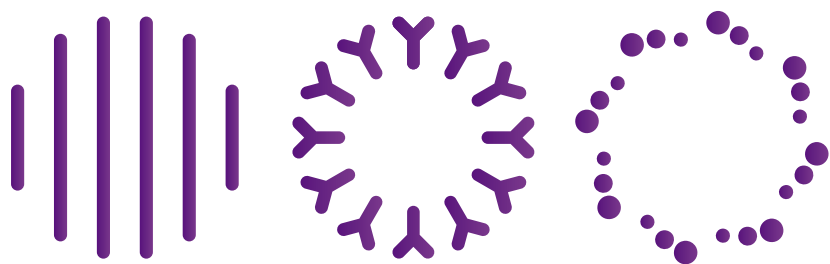


抗体滴度和 IF 预实验 使用说明书



适用产品：时空蛋白转录组 Stereo-CITE

说明书版本号：A

版本历史

说明书版本： A
修订日期： 2024 年 3 月
描述： 首次发布

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。

2024 深圳华大生命科学研究院保留所有权利。

- 本产品仅用于研究，不用于诊断。
- 本手册上的内容可能全部或部分受到适用的知识产权法的保护。深圳华大生命科学研究院和 / 或相应权利主体依法拥有其知识产权，包括但不限于商标权、版权等。
- 深圳华大生命科学研究院不授予或暗示使用我们或任何第三方的任何版权内容或商标（注册或未注册）的权利或许可。未经本单位书面同意，任何人不得擅自使用、修改、复制、公开传播、更改、分发或发布本手册的程序或内容，不得使用或利用设计技巧使用或占有本单位或本单位关联方的商标、标识或其他专有信息（包括图像、文本、网页设计或形式）。
- 此处的任何内容都无意于或应被理解为对此处列出或描述的任何产品的性能的任何保证、表达或暗示。适用于本文所列任何产品的任何和所有保证均载于购买该产品所附的适用销售条款和条件。深圳华大生命科学研究院不做任何保证，并在此声明对本文所述任何第三方产品或协议的使用不做任何保证。

工作流程





目录

第一章 自备物料清单	2
第二章 抗体滴定（新鲜冷冻样本）	
2.1. 实验前准备	6
2.2. 切片准备	7
2.3. 组织贴片	8
2.4. 组织固定	9
2.5. 封闭与一抗孵育	10
2.6. 孵育二抗	11
2.7. 荧光拍照	12
2.8. 抗体滴定最佳浓度选择标准	13
第三章 IF 预实验（新鲜冷冻样本）	
3.1. 实验前准备	15
3.2. 切片准备	16
3.3. 组织贴片	17
3.4. 组织固定	18
3.5. 封闭与一抗孵育	19
3.6. 孵育二抗	20
3.7. 荧光拍照	21
3.8. 多组学 IF 预实验成功标准	22
附录 A 试剂配制总览表	23



提示：额外的操作提示和指导。



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



质量检查点



注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



停止点：您可以在此暂停实验并存储样品。

第一章

自备物料清单



表格 1-1 列出了本实验所需的第三方设备和物料，该清单中不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱、天平等。关于显微镜的要求，请参考《STOmicS 显微镜评估参考手册》。<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

表格 1-1

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
Eppendorf	低温离心机	5418R
-	小型离心机	-
-	移液器	-
-	荧光显微镜（拼接功能）	-
-	漩涡混匀仪	-
试剂		
品牌	描述	产品编号
Ambion	Nuclease-Free Water	AM9937
	20X SSC	AM9770
Boster	4% PFA 多聚甲醛（组织固定液含 DEPC）	AR1069
Invitrogen	剪切鲑鱼精子 DNA（10 mg/mL）	AM9680
Thermo Fisher Scientific	Gibco™ 马血清	26050070
	Gibco™ 山羊血清	16210064
Sigma Aldrich	Triton X-100 Solution, 10%	93443-100ML
Thermo Fisher Scientific	DAPI 溶液（1 mg/mL）	62248
Biolegend	TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody	156604
	Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	422301
FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可根据实验组织的种属选择购买。若为人源组织，选择 Human TruStain FcX™（Biolegend, Cat. No. 422301）；小鼠组织则选择 TruStain FcX™ PLUS（anti-mouse CD16/32）Antibody（Biolegend, Cat.No. 156604）。		
Biolegend	TotalSeq™-A 一抗（自由组合抗体）	-
本产品支持用户自己选择感兴趣的靶标蛋白，自由组合 TotalSeq™-A 一抗进行蛋白和转录组的检测。目前 Biolegend 公司 TotalSeq™-A 一抗只涵盖了针对人和鼠两种物种靶标的抗体，具体抗体的选择可参考此网站： https://www.biolegend.com/en-us/search-results?PageSize=25&Format=TOTALSEQ_A		

试剂

品牌	描述	产品编号
Thermo Fisher Scientific	Alexa Fluor™ Plus 系列 anti-Rat 二抗（用于小鼠样本，其它等同抗体需要自行验证）	A48270
	Alexa Fluor™ Plus 系列 anti-mouse 二抗（用于人类样本，其它等同抗体需要自行验证）	A32773
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML

特别说明：

同型对照抗体 (Isotype control antibody)

