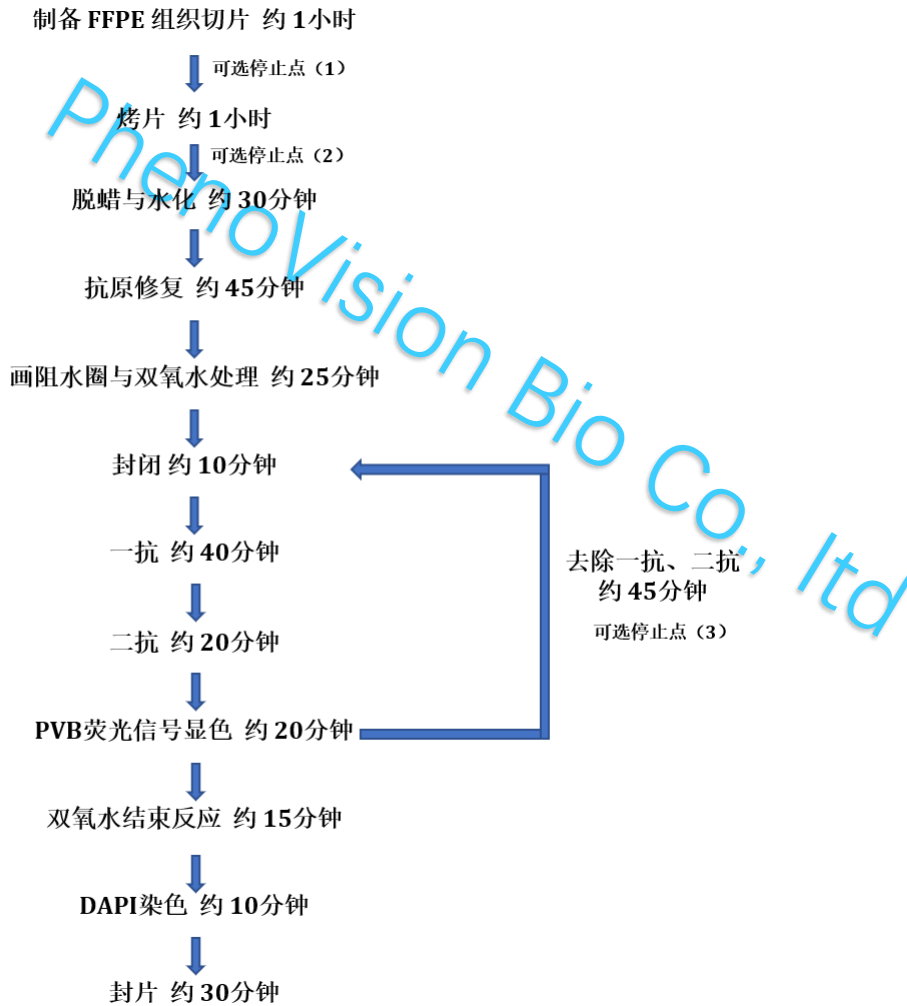
【储存条件】

1. 试剂盒有效期为 12 个月，开封后有效期为 3 个月，请尽快使用。
2. 部分试剂 2~8 °C 避光保存。使用前充分混匀。
3. 生产日期和失效日期见包装标签。
4. TSA 荧光染料使用封口膜密封，2~8 °C 避光保存。

【设备耗材】

1. 检测所需设备器材：荧光显微镜或荧光扫描仪、通风橱、微波炉、水浴锅、干燥烤箱等。
2. 检测所需耗材器皿：阻水笔、盖玻片、免疫组化的抗体孵育湿盒、清洗槽、载玻片夹、24 位垂直载玻片架、纸巾或吸水纸等。

【实验流程】



【操作步骤】

1. 制备 FFPE 组织切片
  - 1) 样本取材后，立即放入 10% NBF 中，室温下固定 16-32 小时（根据组织类型和大小，调整固定时间）。
  - 重要提示！** 固定时间不宜少于16小时或长于32小时，以保证mIF检测的结果。
  - 2) 用 1× PBS 清洗样本。
  - 3) 使用乙醇进行逐级脱水，然后使用二甲苯对样本进行透明。
  - 4) 采用标准流程对样本进行石蜡包埋。包埋好的样本可在有干燥剂的条件下室温存储。
  - 5) 根据需要修石蜡块，用切片机将包埋好的组织切成 3-5  $\mu\text{m}$  的切片。
  - 6) 40°C温水中展片，捞片并将切片贴附在高粘附载玻片中心位置上。每张载玻片建议只贴附一个组织切片。
  - 7) 在室温下过夜风干载玻片。

**重要提示!** 拟长期保留的切片请在冷藏干燥环境中存储切片。

可选停止点 (1) 请使用2—3个月内制备的组织切片。请在室温下干燥存储切片。

## 2. 烤片

将石蜡切片放置于60°C干燥箱中烤片60 min。

可选停止点 (2) 烤片完成后立即使用,或在室温下干燥存储,不超过2天。

## 3. 脱蜡与水化

在通风橱内进行脱蜡和水化

- 1) 准备四个盛有新鲜二甲苯染色盒,两个盛有新鲜无水乙醇染色盒,一个盛有70%乙醇染色盒。
- 2) 将玻片依次放入新鲜二甲苯 I、新鲜二甲苯 II、新鲜二甲苯 III、新鲜二甲苯 IV 各5 min,无水乙醇 I、无水乙醇 II 各2min,70%乙醇2min,蒸馏水浸泡5 min。

