

# Hyperion 实验开展技术要点

2020-02-26 Version 2.1

## 前言

Hyperion 组织成像质谱流式系统由成像质谱流式技术 (Imaging Mass Cytometry) 发展而来, 可以实现对组织石蜡切片、冰冻切片等样本进行几十个参数的同时检测, 在组织微环境相关研究中发挥着重要作用。在这里, 我们通过查阅相关的文献, 以及吸收国内技术支持团队及部分客户分享的经验, 对 Hyperion 实验的流程及技术细节进行梳理和总结, 希望可以帮助大家快速掌握相关的技术要领, 顺利开展相关实验。

## 目录

一、切片样本的准备和储存.....	2
1、切片类型选择.....	2
2、切片的制备.....	2
3、样本的保存.....	4
二、实验设计.....	6
1、检测靶标蛋白的筛选.....	6
2、金属标签匹配 (配色) .....	8
3、抗体的选择.....	9
三、Panel 验证 (即预实验) .....	11
1、选择合适的染色条件.....	11
2、验证抗体的特异性.....	12
3、第三方抗体的标记.....	13
4、确定抗体的稀释度.....	13
5、预实验 pipeline 的安排.....	14
四、附件说明.....	15
五、参考文献: .....	15

# 一、切片样本的准备和储存

## 1、切片类型选择

### 冰冻切片 Or 石蜡切片

所有的实验开始前，首先要确定所检测切片的种类，是石蜡切片还是冰冻切片。

两种切片类型有各自的优势：冰冻切片具有制样速度快、蛋白表位保存较好等优点；而石蜡切片（FFPE）的组织结构保存较好。两者各有优势，要根据自己的课题方向以及相关文献进行选择。由于石蜡切片来源较为广泛，在实际的临床研究多中使用的更多。

	冰冻切片	石蜡切片
制片过程	制样简单，将新鲜组织用OTC包埋速冻、切片即可，对实验人员技术有一定要求	步骤较多，固定过夜，包埋，切片等步骤
染色过程	步骤简单，固定，打孔，封闭后即可染抗体	需要脱蜡、复水、抗原修复等操作
抗体选择	有38种IMC预标记抗体可供选择，但第三方抗体选择相对容易，需要选择IHC-F的抗体	目前有88种IMC预标记抗体，第三方抗体选择需要IHC-P的切片，并要求抗原修复条件的一致性
形态保存	组织结构易变形	组织结构保存良好
样本来源	临床上存量较少，往往需要从新鲜组织制备	大量包埋好的组织蜡块，可以支持长期的回溯性研究
样本保存	组织块和切片均需冻存在-80度	组织块：常温放置；切片：需要石蜡油密封，四度保存

冰冻切片和石蜡切片的比较  劣势  优势

## 2、切片的制备

Hyperion 切片样本的预处理的方法与传统免疫组化基本相同，各实验室可以依据自己实验室各自的 protocol 进行相关的制备工作。我们也多方搜集了相关的一些第三方资料，以便大家对这个过程有一个基本的了解：

冰冻切片和石蜡切片的制备过程有较大差别，下面分开叙述：

### 2.1 冰冻切片

冰冻切片的制备需要用到特殊的 OCT 包埋剂，它可以渗透入组织，并有效防止冰冻过程中冰晶在组织内的产生。具体的制样步骤如下\*：

- i. 解剖组织后，放入模具中，上面覆盖 OCT（防止气泡），之后用夹子夹住模具，使其底部接触液氮直至 OCT 冷冻。冻好的组织块可以转移至-80 度，可保存一年。  
(注意：不可使液氮进入到模具里面，或者把模具直接扔到液氮里，否则组织会裂开)。
- ii. 提前将冰冻切片机的温度降至-20℃~-25℃。一般将冷冻箱温度降至-25℃，冷冻头温度降至-30℃。
- iii. 切片，注意保持刀具和台面干燥，调节防卷板的角度使切下的切片不卷，贴到多聚赖氨酸载玻片上。

(\*相关制样细节由韩晖博士提供)

