

## 鼠兔双标三色荧光检测试剂盒（温和型）

### 【产品货号】

RS0069

### 【产品名称】

- 1、通用名称：鼠兔双标三色荧光检测试剂盒 (pH9.0)
- 2、英文名称：Double-Fluorescence immunohistochemical mouse/rabbit kit (pH9.0)

### 【主要组成成份】

编号	名称	规格			保存条件
		1mL	2mL	5mL	
试剂 9A	脱蜡修复二合一溶液 20X	60 mL	60 mL	200mL	2~8° C
试剂 B	过氧化物酶封闭缓冲液	1mL	2mL	5mL	2~8° C
试剂 C	HRP 多聚合抗兔/鼠二抗	2mL	4mL	10mL	2~8° C
试剂 D-488	488 标记 Tyramide	1mL	2mL	5mL	2~8° C
试剂 D-594	594 标记 Tyramide	1mL	2mL	5mL	2~8° C
试剂 G	DAPI/封片二合一溶液	1mL	2mL	5mL	-20° C
试剂 F	温和型抗体剥离液	2mL	4mL	10mL	2~8° C

### 【预期用途】

免疫组织荧光染色，配合 Immunoway 常规兔来源或鼠来源的浓缩型或即用型一抗使用。

### 【作用原理】

鼠兔多色免疫荧光检测试剂盒，摆脱传统免疫荧光实验条件对抗体种属来源的限制和束缚，无需通风橱和传统的脱蜡修复缸，将传统的三次二甲苯脱蜡、三到五次梯度乙醇水化和抗原修复整合成一个溶液，DAPI 与封片整合成了一个溶液，有效的缩短了操作时间，简化了繁琐的操作步骤。提高了染色的稳定性。三种荧光染料免疫组化实验用到的试剂一站式配齐，具有高灵敏度的 HRP 多聚合物二抗 (Anti-Rabbit/Mouse) 和 荧光显色液配套使用，可以一次显色两种抗体 (无需考虑抗体来源种属)，使得该试剂盒具有操作方便、快速、灵敏度高等特点。

### 【包装规格】

1mL 2mL 5mL 装

### 【储存条件及有效期】

- 1、储存要求：见上表。
- 2、有效期：一年

### 【适用仪器】

手工操作

### 【自备材料】

- 1、合适的加热装置，染缸，移液器，盖玻片等常用耗材
- 2、无水酒精
- 3、中性树脂
- 4、PBST、纯水等常用试剂

### 【样本要求】

石蜡或冰冻切片，细胞爬片。建议配合 Immunoway 常规浓缩型或即用型一抗使用。

石蜡切片：建议一抗应用中注明 IHC-p

冰冻切片：建议一抗应用中注明 IHC-f

细胞爬片：建议一抗应用中注明 IF/ICC

部分冰冻或组织切片经多次加热易掉片的，可把组织放入孔板中操作

#### 【使用前必读】

- 1、使用去离子水稀释试剂 9A，体积比 1:19，加入去离子水至**工作液**。
- 2、封片后盖玻片可能有滑动现象，不影响成像。如需寄送或直立保存切片，请在盖玻片四周滴加指甲油或中性树胶晾干即可。
- 3、石蜡切片使用前需提前放入烘箱中 65° C 烤片一小时。冰冻切片、细胞爬片无此步骤。
- 4、TSA 染色比常规的荧光显色、TMB 显色有更高的灵敏度，如果荧光强度过高，可以尝试加倍稀释一抗，或加倍稀释 Tyramide 染料
- 5、可通过常规染色或预实验确定指标的表达丰度，通常优先染色表达量最高的指标，最后染色表达量最低的指标。
- 6、525、555、594 标记在镜下为不同程度的红色，请使用专门成像仪器和分析软件区分光谱。
- 7、本试剂盒中的脱蜡抗原修复液适配绝大多数一抗，如遇染色效果不佳，可使用通用公开配方对切片进行脱蜡，抗原修复步骤。
- 8、因冰冻切片、细胞爬片的粘附能力较小，使用前可单独进行步骤 9 的预实验，确保不发生掉片现象

