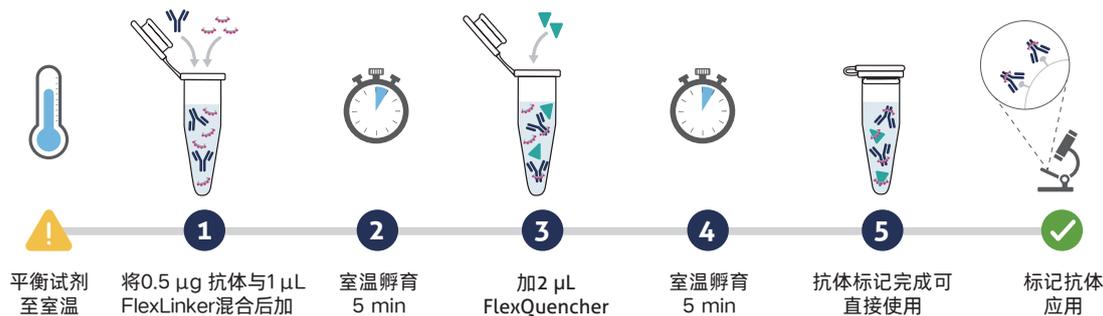


# FlexAble 抗体标记试剂盒操作说明

Any antibody. Any color. Any time.

FlexAble系列是Proteintech研发的一种新型抗体标记试剂盒。该试剂盒采用FlexLinker抗体标记技术专利，可在任何抗体缓冲液条件下，10分钟将荧光染料、酶以及其他分子与抗体结合，极大提高流式细胞术、免疫荧光及免疫印迹实验效率。



▲ FlexAble操作流程图

## 操作流程：

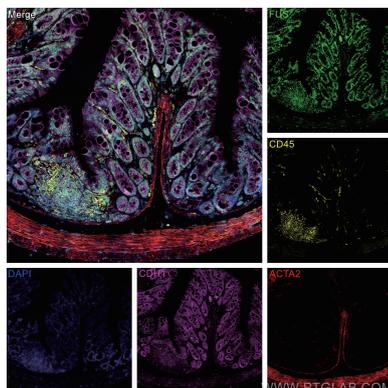
- ⚠ 进行标记之前，所有试剂需平衡至室温。
- 1 将0.5 μg抗体与1 μL FlexLinker混合后，加入 FlexBuffer补充体积至8 μL。

注意：此处需要进行抗体质量换算：抗体质量=抗体浓度×体积。若无法确定抗体浓度，请参考《FlexAble抗体标记试剂盒常见问题解析》-标记抗体量及浓度说明。

- 2 室温避光孵育5 min。
- 3 加2 μL FlexQuencher。
- 4 室温避光孵育5 min。
- 5 抗体标记完成，可直接使用，无需过滤纯化。

## 多重染色应用说明：

1. 相同种属来源的抗体，需要分别标记后再混合进行实验。
2. 不同种属来源的抗体，可以在一支EP管内同时标记。
3. 同时有直接法及间接法染色，推荐先做间接法染色，再使用直标抗体进行染色。
4. FlexAble标记抗体可以与直标抗体共染。



## 应用示例：

染色顺序（样本：小鼠结肠组织）：

- 黄色** 一抗：CD45重组单抗（货号：80297-1-RR）  
二抗：CL555偶联重组羊抗兔二抗（货号：RGAR003）
- 洋红色** 一抗：CDH1兔多抗（货号：20874-1-AP）  
FlexAble：CL647标记Rabbit IgG试剂盒（货号：KFA003）
- 绿色** 一抗：FUS/TLS兔多抗（货号：11570-1-AP）  
FlexAble：CL488标记Rabbit IgG试剂盒（货号：KFA001）
- 红色** 直标一抗：CL594偶联ACTA2 兔多抗（货号：CL594-14395）
- 蓝色** DAPI

## 一、细胞爬片的FlexAble染色操作流程

### 1、细胞固定及通透

- 1) 吸走培养基，用1×PBS缓冲液缓慢清洗种上细胞的细胞爬片。
- 2) 室温条件下，用4% PFA固定15 min或者使用-20℃甲醇或乙醇固定10 min。
- 3) 固定结束后，用1×PBS缓冲液清洗细胞爬片三次，3 min/次。
- 4) 室温条件下，用0.2% Triton X-100-PBS溶液将细胞通透处理5 min。细胞通透结束后，用1×PBS缓冲液清洗细胞爬片三次，3 min/次。