注意：不同的组织可能有不同的最适合温度。

## 2.2 石蜡切片：

下面是 BD 公司关于样本固定的 Protocol，仅供参考，各实验室也可以使用已有的实验方法：

### Fixation of Tissues in 10% Neutral Buffered Formalin

1. *Sacrifice animal by prescribed and approved euthanasia techniques. Tissues to be fixed and processed should be cut to a size no larger than 3 mm thick. Let tissues fix in 10% formalin at room temperature for 8 hours but not to exceed 24 hours. (For small rodent tissue, it is recommended to fix tissues for 4-8 hours.)*
2. *Rinse with running tap water for 1 hour.*
3. *Embedding and sectioning of paraffin blocks*

以上内容来自：[http://www.bdbiosciences.com/in/resources/protocols/paraffin\\_sections.jsp](http://www.bdbiosciences.com/in/resources/protocols/paraffin_sections.jsp)

其中第三步包埋和切片需要专门的设备，更简单的方法是通过第三方服务公司协助完成，Hyperion 实验切片厚度要求 $\leq 7\mu\text{m}$ 。

(\*注意：免疫组化的切片与用于 HE 染色的切片固定包埋方法是不同的)

### 3、样本的保存

#### 3.1 冰冻切片：

包埋冷冻好的组织块和切片都可以在-80 保存一年。切片样本需要装在密封的盒子中冻存，取出切片时注意先平衡温度至室温后再打开盒子，以免生成冷凝水。

<https://www.novusbio.com/sample-preparation-for-ihc-experiments>

#### 3.2 石蜡切片：

石蜡包埋的组织块和已经切好的组织切片样本需要得到很好的保存。保存的关键在于样本中的组织要尽量避免与空气（引起氧化）、水（引发水解）以及阳光（温度以及辐射的影响）的接触。在这方面石蜡包埋的组织块和切好的组织切片有非常大的差别，应该引起足够重视。

##### 3.2.1 石蜡组织块的保存：

石蜡块中的组织由于有包埋石蜡的阻隔，处于相对封闭的状态，一般情况下可以在常温保存数年。

##### 3.2.2 石蜡切片的保存：

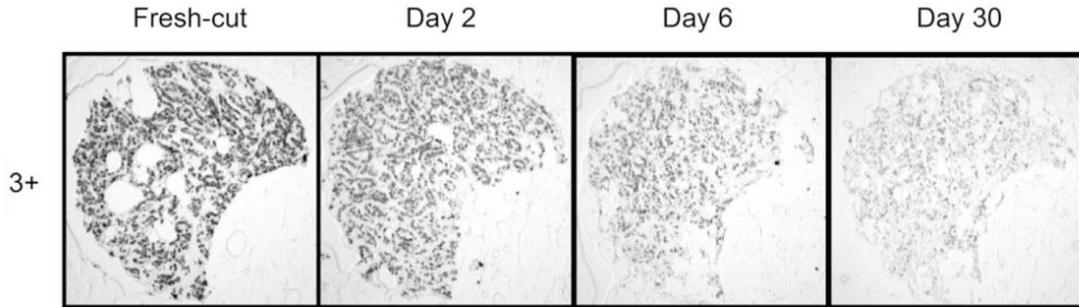
对于已经做好的切片，组织已经被暴露出来，保存的条件、抗体种类都有可能对结果产生很大影响。因此，**我们强烈建议对研究项目进行良好的设计和规划，尽可能多的使用 Fresh Cut 的切片。**

石蜡块最先切下的若干层切片，也不建议使用，因为它们也不同程度的暴露在外面环境中，这些切片可以用来做 HE 染色。

同时，我们也注意到，一些研究项目不可避免的涉及到切片的保存问题，对于这一点有大量相关文章进行了细致的研究，我们根据其中部分文章的内容总结出下面几条重要的信息：

**1) 在毫无保护的情况下常温放置，会迅速导致部分抗原信号的降低、丢失。**

下图是常温保存的乳腺样本切片，雌激素受体 (ER) 的信号随保存时间的下降情况：



图片来源: [1]

当然, 并非所有抗原的信号都如上图下降的如此迅速, 实际上不同的抗原在保存时间中的表现是不一样的, 但是对于 IMC 这样会涉及到几十个 marker 的实验来说, 无论如何, 这种保存条件都是不可取的。

## 2) 在文献中验证的保存方法有以下策略:

- A 充氮隔绝空气(Nitrogen Storage)
- B 石蜡封闭(Paraffin coating);
- C 降低温度 (4 度保存) ;