同型对照抗体是与一抗保持相似特性但缺乏特异性靶标的抗体。同型对照抗体常被作为阴性对照，用来帮助分辨非特异性背景信号和特异的抗体信号。同型对照抗体的选择应与一抗的种属和类别相同，包括轻链。

例如，如图一，TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) 抗体的同种型 (Isotype) 为 Mouse IgG2b κ，那么进行此种抗体的检测时，就需要加入 TotalSeq™ -A0092 Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl Antibody。具体加入同型对照抗体的种类需要参考所加入的 TotalSeq™-A 一抗的种类来确定。另外需要注意，如果试剂盒搭配 TotalSeq™ -A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 199901) 和 TotalSeq™ -A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 399907) 使用，则无需加入同型对照抗体，因为这两款 Cocktail 中已经加入了同型对照抗体。

同型对照抗体的选择可参考此网址：

https://www.biolegend.com/en-us/search-results?PageSize=25&Category=ISO_CTRL&Format=TOTALSEQ_A

Home > Products

TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody

Pricing & Availability

Product Details

Antigen Details

Documentation

Reviews

Related Protocols

Related Products

Related Pages & Pathways

Related FAQs

Other Formats

Concentration & Expiration Lookup

Certificate of Analysis

Clone 29E.2A3 (See other available formats)

Regulatory Status RUO

Other Names Programmed cell death ligand 1 (PD-L1), B7 homolog 1 (B7-H1)

Isotype Mouse IgG2b, κ

Barcode Sequence GTTGCCGACAATAC

Ave. Rating Submit a Review

Compare all formats

Cat #	Size	Price	Quantity	Check Availability	Save
329743	10 µg	\$358	1		Add to cart

图一 . TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) 抗体的同种型 (Isotype) 举例

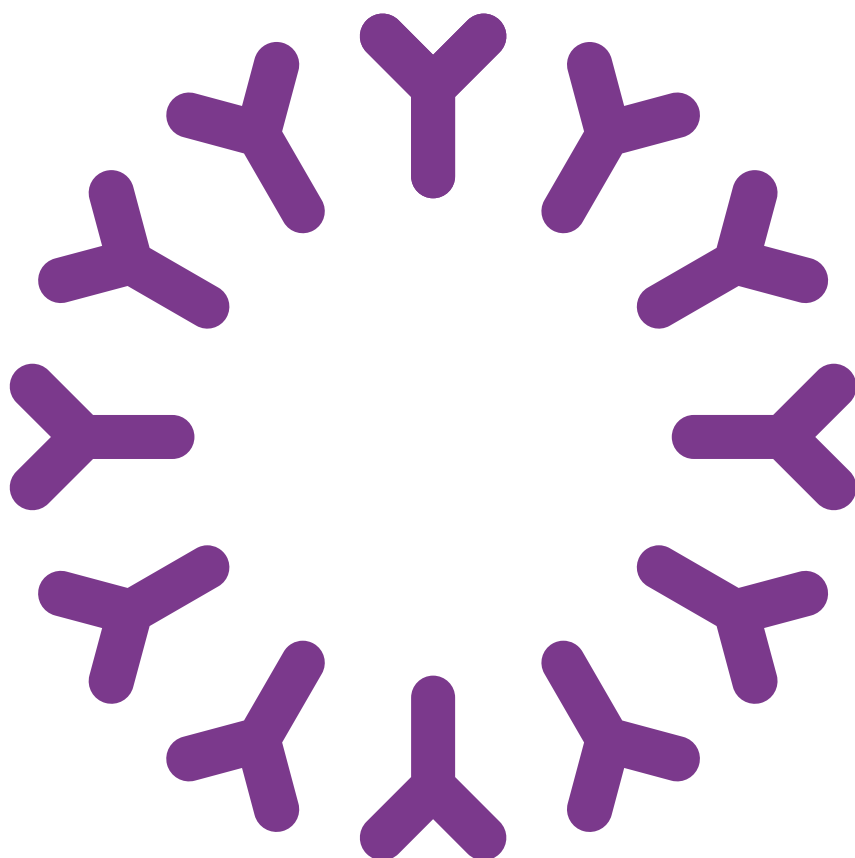
耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	粘附载玻片	-
-	显微镜盖玻片 (尺寸: 18 mm × 18 mm, 厚度: 0.13 - 0.16 mm) ¹	-
晶安生物	24 孔板圆形细胞爬片 ¹	J24001
Corning	Corning® 35mm TC-treated Culture Dish	353001
	50 mL 离心管	430829
BBI	5.0 mL 离心管	F611888-0001
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
Matin	Power dust remover (空气罐)	M-6318
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	2.0 mL 离心管	MCT-200-C
	1000 µL 带滤芯枪头	TF-1000-L-R-S
	200 µL 带滤芯枪头	TF-200-L-R-S
	100 µL 带滤芯枪头	TF-100-R-S
Beyotime	10 µL 带滤芯枪头	TXLF-10-L-R-S
	玻片盒	FBX003
-	一次性无菌注射器	-
津腾	针筒式过滤器 ²	JTSF0303
Millipore	Millex 针式过滤器 ²	SLGV033N
Sangon Biotech	免疫组化湿盒	E678019
Biosharp	免疫组化笔	BC004 (或同等替代)



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

第二章

抗体滴定 (新鲜冷冻样本)



