

## 产品组成:

规格	100T
TYR-520 荧光染料 (即用型)	5ml
TYR-570 荧光染料 (即用型)	5ml
TYR-620 荧光染料 (即用型)	5ml
TYR-690 荧光染料 (即用型)	5ml
TSA+增强剂	40ul

染料	激发波长	发射波长
TYR-520 绿色	490	520
TYR-570 红色	550	570
TYR-620 橙色	590	620
TYR-690 粉色	630	690

## 储存条件:

-20℃保存

## 有效期:

一年。

## TSA+增强剂:

TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号,放大 5-10 倍, TSA+增强剂是必须的选项,可以根据具体的荧光显色强度选择是否添加。

## 使用说明:

使用比例【TSA+增强剂:TRY-XXX 荧光染料=1: 500】

## 注意事项:

1. TYR-520、TYR-570 等荧光染料在-20℃下均为固体,使用之前需解冻。本试剂仅用于科学研究,不作其他用途。
2. 开始实验前,应仔细阅读此说明书。
3. 本试剂仅限有与业经验或经与业培训的人员使用。
4. 避免试剂接触眼睛和粘膜,如接触到敏感区域,立即用大量清水冲洗。

## 使用方法:

- 1) 石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯I15min-二甲苯II15min-无水乙醇I5min-无水乙醇II5min-95%乙醇5min-85%乙醇5min-75%乙醇5min-蒸馏水中待用。
- 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収,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: 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°C 1-2h。(湿盒内加少量水防止抗体蒸収)
  - 6) 加免疫组化 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不一抗相应种属的免疫组化 HRP 二抗覆盖组织, 避光室温孵育 30-50min, PBS 洗三次。
  - 7) 荧光染料反应: TYR-520 荧光染料反应 3-10min, PBS 洗三次。
  - 8) 重复 2-7 步骤 (换用另外一种 TYR-XXX 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。

#### 检测原理:

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, 活化底物可不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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下形成共价键结合位点), 产生大量的酶促产物, 该产物能不周围的蛋白残基(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, 使得蛋白样品不荧光素稳定结合。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, 而信号放大的倍数大大增强。本公司开収的试剂盒具体酪胺荧光染料为一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。