

多重荧光免疫组化试剂盒（三标四色）

货 号： DS0444

规 格： 100T

保 存： -20℃

保质期： 一年

产品简介:

多重荧光免疫组化（mIHC）试剂盒原理介绍：酪胺信号放大(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。

上海威奥生物开发的多重荧光免疫组化（mIHC）试剂盒具体酪胺荧光染料为一下其中一种或者多种：480，520，570，620，690，780；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。

试剂盒组分:

产品编号	产品名称	规格	储存
1	520荧光染料(绿)	5ml	-20℃
2	570荧光染料（红）	5ml	-20℃
3	690荧光染料（红）	5ml	-20℃
4	TSA+增强剂	100ul	-20℃
5	山羊抗兔IgG（HRP-Polymer）	30ml	4℃
—	说明书	1份	1份

备注：荧光染料在-20℃下，均为固体，使用之前需解冻；IgG（HRP-Polymer）二抗 4℃保存。

TSA+增强剂 使用方法：TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号放大液的放大信号5-10倍，TSA+增强剂：荧光放大液=1:500，使用TSA+增强剂不是必须的选项，可以根据具体的情况选择添加或者不选择添加。

操作步骤:

- 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、**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X, 切片平放于避光湿盒内4 ° C孵育过夜或者37度1-2h。(湿盒内加少量水防止抗体蒸发)
- 6、**孵育二抗**: 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**: 荧光染料反应 2min-15min, PBS洗三次。
- 8、重复2-7步骤 (换用另外一种荧光染料)
- 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。

注意事项:

为了您的安全, 请佩戴口罩及一次性手套。

注: 更多产品的文献请参考威奥生物官网。