Novo-light™ 多重荧光免疫组化染色试剂盒

多重荧光免疫组化染色技术简介：免疫组化染色是一种研究组织形态和原位蛋白表达的常见技术，随着免疫治疗的崛起，越来越多肿瘤微环境种的标志物被发现与疾病治疗、进展密切相关，对这些标志物进行同时染色标记、并研究它们之间的共定位、表达量和距离关系成为肿瘤免疫研究的普遍需求。

酪氨信号放大技术原理：类似常规免疫组化的 DAB 显色法，TSA 技术同样采用 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。之后用热修复洗去非共价结合的抗体，再换下一种一抗来第二轮孵育，换另一种荧光素底物，如此往复就可实现多重标记。 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**。原理及染色过程如下：

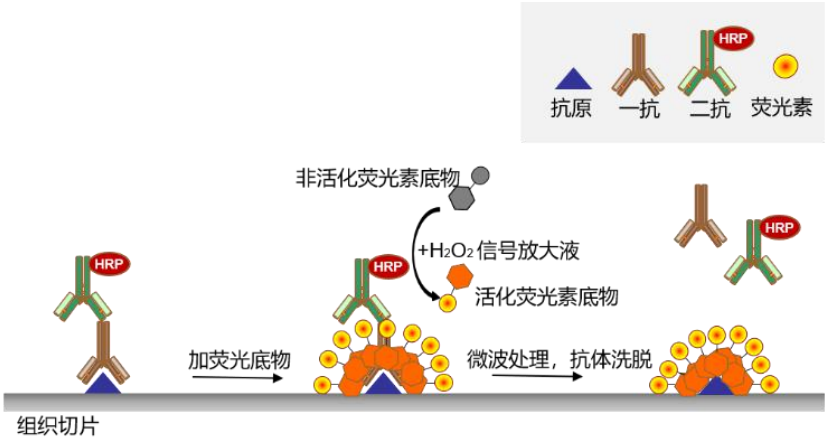


图 1 酪氨信号放大技术原理

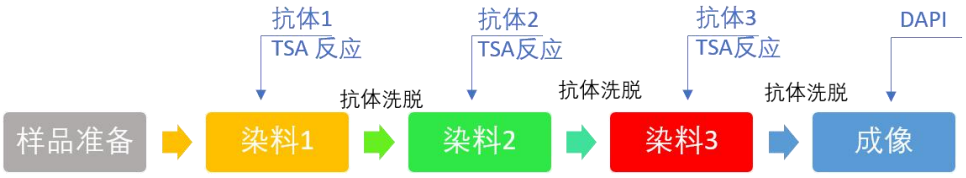


图 2 多重荧光免疫组化染色流程图

Novo-light™ 多重荧光免疫组化染色试剂盒 7 色

使用说明书

【货号、规格】

产品名称	货号	规格
Novo-Light TSA 7 色试剂盒（鼠源样本）	M-D110071-50T	50T
Novo-Light TSA 7 色试剂盒（人源样本）	H-D110071-50T	50T

【试剂盒主要组成成分】

主要组成成分	浓度	货号	储存条件	规格
TSA 520	100×母液	D110011-50T	2-8℃	50μl
TSA 540	100×母液	D110012-50T	2-8℃	50μl
TSA 570	100×母液	D110013-50T	2-8℃	50μl
TSA 620	100×母液	D110014-50T	2-8℃	50μl
TSA 650	100×母液	D110015-50T	2-8℃	50μl
TSA 700	100×母液	D110017-50T	2-8℃	50μl
信号放大反应液	1×稀释液	A10014	2-8℃	30ml
Polymer HRP 标记二抗	1×稀释液	A10011 (羊抗鼠/兔) A10012（羊抗兔）	2-8℃	30ml
DAPI	100×母液	A11008-100	2-8℃	100μl
抗荧光淬灭封片剂	1×工作液	A11009-5	2-8℃	5ml

注：染料的稀释比例需根据具体实验进行调整，一般按 1：100 的比例稀释。

【储存条件及有效期】

2～8℃储存。荧光染料需避光保存。

【样本实验要求】

1. 可用于小鼠及人的 FFPE 样本检测。
2. 福尔马林固定的蜡块或玻片，大块组织或 TMA 都可以，封蜡不能有明显的破损。

3. 玻片样本，组织需要紧贴玻片，避免褶皱，玻片不能有破损、划伤或污渍。

4. 切片厚度为 4μm 左右，使用防脱载玻片。样本应置于玻片正面、中央。

【检验方法】

1. **所需材料：**

1000W 以上可调功率的微波炉，至少有 5 个以上的挡位，移液器、恒温干燥箱、免疫组化笔、微波修复杯、染色缸、计时器、孵育湿盒、盖玻片、通风橱、洗瓶、荧光显微镜。

2. 所需试剂：

DMSO、灭菌去离子水、二甲苯、乙醇（100%、90%、70%）、抗原修复液酸性（A11006-100）或碱性抗原修复液（A11007-100）、3%双氧水、封闭/抗体稀释液（A10015-100）、TBST 或 PBST。