抗体是 IF 实验的关键成分，其性能可直接影响到数据质量。我们建议首先在感兴趣组织切片上进行抗体滴定，选择最合适的抗体浓度后，再进行 Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装（载体版）标准操作流程。

2.1. 实验前准备



 本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 Nuclease - Free Water。

准备试剂	准备流程	储存
4% PFA	- 20°C取出融化后混匀，再分装每管 2 mL	- 20°C
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 200 μ L 用 Nuclease-Free Water 稀释到 40 mL	室温
滤后血清	提前取出血清，融化后，马血清与山羊血清按 1: 1 混合，用 0.22 μ m 滤膜（针筒式过滤器配套一次性无菌注射器）进行过滤后分装，建议分装 200 μ L/ 管（一轮的透化 + 蛋白转录组），分装后不可反复冻融超过 3 次。实验之前，- 20°C取出分装血清融化，4°C，14000g 离心 10 min，备用。一张芯片大致需 20 μ L，剩余血清可重复利用	- 20°C
剪切鲑鱼精子 DNA	- 20°C取出融化，一张芯片用量 20 μ L，冰上备用	- 20°C
一抗、二抗	根据说明书提示从 4°C或- 20°C取出，4°C，14000g 离心 10 min 后置于冰上备用，一抗含有对应的同型对照抗体	4°C或- 20°C
稀释后的一抗、二抗（可选）	若某些抗体需要高度稀释，可根据实验需求，预先进行抗体稀释	冰上备用
10% Triton X-100	若无 10% Triton X-100，可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温
FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择，人源组织用 Human TruStain FcX™ (Cat. No. 422301)，小鼠的组织用 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Cat. No. 156604)，冰上备用	4°C
Glycerol	- 20°C取出恢复至室温	室温

准备仪器	设定	备注
冷冻切片机	箱体预冷至-20℃，样本头预冷至-15℃~-10℃	温度根据实际操作过程调整
离心机	提前将离心机温度调节到4℃	-
PCR 仪器	提前将温度调节到37℃用于烤片（热盖42℃）	-
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	可根据二抗选择不同的荧光通道

2.2. 切片准备

a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37℃，热盖温度为 42℃，放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42℃热盖	on	-
37℃	5 min	1
37℃	Hold	-



⋯ 样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

b. 冷冻切片机箱体预冷至-20℃，样本头预冷至-15℃~-10℃（根据实际操作过程调整）；

c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；

d. 将 OCT 包埋的组织块从-80℃冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 30 min；

e. 组织温度平衡过程，可参考 [2.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 2-1 提前配制封闭液，（若验证单个抗体，需制备 4 片组织的用量）放于冰上备用；

f. 组织温度平衡过程，提前从 4℃冰箱取出足量 4% PFA 溶液于离心管内平衡至室温；

g. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；

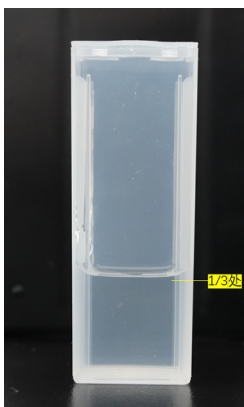
h. 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；

i. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

2.3. 组织贴片

a. 在玻片盒中装入 1/3 体积以上的复温的 4% PFA 溶液（需确保溶液体积能完全覆盖组织切片）；

b. 组织贴片：根据需求选择切片厚度，通常为 10 μm ，建议一张玻片只贴一片组织（若验证单个抗体，需贴 4 片组织，其中 1 片作为阴性对照）。组织贴片有两种操作方式可选：热贴（A）和冷贴（B）；



A. 热贴

- 1) 进行冷冻切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平；
- 2) 拿起玻片一角，将其翻转使玻片正面朝下，尽量使玻片中央对准贴片；
- 3) 轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到玻片表面（贴片时间控制在 **1 min** 以内）；
- 4) 再次翻转玻片使其正面朝上，快速将玻片置于提前平衡好温度的 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。



B. 冷贴

1) 将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；

⋯ 预冷时间不可过长，以免玻片表面产生水雾；预冷时间不可太短，以免玻片无法达到预冷温度。

2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；

3) 立即拿起玻片，用指腹加温玻片背面，直至切片贴合在玻片上；

4) 快速将玻片置于 PCR 适配器上 **37°C** 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。

2.4. 组织固定

a. 将上一步孵育完成的玻片立即放于已恢复室温的 4% PFA 溶液中固定 **10 min**；

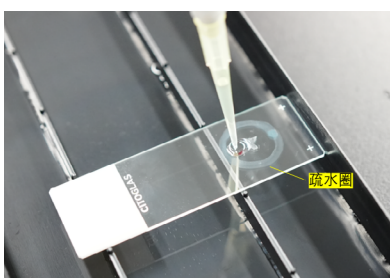
b. 固定完成后，将固定好组织的玻片从 4% PFA 溶液中取出，立刻将玻片置于装有至少 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 **10 s**；