由于不同抗原性质存在非常大的差异, 使用单一策略可能效果不佳, 文章里更多的是验证这些策略的组合以提高抗原信号的保存程度:

### 1) 组合策略 A+B

从实际效果上看, 使用氮气保存和石蜡封闭的组合策略放置 3 个月可以获得与新鲜切片 (Fresh Cut) 最接近的效果 (72%~99%) [1]。

**Table 3** Paired T-test of mean cytokeratin scores of stored slides stored for 3 months with nitrogen desiccation and/or paraffin coating

Condition	Automated score	
	% Fresh	P-value
Fresh	100	
Uncoated, room-air	12	<0.0001
Uncoated, nitrogen	54	<0.0001
Paraffin coated, room-air	69	<0.0001
Paraffin coated, nitrogen	96	0.4698

**Table 4** Paired T-test of mean Ki-67 scores of stored slides stored for 3 months with nitrogen desiccation and/or paraffin coating

Condition	Manual score	
	% Fresh	P-value
Fresh	100	
Uncoated, room-air	48	<0.0001
Uncoated, nitrogen	59	<0.0001
Paraffin coated, room-air	48	<0.0001
Paraffin coated, nitrogen	72	<0.0001

### 2) 组合策略 B+C

具体做法是: 将新鲜切片干燥一天后, 用石蜡封闭后四度保存[2, 3]。保存过程中要注意防潮, 用密封良好的容器中, 放入硅胶或者其他干燥剂[4]。

需要特别指出的是，不同抗原信号随时间、保存条件的下降有很大差别，有时候甚至是决定因素[5]。所以一切以该抗原的文献资料、预实验信息为准，不能把某一种抗原的保存经验外推至所有抗体。

## 二、实验设计

实验设计阶段的工作内容包括以下几个方面：**检测靶标蛋白的筛选，金属标签匹配以及第三方抗体的选择**

### 1、检测靶标蛋白的筛选

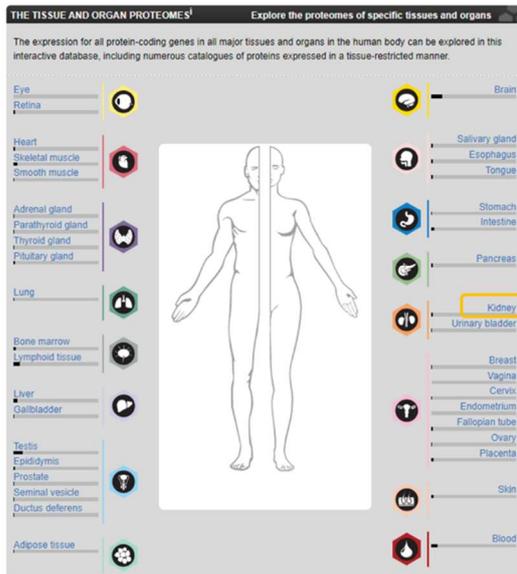
目前 Fluidigm 提供的所有 44 种抗体标签中，有 35 个已经在 IMC 实验中进行了验证。因此我们建议，一个 IMC Panel 中目标蛋白的个数应该控制在 35 个以内。除了总数的要求以外，在选择靶标蛋白时还应该从下面几个方面进行考虑。

#### 1.1 组织结构相关蛋白

Hyperion 的 Panel 设计思路与 Helios 不太一样，这是出于他们研究思路的差异。Helios Panel 设计主要考虑感兴趣细胞的 Marker 表达，其他的细胞简单的用少量 Marker Gate 掉即可。而 Hyperion 因为要检测的是组织切片，组织结构的信息非常重要。因此在自己感兴趣的目标蛋白以外，很有必要在 Panel 里面加入一些组织细胞的 marker，用来反映组织结构的蛋白。例如在一些关于癌症组织的文献里面他们会加入 aSMA(间充质细胞)，Pan-Keratin（上皮细胞）、Collagen1（细胞间基质）Histone H3（细胞核的标志）等蛋白等等；

由于不同组织的细胞类型不同，涉及到的 marker 也会有较大差异，因此需要进行认真的查阅相关的文献资料弄清研究对象所包含细胞类型以及涉及到 marker。在 ProteinAtlas 网站上对人体几十种组织的 marker 进行了总结，可以做为很好的参考。

