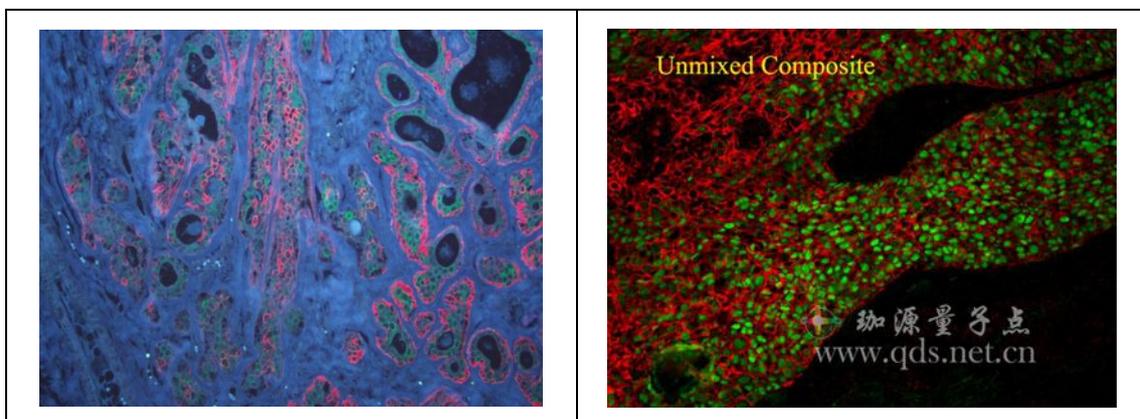




武汉珈源量子点技术开发有限公司
WUHAN JIAYUAN QUANTUM DOTS CO.,LTD.

量子点免疫荧光双染试剂盒

Cat. nos.QDK001 QDK002



目 录

一、试剂盒简介	2
二、试剂盒组成和保存条件	2
三、用户自备试剂	3
四、实验步骤	3
(一) 石蜡包埋组织切片免疫染色步骤	3
(二) 培养细胞免疫染色步骤	4
五、注意事项	4
六、应用实例	5
七、抗原修复方法	5
八、常见问题及解决方案	6
九、相关产品信息及成像条件	9
十、售后服务	11

一、试剂盒简介

本试剂盒是以自主研发的量子点标记的二抗IgG复合物（Qdots IgG Conjugate, QDs-IgG）为基础的新一代荧光标记产品。两种不同发射波长的QDs产品分别发绿色和红色荧光，可以同时检测胞核和胞浆/胞膜或者胞膜和胞浆。且不同颜色的量子点可由同一激发光激发，因此可同时显示多种颜色。所用一抗与相应靶抗原结合后，再加入QDs-IgG 形成“一抗—QDs-IgG复合物”，最后，在荧光显微镜下紫外光激发观察成像，也可进行多光谱成像及共定位分析。

注：本产品为科研用试剂，提供的实验步骤为基本步骤，客户可根据具体情况对实验步骤进行调整和优化。

适用范围：冰冻组织切片、石蜡包埋组织切片、细胞爬片、细胞涂片等

特点：灵敏度高、特异性强、定位准确、信噪比高、荧光不易猝灭、两种颜色同时激发、操作简单等

成像平台：正置/倒置荧光显微镜、激光共聚焦荧光显微镜等

二、试剂盒组成和保存条件

备注：此试剂盒适用于鼠源和兔源的两种一抗组合，其他种属须定制；此试剂盒提供 QDs-IgG 一种发射波长为 525nm（绿色）、另一种发射波长为 605nm（红色）。

组分	组分名称	规格	保存条件
试剂A	Tween 20	5 mL/瓶, 1瓶	
试剂B	缓冲液: 2% BSA (用于封闭和稀释试剂)	20 mL/瓶, 2瓶	
试剂C	QDs-IgG复合物1 (1 μ M, 稀释比为1:25-1:100) (依客户需求提供不同波长、不同种属的产品)	1支	
试剂D	QDs-IgG复合物2 (1 μ M, 稀释比为1:25-1:100) (与试剂C波长、种属不同)	1支	2~8 $^{\circ}$ C
试剂E	通透液: 0.1% Triton-X 100	10 mL/瓶, 1瓶	
试剂F	缓冲甘油封固剂	10 mL/瓶, 1瓶	