3. 试剂准备：

1) TBST 洗液：25 mM TRIS-HCl （pH 7.5），150 mM NaCl，0.05% Tween®20 (v/v)。

2) 抗原修复液：抗原修复液用蒸馏水稀释至合适浓度，制成免疫组化抗原修复缓冲工作液。

3) 抗体稀释液：可做抗体稀释和封闭使用，即用型。

4) 一抗工作液：用抗体稀释液按照抗体说明书要求稀释。

5) 二抗工作液：二抗工作液为即用型。请注意试剂盒附带的二抗类型。若检测人源样本，一抗多用鼠抗或兔抗，因此需使用**羊抗鼠兔**通用型二抗（A10011）。若检测鼠源样本，不建议使用鼠抗做一抗，推荐使用**羊抗兔**二抗（A10011）。

6) TSA 荧光染料染色工作液：TSA 系列单色荧光染料为 100x 母液，使用前用信号放大反应液稀释按 1：100 稀释，配好的工作液 4℃保存，仅限当天使用。

7) DAPI 工作液：100×母液用 PBS 稀释 100 倍，制备 1×工作液，4℃保存，仅限当天使用。

4. **检测设备：**

荧光显微镜或荧光全片扫描设备，TSA 系列荧光染料适用的激发和发射滤光片应符合下表中的建议。

TSA 荧光染料名	**波长**	
	激发 Excitation	**发射 Emission**
TSA 520	488	519
TSA 540	517	539
TSA 570	555	570
TSA 620	594	615
TSA 650	633	655
TSA 700	682	702

【多重荧光免疫组化染色 step-by-step，FFPE 样本】

注意：本实验操作大约需耗时 8h，如需中途停止可选择以下步骤：

- 抗原修复处理后，在修复液中室温冷却
- 4℃ 封闭
- 4℃ 一抗孵育

1. 样品脱蜡准备：

a) 温箱设置到 60℃，烤片 0.5h 以上。

b) 新鲜二甲苯浸片 10min，重复 2 次。

c) 梯度乙醇浸片：100% 3min；100% 3min ；95% 3min；70% 3min。

d) 灭菌水洗片 1min，重复 3 次。

2. 多重荧光免疫组化染色步骤：

第一轮 C1：

C1.1 抗原修复：把 1× 抗原修复液倒入修复杯中，微波炉高火加热 3min。将脱蜡后的玻片至于修复杯中，低火继续加热 15min 后冷却至室温。

进行该步骤之前建议不放样品进行一次预实验，检测 15min 后液面是否高于样品，避免干片。抗原修复液不能重复使用。

C1.2 灭活：去除玻片上残存洗液，用免疫组化笔圈出玻片上的样本区域，1× TBST 浸洗玻片，滴加 3%双氧水浸没样本区域，灭活 10min。

C1.3 封闭：用 1× TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min，滴加封闭液，覆盖样本区域，室温孵育 10min。

C1.4 一抗孵育：用抗体稀释液按照说明书浓度稀释一抗，去除玻片上的封闭液，加一抗工作液，使其完全覆盖样本。室温孵育 30min 或更长时间（需针对不同抗体做优化调整）。用 1× TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

C1.5 二抗孵育：去除玻片上残存的洗液，滴加 HRP 二抗工作液，浸没样本区域。室温孵育 10min，用 1× TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

C1.6 荧光染色放大信号：去除玻片上残存的洗液，滴加 1× TSA 荧光染料染色工作液，浸没样本区域。室温孵育 10min，用 1× TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。

重复 C1.1—C1.6 的操作，进行后续多轮染色。

每轮染色结束后可用荧光显微镜确认染色情况，注意用 TBST 覆盖样品，防止干片。

3. 染核及封片：

滴加 1× DAPI 工作液到样品上，浸没样本区域，室温孵育 5min。用 1× TBST 浸洗玻片 3 次，每次 2min。然后滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡，长期保存请用透明指甲油对盖玻片边缘进行密封。

4. 成像：

选用合适的成像设备按照【检验设备】的条件设置成像设备对染色后的组织片在荧光显微镜下观察并进

行判读。

【使用说明】

1. 染色过程中，需设置组织阳性对照和试剂阴性对照同时进行。
2. 阳性信号定位不正确即为假阳性，包括着色不匀、背景染色、边缘效应。组织的某些特定成分也会导致假阳性。
3. 如果信号太强或背景偏高请减少荧光信号放大步骤（C1.6）的反应时间至 1-3 分钟，或降低一抗浓度，或减少一抗孵育时间。
4. 抗原修复方法不当或一抗失效，均有可能导致假阴性结果。
5. 如需进行冰冻切片样本的实验，无需做第一步抗原修复，并需使用特殊的冰冻切片抗体洗脱液，详情请咨询媛禧生物。

【注意事项】

1. 本试剂盒只用于免疫组化，不做其他用途。
2. 本试剂盒仅限专业人员使用。
3. 应使用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
4. 请在实际有效期内使用。
5. 若将本试剂盒的染色组分与其他公司的产品混合使用，在染色过程中可能出现异常情况。
6. 为了防止可能出现的假阴性、假阳性结果，实验过程需设置阳性对照和阴性对照同时进行。

【基本信息】

生产企业：上海媛禧生物科技有限公司

联系电话：021-58086682

电子邮箱：info@yuanxibio.com

【说明书批准日期】

2021 年 12 月