网址：<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue>



**Proteins specifically expressed in glomerulus**

The process of urine formation begins in the glomerulus, where an ultrafiltrate of plasma is formed, and the filtered fluid enters the renal tubules. The filter consists of three layers, the fenestrated endothelium, the basement membrane, and the podocyte slit diaphragm. The analysis of the glomerulus elevated proteins is well in line with the function of the glomerulus as a filtration apparatus assembling a slit diaphragm. The list of kidney elevated proteins includes several well-known glomeruli associated genes, such as podocin (NPHS2) and nephrin (NPHS1), well established as proteins creating the filtration diaphragm making up a filter for large molecules. In addition, KIRREL1 is present in the glomerulus as described before. This latter protein is not identified as elevated in kidney, since the placenta shows higher mRNA levels than kidney for this gene. The placenta also acts as a filtration machinery for large and small molecules is therefore interesting. Another kidney elevated gene expressed in the glomerulus is FGF1.

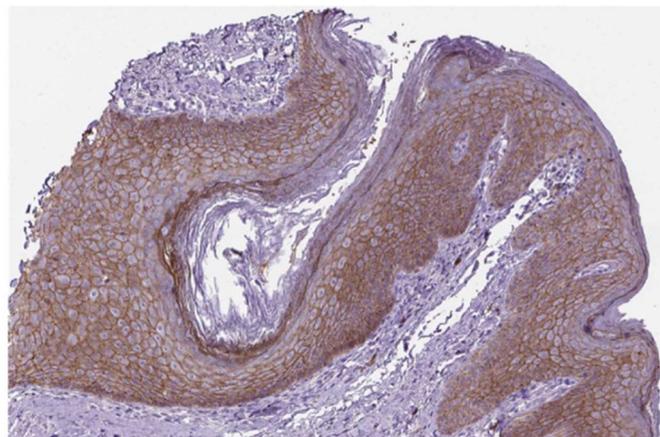
**Proteins specifically expressed in proximal tubule**

Approximately 60% of the filtered  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{H}_2\text{O}$  and more than 90% of the filtered  $\text{HCO}_3^-$  are absorbed along the proximal tubule. This is also the segment that normally reabsorbs virtually all the filtered glucose and amino acids. An additional function is the secretion of numerous organic anions and cations. Most of the proteins elevated in the kidney are localized to the proximal tubule, which is in line with the function of proximal

除此以外，对于一些特别的组织结构、细胞类型，则需要查阅相关文献，找到特异的 marker。

### 1.2 定位于细胞边缘的蛋白

可以是一些膜蛋白，或者与细胞粘附相关的蛋白（例如 E-Cadherin），定位在细胞边缘，对于后期图像处理时进行单细胞化非常有帮助。



如图：E-Cadherin在真皮细胞中的表达，显示出明显的膜定位  
图片来源：<https://www.proteinatlas.org/>

### 1.3 与课题相关的目标蛋白

这部分蛋白是与研究课题直接相关的，需要根据具体的课题方向进行选择。例如，研究肿瘤免疫可能要加上免疫亚群的 marker（CD45、CD3、CD4、CD8 等），或者肿瘤增殖、重要的肿瘤标志物等。

在选取这部分目标蛋白的时候要特别注意以下几点：

1) 做好信息收集, 认真查阅每个蛋白在目标组织中的表达情况, 包括表达强度、阳性率等情况。剔除组织不表达的目标蛋白, 以防止后续的资源浪费。

对于人的样本, Protein ATLAS 网站可以提供详细的参考资料。

2) 对于组织中阳性细胞非常稀少的 marker, 应谨慎处理, 结合目标蛋白在课题中的重要性, 决定是否保留。

举一个例子, 在设计肿瘤免疫相关 Panel 的时候, 有时大家会习惯性的按照 helios Panel 设计的思路直接在 IMC Panel 里面设置 30 多个 CD marker, 这个时候就要考虑实际在组织里面是否可以看到期望的一些 rare population。我们实际看到情况可能是这样的: 视野中大部分是组织细胞, 中间零星的浸润着少量的肿瘤细胞。由于免疫细胞的总量不大, 寄希望于通过几个 marker 进行细致分群基本上是不可能的, 所以对相关 marker 进行精简是很有必要的。