## 4. 抗原修复

### 1) 试剂准备:

取50×抗原修复液4mL,加入到196ml蒸馏水中,制备成1×抗原修复液。

取10×1L清洗缓冲液粉末1袋,加入到适量蒸馏水中,定容到1000ml(混匀),制备成10×清洗缓冲液贮存液;根据实验需要稀释至1×清洗缓冲液,每1000ml的1×清洗缓冲液加入0.5ml Tween-20混匀后使用。

**重要提示!** 溶解清洗缓冲液的水需要使用蒸馏水或者双蒸水。否则有可能出现清洗液浑浊。

- 2) 将抗原修复液在微波炉里高火加热2.5 min至沸腾,将装有样本的玻片架浸入抗原修复液中,低火保持20 min,取出后室温放置冷却20 min。

**注:** 以下步骤中所有孵育均在湿盒中进行,清洗均在清洗槽中进行。

## 5. 细胞通透与封闭

- 1) 用阻水笔在每张样本上画阻水圈,把样本圈起来,阻水圈位置以距离组织切片边缘3mm左右为宜。
- 2) 对圈内的组织切片滴加PVB过氧化氢,浸润样本10 min (RT避光),去除内源性过氧化物酶。用蒸馏水冲洗1次,1×清洗缓冲液浸泡洗5 min。

## 6. 封闭

- 1) 取适量10×封闭液(100μl/抗体/slide),使用蒸馏水十倍稀释,制备成1×封闭液,配置好的1×封闭液建议保存在2-8°C(一周内用完)。
- 2) 将玻片固定在载玻片固定架上,滴加1×封闭液,在室温下孵育10 min,去除多余的封闭液。

## 7. 孵育一抗

- 1) 取适量10×一抗稀释液,使用蒸馏水十倍稀释,制备成1×抗体稀释液;配置好的1×抗体稀释液建议保存在2-8°C(一周内用完)。
- 2) 准备一抗抗体工作液:使用1×抗体稀释液按照适当的稀释比稀释一抗。
- 3) 对样本滴加适量稀释好的一抗试剂(视样本大小而定,约100μl/slide),室温孵育30 min。1×清洗缓冲液漂洗3次,每次3 min。

## 8. 孵育二抗

对样本滴加适量二抗试剂(视样本大小而定,约100μl/slide),室温孵育10 min。1×清洗缓冲液漂洗3次,每次3 min。

## 9. TSA 荧光染色信号显色

- 1) 使用1×TSA 荧光染料稀释液-A 和1×TSA 荧光染料稀释液-B 按1:1混合后制备成1×TSA 荧光染料稀释液工作液,用该工作液按一定比例稀释染料。

染料名称	稀释比	取量 (μl)
TSA 荧光染料-PVB520	推荐 1:100	视样本数量而定, 约 100μl/slide
TSA 荧光染料-PVB570	使用 1×TSA 荧光染料 稀释液工作液稀释	
荧光染料-DAPI	推荐1:100 使用 1×清洗液稀释	

**重要提示!** 1×TSA荧光染料稀释液工作液需使用1×TSA荧光染料稀释液-A和1×TSA荧光染料稀释液-B按1:1混合。TSA荧光染料-PVB 染料一旦使用1×TSA荧光染料稀释液工作液制备成1×TSA荧光染料-PVB 染料, 应在5天内完成使用。超过一周后稀释过的染料不建议继续使用。TSA荧光染料-PVB 染料在每次开管使用前, 请先瞬时离心, 保证所有液体均离心到管底, 之后再吸取对应体积的染料。TSA荧光染料每次使用后, 请使用封口膜封好, 放在冷藏保存。

2) 对样本滴加适量 1×TSA 荧光染料 (如稀释好的 TSA 荧光染料-PVB520), 室温孵育 10 min, 1×清洗缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min。

#### 10. 去除一抗、二抗

将倒入新鲜的1×抗原修复液的孵育盒放在微波炉中, 高火加热2.5 min至沸腾, 将玻片从固定架取下插入24位垂直玻片架后浸入抗原修复液中, 低火保持20 min, 取出装有切片的孵育盒后室温放置20 min。

可选停止点 (3) 去除一抗、二抗后可在修复液中室温下过夜保存, 第二天继续实验, 此步骤不建议超过1天。

11. 重复步骤 6-10, 依次在步骤 7 和步骤 9 加入相应的一抗抗体和 1×TSA 显色试剂, 完成 2 个一抗抗体的染色。

#### 12. 结束反应

对样本滴加PVB过氧化氢浸润样本10 min (RT 避光) 终止反应。用蒸馏水冲洗1次, 1×清洗缓冲液漂洗5 min。

#### 13. 细胞核 DAPI 染色

1) 准备 DAPI 复染试剂: 将 DAPI 试剂用 1×清洗缓冲液按照 1: 100 稀释 (视样本数量而定, 约 100 μl/slide)

2) 对样本滴加适量 DAPI 复染试剂, 室温孵育 5 min, 1×清洗缓冲液漂洗 5 min。

#### 14. 封片

擦去阻水圈, 使用抗荧光淬灭封片剂进行封片, 必要时使用指甲油固定盖玻片。

注: 1. 染色后的玻片可在常温避光风干过夜, 长期保存需要保存在4°C冰箱中。

2. 建议染色完成后一周内进行多色图像采集。

#### 【企业信息】

企业名称: 北京菲诺维康生物科技有限公司

公司地址: 北京市大兴区嘉捷·box企业汇15号楼1单元3层

联系电话: 86-010-67873050

电子邮箱: [info@phenobiotech.com](mailto:info@phenobiotech.com)

#### 【修订日期】

2025.02.13