

## 多重荧光试剂盒 Plus（二标三色）说明书

【产品货号】Gk500534

【产品规格】10T/25T/50T/100T

【储存条件】长期-20℃储存，开封后 2-8℃储存，密封避光

【有效期】一年

### 【染色原理】

多重荧光免疫组化染色试剂盒采用酪胺信号放大技术(TSA, Tyramide signal amplification)，利用辣根过氧化物酶（HRP）介导的酶促反应对靶蛋白进行高密度原位标记，大幅提高检测的灵敏度和信噪比。TSA 技术采用 HRP 标记的二抗，HRP 催化加入体系的荧光素底物，生成活化荧光底物，活化底物可与抗原上的酪氨酸共价结合，使样品上稳定地共价结合荧光素。用热修复洗去非共价结合的抗体。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。此类型试剂盒的优点之一是荧光信号比传统免疫荧光强 10 倍以上，第二也是更重要的，可以使用同一种属的一抗实现多重标记。

### 【主要组成部分】

组成名称	10T	25T	50T	100T	保存条件
PPT-480 荧光染料	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	2-8℃、避光保存
PPT-520 荧光染料	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	2-8℃、避光保存

### 【多重荧光试剂盒-二标三色】

组成名称	10T	25T	50T	100T	保存条件
20X 抗原修复液(PH9.0)	100ml	150ml	200ml	250ml	2-8℃、避光保存
羊抗兔二抗（即用）	10ul	25ul	50ul	100ul	2-8℃、避光保存
染封一体抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)	0.5ml	1.5ml	2.5ml	5ml	2-8℃、避光保存
信号放大 A 液（480 荧光染料）	0.5ml	2ml	4.5ml	9.5ml	2-8℃、避光保存
信号放大 A 液（520 荧光染料）	0.5ml	2ml	4.5ml	9.5ml	2-8℃、避光保存
信号放大 B 液	1ml	1ml	1ml	1ml	2-8℃、避光保存

### 【检测样本】

1. 石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞爬片（建议冰冻切片，细胞爬片需要配合抗体洗脱液使用）；
2. 组织离体后使用 10%中性福尔马林固定，固定时间 24-72h 最佳；
3. 建议组织切片厚度 3-5  $\mu\text{m}$ ，使用防脱载玻片捞片。

【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

荧光染料	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
DAPI 核染料	358	461
PPT-480 荧光染料	435	480
PPT-520 荧光染料	490	520
PPT-570 荧光染料	550	570
PPT-620 荧光染料	590	620
PPT-670 荧光染料	630	670
PPT-780 荧光染料	750	780

使用前将荧光染料与对应荧光素（波长）的信号放大A液充分混合形成C液，将C液与信号放大B液按照（99:1）配制（使用前半小时内配置**荧光素工作液**，请勿提前配置）

例如（99ulC液+1ul 信号放大B液）=100ul 为荧光素工作液，推荐可染一张片。

【山羊抗兔二抗工作液配制】 将山羊抗兔二抗浓缩液，用PBS缓冲液按1：200比例稀释为工作液（例如：**1ul 羊抗兔二抗+199ulPBS 缓冲液=200ul 工作液**，推荐100ul 染一张片）。

【检验方法】

注意：实验前确认所需设备、耗材、试剂等已准备完毕，仔细阅读【荧光染料工作液配制】部分并按要求配制工作液。

一. 手工检验步骤

1. 样本准备：

- 石蜡切片:依次将切片放入二甲苯 15min-二甲苯Ⅱ15min-无水乙醇|5min-无水乙醇Ⅱ5min-95%乙醇 5min-85%乙醇 5min-75%乙醇 5min，蒸馏水洗。
- 冰冻切片:冰冻切片固定 10-30min，PBS 洗 5min，重复 3 次，滴加 0.3% TritonX-100 破膜液通透 20min(检测膜表达蛋白可省略此步)，PBS 洗三次，5min/次（建议用抗体洗脱液进行清洗）。
- 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，5min/次。
- 抗原修复：将抗原修复液工作液提前放置微波水浴高火预热 5min，放入玻片，高火 5min，中低火 15min，室温隔水冷却 30min；
- 洗涤：蒸馏水洗 2 次，5min/次；
- 阻断：3%过氧化氢室温 10min；
- 洗涤：PBS 洗 3 次，5min/次；
- 血清封闭液 37℃孵育，封闭 15-30min（封闭液推荐与二抗同源血清，例如：山羊抗兔二抗需要使用山羊血清）；
- 一抗孵育：滴加一抗工作液 100ul，37℃孵育 1 h（或者 4℃过夜孵育）；
- 洗涤：PBS 洗 3 次，5min/次；
- 二抗孵育：滴加二抗 100 μl，37℃孵育 15-30 min；
- 洗涤：PBS 洗 3 次，5min/次；

11. 荧光显色：滴加荧光染料工作液 100ul，室温 5min；
12. 洗涤：PBS 洗 3 次，5min/次；
13. 抗原修复液处理：重复步骤 2-12；
14. 抗体依次染色：第一个抗体染色结束，后续每个抗体均需重复步骤 2-12，依次完成所有染色；
15. 滴加染封一体抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI) 30-50ul，盖玻片封片。

**\*实验步骤中所有条件均为建议条件，具体实验条件根据实际情况进行调整。**

**【注意事项】**

- 1、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、本试剂仅限经专业培训的人员使用。
- 4、应使用适当防护措施，避免试剂接触皮肤和眼睛，接触到敏感区域，立即用大量清水冲洗。
- 5、载玻片应清洁、无酸碱污染，否则影响染色效果。
- 6、若将本试剂盒的染色组分与其他公司的产品合并使用，实验结果可能会出现异常情况。

官方网址：www.genesion.com.cn

公司邮箱：GenXion@vip.qq.com

订货热线：4006-169-114、020-84224925