⋯ 玻片转移过程尽可能快，避免固定后组织干燥。

c. 取出玻片，立刻用无尘纸吸干玻片背面及组织四周的残液，确保组织周围无液体残留；

d. 在玻片上使用免疫组化笔在组织周围画一圈，产生疏水隔离区，防止后续加入的液体流出；

⋯ 后续的换液操作均在疏水隔离区内进行。



e. 将处理好的玻片转移到免疫组化湿盒中。

⋯ 待疏水圈完全干燥后方可加液体。

2.5. 封闭与一抗孵育



a. 将已配制好的封闭液涡旋混匀，滴加封闭液到组织表面疏水隔离区内，用量不超过 100 μL / 切片，室温封闭 **20 min**；

需结合疏水圈的大小适当调整体积用量，比如圈大小为 0.5 cm \times 0.5 cm，则用量约为 30 μL / 切片。

表格 2-1 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	120	132	252	372	492
10% Triton X-100	2	2.2	4.2	6.2	8.2
剪切鲑鱼精子 DNA	20	22	42	62	82
FcR Blocking Reagent *	10	11	21	31	41
滤后血清	20	22	42	62	82
Nuclease-Free Water	28	30.8	58.8	86.8	114.8
Total	200	220	420	620	820

* FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可跟据实验组织的种属选择购买。例如组织为人源性组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No. 422301)，小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)。



1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

b. 封闭等待过程中，按照 [2.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 2-2 配制一抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用；

例如，本示例测试中，设置 CD68 抗体的稀释比例为 1:100、1:250、1:500 及阴性对照（不加入一抗剂）共 4 种的抗体稀释比例进行滴定测试。将一抗孵育液涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用。

表格 2-2 一抗孵育液配制（抗体滴定）

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
一抗 或 稀释后的一抗 * V		1.1 \times V	2.1 \times V	3.1 \times V	4.1 \times V
封闭液	100-V	1.1 \times (100-V)	2.1 \times (100-V)	3.1 \times (100-V)	4.1 \times (100-V)
Total	100	1.1 \times 100	2.1 \times 100	3.1 \times 100	4.1 \times 100

c. 吸弃封闭液，实验组从非组织区域缓慢加入不同稀释比例的一抗孵育液，用量不超过 100 μL / 切片，进行一抗孵育，并在玻片上标记好所测试的抗体稀释比例；阴性对照组吸不加一抗孵育液，而是滴加等量的封闭液。室温孵育 **45 min**；

换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

需结合疏水圈的大小适当调整一抗孵育液的用量。

d. 一抗孵育等待期间，按照二抗的最佳稀释比例，参考 [2.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 2-3 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用（避光）。

表格 2-3 二抗孵育液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
二抗	0.2	0.22	0.42	0.62	0.82
Nuclease-Free Water	99.8	109.78	209.58	309.38	409.18
Total	100	110	210	310	410



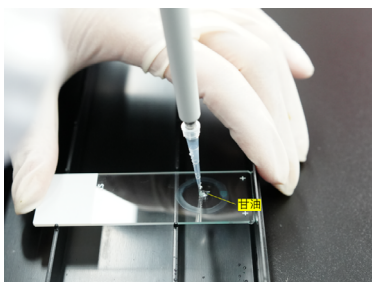
二抗推荐使用 Thermo Fisher Scientific 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗，可选择 1: 500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗需结合自身经验确定比例。

2.6. 孵育二抗

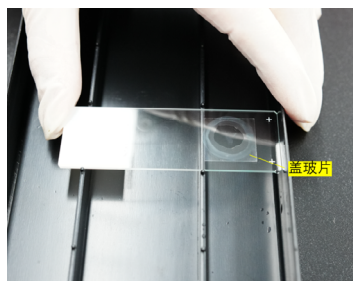
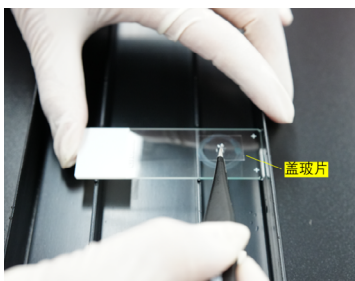
- 吸弃实验组一抗孵育液及阴性对照组封闭液；
- 缓慢滴加 0.1X SSC 清洗，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **1 min** 后吸弃；
- 换液过程注意玻片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。
- 重复步骤 b. 一次；
- 实验组和阴性对照组均从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液，用量不超过 100 μL / 切片，室温避光孵育 **15 min**；
- 需结合疏水圈的大小适当调整二抗孵育液的用量。
- 吸弃二抗孵育液；
- 加入 0.1X SSC 清洗，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **1 min** 后吸弃；
- 重复步骤 f. 一次；
- 用空气罐吹干组织表面液体，出气口距离组织一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角缓慢吹气，从组织一角开始顺序推进，吹干组织表面液体，勿使气流过猛；



i. 用移液器缓慢吸取 5 μL Glycerol 甘油滴加到组织中央, 避免产生气泡;



j. 用镊子夹取盖玻片或 24 孔板圆形细胞爬片的一端, 小心将盖玻片或爬片的另一端放在芯片边上, 然后逐渐将盖玻片或爬片放低到芯片上, 直至完全覆盖芯片; 待甘油浸润整张芯片后, 立即安排拍照, 避免荧光淬灭。



⋯ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘, 可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。

2.7. 荧光拍照

a. 使用具有拼接功能的荧光显微镜拍摄荧光图像, 推荐荧光配置:

