

# 皮肤组织透明化免疫荧光试剂盒

## Skin Tissue Clearing and Immunofluorescence Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及室温,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IFH015 (10T)	IFH015M (50T)	IFH015L (100T)	
01	组织渗透化溶液	15 mL	75 mL	150 mL	RT
02	组织漂白液	10 mL	50 mL	100 mL	RT
03	组织水化液	10 mL	50 mL	100 mL	RT
04	封闭液	25 mL	125 mL	250 mL	4°C
05	2% TritonX-PBS(10×)	20 mL	500 mL	1 L	RT
06	折射率匹配液	10 mL	50 mL	100 mL	4°C

### 产品简介/Product Description

本试剂盒适用于人 / 小鼠 / 大鼠等哺乳动物皮肤组织, 专为皮肤组织设计的免疫荧光染色试剂盒, 用于厚组织样本的抗原定位和表达分析。

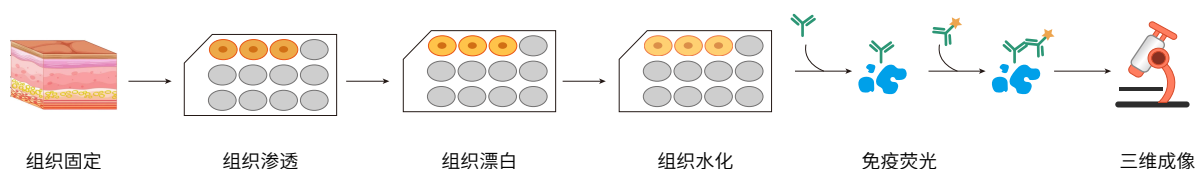
本试剂盒在开展免疫荧光染色的过程中特别结合了组织透明化处理, 基于梯度脱水、脱脂以及折射率匹配的原理实现组织透明化, 有效去除组织中的脂质与内源性色素, 统一组织折射率, 降低光散射, 可实现厚组织的高效透明化, 并保留抗原性和荧光信号, 从而提升显微成像深度和荧光信噪比。透明化后的组织适用于荧光显微镜 / 激光共聚焦 / 光谱显微镜三维成像, 确保样本结构完整、信号清晰, 是开展高分辨率空间定位和定量分析的重要保障。

本产品广泛应用于皮肤组织的细胞亚结构观察、基因表达研究及病理机制探索, 尤其适用于高精度组织

免疫荧光分析需求的科研实验。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 技术路线图



## 使用流程/Procedure

### 1. 取材固定

①皮肤组织取材后立即置于 4% 多聚甲醛溶液中 4°C 摇床上 50 rpm 震荡固定 2 天，固定后将组织块修剪成特定大小（长 1.8 cm，宽 1.3 cm），每次修块 2 个；

注意：

1. 严格控制组织块的长度和宽度，避免组织块切片后在 12 孔板中无法悬浮；
2. 4°C 震荡固定，根据样本大小决定固定时间，（300 μm~1 mm 厚度大约固定 2 天，大于 1 mm 的厚度适当延长固定时间）；
3. 长期储存可以一直在甲醛里面浸泡，但是前期一定要进行两天的震荡固定。

### 2. 清洗

①无菌 1×PBS 清洗 30 min，初步清洗数次后，于 4°C 摇床上 50 rpm 过夜清洗。

注意：每次新开一瓶无菌 PBS，确保无污染；该步骤主要目的是洗去组织中的 4% 多聚甲醛。

### 3. 梯度甲醇脱水

- ①吸去液体，加入 20% MeOH 溶液，1mL~2mL/ 孔，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h；
- ②吸去液体，加入 40% MeOH 溶液，1mL~2mL/ 孔，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h；
- ③吸去液体，加入 60% MeOH 溶液，1mL~2mL/ 孔，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h；
- ④吸去液体，加入 80% MeOH 溶液，1mL~2mL/ 孔，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h；
- ⑤吸去液体，加入 100% MeOH 溶液，1 mL~2 mL/ 孔，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h，随后转入 4°C 摇床中过夜；

注意：0.2% Triton-PBS 溶液配制：90 mL PBS+10mL 2% Triton-100。

### 4. 组织透明

- ①准备好与样本等量的 2.0 mL 离心管，每管加入 1.5 mL 组织渗透化溶液，标记好样本顺序，按顺序将样本转入离心管中，于脱色摇床上 50 rpm 室温过夜（按照样本类型和厚度决定渗透时间，一般 1~2 天）；。
- ②将组织按顺序重新移回至 12 孔板，加入 1 mL MeOH，于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h，清洗 2 次后，转入 4°C 摇床中清洗 1 h；
- ③每孔加入 1 mL 组织漂白液，包上 2 层保鲜膜，于脱色摇床上 50 rpm 4°C 孵育过夜（按照样本类型和厚度决定漂白时间，一般 1~2 天）。

