

四色多重荧光染色试剂盒（三标四色）

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-690 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 (5mL) 4°C。

备注: TYR-520 荧光染料、TYR-570 荧光染料、TYR-690 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℃ 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

文章引用试剂盒 / 方法： Co-staining of A, B and C was performed using a Four-color Fluorescence kit (Recordbio Biological Technology, Shanghai, China) based on the tyramide signal amplification (TSA) technology according to the manufacture's instruction.