#### 【成像推荐荧光通道】

编号	名称	激发光	发射光	建议滤光片	推荐颜色设置
试剂 D-350	350 标记 Tyramide	350	450	DAPI	
试剂 D-435	435 标记 Tyramide	435	470	Aqua, Opa1480	
试剂 D-488	488 标记 Tyramide	496	519	FITC, Opa1520	
试剂 D-525	525 标记 Tyramide	530	560	Cy3, SpGold, Opa1540	
试剂 D-555	555 标记 Tyramide	555	567	TRITC, Cy3, SpOr, Opa1570	
试剂 D-594	594 标记 Tyramide	590	617	SpRed, TxRed, Opa1620	
试剂 D-647	647 标记 Tyramide	650	665	Cy5, Opa1650	
试剂 D-680	680 标记 Tyramide	680	700	Cy5.5, Opa1690	
试剂 D-750	750 标记 Tyramide	750	796	Cy7, Opa1780	
试剂 G	DAPI 封片二合一溶液	345	455	DAPI	

\*因激发与发射光谱的重叠,在荧光显微镜物镜下 Opa1540/570 可以混合观察。Cy5/Cy5.5 可以混合观察

\*\* 使用全光谱成像系统可以拆分单独光谱实现 6 色以上成像

#### 【石蜡切片使用步骤】

1. 将试剂 9A (脱蜡修复二合一) **工作液**放入修复盒中，加热至沸腾。
2. 将切片放入沸腾的试剂 9A (脱蜡修复二合一) 工作液中 (为保证修复液的 pH 值，不能使用金属切片架)，液体完全浸没切片上的组织。中小火持续加热 30 min.
3. 将修复盒撤离加热源，自然冷却至室温。
4. 取出切片放入装有蒸馏水的烧杯中，再用蒸馏水浸洗 5-6 遍。
5. 将玻片沥干几秒钟，用滤纸把组织周围的水分擦掉后，滴加**试剂 B** (过氧化物酶封闭缓冲液) 50-100ul (可以覆盖组织即可)，室温孵育 15 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
6. 将玻片沥干几秒钟，用滤纸把组织周围的水分擦掉后，用免疫组化笔将组织圈起来 (首尾要闭合，且不能画到组织上)，稀释一抗，滴加相应的一抗到组织上，直至完全覆盖组织。室温或 37° C 孵育 1~2 小时，或 4° C 湿盒中过夜后 37° C 复温 30 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
7. 将玻片沥干几秒钟，用滤纸把组织周围的水分擦掉后，滴加**试剂 C** (HRP 多聚抗兔/鼠二抗) 工作液 50-100ul (可以覆盖组织即可)，室温孵育 30 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
8. 加入荧光染料**试剂 D-594** 工作液 50-100ul (可以覆盖组织即可)，10 分钟后，PBST 冲洗 2 min × 3 次。
9. 加入**试剂 F** (抗体剥离液需预热)：滴加适量 37° C 预热的抗体洗脱液覆盖组织，37° C 放置 5-20min，甩干后无需洗涤，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖组织 37° C 放置 5-20min，弃洗脱液，PBST 洗三次，每次 5min
10. 重复步骤 6-8，中间荧光染料改为试剂 D-488，孵育第二支一抗

11. 滴一滴试剂 G (约 30-50u1) 在组织切片上, 盖上盖玻片, 让切片接触封片液, 尽量避免气泡, 扫描或拍照

**备注:** 以上荧光顺序适用于各指标表达含量相差不大的情况。可以根据对应指标的表达情况按预实验结果调整荧光染料顺序。例如可优先标记高表达指标, 后标记低表达指标。部分组织经过多次加热可能会影响一抗与蛋白的结合, 建议通过单色的多轮加热步骤调整染色顺序。

