ShareBio圣尔

产 品 说 明 书

五色酪酰胺信号放大试剂盒（抗兔二抗）

产品规格： 20 slides, 60 slides，200 slides
产品货号： SB-Y6116
产品内容：

产品编号	产品名称	产品规格		
		20 slides(SB-Y6116)	60 slides(SB-Y6116)	200slides(SB-Y6116)
SB-YT0070	488 Tyramide（200×）	10 μL	10 μL*3	100 μL
SB-YT0071	555 Tyramide（200×）	10 μL	10 μL*3	100 μL
SB-YT0072	594 Tyramide（200×）	10 μL	10 μL*3	100 μL
SB-YT0073	640 Tyramide（200×）	10 μL	10 μL*3	100 μL
SB-AB0101	HRP-羊抗兔IgG	100 μL	200 μL	500 μL
SB-AB0102	HRP-羊抗鼠IgG	100 μL	200 μL	500 μL
AA691-25g	BSA	25g	25 g	25 g
SB-60012	1×Tyramide Amplification Buffer	4*2mL	24mL	4*20ml
SB-D4080	DAPI 染色液（即用型）	10mL	10mL	10mL
SB-A4083	抗荧光淬灭封片剂	5 mL	5 mL	5 mL

荧光光谱数据： 488: 490/515 nm; 555: 555/565 nm;
594: 590/617 nm；640: 642/662 nm

储存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装。

产品优势：

- ✓ **无需考虑抗体种属**
- ✓ **主要用于低表达丰度靶标染色**
- ✓ **可用于IF、ICC和FISH等实验：**工作流程与标准ICC、IF和FISH相似
- ✓ **兼容性好且多色共定位检测：**与多种染料和检测系统兼容，可进行多色标记及共定位检测
- ✓ **操作简单：**仅需一个简单的孵育步骤对样本进行处理即可获得样本的多色标记信号
- ✓ **灵敏度高：**比传统的ICC、IF和FISH方法高100倍
- ✓ **减少抗体或探针用量：**提供更高的抗体稀释比例，降低了抗体的非特异性结合
- ✓ **高分辨率和低背景：**一级检测试剂更高程度的稀释能够降低非特异性标记

上海圣尔生物科技有限公司 021-34122580 www.share-bio.com 上海市闵行区剑川路951号1幢615室

产品介绍

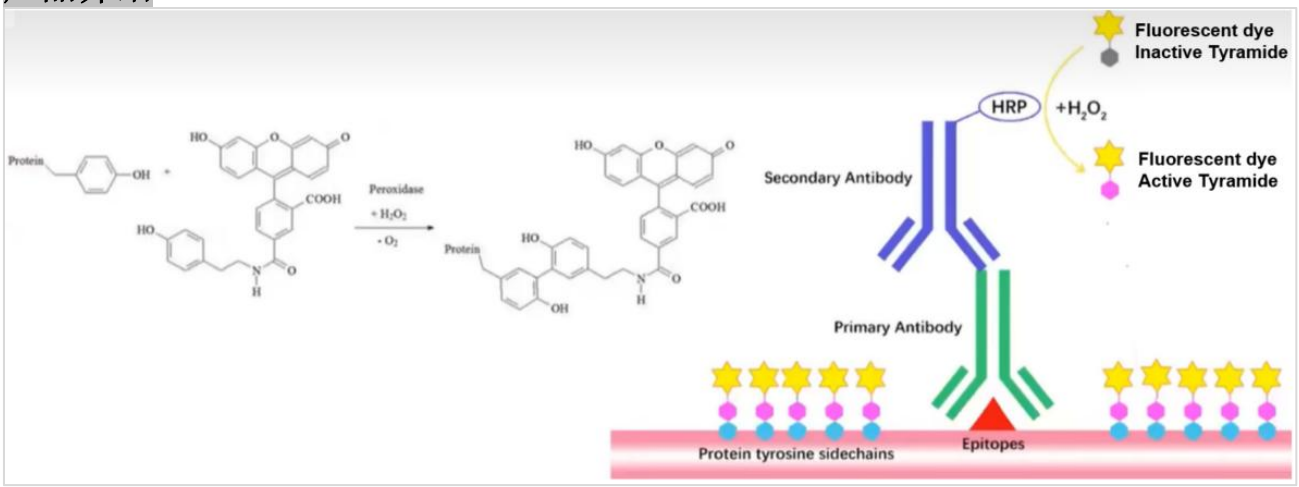

图1：酪胺信号放大（TSA）原理

酪胺信号放大（TSA）是一种基于辣根过氧化物酶（HRP）的催化活性对靶蛋白或核酸进行高密度原位标记的酶学检测方法。原理为酪胺（tyramide）的过氧化物酶反应（已标记荧光的酪胺在HRP催化H_2O_2下形成共价键结合位点）产生的大量酶促产物与目标蛋白的酪氨酸残基共价结合，从而使目标蛋白标记上特异的荧光。多重标记仅需在热修复法去除非共价结合的抗体后换另一种一抗、荧光素酪胺，如此往复即可。