- 光源波长范围: 380-680 nm
- 黑白相机 (≥ 12 bit)
- DAPI filter cube (参考: Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
- FITC filter cube (参考: Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
- TRITC filter cube (参考: Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
- CY5 filter cube (参考: Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
- 最大像元尺寸: 5 μm /pixel
- 曝光时间: 1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)

b. 将玻片转移到显微镜载物台上, 取下遮光罩;

c. 选择落射荧光扫描模式, 根据所使用二抗的荧光激发光调节荧光通道, 选择 10 倍镜, 扫描玻片上贴有切片的区域, 保存图片。

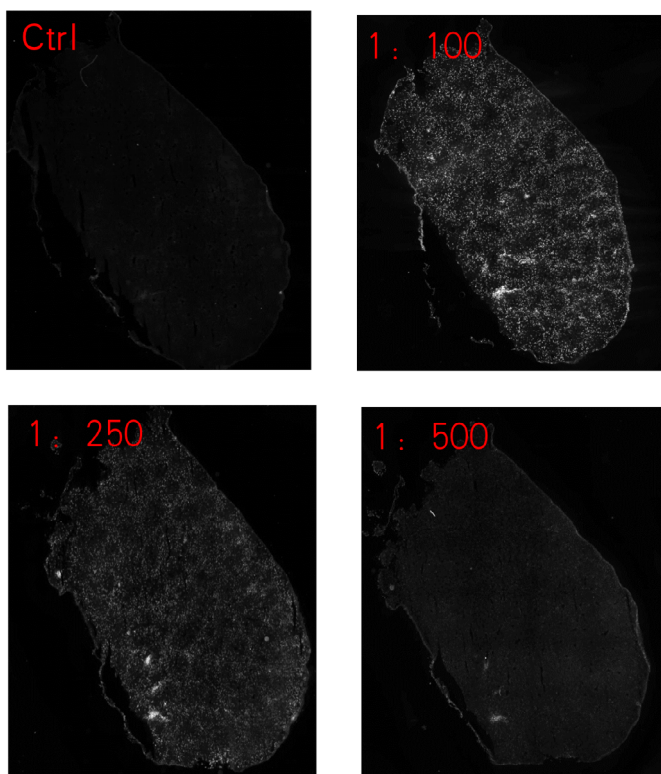


同一实验组的不同玻片要在相同成像条件下扫描, 包括亮度和曝光等条件, 以利于比对差异。



2.8. 抗体滴定最佳浓度选择标准

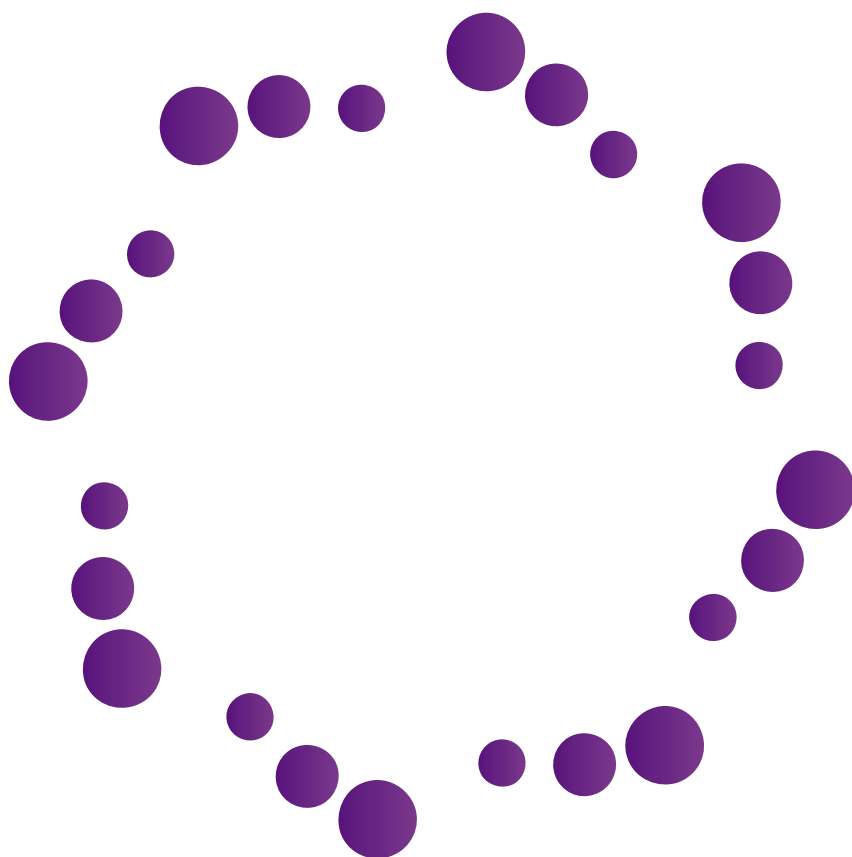
抗体最佳浓度选择原则为，稀释过的抗体浓度产生最佳信号又能最大程度减少背景染色。以 CD68 抗体滴定示例数据为例，如图二所示，根据荧光信号选择荧光强度不显著减低的最低浓度，应选择 1: 250 作为最佳抗体稀释浓度，用于后续 IF 预实验以及正式实验。



图二. 小鼠肝脏 IF 滴定图

第三章

IF 预实验 (新鲜冷冻样本)



