

五标多重免疫荧光试剂盒

产品描述：

本产品是一种基于酪酰胺信号放大技术对细胞或组织样品进行多重荧光染色的试剂盒。酪酰胺信号放大（Tyramide signal amplification, TSA）技术是一类利用辣根过氧化物酶(HRP)对靶蛋白进行高密度原位标记的酶学检测方法，荧光标记的酪胺分子在 H_2O_2 环境下被二抗标记的 HRP 催化激活，产生大量的酶促反应，使荧光素在抗原-抗体结合部位与组织周围的蛋白残基结合，形成大量的荧光素沉积，实现信号放大。

TSA 的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_2O_2 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。利用 TSA 技术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。然后通过抗体洗脱液或者热修复处理，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。后续可不必考虑上一轮实验中抗体的交叉干扰，即可直接使用不同或相同种属来源的抗体进行后续轮次的孵育，从而标记其它靶抗原。如此重复循环染色，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，实现同一个样品上的多重荧光染色。

本试剂盒可同时标记和检测 1-5 种目的蛋白。本试剂盒包含 TYR-520、TYR-570、TYR-620、TYR-690 和 TYR-780 五种荧光染料，可单独或配合使用实现单标、双标、三标以及最多五标多重荧光放大/多重同源抗体荧光标记等功能。本试剂盒配合相应一抗和二抗使用，节省抗体用量，增强荧光强度，信号稳定，可用于多色标记和定位研究，尤其适用于低丰度靶标和复杂样品的检测。本产品适用于石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片、细胞涂片等细胞或组织样品的多重荧光染色。

本试剂盒突破了多重免疫荧光染色对抗体种属选择的限制，每种抗体染色后均会去除相应的一抗和二抗，所以对于一抗的种属来源没有特殊要求，适用于不同或相同种属来源的一抗。

对于组织切片、细胞爬片或涂片，按照每个样品需要 50 μ l TSA 荧光染料计算，本试剂盒可用于 100 个样品的靶蛋白的五重荧光标记检测，如果用于靶蛋白的单色荧光标记，可以检测的样品数量约为五重荧光标记的 5 倍。



产品规格：

产品名称	货号	规格	保存条件
五标多重免疫荧光试剂盒	YB008	100T	2-8℃避光

产品特点：

- 1、最多可做到免疫荧光六标且不串色 (YB009) ；
- 2、本产品对一抗来源无限制，可以不同种属也可以同一种属；
- 3、荧光发光时间更久，4℃可保存一个月；
- 4、大大提高放大荧光信号的倍数（10-100 倍），阳性表达更强，背景更干净；
- 5、节省一抗，在原来的抗体使用稀释比例基础上再稀释 8-10 倍；
- 6、可以在同一张切片上对多种蛋白进行不同荧光标记，实现多种蛋白共定位。

包装清单：

组分名称	规格	保存条件
TYR-520 荧光染料（即用型）	5ml	2-8℃避光
TYR-570 荧光染料（即用型）	5ml	2-8℃避光
TYR-620 荧光染料（即用型）	5ml	2-8℃避光
TYR-690 荧光染料（即用型）	5ml	2-8℃避光
TYR-780 荧光染料（即用型）	5ml	2-8℃避光
Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗	25ml	2-8℃避光
抗荧光淬灭封片剂（含 DAPI）	10ml	2-8℃避光
抗体稀释液	50ml	2-8℃避光
过氧化物酶封闭液	50ml	2-8℃避光
说明书	1 份	-

使用说明：

1、样本准备：

对于石蜡切片：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 5min，95%乙醇 5min，85%乙醇 5min，75%乙醇 5min，蒸馏水洗 5min。



对于冰冻切片：冰冻切片用 4%多聚甲醛固定 10-30min，PBS 清洗 5min，重复 3 次，滴加 Triton-X 100 通透 20min，PBS 清洗 5min，重复 3 次。

对于细胞爬片或者细胞涂片：细胞样本用 4%多聚甲醛固定 10-30min，PBS 清洗 5min，重复 3 次，滴加 Triton-X100 通透 20min，PBS 清洗 5min，重复 3 次。

2、抗原修复：石蜡切片置于盛满抗原修复液的修复盒中，于微波炉内进行抗原修复（也可以用高压 1-2min，或 100℃水煮 15min，或 95℃水浴 20min 等热修复方法），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 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，冰冻切片和细胞样本可省略此步骤）。

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 15min，将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

4、非特异性靶点封闭：切片稍甩干后用免疫组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加封闭液（如 3%BSA）均匀覆盖组织，室温封闭 30-60min。

5、孵育一抗：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，切片平放于避光湿盒内 4℃孵育过夜或室温孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止蒸发），孵育结束将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

6、孵育二抗：切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的多聚 HRP 二抗覆盖组织，避光室温孵育 50min，PBS 清洗 3 次。

7、TSA 荧光标记：直接滴加 50μl 即用型 TYR 荧光染料，均匀覆盖组织室温孵育 3-15min（最佳时间 5-10min），PBS 清洗三次（预实验可先染 1min 洗干净荧光染料后显微镜下观察染色效果，如果阳性弱继续滴加荧光染料加强染色强度直至合适强度后继续进行下一步）。

8、抗体洗脱（以下方法二选一，优先推荐使用抗体洗脱液进行洗脱）：

高温热修复法洗脱：组织切片置于抗原修复液中 95℃水浴 25-40min（根据不同抗体亲和力调整时间），注意避免干片。自然冷却后 PBS 清洗 3 次，每次 5min。由于冰冻切片易脱片，本方法较适用于石蜡切片。

抗体洗脱液洗脱：滴加适量 37℃预热的抗体洗脱液覆盖样本，37℃孵育 5-20min。弃洗脱液，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本，37℃孵育 5-20min。弃洗脱液，PBS 清洗 3 次，每次 5min（本法更温和，石蜡切片、冰冻切片、细胞或骨组织等易脱落组织样品均可使用）。



- 9、重复 3-8 步骤（换用第二种 TYR 荧光染料），进行第二轮标记。
- 10、重复 3-8 步骤（换用第三种 TYR 荧光染料），进行第三轮标记。
- 11、重复 3-8 步骤（换用第四种 TYR 荧光染料），进行第四轮标记。
- 12、重复 3-7 步骤（换用第五种 TYR 荧光染料），进行第五轮标记，最后一轮 TSA 染色后可以不进行抗体洗脱。
- 13、DAPI 染色细胞核：玻片置于 PBS 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 染色液，室温避光孵育 5-20 min。
- 14、封片：玻片置于 PBS 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。
- 15、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。

染料荧光光谱信息如下：

染料	激发波长(nm)	发射波长(nm)	荧光颜色
DAPI	350	420	蓝紫色
TYR-480	440	480	绿色
TYR-520	488	519	黄绿色
TYR-570	555	570	橙红色
TYR-620	594	615	深红色
TYR-690	682	702	近红外（伪彩）

注意事项：

- 1、本产品为荧光染料，请注意避光保存和使用，以减缓荧光淬灭。
- 2、本公司提供多重免疫荧光染色及扫描分析实验服务，咨询电话 400-681-8582。
- 3、本产品仅作体外科研使用，不可用于临床诊断或治疗。
- 4、实验员请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

保存方法：

2-8℃避光保存，12 个月有效。

