



四标五色多重荧光检测试剂盒

Five Color mIHC Fluorescence Kit

产品编号：IHCT003

产品规格：20T/100T

保存条件：4℃可保存 12 个月。

产品组份：

编号	名称	规格	
		20T	100T
TSA 荧光染料 1	TSA-520 Plus	浓缩型, 10μL, 200x	浓缩型, 50μL, 200x
TSA 荧光染料 2	TSA-570 Plus	浓缩型, 10μL, 200x	浓缩型, 50μL, 200x
TSA 荧光染料 3	TSA-620 Plus	浓缩型, 10μL, 200x	浓缩型, 50μL, 200x
TSA 荧光染料 4	TSA-690 Plus	浓缩型, 10μL, 200x	浓缩型, 50μL, 200x
核染料 1	DAPI 染液 (即用型)	2mL	10mL
试剂 1	TSA buffer	6.4mL	32mL
试剂 2	HRP 山羊抗兔/鼠通用二抗	6.4mL	32mL
试剂 3	抗体稀释液	8mL	40mL
试剂 4	3%过氧化氢	8mL	40mL
试剂 5	抗荧光淬灭封片剂 (干固型)	2mL	10mL

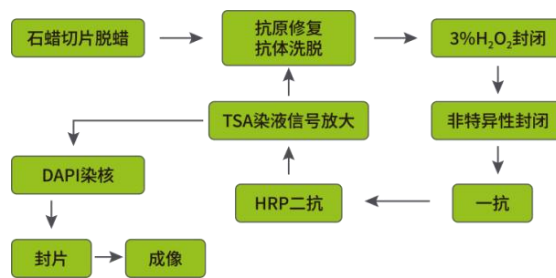
TSA 荧光染料反应液=TSA 浓缩型荧光染料+TSA buffer, 稀释比例可以根据具体情况进行调整优化, 最佳范围为 1:50-1:400, 大部分情况下 1:200 能得到最佳结果。若一抗常温孵育, 孵育时间为 1h-3h, 建议稀释比例为 1:50-1:200; 若一抗 4℃孵育过夜, 建议稀释比例为 1:200-1:400 或更高。信号过强则需要降低染料浓度/反应时间/一抗浓度, 信号过低则需要提高染料浓度/反应时间/一抗浓度。

产品原理：

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) 对靶蛋白进行原位标记的酶学检测方法。其原理是利用酪胺 (Tyramide) 的过氧化物酶反应, 酪胺荧光素底物在 HRP 和 H₂O₂ 的作用下被活化, 活化的荧光底物能与目标蛋白上的酪氨酸等残基共价结合, 导致在抗原-抗体结合位点大量沉积荧光素, 实现信号放大。通过热修复或者抗体洗脱液洗去前一轮非共价结合的抗体, 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, 因此无需担心抗体的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。此试剂盒中的荧光染料可以单独或组合使用, 能够实现单标、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。

实验步骤：



1. 样本准备:

1) 石蜡切片: 切片依次放入二甲苯 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。

2) 冰冻切片: 冰冻切片固定 10-30min, PBS 洗 5min, 重复 3 次, 滴加 0.3% Triton-X100 破膜液通透 20min, PBS 洗 5min, 重复 3 次。

3) 细胞爬片或者细胞涂片: 细胞样本固定 10-30min, PBS 洗 5min, 重复 3 次, 滴加 0.3% Triton-X100 破膜液通透 20min, PBS 洗 5min, 重复 3 次。

2. 抗原修复:

组织切片置于盛满 pH 9.0 的 EDTA 碱性抗原修复液或者 pH 6.0 的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°C 水煮 15min, 95°C 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 pH 7.4 的 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、固定方法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% 的 H₂O₂ 溶液中, 室温避光孵育 15min, 将玻片置于 pH 7.4 的 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:

切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈, 在圈内滴加用抗体稀释液 (或者其他封闭液, 如 3% 的 BSA 或者山羊血清等) 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min。注: 抗体稀释液内含有各种保护剂以及防腐剂, 可以用来封闭或者稀释一抗, 稀释后的一抗可以长期 4°C 保存 (在常温下可以保存一个月)。

5. 一抗孵育:

轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加已稀释到适当浓度的一抗工作液, 平放于避光湿盒内 4°C 孵育过夜或者 37°C 孵育 1-2h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。

6. 二抗孵育:

玻片置于 pH 7.4 的 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与一抗相应种属的 HRP 二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50min, PBS 洗 5min, 重复 3 次。注: 本试剂盒内自带的 HRP 山羊抗兔/鼠通用二抗为即用型, 具有超高灵敏度, 随时可用, 无需配置。

7. 荧光染色:

滴加稀释好的 TSA 荧光染料反应液均匀覆盖组织, 室温反应 1-15min (反应最佳时间: 5-10min), PBS 洗 5min, 重复 3 次。注: 预实验可先染 1min, 洗涤后观察染色效果, 如果阳性弱则继续滴加荧光染料反应液加强染色强度, 直至合适强度后继续进行下一步。

8. 抗体洗脱:

石蜡切片置于抗原修复液中, 95°C 水浴 25-40min (根据不同抗体亲和力灵活调整时间) 或者滴加适量 37°C 预热至完全溶解的 mIHC 专用抗体洗脱液 (细胞爬片及细胞涂片/冰冻切片/易脱片的骨组织建议使用) 覆盖样本, 37°C 放置 5-20min, 弃去洗脱液, 再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本, 37°C 放置 5-20min, 弃去洗脱液, PBS 洗 5min, 重复 3 次。注: 石蜡切片可用热修复洗脱或者抗体洗脱液洗脱, 细胞及冰冻切片需用 mIHC 专用抗体洗脱液洗脱。

9. 第二轮标记:

换用另外一种 TSA 荧光染料反应液，重复步骤 3-8。

10. 第三轮标记：

换用另外一种 TSA 荧光染料反应液，重复步骤 3-8。

11. 第四轮标记：

换用另外一种 TSA 荧光染料反应液，重复步骤 3-7。

12. DAPI 复染细胞核：

玻片置于 pH 7.4 的 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 即用型染液，避光室温孵育 5-20min。

13. 封片：

玻片置于 pH 7.4 的 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。

14. 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。

荧光染料光谱信息：

染料	激发波长(nm)	发射波长(nm)	染料	激发波长(nm)	发射波长(nm)
DAPI	350	420	TSA-620 Plus	590	620
TSA-480 Plus	450	480	TSA-650 Plus	630	650
TSA-520 Plus	490	520	TSA-690 Plus	640	690
TSA-540 Plus	515	540	TSA-700 Plus	680	700
TSA-570 Plus	550	570	TSA-780 Plus	750	780

注意事项：

1. 本试剂盒荧光染料抗淬灭性强，全程无需日光灯下避光，使用过程中也无需在黑暗环境中操作，但不能在太阳光下照射。

2. 尽量选择有 IHC/mIHC/IHC-P 应用的单克隆抗体，优先选择经过敲除验证的抗体。

3. 串色原因：

- 1) 与成像设备滤光片带宽有关，尽量选用窄波长带宽的滤光片；
- 2) 上一轮抗体未被完全洗脱，对于亲和力比较高的抗体，洗脱条件需要适当优化，如提高洗脱温度或时间等；
- 3) 信号不平衡，如相邻两个通道的染料，一个强度过高，一个过低，导致强的信号发生外溢。

4. 抗原修复方式/抗体洗脱方式选择：

建议第一轮抗原修复使用 pH 9.0 的 EDTA，95℃修复 15-25min；第二轮及以上抗体洗脱/抗原修复建议使用 pH 6.0 的柠檬酸，95℃修复 25-40min。针对一些容易掉片的组织，抗体洗脱可以采用抗体洗脱液，但需要注意把控洗脱时间及温度，洗脱时间过长或者温度过高可能会导致抗原识别降低/DAPI 核染弱。

5. 指标/抗体顺序选择

- 1) 第一轮通常做适合使用 pH 9.0 的 EDTA 修复的指标；
- 2) 难做的指标放在前面几轮做；
- 3) 难以洗脱的抗体放在最后一轮，不然容易串色。

6. 非特异性原因：

- 1) 多克隆抗体容易产生非特异，可以换用单克隆抗体或者降低浓度以及修复强度；
- 2) 信号放大过强，可以降低染液反应时间或者浓度；
- 3) 一抗浓度过高或者修复过度，建议采用较低抗体稀释比例，或降低修复强度，如温度、时间、修复液 pH 等。

7. 发表论文时引用本产品的写作建议: "IHCT001, Bioss Antibodies"。引用示例: "Co-staining of A and B was performed using a Three Color mIHC Fluorescence Kit (IHCT001, Bioss Antibodies) based on the tyramide signal amplification (TSA) technology according to the manufacture's instruction."