如果这些 marker 被保留下来, 应该需要做一些技术上的准备, 以保证我们可以在扫描前找到包含这些细胞的 ROI 区域进行扫描。例如: 准备一些连续切片的样本, 进行免疫组化染色, 用光学显微镜在较大视野确定阳性细胞的位置, 并据此选择 ROI 区域。

3) 对于表达量很低的蛋白, 也要谨慎处理。IMC 实验需要很多抗体共用一个抗原修复条件, 每个抗体不一定是在它的最适合的条件下载色的, 所以 Panel 中如果有过多的低表达目标蛋白会给后续的实验条件的优化带来一定困难。

## 2、金属标签匹配 (配色)

在确定目标蛋白列表以后, 就需要对每个抗体配上合适的金属标签了。给每个蛋白匹配那个金属标签主要有以下几点考虑:

1) **预标记抗体的标签种类**, 尽量多的使用预标记抗体, 可以简化预实验阶段的验证工作, 提高实验的成功率。

2) **通道之间的相互影响**, 这里主要指部分同位素的 impurity 导致的对邻近一些通道影响。这个影响比例虽然很小, 但是应该避免把信号强度悬殊的 marker 安排在相关通道上。

3) **目标蛋白的表达强度**，对于 Hyperion 来说在 159~169 之间是灵敏度最高的区域，因此可以考虑把较弱的抗体放在这个区域内。（关于目标蛋白的表达强度信息可以从 ATLAS 网站上获得，在查阅相关数据时注意选择匹配的组织类型。）

在这一环节，推荐使用 *Panel Design Helper*，一个基于 Excel VBA 的第三方 Panel 设计软件，软件中的表格和图形可以帮助您很快找出 Panel 中可能存在的问题，并进行相关的调整。

相关的软件及其说明请见下载地址：

链接: <https://pan.baidu.com/s/1ATFOLpsbW-UCcKpWGHmESQ> 密码: f36a

### 3、抗体的选择

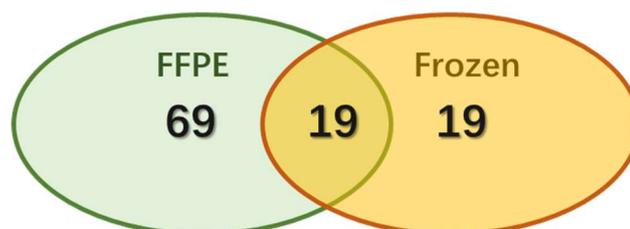
#### 3.1 预标记抗体

Fluidigm 目前（截至 2020 年 2 月）提供 107 种用于 IMC 实验的预标记抗体，抗体的货号都以字母“D”结尾，以区别与以往的“A”、“B”、“C”结尾的抗体。这些抗体的规格都是 25ug，体积 50ul，使用前需要自己利用所检测的样本种类进行 titration。

**选取预标记抗体，需要注意以下几点：**

**首先**，抗体是针对人的，虽然根据裸抗供应商的信息，其中有 50 种抗体与小鼠有交叉反应，但未经 Fluidigm 验证，用其检测小鼠样本是有风险的。

**其次**，要留意抗体的类型，抗体有的是针对石蜡（FFPE）切片，有的是冰冻切片，只有少部分可以兼顾两种切片。



Fluidigm 预标记IMC抗体分类

关于抗体更多具体的信息，可以参照附件中的列表。

此外，部分用于质谱流式悬液检测 (Helios) 抗体可以和冰冻切片反应。如果手上已经有相关的抗体，可以自行进行 validation，挑选出可以使用的部分；如果手上没有，建议直接购买合适的第三方抗体进行标记。

### 3.2 第三方抗体和 Maxpar 金属标记试剂盒

在没有预标记抗体可供选择的情况下，还可以使用第三方来源的抗体，用 Fluidigm 提供的 Maxpar X-8 金属标记试剂盒给抗体加上金属标签。

为了使金属 Label 反应正常进行，第三方抗体的要求具体如下：

- i. 抗体可以用于 IHC-P 或 IHC-F（在抗体说明书：Application 一栏可以看到，具体选择哪种，要根据样本种类决定）
- ii. 抗体本身是裸抗，即不带有荧光或其他性质的标签；抗体中不含有 BSA、血清这些大分子添加物；
- iii. 对抗体种属来源、单克隆或多克隆没有要求，但是最好是 IgG。（IgM 也有标记成功的案例，但是不推荐。）
- iv. 甘油、叠氮化钠等小分子添加物是允许的，它们会在最初的 buffer exchange 阶段直接被去除，不会影响标记反应的进行（较高浓度的甘油需要在一开始稀释）。