Biolegend 的 TotalSeq™-A 抗体是针对单细胞 CITE-seq 技术开发的抗体，在组织切片中可能存在不适用的情况。对于自己选择抗体的用户，为了确保您选择 TotalSeq™-A 抗体可以适用于组织切片，并且确认抗体的最佳稀释比例；我们建议您首先在玻片上利用感兴趣组织类型进行 IF 预实验，确定每个抗体可以工作后，再在芯片上进行正式实验。



如果试剂盒搭配 TotalSeq™-A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 199901) 和 TotalSeq™-A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 399907) 使用，则可以跳过此章节，直接按照我们推荐的稀释比例，参考《Stereo--CITE 蛋白转录组试剂套装使用说明书》进行蛋白转录组标准操作流程。

3.1. 实验前准备



本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 Nuclease - Free Water。

准备试剂	准备流程	储存
4% PFA	- 20°C取出融化后混匀，再分装每管 2 mL	- 20°C
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 200 μL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 40 mL	室温
滤后血清	提前取出血清，融化后，马血清与山羊血清按 1: 1 混合，用 0.22 μm 滤膜（针筒式过滤器配套一次性无菌注射器）进行过滤后分装，建议分装 200 μL/ 管（一轮的透化 + 蛋白转录组），分装后不可反复冻融超过 3 次。实验之前，- 20°C取出分装血清融化，4°C，14000g 离心 10 min，备用。一张芯片大致需 20 μL，剩余血清可重复利用	- 20°C
剪切鲑鱼精子 DNA	- 20°C取出融化，一张芯片用量 20 μL，冰上备用	- 20°C
一抗、二抗	根据说明书提示从 4°C或- 20°C取出，4°C，14000g 离心 10 min 后置于冰上备用，一抗含有对应的同型对照抗体	4°C或- 20°C
稀释后的一抗、二抗 (可选)	若某些抗体需要高度稀释，可根据实验需求，预先进行抗体稀释	冰上备用
10% Triton X-100	若无 10% Triton X-100，可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温

FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择，人源组织用 Human TruStain FcX™（Cat. No. 422301），小鼠的组织用 TruStain FcX™ PLUS（anti-mouse CD16/32）Antibody（Cat. No. 156604），冰上备用	4°C
Glycerol	- 20°C取出恢复至室温	室温

准备仪器	设定	备注
冷冻切片机	箱体预冷至- 20°C，样本头预冷至- 15°C ~ - 10°C	温度根据实际操作过程调整
离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	-
PCR 仪器	提前将温度调节到 37°C用于烤片（热盖 42°C）	-
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	可根据二抗选择不同的荧光通道

3.2. 切片准备

a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37°C，热盖温度为 42°C，放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42°C热盖	on	-
37°C	5 min	1
37°C	Hold	-



样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

b. 冷冻切片机箱体预冷至- 20°C，样本头预冷至- 15°C ~ - 10°C（根据实际操作过程调整）；

c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；

d. 将 OCT 包埋的组织块从- 80°C冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 **30 min**；

e. 组织温度平衡过程，可参考 [3.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 3-1 提前配制封闭液，（若验证单个抗体，需制备 2 片组织的用量）放于冰上备用；

f. 组织温度平衡过程，提前从 4°C冰箱取出足量 4% PFA 溶液于离心管内平衡至室温；

g. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；

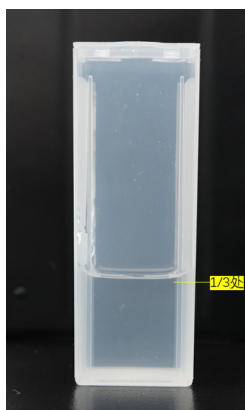
h. 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；

i. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

3.3. 组织贴片

a. 在玻片盒中装入 1/3 体积以上的复温的 4% PFA 溶液 (需确保溶液体积能完全覆盖组织切片) ;

b. 组织贴片: 根据需求选择切片厚度, 通常为 10 μm , 建议一张玻片只贴一片组织 (若验证单个抗体, 需贴 2 片组织, 其中 1 片作为阴性对照)。组织贴片有两种操作方式可选: 热贴 (A) 和冷贴 (B) ;



A. 热贴

- 1) 进行冷冻切片, 将切片移到切片台右侧靠近边缘处, 然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平;
- 2) 拿起玻片一角, 将其翻转使玻片正面朝下, 尽量使玻片中央对准贴片;
- 3) 轻轻一压, 肉眼可见切片已经吸附到玻片表面 (贴片时间控制在 **1 min** 以内);
- 4) 再次翻转玻片使其正面朝上, 快速将玻片置于提前平衡好温度的 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**, 无需盖 PCR 热盖。



B. 冷贴

1) 将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；

⋯ 预冷时间不可过长，以免玻片表面产生水雾；预冷时间不可太短，以免玻片无法达到预冷温度。

2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；

3) 立即拿起玻片，用指腹加温玻片背面，直至切片贴合在玻片上；

4) 快速将玻片置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。

3.4. 组织固定

a. 将上一步孵育完成的玻片立即放于已恢复室温的 4% PFA 溶液中固定 **10 min**；

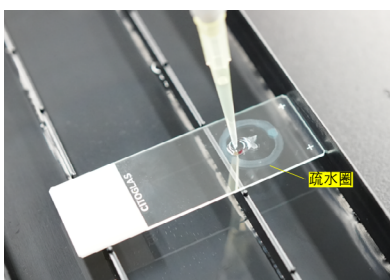
b. 固定完成后，将固定好组织的玻片从 4% PFA 溶液中取出，立刻将玻片置于装有至少 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 **10 s**；