三、用户自备试剂

1. 10 mM pH7.4 TBS

三羟基氨基甲烷	1.21 g
氯化钠	7.6 g

加蒸馏水900 mL，浓盐酸调pH值，最后定容至1000 mL

TBS-T: TBS+Tween 20 (试剂A) (0.05% 体积比)

2. 抗原修复液 (依检测抗原不同而选择不同的修复液)

10 mM pH6.0 柠檬酸缓冲液

柠檬酸	0.38 g
柠檬酸三钠	2.45 g

加蒸馏水900 mL，浓盐酸调pH值至6.0，最后定容至1000 mL

或: 0.5M EDTA修复液 (pH8.0)

EDTA 2H ₂ O	186.1 g
柠檬酸三钠	2.45 g

加蒸馏水900 mL，用10 mM NaOH调pH值至8.0，最后定容至1000 mL

四、实验步骤

1. 所有浓缩型试剂均用试剂B稀释;

2. 所有封闭步骤均用试剂B封闭，封闭时间为37℃ 15 min

(一) 石蜡包埋组织切片免疫染色步骤

石蜡包埋组织切片3~4 μm 厚度

1. 烤片: 将待做切片置于切片架上，于60℃恒温烤箱中至少烤1 hr;
2. 脱蜡 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡3次 (即二甲苯 I、II、III)，每次10 min;
3. 水化: 切片经下行酒精水化，无水乙醇 5 min，95%乙醇 2次 (每次2min)，85%乙醇2 min; 75%乙醇 2min，自来水冲洗，ddH₂O洗 2×2 min;
4. 抗原修复: 根据抗体说明书推荐方法进行抗原修复，常采用高压、微波或酶消化修复法，

室温自然冷却，自来水冲洗，ddH₂O洗 2×2 min，TBS 洗涤（2×2 min）（具体修复方法见附3） * 注：有些抗原无需修复，直接进入第5步封闭。

- 5.加一抗：** 封闭，滴加一抗混合液，37 °C湿盒孵育2 hr或4 °C过夜；
*注：一抗要求种属来源不同（例如一种为鼠抗，另一种为兔抗）
- 6.洗涤：** TBS-T洗涤（3×5 min）；
- 7.加QDs-IgG混合物** 封闭，滴加试剂C和试剂D混合液，37 °C湿盒中孵育1~2 hr；
- 8.洗涤：** TBS-T洗涤（3×5 min），TBS洗涤（2×5 min）；
- 9.封片：** 待组织标本干后，用试剂F封片；
- 10.观察成像：** 荧光显微镜下紫外光激发观察成像。

（二）培养细胞免疫染色步骤

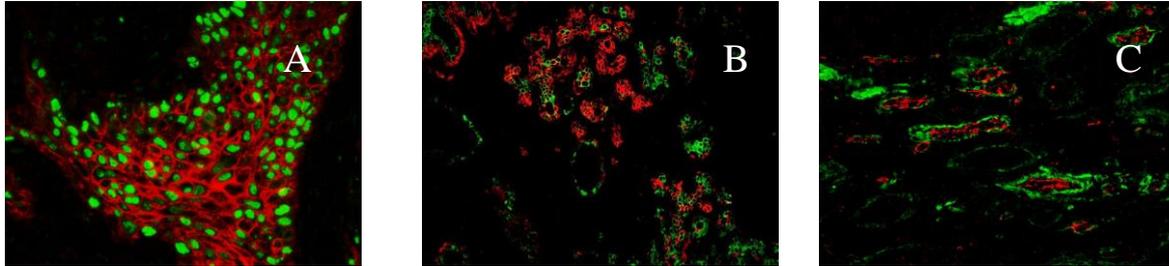
- 1.固定：** 小心移去培养基，TBS洗涤（2×5 min），加固定液室温作用10 min，自然干燥；（建议固定液有以下几种：1%中性甲醛、冷丙酮和95%酒精）
- 2.通透：** TBS洗涤（2×5 min），滴加试剂E，37°C湿盒孵育10~20 min，ddH₂O洗 2×2 min，TBS 洗涤（2×2 min）；（冰冻切片从第2步开始）
*注：如为细胞核染色则应延长通透时间至30 min。