如果是 FFPE 样本，除上述几点外，还应注意抗原修复条件，在传统免疫组化实验中 **酸性修复 (citrate buffer pH6.0)** 和 **碱性修复 (Tris/EDTA buffer pH9.0)** 两种修复条件。

所以在选择抗体的过程中需要向裸抗供应商询问其适合的抗原修复条件，务必保持一致，以便保证所有抗体均可以做出想要的信号。另外，我们强烈建议优先选择那些在 IMC 文章中已经报道使用过的克隆号，这样可以提高后面实验的成功率。

由于 Fluidigm 提供的预标记抗体的修复条件是碱性 Tris/EDTA buffer, pH 9，所以如果 Panel 中已经带有部分预标记抗体，请优先选择碱性抗原修复条件的裸抗。

### 关于 Maxpar 金属标记试剂盒

Fluidigm 提供 35 种金属标记试剂盒用于 IMC 实验，相关的标记试剂盒信息见以下链接：

<http://cn.fluidigm.com/catalog?applications=massCytometry&productTypes=labelingKits&query=>

<http://cn.fluidigm.com/catalog/multi-metal-kits>

具体 kit 的选择请参见前面所述“金属标签匹配”一节

(标记抗体的 Protocol 与原 Helios 抗体相同, **注意**: 新推出的 7 基于 Cd 元素的抗体标记 kit 不能用于 IMC 实验。)

### 三、Panel 验证 (即预实验)

良好设计的预实验是最终获取高质量科研数据的必要保障。IMC 的预实验涉及很多方面, 总结起来主要有以下几点:

#### 1、选择合适的染色条件

##### 1.1 抗原修复条件的选择

冰冻切片不需要抗原修复, 所以这一点主要是就 FFPE 样本而言的。

事实上, 每个抗体都有其最适宜的抗原修复条件, 但是在 IMC 实验中, 我们需要将所有抗体在一起染, 需要共用一个抗原修复条件, 所以不一定每个抗体都能在其最适宜的抗原修复条件, 需要做一些权衡。这是 IMC 实验与普通免疫组化的重要区别。

上文提到 Fluidigm 的预标记抗体用的是一种碱性修复条件, 在官方的 Protocol 中, 详细说明了其具体细节。

如果 Panel 中全是预标记抗体, 我们建议您直接选择这个修复条件进行后续的抗体浓度滴定; 如果有一部分是预标记抗体, 我们建议您优先尝试这个条件, 然后根据结果再进行相应的优化; 如果全部都是第三方抗体, 则可以根据自己的经验以及裸抗的说明选择适合所有抗体的抗原修复条件进行验证。

在这里, 我们特别推荐 2019 年 10 月份 Marieke 等发表的一篇文章(全文见附件), 在这篇文章中作者成功构建了一个包含 40 个抗体的 IMC Panel, 文中详细说明了验证实验的相关细节。值得一提的是, 在这篇文章中作者选择的是酸性的抗原修复条件。[6]

##### 1.2 抗体孵育条件的选择

Fluidigm 的官方的 Protocol 中 (石蜡和冰冻切片), 在用 BSA 进行 block 以后, 抗体的 cocktail 直接 4 度孵育过夜。这也是预标记抗体验证过的条件。

Marieke 等做了更仔细的验证工作，他们发现在 5 小时常温孵育和 4 度过夜修复两种条件下，大部分抗体信号观察到了显著的不同（原文：*striking differences*）。大体来讲，低丰度抗原在常温条件下孵育较好而高丰度抗原需要在四度孵育以降低其背景信号。不过我们还是推荐跟据实际的结果来选择孵育条件，毕竟对于抗体而言，由于其多态性的存在，总有例外出现。

确定了每个抗体的孵育条件，在 IMC 实验中可以将所有抗体分为两组，分别配制抗体 cocktail，进行 5h 常温孵育第一组抗体，洗片后，四度过夜孵育第二组抗体。

