



## 五标六色多重荧光检测试剂盒

### Six Color mIHC Fluorescence Kit

产品编号：IHCT004

产品规格：30T/100T

保存条件：避光保存，-20℃可保存 12 个月，开封后 2-8℃保存。

预期用途：用于石蜡组织切片的多重荧光染色，配合 Bioss 常规兔来源或鼠来源的一抗使用。

产品组成：

编号	名称	规格	
		30T	100T
TSA 染料 1	TSA AbBy Fluor® 350	15μL	50μL
TSA 染料 2	TSA AbBy Fluor® 488	15μL	50μL
TSA 染料 3	TSA AbBy Fluor® 555	15μL	50μL
TSA 染料 4	TSA AbBy Fluor® 633	15μL	50μL
TSA 染料 5	TSA AbBy Fluor® 680	15μL	50μL
核染料 1	DAPI	15μL	50μL
试剂 1	TSA Buffer 快速反应缓冲液	15mL	60mL
试剂 2	修复/速除二合一缓冲液	2L	5L
试剂 3	3%双氧水	50mL	100mL
试剂 4	封闭液	10mL	30mL
试剂 5	一抗稀释液	15mL	50mL
试剂 6	快速封片剂	5mL	10mL

产品原理：

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。其原理是利用酪胺的过氧化物酶反应，酪胺荧光素底物在 HRP 和过氧化氢的作用下被活化，产生的活化荧光底物能与目标蛋白的蛋白残基（酪氨酸残基）共价结合，导致在抗原-抗体结合位点大量沉积荧光素，实现信号放大。通过热修复处理，将前一轮非共价结合的抗体洗掉，而荧光素稳定结合在蛋白上，进行下一轮染色。直至所有抗体孵育结束，进行核染色，封片，扫描。

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及一抗二抗种属匹配问题，摆脱了传统免疫荧光实验条件对抗体种属来源的限制和束缚。本试剂盒中的修复/速除二合一缓冲液效果远胜普通修复液，显著杜绝“串染”、“过修复”现象；快速反应缓冲液使反应体系不再依赖 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，将反应时间从 5-20 min 缩短至 10 sec-10 min；水晶封片剂采用抑制气泡配方及增强型防淬灭配方，有效防止封片过程产生泡，并使 TSA 荧光可保存 6 个月-2 年。本试剂盒将实验所需试剂一站式配齐，有效缩短了操作时间，简化了繁琐的操作步骤。

准备检测样本：

1. 不同物种的活检或手术切除样本。
2. 组织离体后使用 10%中性福尔马林固定，固定时间 8-48 h 最佳。
3. 建议组织切片厚度 3-4 μm，使用防脱载玻片。

实验设备：

取材设备、切片机、脱水机、包埋机、摊烤片机、染色机、恒温箱、微波炉、漩涡混匀器、离心机

### 实验耗材：

防脱载玻片、修复盒、晾片架、免疫组化疏水笔、避光孵育湿盒、计时器、离心管、移液器、移液器吸头、量筒、试剂配制瓶、洗瓶、盖玻片

### 实验步骤：

1. **脱蜡水化：**切片置于玻片架放入二甲苯中浸洗 3 次，每次 10 min。依次置于不同浓度（100%、100%、95%、95%、85%、75%）乙醇中浸泡各 5 min，再置于 ddH<sub>2</sub>O 中 5 min。

2. **抗原修复：**玻片架放入修复盒，修复液没过切片上沿，微波或高压修复。

2L 修复/速除二合一缓冲液配置：向 6.4g 粉末中加入 36.8 ml ddH<sub>2</sub>O 配置成 50X 浓缩液，再用 ddH<sub>2</sub>O 稀释成工作液。5L 修复/速除二合一缓冲液配置同理。

微波炉高功率至沸腾，维持 20 sec，转低功率维持低沸状态 5 min，关火自然冷却。

3. 用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次。

4. **阻断内源性过氧化物酶：**用吸水纸吸去玻片上多余的液体，用免疫组化疏水笔将组织圈出，加 3%双氧水，室温下孵育 10 min。

5. 用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次。

6. **封闭：**用吸水纸吸去玻片上多余的液体，滴加封闭液，室温下封闭 30 min。

7. **一抗孵育：**用吸水纸吸去玻片上多余的液体，滴加已稀释到适当浓度的一抗工作液，在湿盒中 4℃孵育过夜或恒温箱内 37℃孵育 1 h。

8. 用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次。

9. **二抗孵育：**用吸水纸吸去玻片上多余的液体，滴加 HRP 标记的二抗，室温下孵育 30 min。

10. 用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次。

11. **显色反应及信号放大：**用 TSA Buffer 快速反应缓冲液将 TSA 染料稀释成工作液（具体稀释条件参照荧光染料光谱信息），滴加 50-200 μL 至完全覆盖组织，室温下反应 60 sec，浸泡于 PBS 中 2 min 中止反应。

注：实验时建议镜检观察每轮染色效果，如果背景荧光较强，可于 PBS 中静置一段时间再观察；如果信号强度不够，可以继续滴加 1:20-1:50 稀释的工作液，室温反应足够长的时间。显色时间推荐在 60 sec 左右，最好不要超过 20 min。

### 12. 抗体复合物的去除：

（1）Option：修复/速除二合一缓冲液：微波炉高功率至修复/速除二合一缓冲液工作液沸腾，维持 10 sec 后关火，5 min 后将烧杯置于盆中水浴，降至室温，可缩短实验时间（用过的缓冲液不建议重复使用）。