⋯ 玻片转移过程尽可能快，避免固定后组织干燥。

c. 取出玻片，立刻用无尘纸吸干玻片背面及组织四周的残液，确保组织周围无液体残留；

d. 在玻片上使用免疫组化笔在组织周围画一圈，产生疏水隔离区，防止后续加入的液体流出；

⋯ 后续的换液操作均在疏水隔离区内进行。



e. 将处理好的玻片转移到免疫组化湿盒中。

⋯ 待疏水圈完全干燥后方可加液体。

3.5. 封闭与一抗孵育



a. 将已配制好的封闭液涡旋混匀，滴加封闭液到组织表面疏水隔离区内，用量不超过 100 μL / 切片，室温封闭 **20 min**；

需结合疏水圈的大小适当调整体积用量，比如圈大小为 0.5 cm \times 0.5 cm，则用量约为 30 μL / 切片。

表格 3-1 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	120	132	252	372	492
10% Triton X-100	2	2.2	4.2	6.2	8.2
剪切鲑鱼精子 DNA	20	22	42	62	82
FcR Blocking Reagent *	10	11	21	31	41
滤后血清	20	22	42	62	82
Nuclease-Free Water	28	30.8	58.8	86.8	114.8
Total	200	220	420	620	820

* FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可跟据实验组织的种属选择购买。例如组织为人源性组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No. 422301)，小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)。



1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

b. 封闭等待过程中，按照 [3.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 3-2 配制一抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用

表格 3-2 一抗孵育液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
一抗	V	1.1 \times V	2.1 \times V	3.1 \times V	4.1 \times V
封闭液	100-V	1.1 \times (100-V)	2.1 \times (100-V)	3.1 \times (100-V)	4.1 \times (100-V)
Total	100	1.1 \times 100	2.1 \times 100	3.1 \times 100	4.1 \times 100



Biolegend 公司 TotalSeq™-A 一抗，浓度可选择 1: 250 进行配制。如果荧光染色不能达到要求，建议对这种抗体进行专门滴定后确定最终的抗体稀释比例。

c. 吸弃封闭液，实验组从非组织区域缓慢加入一抗孵育液，用量不超过 100 μL / 切片，进行一抗孵育；阴性对照组不加一抗孵育液，而是加入等量的封闭液。室温孵育 **45 min**；

换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

需结合疏水圈的大小适当调整一抗孵育液的用量。

d. 一抗孵育等待期间, 按照二抗的最佳稀释比例, 参考 [3.5. 封闭与一抗孵育](#) 中的表格 2-3 配制二抗孵育液, 涡旋混匀后瞬时离心, 放于冰盒上备用 (**避光**)。

表格 3-3 二抗孵育液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	60	66	126	186	246
二抗	V	1.1 × V	2.1 × V	3.1 × V	4.1 × V
Nuclease-Free Water	40-V	1.1 × (40-V)	2.1 × (40-V)	3.1 × (40-V)	4.1 × (40-V)
Total	100	1.1 × 100	2.1 × 100	3.1 × 100	4.1 × 100



二抗推荐使用 Thermo Fisher Scientific 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗, 可选择 1: 500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗需结合自身经验确定比例。

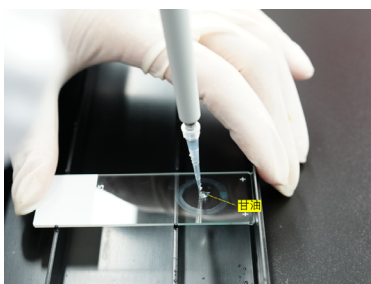
3.6. 孵育二抗



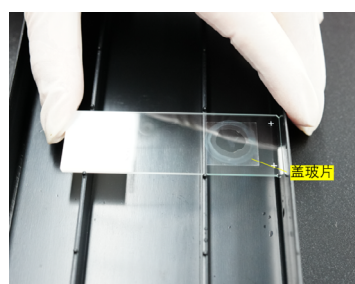
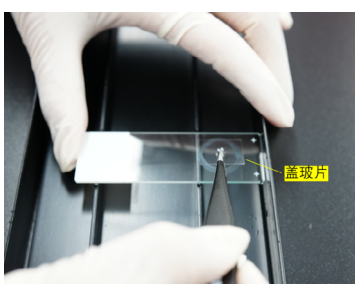
- 吸弃实验组一抗孵育液及阴性对照组封闭液;
- 加入 0.1X SSC 清洗, 用量为 100 μ L / 切片, 室温孵育 **1 min** 后吸弃;
- 换液过程注意玻片不可干燥, 若组织干燥易产生非特异性信号。
- 重复步骤 b. 一次;
- 实验组和阴性对照组均从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液, 用量不超过 100 μ L / 切片, 室温避光孵育 **15 min**;
- 需结合疏水圈的大小适当调整二抗孵育液的用量。
- 吸弃二抗孵育液;
- 加入 0.1X SSC 清洗, 用量为 100 μ L / 切片, 室温孵育 **1 min** 后吸弃;
- 重复步骤 f. 一次;
- 用空气罐吹干组织表面液体, 出气口距离组织一角 2-3 cm 位置, 以大概 30° 倾角缓慢吹气, 从组织一角开始顺序推进, 吹干组织表面液体, 勿使气流过猛;



i. 用移液器缓慢吸取 5 μL Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；



j. 用镊子夹取盖玻片或 24 孔板圆形细胞爬片的一端，小心将盖玻片或爬片的另一端放在芯片边上，然后逐渐将盖玻片或爬片放低到芯片上，直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即安排拍照，避免荧光淬灭。



