同源 IF 三染试剂盒

Cat Number：GPI18251

Store at -20℃ for 6 months，避光

For Research Use Only

一 试剂盒说明

产品应用：

本试剂盒应用于冰冻切片或石蜡切片同源IF三染实验。请于步骤6开始使用本试剂盒内试剂。样本以18mm X 18mm 100ul的使用量计算。

二 试剂盒组份

组分名称	20 tests	保存条件
试剂 A	15ul	
试剂 B	1ml	
试剂 C	10ml	
稀释液	25ml	-20℃，避光
FITC 试剂	4ul	
Cy3 试剂	4ul	
Cy5 试剂	4ul	

三 操作步骤

试剂准备

1. 取 1ul 试剂 A 溶于 500ul 稀释液，做为**试剂 1**，混匀避光待用。

2. 取 1ul 试剂 B 溶于 10ul 稀释液，做为**试剂 2**，混匀避光待用。

3. **同源 IF 三染工作液**：取 1ul 上述**试剂 2** 溶于 100ul 上述**试剂 1**，混匀避光待用。（**注：同源 IF 三染工作液根据样本多少计算用量现配现用。**）

4. **反应终止工作液**：取 10ul 试剂 B 溶于 90ul 试剂 C，混匀避光待用。

5. **FITC 工作液**：取 1ul FITC 试剂溶于 1ml 稀释液，混匀避光待用。

6. **Cy3 工作液**：取 1ul Cy3 试剂溶于 1ml 稀释液，混匀避光待用。

7. **Cy5 工作液**：取 1ul Cy5 试剂溶于 1ml 稀释液，混匀避光待用。

实验步骤

1. 石蜡切片常规脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯Ⅰ15min-二甲苯Ⅱ15min-无水乙醇Ⅰ5min-无水乙醇Ⅱ5min-85%酒精 5min-75%酒精 5min-蒸馏水洗。

2. 抗原修复：组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液（pH8.0）的修复盒中于蒸锅内进行抗原修复。温度达到 95℃后计时 30min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。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。

3. 封闭：组化笔画圈，圈内滴加封闭液，室温封闭 30min。

4. 加第一种一抗：甩掉封闭液，圈内滴加第一种一抗，湿盒内 4℃孵育过夜。

5. 加对应 HRP 标记的二抗：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加对应 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温湿盒内孵育 1h。

6. **使用同源 IF 三染 kit 试剂**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min；圈内滴加现配的**同源 IF 三染工作液**，湿盒内室温避光孵育 30min；玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min。

7. **加 FITC 工作液**：切片稍甩干后在圈内滴加 **FITC 工作液**覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

8. **加反应终止工作液**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；切片稍甩干后在圈内滴加**反应终止工作**液覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

9. **加第二种一抗**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；圈内滴加第二种一抗，湿盒内 4℃避光孵育过夜。

10. **加对应 HRP 标记的二抗**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加对应 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 1h。

11. **使用同源 IF 三染 kit 试剂**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min；圈内滴加现配的**同源 IF 三染工作液**，湿盒内室温避光孵育 30min；玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min。

12. **加 Cy3 工作液**：切片稍甩干后在圈内滴加 **Cy3 工作液**覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

13. **加反应终止工作液**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；切片稍甩干后在圈内滴加**反应终止工作**液覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

14. **加第三种一抗**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；圈内滴加第三种一抗，湿盒内 4℃避光孵育过夜。

15. **加对应 HRP 标记的二抗**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加对应 HRP 标记的二抗覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 1h。

16. **使用同源 IF 三染 kit 试剂**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min；圈内滴加现配的**同源 IF 三染工作液**，湿盒内室温避光孵育 30min；玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min。

17. **加 Cy5 工作液**：切片稍甩干后在圈内滴加 **Cy5 工作液**覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

18. **加反应终止工作液**：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；切片稍甩干后在圈内滴加**反应终止工作**液覆盖组织，室温湿盒内避光孵育 30min。

19. 封片：玻片置于 PBS（pH7.4）中在脱色摇床上晃动避光洗涤 2 次，每次 5min；切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂（含 DAPI）封片。

20. 镜检：细胞核在紫外光激发下为蓝色，阳性表达为对应荧光素标记的绿色、红色或粉色。