后续步骤与石蜡包埋组织切片步骤5后相同（即加一抗）

五、注意事项

- 1.本试剂盒实验方案适用于两种不同种属的一抗，我公司提供的QDs-IgG产品有羊抗小鼠和羊抗兔两种，购买一抗时务必考虑种属的兼容性。
- 2.若同时检测两种定位相同的抗原（如两种都是胞浆抗原），会有颜色重叠现象，依抗原表达强弱，可能会呈现不同深浅的黄色。
- 3.修复后缓冲液须自然冷却，自来水冲洗后方能把切片取出，骤冷可能导致结晶或抗原封闭。
- 4.缓冲液的量必须保证所有切片都能浸泡到，用过的柠檬酸缓冲液不能反复使用。
- 5.若试剂为微量浓缩液，用前应低速离心，将内盖和管壁附着的溶液离到底部，尤其是QDs复合物用前最好高速离心（约8000 rpm）。
- 6.封片前一定要换用TBS充分洗涤，以便洗去组织上残留的Tween 20，否则会影响结果观察。
- 8.量子点免疫荧光双染方法有多种组合，本试剂盒所述为我公司推荐的常用方案。

六、应用实例



图A：组织切片胞膜胞核双染；图B：组织切片胞浆双染；C：组织切片血管双染

Qdots：605 nm（红色）、525 nm（绿色）

成像：olympus BX51荧光显微镜，CCD为Nuance Fx（软件分析，背景设为黑色）

激发：蓝光激发

七、抗原修复方法

较为常见的抗原修复方法为：高压、微波（温度达到98~100℃）或酶消化修复法。修复完毕自然恢复至室温，流水冷却，取出切片用双蒸水轻柔冲洗（2次×2 min），TBS轻柔冲洗（2次×2 min）。

常用抗原修复液：0.01M柠檬酸缓冲液（pH6.0）和0.5M EDTA抗原修复液（pH8.0或9.0）。具体操作如下：

（一）酶消化修复法

切片脱蜡水化处理，TBS轻柔冲洗（2次×2 min），在切片上滴加胃蛋白酶或胰蛋白酶，37℃孵育20~30 min后，TBS轻柔冲洗（2次×2 min）。

（二）微波抗原修复法

将脱蜡水化后的切片置于耐高温塑料切片架上，完全浸没于盛有修复缓冲液的修复盒中，微波加热10~15 min，取出修复盒自然冷却至室温后，流水冲洗，取出切片用双蒸水轻柔冲洗（2×2 min），TBS轻柔冲洗（2次×2 min）。

（三）直接高压抗原修复法

将抗原修复液置于不锈钢高压锅中加热至沸腾，将组织切片置于耐高温切片架上，浸没于沸腾的修复液中，盖上锅盖，待高压锅喷气后计时1.5~2.5 min即可停止加热，自然冷却至室温后，流水冲洗，取出切片用双蒸水轻柔冲洗（2次×2 min），TBS轻柔冲洗（2次×2 min）。此方法适用于较难检测的抗原，如胞核抗原的修复。

（四）隔水式高压抗原修复法

在不锈钢高压锅中加入自来水煮沸，同时在微波盒中加入修复液于微波炉中加热至沸腾，将切片置于切片架中并放入微波盒内（修复液需完全浸没切片），再将微波盒放入高压锅内，盖上锅盖开始加热，待喷气后计时4~8 min即可停止加热，取出微波盒自然冷却至室温后，流水冲洗，取出切片用双蒸水轻柔冲洗（2次×2 min），TBS轻柔冲洗（2次×2 min）。