## 2、验证抗体的特异性

得到阳性的抗体信号以后，我们需要辨别其是否是特异的。通常我们可以通过以下方式判断信号的特异性：

1) 主观性的经验判断：通过图片本身的信噪比、信号的绝对强度、信号是否是随机分布等来进行初步判断，有一定经验积累的情况下，直觉会帮助你找出部分非特异的抗体。

2) 将抗体的信号与抗体供应商或者 ATLAS 的图片进行比较，观察其分布模式是否是一致的，如果同一组织内，marker 的分布有显著差异，则有可能是非特异信号。当然，因为组织有很大的异质性，根据这个判断也需要积累一定的经验。

3) 如果是 IMC 多通道的数据，则可以根据抗体 marker 的共表达关系进行更精确的判断。

理论上，一个严格的 IMC 抗体验证实验应该包括以下几种对照：

i. **样本的选择上，可以设两个对照：**

**阳性对照：**表达该 marker 的组织样本，确认抗体的 performance

**阴性对照：**不表达该 marker 的样本，排除背景

ii. **在 marker 的选择上，可以设置两个对照**

**Co-localization control：**对与 CD20 而言，CD19 或者 CD45 是与其共定位的

**Counter-colocalization control：**对 CD20 而言，CD3 是不与其共定位

就实际而言，对于很多 marker 来说，找到严格的“阴性对照”样本是不太现实的，而阳性对照中也存在很多阴性细胞，因此阴性对照可以省略。而对于很多 marker，我们可能也无法找到相应的对照抗体，可以直接通过已有 marker 的共定位关系来进行判断。

### 3、第三方抗体的标记

IMC 实验所用的是带有 X-8 polymer 的金属标记试剂盒，与原来 Helios 使用的标记试剂盒相同，所以采用的标记 Protocol 也是一样的。需要指出，小部分抗体由于其结构的特殊性，在标记后可能会发生结构解体、信号下降的问题，为了排除掉这部分抗体，必须对标记后的抗体进行 IHC 或者 IMC 实验验证。

如果确实发生了上述的问题，出问题的抗体应该被替换掉。有几种方法解决该问题：

**1) 替换成不同克隆号的抗体，进行再次标记、验证**

**2) 使用二抗（抗荧光基团）**

在 Fluidigm 的目录中有 anti-FITC、anti-APC、anti-PE 以及 anti-biotin 的金属标签二抗，可以使用相应的荧光/biotin 一抗染色，然后在染二抗。

**3) 使用种属特异的二抗**

Fluidigm 目录中有 **anti-mouse**, **anti-rabbit** 以及 **anti-Rat** 等针对特异种属的二抗，不过考虑到 Panel 中可能有多个 mouse, rabbit 或者 Rat 来源的一抗，此类抗体必须在其他抗体之前先染才行。这种方法的好处是可以直接使用裸抗进行实验，不过会使染色的 Protocol 变复杂，谨慎使用。

