

六色多重荧光染色试剂盒 (五标六色)

原理介绍: 酪酰胺信号放大(TSA, Tyramide signal amplification)技术是一类利用辣根过氧化物酶

(HRP) 对靶蛋白进行标记的酶学检测方法, 类似常规免疫组化的 DAB 显色方法, TSA 技术同样采用 HRP 标记的二抗, 同样有对应的“显色”步骤 (HRP 催化加入反应体系的酪胺荧光素底物, 产生活化荧光底物, 活化底物可与抗原上的酪氨酸等残基共价结合, 使样品上稳定的共价结合酪胺荧光素。之后用热修复法洗去非共价结合的一抗-二抗-HRP 复合物, 重复下一种一抗-hrp 二抗来第二轮孵育, 换另一种酪胺荧光素底物, 如此往复就可实现多重标记。

TSA 详细原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应(酪胺盐在 HRP 催化 H₂O₂ 下形成共价键结合位点), 产生大量的酶促产物, 该产物能与周围的蛋白残基(包括色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基)结合, 这样在抗原-抗体结合部位就有大量的荧光素沉积, 结果使其检测信号得到 10-100 倍增强。简单来说, 用这种方法做多重免疫荧光是利用二抗上带有的 HRP (而不是直接偶联荧光素), 来催化后续添加入体系的非活性荧光素。荧光素在 HRP 和过氧化氢的作用下被活化, 跟临近蛋白的酪氨酸残基共价偶联, 使得蛋白样品与荧光素稳定结合。然后微波或煮沸或者水浴等热修复处理, 前一轮非共价结合的抗体被洗掉, 共价结合的荧光素稳定共价结合在样本切片蛋白上。再换一个一抗来第二轮孵育, 周而复始。等到所有抗体孵育结束, 荧光素都结合好后, 最后去检测结果。由于每次体系中都只有单一抗体孵育, 因此无需担心抗体交叉反应, 以及一抗二抗种属匹配问题, 大大减少了实验设计时不同种属抗体选择匹配的限制。也就是说, 如果用 TSA 技术, 同一张片子上所有的靶标都可以选用特异性高的兔单克隆抗体。搭配同一支抗兔的 HRP 二抗就可以进行实验, 而且信号放大的倍数大大增强。本公司开发的试剂盒具体酪胺荧光染料为以下其中以下一种或者多种: TYR-480, TYR-520, TYR-570, TYR-620, TYR-690, TYR-780。此试剂盒中的荧光染料可单独或配合使用。可以实现单标、双标、三标以及更多重荧光放大/多重同源抗体荧光标记等功能, 极大丰富了此试剂盒的内涵。

试剂盒组成: TYR-520 荧光染料(绿光)(即用型, 5mL), -20°C; TYR-570 荧光染料 (红光) (即用型, 5mL), -20°C; TYR-620 荧光染料 (即用型, 5mL), -20°C; TYR-690 荧光染料 (即用型, 5mL), -20°C; TYR-780 荧光染料 (即用型, 5mL), -20°C; TSA+增强剂, 100ul, -20°C (可选);

高敏多聚 hrp 山羊抗兔二抗 (15mL) 4°C (可选)。

备注: TYR-520 荧光染料、TYR-570 荧光染料、TYR-620 荧光染料、TYR-690 荧光染料、TYR-780 荧光染料 在-20 度下, 均为固体, 使用之前需解冻。

备注: TYR-520 荧光染料、TYR-570 荧光染料 在-20 度下, 均为固体, 使用之前需解冻。



TSA+增强剂 使用方法: TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号强度 5-10 倍, TSA+增强剂: TYR 荧光染料=1:500, 使用 TSA+增强剂不是必须的选项, 可以根据具体的情况 (荧光信号弱的靶标/表达丰度低的靶标) 选择添加或者选择不添加 (信号过强的靶标/表达丰度高的靶标), 同时尽可能控制整个 TYR 荧光染料反应时间。

TSA+增强剂注意事项: TSA+增强剂在 4 度或者-20 度是固体状态, 使用之前需要解冻; 将增强剂按比例加入到 TYR-XXX 荧光染料中, 反应信号进一步提高 5-10 倍, 适用于信号比较弱的情况, TSA+增强剂不一定要加入到荧光反应体系中, 是可选择的, 根据具体情况而定, 具体使用方法: TSA+增强剂: TYR 荧光反应液=1:500 (也可以用 1: 1000)

操作流程:

- 1、石蜡切片脱蜡至水:** 依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II。取出放在通风厨内, 酒精晾干后放入自来水中稍洗, 蒸馏水洗。
- 2、抗原修复:** 组织切片置于盛满 PH 9.0 EDTA 碱性抗原修复液或者 PH6.0 柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复 (也可以用高压 1-2min 100 度水煮 15min 95 度水浴 20min 等其他热修复方法)。中火 8min, 停火 8min, 转中低火 7min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。(修复液和修复条件根据组织类型以及抗原类型来确定)。
- 3、阻断内源性过氧化物酶:** 切片放入 3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育 15 min, 将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。
- 4、BSA 封闭:**切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内滴加用 3%BSA-PBS (或者其他封闭液) 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min。
- 5、加一抗:** 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗 X, 切片平放于避光湿盒内 4°C 孵育过夜或者 37 度 1-2h。(湿盒内加少量水防止抗体蒸发)
- 6、加 hrp 二抗:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的 hrp 二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50min, PBS 洗三次。
- 7、荧光染料反应: TYRXXX 荧光染料**反应 10-15min, PBS 洗三次。
- 8、重复 2-7 步骤 (换用另外一种 TYRXXX 荧光染料)**
- 9、DAPI 复染细胞核:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10min。
- 10、封片:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- 11、镜检拍照:** 切片于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。

染料	激发波长	发射波长
----	------	------



DAPI 蓝色	350	420
TYR-480	450	480
TYR-520 绿色	490	520
TYR-570 红色	550	570
TYR-620	590	620
TYR-690	630	690
TYR-780	750	780

文献引用格式: Co-staining of A, B , C, D and E was performed using a Six-color multiple immunofluorescence Kit (Recordbio Biological Technology, Shanghai, China) based on the tyramide signal amplification (TSA) technology according to the manufacture's instruction.