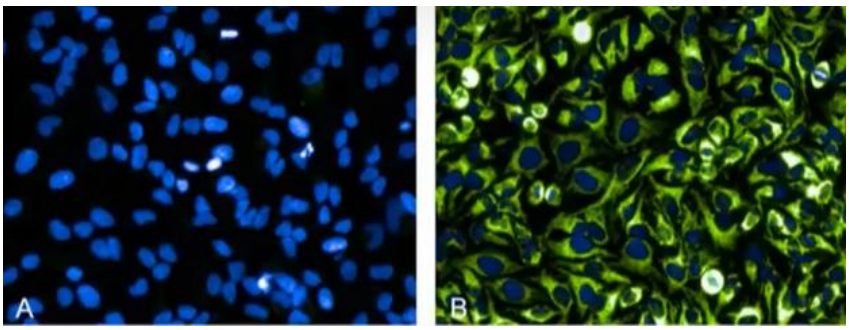

图2：Hela细胞细胞色素C经酪酰胺信号放大(TSA)染色（B）比传统组织化学染色（A）相比，信号强度成几何倍数放大。

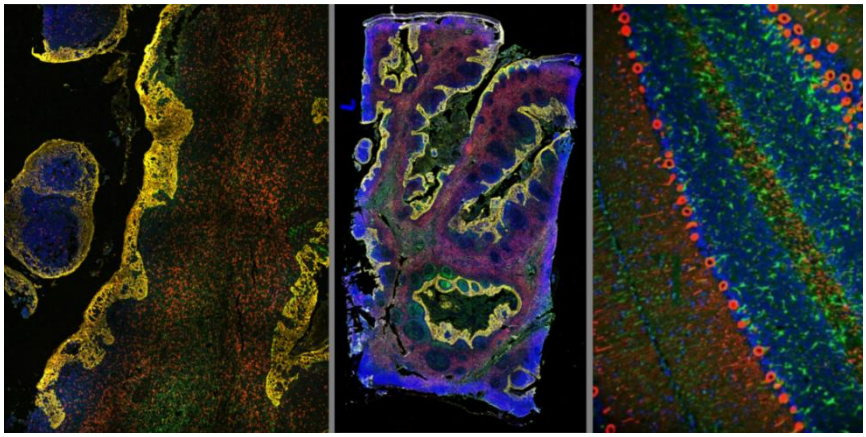

图3：经多色酪酰胺信号放大试剂，多色标记多种组织切片的实验结果

上海圣尔生物科技有限公司 021-34122580 www.share-bio.com 上海市闵行区剑川路951号1幢615室

自备试剂：

- 1×PBS
- 二甲苯
- 乙醇
- 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）或市售抗体剥离液/抗体洗脱液（mIHC专用）
- 30%过氧化氢
- 封闭缓冲液：1 g BSA 溶于 100 mL 含 0.5% Triton X-100 的PBS 中，或选择市售封闭缓冲液。

使用方法

样本准备（包括石蜡切片、冷冻切片、细胞爬片和细胞涂片）

1 石蜡切片样本

将样本脱蜡、脱水，并完成抗原修复、灭活内源性过氧化物酶。

1.1 将石蜡切片放置在60℃的烘箱中30 min。

1.2 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片2次，每次5 min，以彻底脱掉石蜡。

注：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

1.3 室温下，将切片浸没于无水乙醇中漂洗 2 次，每次 5 min 。

1.4 室温下，将样本连续浸没在不同浓度的乙醇（95% 、90%、80% 、70%）中，每种浓度漂洗 1 次，每次 5 min。

1.5 室温下，将切片浸没于纯水中 3 min，再将切片浸没于 1× PBS 中 3 min，用滤纸吸干多余液体。

1.6 用免疫组化笔描绘样品轮廓，以便下游通透与标记。

1.7 抗原修复：将 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液（PH 6.0），用微波炉加热至沸腾，将切片置于缓冲液中，间断煮沸 10 min。