⋯ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。

3.7. 荧光拍照

a. 使用具有拼接功能的荧光显微镜拍摄荧光图像，推荐荧光配置：

- 光源波长范围：380-680 nm
- 黑白相机 (≥ 12 bit)
- DAPI filter cube (参考：Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
- FITC filter cube (参考：Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
- TRITC filter cube (参考：Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
- CY5 filter cube (参考：Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
- 最大像元尺寸：5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$
- 曝光时间：1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)

b. 将玻片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩；

c. 选择落射荧光扫描模式，根据所使用二抗的荧光激发光调节荧光通道，选择 10 倍镜，扫描玻片上贴有切片的区域，保存图片。

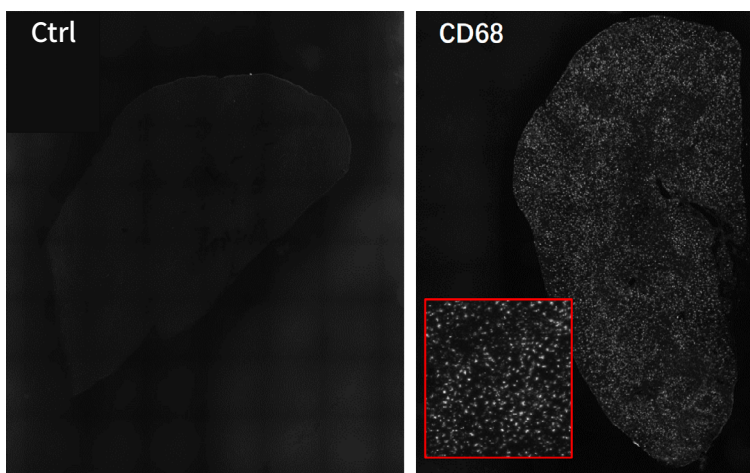


同一实验组的不同玻片要在相同成像条件下扫描，包括亮度和曝光等条件，以利于比对差异。



3.8. 多组学 IF 预实验成功标准照

如图三所示，以小鼠胸腺组织的阴性对照 Ctrl 和 CD68 染色为例，应保证一抗按推荐的 1: 250 比例染色后，能得到预期的染色结果。如未获得预期结果，则需要客户自行进行抗体滴定，抗体滴定流程可参考[第二章 抗体滴定 \(新鲜冷冻样本\)](#)。



图三 . 小鼠胸腺 Ctrl 和 CD68 的 IF 染色

附录 A 试剂配制总览表

表格 2-1 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	120	132	252	372	492
10% Triton X-100	2	2.2	4.2	6.2	8.2
剪切鲑鱼精子 DNA	20	22	42	62	82
FcR Blocking Reagent *	10	11	21	31	41
滤后血清	20	22	42	62	82
Nuclease-Free Water	28	30.8	58.8	86.8	114.8
Total	200	220	420	620	820

表格 2-2 一抗孵育液配制 (抗体滴定)

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
一抗 或 稀释后的一抗 * V	V	$1.1 \times V$	$2.1 \times V$	$3.1 \times V$	$4.1 \times V$
封闭液	$100 - V$	$1.1 \times (100 - V)$	$2.1 \times (100 - V)$	$3.1 \times (100 - V)$	$4.1 \times (100 - V)$
Total	100	1.1×100	2.1×100	3.1×100	4.1×100

表格 2-3 二抗孵育液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
二抗	0.2	0.22	0.42	0.62	0.82
Nuclease-Free Water	99.8	109.78	209.58	309.38	409.18
Total	100	110	210	310	410

表格 3-1 封闭液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	120	132	252	372	492
10% Triton X-100	2	2.2	4.2	6.2	8.2
剪切鲑鱼精子 DNA	20	22	42	62	82
FcR Blocking Reagent *	10	11	21	31	41
滤后血清	20	22	42	62	82
Nuclease-Free Water	28	30.8	58.8	86.8	114.8
Total	200	220	420	620	820

表格 3-2 一抗孵育液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
一抗	V	1.1 \times V	2.1 \times V	3.1 \times V	4.1 \times V
封闭液	100-V	1.1 \times (100-V)	2.1 \times (100-V)	3.1 \times (100-V)	4.1 \times (100-V)
Total	100	1.1 \times 100	2.1 \times 100	3.1 \times 100	4.1 \times 100

表格 3-3 二抗孵育液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	60	66	126	186	246
二抗	V	1.1 \times V	2.1 \times V	3.1 \times V	4.1 \times V
Nuclease-Free Water	40-V	1.1 \times (40-V)	2.1 \times (40-V)	3.1 \times (40-V)	4.1 \times (40-V)
Total	100	1.1 \times 100	2.1 \times 100	3.1 \times 100	4.1 \times 100