八、常见问题及解决方案

组织切片免疫染色

常见问题	可能原因	解决方案
脱片	1.组织固定、脱水透明不充分； 2.组织切片太厚； 3.组织切片有折叠； 4.抗原修复过度（温度过高、时间过长或pH值偏高） 5.冲洗方法不对； 6.玻片没有经过防脱处理； 7.烤片不充分。	1.取材后及时固定，脱水透明要充分彻底； 2.切片3~4 μm厚； 3.贴片时避免组织折叠； 4.采用温和抗原修复方法，适量减少修复时间，保持温度在98~100 °C；修复时用不锈钢或耐高温塑料切片架，不能使用铜架，以防pH值改变； 5.避免直接对着组织处直接冲洗； 6.玻片清洗后须采用防脱片处理，如用多聚-L-赖氨酸或APES处理。 7.切片后应立即于60 °C烤箱中烤片过夜或80 °C烤片1~2 hr；脱蜡前也于60 °C烤片过夜。
阴性结果	1.操作步骤错误； 2.组织中无抗原； 3.一抗与QDs复合物种属连接错误； 4.一抗或其它试剂活性降低； 5.修复不到位； 6.激发光源选择错误。	1.重新实验，设立阳性对照； 2.设立阳性对照，以验证实验结果； 3.仔细确认一抗与QDs复合物的种属无误； 4.确认试剂有效期或重新检测抗体效价。 5.改善修复方法，延长时间；或微波修复换用高压修复；或柠檬酸修复缓冲液换成EDTA修复液； 6.确认激发光选择正确，525 nm的QDs复合物建议用紫外激发，605 nm的QDs复合物可用紫外或蓝

		光。
阳性太弱	1.试剂浓度过低或孵育时间过短； 2.试剂超过有效期； 3.操作中，滴加试剂时缓冲液未沥干，导致试剂稀释； 4.组织处理时抗原被破坏，残留抗原未被抗体检出； 5.封闭过度； 6.修复不到位，抗原暴露不完全。	1.提高试剂浓度，延长孵育时间，如37 °C孵育1~2 hr后再转入4 °C过夜等等； 2.检查试剂有效期，如过期则应及时更换试剂； 3.每步滴加试剂前都要沥干多余的缓冲液，但是要防止切片干燥； 4.新鲜组织取材后应及时固定，防止自溶； 5.相对缩短封闭时间； 6.改善修复方法。
染色过强	1.一抗浓度过高或孵育时间过长； 2.孵育温度过高； 3.QDs复合物终浓度过高或孵育时间过长。	1.降低一抗浓度，缩短抗体孵育时间； 2.孵育温度不能高于37 °C； 3.降低QDs复合物浓度，缩短孵育时间。
非特异性染色	1.操作过程中冲洗不充分； 2.加试剂前切片干燥； 3.组织切片折叠； 4.组织抗原弥散； 5.封闭不充分； 6.一抗不纯。	1保证每步冲洗不低于3×5 min； 7.防止切片干燥，必要时可以重做； 8.勿在折叠处观察染色结果； 9.新鲜组织及时固定，固定要符合标准； 10.延长封闭时间，特别是在加QDs复合物之前； 11.做好对照，换用纯度高的抗体。
QDs复合物团聚	1.QDs复合物超过有效期； 2.QDs复合物保存不当。	1.确认QDs生物复合物产品在有效期内，若过期则应购买新产品； 2.QDs复合物应以浓缩液保存，不要保存稀释液。
成像不清晰	1.显微镜焦距不对； 2.封片前缓冲液未沥干； 3.荧光过暗。	1.重新校正显微镜光学系统； 2.封片前须彻底沥干组织上的多余水分，残留的水分会导致成像模糊； 3.调整曝光时间，或连续激发2 min以后再成像； 检查显微镜shutter按钮是否在正确的位置。

培养细胞及冰冻切片免疫染色

常见问题	可能原因	解决方案
非特异性染色	1.细胞未及时固定, 杂菌污染导致; 2.细胞过密。	1.细胞应及时固定以免杂菌污染; 2.细胞密度保证在50%~80%之间。
阳性太弱	1.细胞处理不完全。	1.延长通透液处理时间; 本试剂盒配套的通透液为0.1% Triton-X 100, 如果阳性太弱可自配更高浓度的Triton-X 100, 如1%。(特别是检测细胞核抗原)