（2）传统方法：切片置于枸橼酸盐或 pH9.0 的 EDTA 抗原修复液中，微波炉加热至沸腾 20 sec，转低功率维持低沸状态 10-20 min，将修复盒置于盆中水浴，降至室温。

13. 用 PBS 洗涤 5 min。

14. 重复步骤 6-步骤 13，直至多轮染色完成。

15. **核染：**滴加适量核染料，室温下避光湿盒内孵育 5 min。用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次（具体稀释条件参照荧光染料光谱信息）。

16. **封片：**滴加防荧光淬灭封片剂 1-2 滴，盖玻片封片。置于 37℃恒温箱固化干片 30 min-1 h，切勿放入湿盒。

17. **切片保存：**切片放置于片盒，可于-20℃冰箱长期保存。室温下需避光保存，并于 1 个月之内完成拍照。

### 荧光染料光谱信息：

Product name 产品名称	Ex.(nm)激发峰波长/ Em.(nm)发射峰波长	Dilution 建议稀释比例	Dilution conditions 稀释条件
TSA AbBy Fluor® 350	362/436	1:99 ~199	与 TSA Buffer 快速反应缓

TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 488	488/519	1:99 ~199	冲液配比稀释，稀释后避光湿盒内室温孵育 5min
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 555	555/570	1:99 ~199	
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 594	594/615	1:99 ~199	
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 633	633/655	1:99 ~199	
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 647	650/670	1:99 ~199	
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 680	682/702	1:99 ~199	
TSA AbBy Fluor <sup>®</sup> 750	750/780	1:99 ~199	
AbBy NU470	450/470	1:99 ~199	与 PBS 配比稀释
DAPI	360/460	1:99 ~199	与纯水配比稀释
修复/速除二合一缓冲液	/	1:49	与纯水配比稀释

### 注意事项：

#### 1. 一抗选择

- ①选择通过 IHC 实验验证的抗体。
- ②选择已有文献报道的抗体。
- ③尽量选择单抗，谨慎选择多抗。
- ④小鼠标本不要选择小鼠来源的一抗（细胞染色除外）。

#### 2. 自发荧光

TSA 荧光多标需考虑样本自发荧光的影响，如角蛋白丰富的样本、脂褐质丰富的脑组织和淋巴瘤样本、骨组织及骨髓样本、过固定样本等。可通过光谱拆分功能对背景荧光进行扣除，或在标记时避免使用和自发荧光同一通道的 TSA 染料。

#### 3. 占位效应

在多色标记过程中，当两个靶点抗原距离接近时，上一轮反应将抗原附近的酪氨酸耗尽，导致下一轮荧光结合不上的问题，称为占位效应。

- ①TSA 荧光化合物的作用半径为 5-10 nm，半径外不会发生占位效应。
- ②组织中的酪氨酸位点较为丰富时，占位效应不常发生。
- ③占位效应通常发生在距离接近且表达差异较大的靶点之间；某些表达广泛且丰度高的靶点在信号放大过度时也可能耗尽整个细胞的酪氨酸位点。

#### 4. 染色顺序的确定

- ①抗体必须逐个验证，在熟悉每个靶点及对应抗体的情况之前，不要贸然做多色标记。
- ②不能长时间修复的抗原安排到第一轮；需长时间修复的则安排到最后一轮。遵循“先低后高”、“先少后多”原则。
- ③难以去除的抗体需安排到最后一轮。
- ④对于科研用户，尽量边染边观察。
- ⑤对于工业用户或者染色工作量大的用户，可能无法镜下观察每轮染色效果，因此通常不考虑荧光先后顺序，请遵循平衡原则。
- ⑥通道之间无先后顺序考量，但在同一通道内，建议低丰度靶点选择较短波长荧光先染；高丰度靶点选择较长波长荧光后染。
- ⑦荧光强度取决于一抗浓度、孵育时间和温度，二抗孵育时间，TSA 稀释比例、显色时间乃至当天室温，务必详细记录。

⑧多色标记的荧光种类越多，越要求各荧光强度达到均衡。请将一抗与 TSA 荧光一一对应，测试并汇总达到荧光均衡的实验条件。对于没有条件测试某些 TSA 荧光的用户，可用可观测荧光代替测试，获得近似条件。

#### 5. 串色

在 TSA 多色标记中，荧光种类越多，通道串扰的可能性就越大。

①同激发通道之间的串色现象很少见，例如 TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 488 与 TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 555 之间几乎不串色；但同一激发通道内，例如 TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 555/TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 594、TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 633/TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 680，前者因保持一段特征光谱供识别而很少被后者干扰，但前者常常因染色过强而干扰后者。

②可用 TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 350 替代，以消除 TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 488/TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 555 的经常性干扰。

③用核染料 AbBy NU470（大斯托克司频移特性）代替 DAPI。

④优化染料结构，微调 EM 峰值并缩窄其分布宽度，使荧光分布更均衡。

⑤TSA AbBy Fluor<sup>®</sup> 350 所属通道样本自发荧光较强，请选择丰度高且特异的靶点如 CD3、Keratin 19、Vimentin 等，建议最后一轮染色并且强染，提高信噪比利于识别和拆分。通常不适用于 PD1、PD-L1 等中低丰度且指标重要的靶点。

6. 发表论文时引用本产品的写作建议：“IHCT004, Bioss Antibodies”。引用示例：“Co-staining of A and B was performed using a Six Color mIHC Fluorescence Kit (IHCT004, Bioss Antibodies) based on the tyramide signal amplification (TSA) technology according to the manufacture’s instruction.”

7. TSA 染料极易挥发，为保障实验质量，建议开封后一次性使用完毕。