注意：此过程中，组织要一直浸没于缓冲液中，以保证组织的抗原修复效果。抗原修复后，取出切片于室温中逐渐降温。

注：需根据不同的样本选择不同的抗原修复方法。

1.8 用1×PBS 清洗两次。

1.9（可选）内源性过氧化物酶灭活：加入足够量的 3%过氧化氢覆盖样品并在室温孵育 60 min，淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

2 冷冻切片样本

与石蜡切片基本相同，不需要抗原修复和脱蜡步骤。

2.1 组织冷冻切片，室温晾干15分钟；

2.2 用组化油笔将待染组织圈好，置PBS中浸泡10分钟，以去除OCT；

注意：组织冷冻切片样本反复煮沸后非常易脱片，需要预实验摸索条件，建议使用抗体洗脱液（mIHC专用），或者联系圣尔公司进行技术服务支持。

3 细胞样本

3.1 样本准备：制备细胞样本(细胞爬片、细胞涂片等)，建议直接使用腔室载玻片进行细胞培养，方便后续检测。完成制备后，用PBS简单漂洗(2×2min);

3.2 细胞固定:用4%多聚甲醛常温固定10-20min，PBS洗涤3×5min;

3.3 淬灭内源性过氧化物酶:滴加3% H_2O_2，室温下孵育10-30min，PBS洗涤3×5min;

3.4 细胞通透(胞膜指标省略此步):滴加含1-0.25% Triton X-100的PBS溶液，室温下处理10min，PBS洗涤3×5min

4 免疫标记
4.1 封闭:滴加封闭液(5%二抗同来源封闭血清或BSA)，室温孵育30min;
4.2 一抗孵育:弃封闭液，滴加稀释好的一抗工作液，于避光湿盒内4°℃孵育过夜或37°℃1-2h(湿盒中可加少量水，防止抗体孵育过程干片)，PBS漂洗3×5min;
4.3 二抗孵育:滴加与一抗相应种属的HRP二抗覆盖组织，避光室温孵育20-50min，PBS漂洗3×5min;
4.4 染料孵育:滴加现配的1×TSA染料工作液(使用信号放大液按1:200稀释)，反应1-10min，PBS漂洗3×5min;
4.5 抗体洗脱:抗体洗脱液37℃预热，甩去PBS后，滴加洗脱液浸润整个爬片，洗脱时间可控制在15-30min(洗脱难度:结构性膜蛋白和细胞骨架蛋白>胞浆蛋白>胞核蛋白)，PBS漂洗3×5min;
注意：细胞爬片和细胞涂片务必用抗体洗脱液完成此步骤。
4.6 重复进行上述步骤[4.1-4.5]，直到完成所有指标染色;

5 复染封片
5.1 滴加DAPI 染色液（即用型）到样品上，浸没样本区域，室温孵育10min，PBS漂洗3×5min;
5.2 滴加抗荧光淬灭封片剂，用盖玻片封片，避免气泡;
5.3 扫描成像，数据分析。

注意事项

1. 1×Tyramide Amplification Buffer 首次使用后，建议小量分装，-20℃保存，避免反复冻融。
2. 为了防止出现假阴性、假阳性的结果，实验过程中需设置阴性对照和阳性对照。对于组织样品，建议对未染色的对照（不添加抗体或酪酰胺）进行成像，确定组织是否有自发荧光，排除对背景的影响。
3. 建议1:200 稀释Tyramide。较高的浓度可能会导致信号过强或背景高，建议从1:100到1:1000 梯度稀释。
4. 可依次使用多个Tyramide 来标记同一样品的不同靶标，每次酪酰胺反应后需进行抗体剥离。
5. 观察拍照可以用普通荧光显微镜，但是拍照最好用激光共聚焦显微镜，后者对光谱的区分更精细。
6. 酪酰胺室温孵育不宜时间太长，防止游离的酪酰胺造成假阳性信号。
7. 荧光信号弱考虑以下因素：抗原被破坏（避免强酸强碱接触样本）；抗原抗体不能充分接触，可使用震荡孵育，使用去垢剂处理样本；试剂不够新鲜，如H_2O_2现用现配；需要使用抗荧光猝灭剂。
8. 背景高考虑以下因素：在溶液中操作，避免切片干燥；样本中过氧化物酶灭活不充分，H_2O_2失效；一抗特异性不好；选择合适的封闭液，可以用二抗的宿主血清来封闭；避免抗体交叉污染。

上海圣尔生物科技有限公司 021-34122580 www.share-bio.com 上海市闵行区剑川路951号1幢615室