注意：

1. 推荐使用 Thermo 内旋细胞冻存管，密封性较好；

2. 每个管子用灭菌胶带粘好, 做好标记, 平铺在摇床上即可; 该步骤的主要目的是去除组织中的脂质, 使组织透明;
3. 组织漂白液加入前先预冷, 加入后包上保鲜膜防止液体挥发, 该步骤的主要目的是过氧化氢能够对组织进行氧化漂白, 降解色素结构以达到彻底脱色。

## 5. 复水

- ①吸去液体, 加入 MeOH 溶液, 1 mL~2 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗 1 h, 清洗 2 次;
- ②吸去液体, 加入 80% MeOH 溶液, 1 mL~2 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50rpm 室温清洗 1 h;
- ③吸去液体, 加入 60%MeOH 溶液, 1 mL~2 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50rpm 室温清洗 1 h;
- ④吸去液体, 加入 40% MeOH 溶液, 1 mL~2 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50rpm 室温清洗 1 h;
- ⑤吸去液体, 加入 20% MeOH 溶液, 1 mL~2 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50rpm 室温清洗 1 h;
- ⑥吸去液体, 加入 0.2% Triton-PBS, 1 mL~2 mL/ 孔, 包上一层保鲜膜, 于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗过夜。

## 6. 水化组织

- ①吸去液体, 每孔加入 1 mL 组织水化液, 于脱色摇床上 50 rpm 室温孵育过夜 (按照样本类型和厚度决定水化时间, 一般 1~2 天);

注意: 该步骤的主要目的是水化组织。

## 7. 封闭

- ①吸去液体, 每孔加入 1 mL 封闭液, 用一层保鲜膜、一层锡箔纸包住 12 孔板, 于脱色摇床上 50 rpm、37°C 孵育 3~7 天 (300  $\mu$ m 厚度样本孵育 3 天, 按照样本类型和厚度决定封闭时间, 可延长至 7 天);

注意: 封闭液低温状态下会出现分层现象, 请使用前先摇匀后使用。

## 8. 一抗结合

- ①吸去液体, 用 495  $\mu$ L 封闭液 +5  $\mu$ L 一抗配制抗体结合液 (以 1:100 比例稀释为例), 500  $\mu$ L/ 孔, 用一层保鲜膜、一层锡箔纸包住 12 孔板, 于脱色摇床上 50 rpm、37°C 孵育 3~14 天 (300  $\mu$ m 孵育 3 天, 按照样本类型和厚度决定一抗结合时间, 可延长至 14 天), 期间注意观察是否需要补充一抗稀释液;
- ②弃一抗结合液, 加入 0.2% Triton-PBS, 1 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗, 每小时更换一次清洗液, 清洗 2 天, 过夜清洗时注意包裹一层保鲜膜;

注意: 结缔组织根据样本增加时间, 一周换一次抗体孵育液。

## 9. 二抗结合

- ①吸去液体, 用 499  $\mu$ L 封闭液 +1  $\mu$ L 二抗配制二抗结合液 (以 1:500 比例稀释为例), 500  $\mu$ L/ 孔, 用一层保鲜膜、一层锡箔纸包住 12 孔板, 于脱色摇床上 50 rpm、37°C 孵育 3~14 天 (300  $\mu$ m 孵育 3 天, 按照样本类型和厚度决定一抗结合时间, 可延长至 14 天), 期间注意观察是否需要补充二抗稀释液;
- ②弃二抗结合液, 加入 0.2% Triton-PBS, 1 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗, 每小时更换一次清洗液, 清洗 2 天;

注意:

1. 二抗结合液需根据实际染色需求进行二抗荧光通道选择, 一般选择鼠二抗 488+ 兔二抗 555;
2. 此步骤开始需要严格进行避光操作, 每步操作都需要覆盖好一层保鲜膜和一层锡箔纸;
3. 结缔组织根据样本增加时间, 一周换一次抗体孵育液。

## 10. DAPI 染核

- ①吸去液体, 每孔加入 1 mL DAPI (可用 0.2% Triton-PBS 稀释), 于脱色摇床上 50 rpm 室温避光孵育 3 天, 更换一次 1 mL DAPI 后, 4°C 避光孵育至成像前;
- ②吸去液体, 加入 0.2% Triton-PBS, 1 mL/ 孔, 于脱色摇床上 50 rpm 室温清洗, 每小时更换一次清洗液, 清洗 2 天。

## 11. 荧光显微镜成像

- ①取 1 mL 折射率匹配液加入 12 孔板中浸没组织, 用毛笔将浸润后的组织贴片于玻璃板上, 稍加晾干后, 用移液枪吸取适量折射率匹配液添加至组织间隙。取另一块玻璃板盖上组织, 用工具对玻璃板四周进行固定, 用移

液枪吸取折射率匹配液沿玻璃板夹缝加入，使整块玻璃板内填充完全。整块玻璃板于 37°C 恒温箱中交联 4h 至过夜后，进行成像。

## 12. 荧光显微镜成像

① 荧光显微镜 / 激光共聚焦 / 光谱显微镜进行三维成像拍照，或 -20°C 避光暂存。

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