(注：如果使用的固定剂是有机溶剂，此步骤可免)

### 2、封闭

将样片置于干燥的培养皿内，滴加3% BSA-PBST (0.1% Tween)；将样片完全覆没放于湿盒中，室温封闭1 h或者4℃封闭过夜。

### 3、标记抗体制备

- 1) 将0.5 μg的一抗与1 μL FlexLinker混合后加入FlexBuffer补充体积至8 μL，轻轻混匀，室温避光孵育5 min。

(注：请参考《FlexAble抗体标记试剂盒常见问题解析》-标记抗体量及浓度说明)

- 2) 加入2 μL FlexQuencher，混匀后，室温避光孵育5 min。
- 3) 使用PBS补充体积至50-100 μL。(供参考，部分情况可能需要根据结果调整)

### 4、抗体孵育

- 1) 用吸水纸将多余封闭液吸去，注意不要干片。
- 2) 在样片上滴加一种FlexAble标记抗体（一抗+FlexLinker+FlexQuencher混合物）或多种FlexAble标记抗体混合物（将所有标记抗体混合在一起，进行多重染色），室温避光孵育2 h或4℃避光孵育过夜。设置不加一抗的空白对照。
- 3) 用PBST (0.1% Tween) 溶液清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
- 4) 在样片上滴加DAPI，将完全浸没于DAPI的样片放于湿盒中室温避光孵育5-10 min。
- 5) 用PBS缓冲液清洗样片，快速冲洗3次。
- 6) 滴加封片剂，确定样品在盖玻片与载玻片之间，避免出现气泡。
- 7) 用荧光显微镜观察。根据不同的染料选择不同波段的激发光。

## 二、石蜡切片的FlexAble染色操作流程

### 1.脱蜡 (注：石蜡切片染色前应置60℃ 1 h)

- 1) 在二甲苯I号缸中浸泡20 min；
- 2) 在二甲苯II号缸中浸泡20 min；
- 3) 在无水乙醇I号缸中浸泡5 min；
- 4) 在无水乙醇II号缸中浸泡5 min；
- 5) 在95%乙醇中浸泡5 min；
- 6) 在80%乙醇中浸泡5 min；
- 7) 在60%乙醇中浸泡5 min；
- 8) 用去离子水或者蒸馏水浸洗3遍，每遍1 min。

注：此处I号和II号缸是指不同的容器，但是内容物一致。

### 2、抗原修复

- 1) 将切片转移到容器中，并完全浸入到修复液内。
- 2) 电炉或者水浴锅加热Tris-EDTA9 (pH 9.0)、EDTA (pH 8.0) 或者柠檬酸 (pH 6.0) 的修复缓冲溶液至95℃左右，放入组织切片加热10-15 min。
- 3) 载玻片浸在缓冲液中自然冷却至室温。

### 3、内源性过氧化氢酶灭活

取出切片，用去离子水浸洗3次，每次1 min，洗净后，将切片浸入装有3% 双氧水的溶液中，盖上盖子，室温密闭下，浸泡10 min。

(注：如果实验体系不涉及HRP，此步骤可免。)

### 4、标记抗体制备

- 1) 将0.5 μg一抗与1 μL FlexLinker混合后加入FlexBuffer补充体积至8 μL，轻轻混匀，室温避光孵育5 min。

(注：请参考《FlexAble抗体标记试剂盒常见问题解析》-标记抗体量及浓度说明)

- 2) 加入2 μL FlexQuencher，混匀后，室温避光孵育5 min。
- 3) 使用TBS补充体积至50-100 μL。(供参考，部分情况可能需要根据结果调整)

### 5、标记抗体孵育

- 1) 用1XTBS溶液冲洗载玻片3次，每次3 min。
- 2) 在1XTBS溶液中准备5% 封闭血清。在室温下将切片封闭1 h。(注：如果没有相应的血清，则用5%的BSA替代。)
- 3) 将切片上滴加一种FlexAble标记抗体（一抗+FlexLinker+FlexQuencher混合物）或多种FlexAble标记抗体混合物（将所有标记抗体混合物混合在一起，进行多重染色），室温避光孵育2 h或4℃避光孵育过夜。设置不加一抗的空白对照。
- 4) 用1XTBS溶液冲洗载玻片3次，每次3 min。

### 6、封片及镜检

- 1) DAPI室温孵育10 min，用1XTBS溶液快速冲洗3次，
- 2) 将封片剂滴加在组织样本上，避光封片。在荧光显微镜下观察。