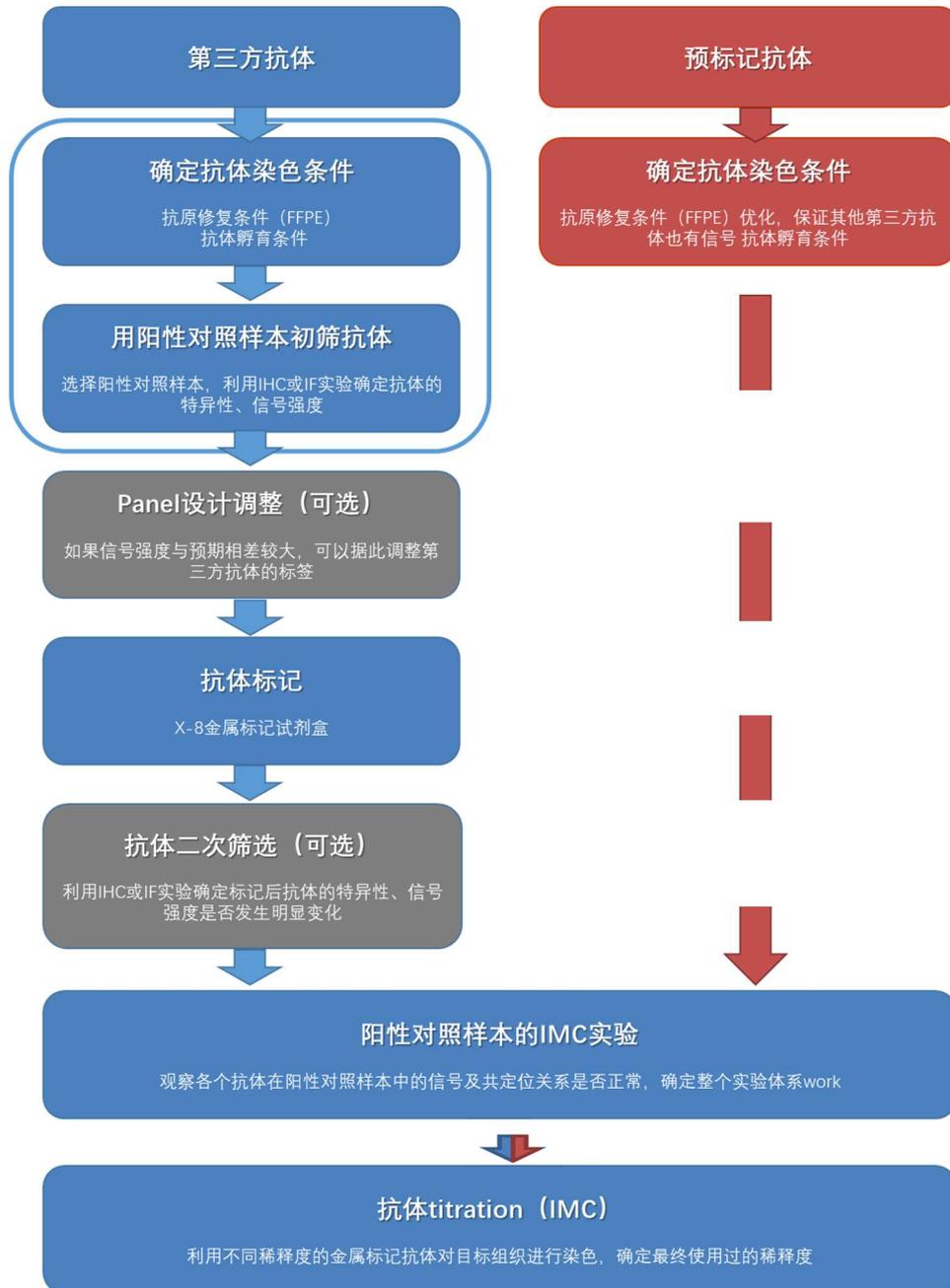
### 4、确定抗体的稀释度

不论是预标记抗体还是自己标记的第三方抗体，在正式实验前，需要确定一个合适的稀释度，这个需要 titration 实验来确定。

一般情况下，我们可以利用 1:50,1:100,1:200 和 1:400 四个稀释度染目标切片，最后根据结果决定使用哪个稀释度。

## 5、预实验 pipeline 的安排

以上所说的四个方面在实际的预实验过程中是穿插在一起的，为了能给大家对预实验过程有一个直观的了解，我们整理了一个 Pipeline 供大家参考。



## 四、附件说明

- 1、中文版 IMC FFPE 样本染色 Protocol
- 2、中文版 IMC 冰冻切片染色 Protocol
- 3、必需第三方试剂耗材列表
- 4、Fluidigm IMC 预标记抗体列表
- 5、Fluidigm 预标记二抗列表
- 6、*Marieke* 等关于 40 个 Marker Panel 的文献全文

## 五、参考文献：

1. DiVito, K.A., et al., *Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays*. Lab Invest, 2004. **84**(8): p. 1071-8.
2. Economou, M., et al., *Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains*. Clin Transl Med, 2014. **3**(1): p. 4.
3. Gelb, A.B., V.A. Freeman, and S.H. Astrow, *Evaluation of methods for preserving PTEN antigenicity in stored paraffin sections*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011. **19**(6): p. 569-73.
4. <https://tissue-microarray-slides.jimdo.com/2017/10/16/storage-options-for-ffpe-tissue-sections/>.
5. Karlsson, C. and M.G. Karlsson, *Effects of long-term storage on the detection of proteins, DNA, and mRNA in tissue microarray slides*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(12): p. 1113-21.
6. Ijsselsteijn, M.E., et al., *A 40-Marker Panel for High Dimensional Characterization of Cancer Immune Microenvironments by Imaging Mass Cytometry*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2534.