九、相关产品信息及成像条件

细胞、组织量子点免疫荧光单染试剂盒

货号	名称	规格	价格
QK525S	量子点超敏荧光试剂盒-525 (QDs-SA)	100-200T	¥1650
QK605S	量子点超敏荧光试剂盒-605 (QDs-SA)	100-200T	¥1650
QK525M	量子点超敏荧光试剂盒-525(QDs 标记山羊抗小鼠 IgG)	100-200T	¥1650
QK605M	量子点超敏荧光试剂盒-605(QDs 标记山羊抗小鼠 IgG)	100-200T	¥1650
QK525R	量子点超敏荧光试剂盒-525 (QDs 标记山羊抗兔 IgG)	100-200T	¥1650
QK605R	量子点超敏荧光试剂盒-605 (QDs 标记山羊抗兔 IgG)	100-200T	¥1650

量子点免疫荧光双染试剂盒

货号	名称	规格	价格
QDK001	量子点免疫荧光双染试剂盒 (QDs-525 标记抗兔 IgG +QDs-605 标记抗小鼠 IgG)	50-100T	¥1850
QDK002	量子点免疫荧光双染试剂盒 (QDs-525 标记抗小鼠 IgG+QDs-605 标记抗兔 IgG)	50-100T	¥1850

量子点活细胞示踪试剂盒(Qdot-Tracing)

货号	名称	规格	价格
QK525CT	量子点活细胞示踪试剂盒-525	50-100T	¥2150
QK605CT	量子点活细胞示踪试剂盒-605	50-100T	¥2150

量子点 Western Blotting 试剂盒 (Qdot-WB)

货号	名称	规格	价格
QK525WB	量子点蛋白印迹试剂盒-525 (QDs-SA)	100-200T	¥1650
QK605WB	量子点蛋白印迹试剂盒-605 (QDs-SA)	100-200T	¥1650

“组合型”免疫荧光双染试剂盒

货号	名称	规格	价格
QDK003	免疫荧光双染试剂盒 (QDs-605+Alexa Fluor488)	50-100T	¥1250
QDK004	免疫荧光双染试剂盒 (QDs-605+Dylight405)	50-100T	¥1250

试剂盒涉及量子点激发及发射波长

名称	Excitation (nm)	Emission (nm)
Qdots 525nm	<500 (385-465), 紫外	525
Qdots 605nm	<580 (405-565), 蓝光	605

新一代有机荧光染料

货号	名称	规格	价格	Ex(nm)	Em(nm)
YR001	Dylight405 标记山羊抗兔 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	405	421
YR002	Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	488	519
YR003	Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	594	614
YR004	Alexa Fluor 647 标记山羊抗兔 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	647	670
YR005	生物标记山羊抗兔 IgG (H+L)	100 μL	¥198.00	-	-
YM001	Dylight405 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	405	421
YM002	Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	488	519
YM003	Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	594	614
YM004	Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	647	670
YM005	生物标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥198.00	-	-
YT001	Dylight405 标记山羊抗大鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	405	421
YT002	Alexa Fluor 488 标记山羊抗大鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	488	519
YT003	Alexa Fluor 594 标记山羊抗大鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥425.00	594	614
YT005	生物标记山羊抗大鼠 IgG (H+L)	100 μL	¥198.00	-	-
YG002	Alexa Fluor 488 标记驴抗山羊 IgG (H+L)	100 μL	¥455.00	488	519
YG003	Alexa Fluor 594 标记驴抗山羊 IgG (H+L)	100 μL	¥455.00	594	614
YG005	生物标记驴抗山羊 IgG (H+L)	100 μL	¥255.00	-	-

十、售后服务

服务电话：027-68789339 027-87158543

技术服务：tel: 13429873429（黄燕华） 13317108587

E-mail: hyh1985921@yahoo.com.cn

联系地址：武汉市东湖高新区高新大道 666 号“光谷生物城”生物技术研究院
B6 栋 1 楼

武汉珈源量子点技术开发有限公司

更多信息可在公司网站查询 www.qds.net.cn