#### 【细胞爬片/冰冻切片使用步骤】

1. **可选步骤:** 固定: 恢复切片至室温后使用滴加 4%多聚甲醛 (试剂盒未提供) 10-15min, 用 1xPBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。此步骤通常在细胞爬片加入。冰冻切片在 OCT 包埋前未做固定处理的。建议加入此步骤。
2. **可选步骤:** 抗原修复: 试剂 9A (脱蜡修复二合一) 工作液放入修复盒中, 加热至沸腾。将切片放入沸腾的试剂 9A (脱蜡修复二合一) 工作液中 (为保证修复液的 pH 值, 不能使用金属切片架), 液体完全浸没切片上的组织。中小火持续加热 30 min. 将修复盒撤离加热源, 自然冷却至室温。  
**备注:** 是否需要抗原修复取决于一抗供应商、组织种类等多种因素, 可以采用实验室常用的抗原修复试剂或其他已验证的修复条件。冰冻切片易掉片的组织、细胞爬片可以省略此步骤或者水浴修复 (参考步骤 9)
3. **可选步骤:** 破膜: 用 0.5%Triton X-100 (试剂盒未提供) 室温通透 20 min (细胞膜上表达的抗原省略此步骤)。
4. 1xPBS 洗涤三次, 每次 2 分钟。
5. 将玻片沥干几秒钟, 用滤纸把组织周围的水分擦掉后, 滴加试剂 B (过氧化物酶封闭缓冲液) 50-100u1 (可以覆盖组织即可), 室温孵育 15 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
6. 将玻片沥干几秒钟, 用滤纸把组织周围的水分擦掉后, 用免疫组化笔将组织圈起来 (首尾要闭合, 且不能画到组织上), 稀释一抗, 滴加相应的一抗到组织上, 直至完全覆盖组织。室温或 37° C 孵育 1~2 小时, 或 4° C 湿盒中过夜后 37° C 复温 30 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
7. 将玻片沥干几秒钟, 用滤纸把组织周围的水分擦掉后, 滴加试剂 C (HRP 多聚抗兔/鼠二抗) 工作液 50-100u1 (可以覆盖组织即可), 室温孵育 30 min, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
8. 加入荧光染料试剂 D-594 工作液 50-100u1 (可以覆盖组织即可), 10 分钟后, PBST 冲洗 2 min × 3 次。
9. 加入试剂 F (抗体剥离液需预热): 滴加适量 37° C 预热的抗体洗脱液覆盖组织, 37° C 放置 5-20min, 甩干后无需洗涤, 再次滴加适量抗体洗脱液覆盖组织 37° C 放置 5-20min, 弃洗脱液, PBST 洗三次, 每次 5min
10. 重复步骤 6-8, 中间荧光染料改为试剂 D-488, 孵育第二支一抗
11. 滴一滴试剂 G (约 30-50u1) 在组织切片上, 盖上盖玻片, 让切片接触封片液, 尽量避免气泡, 扫描或拍照

**备注:** 1 以上荧光顺序适用于各指标表达含量相差不大的情况。可以根据对应指标的表达情况按预实验结果调整荧光染料顺序。例如可优先标记高表达指标, 后标记低表达指标。部分组织经过多次加热可能会影响一抗与蛋白的结合, 建议通过单色的多轮加热步骤调整染色顺序。

#### 【产品性能指标】

- 1、符合性: 阳性对照 (实验自备) 结果为阳性, 阳性着色的定位应准确, 无背景着色; 空白对照和阴性对照染色结果为阴性。
- 2、批内重复性: 同一组织来源的组织切片染色的强度和定位无明显差异。
- 3、批间重复性: 不同批号试剂对同一组织来源的组织片染色的强度和定位无明显差异。

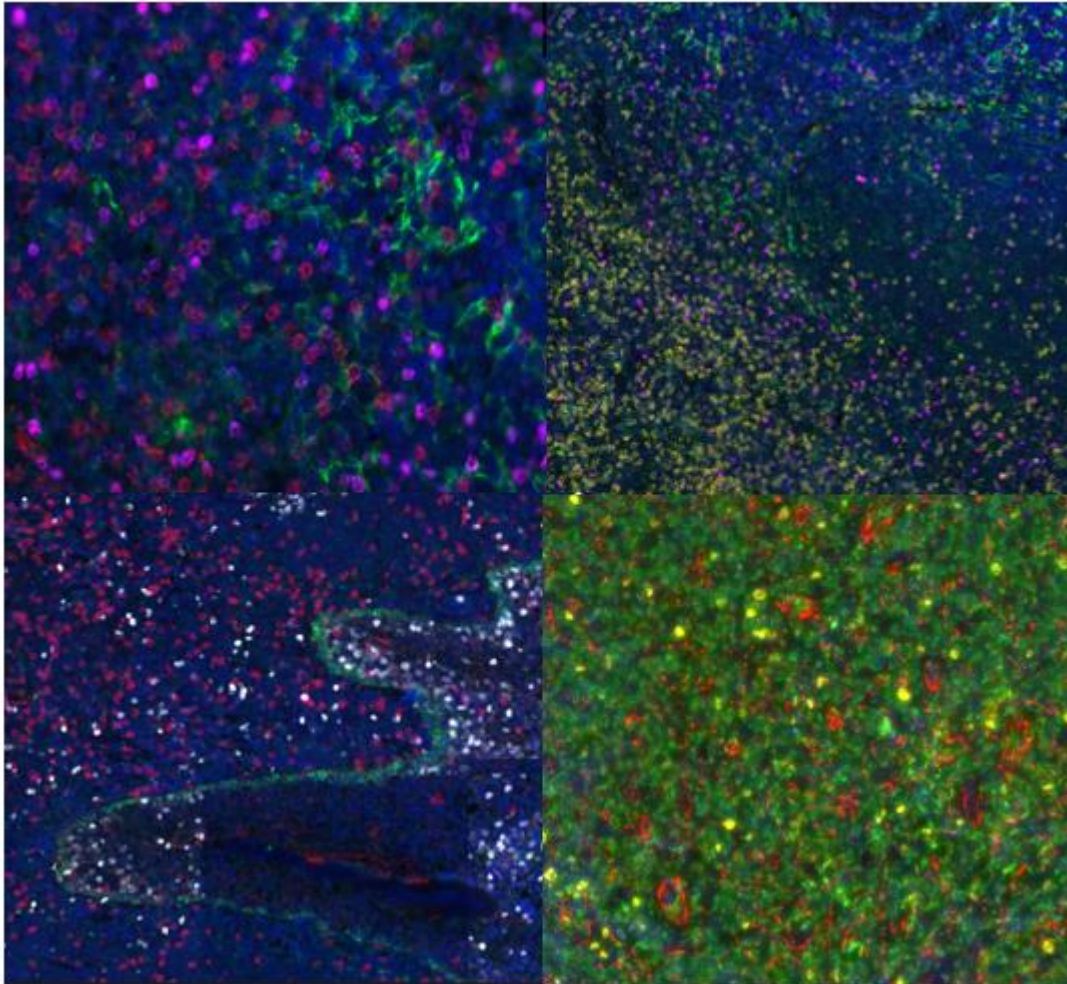
#### 【注意事项】

- 1、本品仅用于科研, 不做其他用途。
- 2、需专业人员使用。
- 3、应用适当防护措施, 避免试剂同皮肤和眼睛接触。
- 4、废液处理: 进行无害化处理, 并符合相关的环保要求。
- 5、操作过程中需保持载玻片组织的湿润, 如出现干片情况, 会导致非特异性的染色结果。
- 6、持续加热修复的过程中, 只需中小火维持沸腾, 切勿高火加热使脱蜡修复试剂溅出烧杯。

#### 【常见问题】

- 1、染色过深: 一抗浓度过高, 时间过长。
- 2、染色过浅或无染色: 一抗浓度过低, 时间过短。
- 3、无特异性染色: 切片脱蜡不彻底。可适当延长烤片时间。

【染色示意】



【相关产品订购】

货号	单独组分	规格
RS0011	HRP 多聚合抗兔/鼠二抗	3mL 10mL 100mL
YS0006	350 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0007	488 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0008	525 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0009	555 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL

YS0010	594 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0011	647 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0012	680 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0018	750 标记 Tyramide	2mL 5mL 10mL
YS0004	抗原修复液 20X pH9.0	250mL
YS0002	抗原修复液 20X pH6.0	250mL
YS0014	DAPI/封片二合一溶液(防淬灭)	5mL
YS0124	温和型抗体剥离液	30mL

编号	名称	规格
RS0068	鼠兔三标四色荧光检测试剂盒(温和型)	1mL 2mL 5mL
RS0069	鼠兔双标三色荧光检测试剂盒(温和型)	1mL 2mL 5mL
RS0070	鼠兔四标五色荧光检测试剂盒(温和型)	1mL 2mL 5mL
RS0071	鼠兔五标六色荧光检测试剂盒(温和型)	1mL 2mL 5mL
RS0072	鼠兔六标七色荧光检测试剂盒(温和型)	1mL 2mL 5mL

**【图标示意】**

以下图标可能部分标注于产品外标签上



货号



批号



供体外诊断用



仅供科研使用



保存温度



参照使用说明书



制造厂商



有效期