

## 三标四色多重荧光染色试剂盒产品说明书

<b>产品名称</b>	<b>三标四色多重荧光染色试剂盒</b>
<b>产品型号</b>	<b>即用型</b>
<b>产品货号</b>	<b>AFIHC024</b>
<b>产品规格</b>	<b>100T</b>
<b>预期用途</b>	<b>在石蜡组织切片进行免疫荧光染色，为医师提供诊断的辅助信息。</b>
<b>检测原理</b>	<p>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 技术同样采用多聚 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。</p> <p>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 <math>H_2O_2</math> 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。搭配同一支抗兔的多聚 HRP 二抗就可以进行实验，而且信号放大的倍数大大增强。本公司开发的试剂盒具体酪胺荧光染料为以下其中一种或者多种：TYR-480, TYR-520, TYR-570, TYR-620, TYR-690, TYR-780。此试剂盒中的荧光染料可单独或配合使用。</p>



**主要组分**

名称	规格	保存条件
TYR-520 荧光染料	5ml (即用型)	-20℃
TYR-570 荧光染料	5ml (即用型)	-20℃
TYR-690 荧光染料	5ml (即用型)	-20℃
TSA+增强剂	10μl*3	-20℃
Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗	15mL	2-8℃
Dapi 染液 (即用型)	10mL	2-8℃
抗体稀释液	30mL	2-8℃
过氧化物酶封闭液	30mL	2-8℃

**TSA+增强剂  
使用方法**

1、在 TSA 荧光染料反应液反应步骤直接滴加 50 μl 即用型 TYR-XXX 荧光染料进行孵育 3-10min;  
2、TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号, 放大 5-10 倍, TSA+增强剂不是必须的选项, 可以根据具体的荧光显色强度选择是否添加。使用比例【TSA+增强剂:TRY-XXX 荧光染料=1: 500】。

**储存条件**

各组分按各自条件保存, 期限一年; TYR-520 荧光染料、TYR-570 荧光染料、TYR-690 荧光染料、TSA+增强剂-20℃长期保存, 期限一年; 使用时 2-8℃保存, 期限一个月

**运输条件**

在泡沫箱中放入冰袋, 箱体密封后, 可在常温下运输且时间不超过一周。

**有效期**

12 个月

**样本要求**

石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞爬片

**检测方法**

**1、样本准备:**

1) 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。

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 X-100 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 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℃水煮 15min ; 100℃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, 冰冻切片和细胞样本需要使用抗体洗脱液来进行抗体洗脱)。



- 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、**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（防止抗体流走），在圈内滴加用**封闭用正常山羊血清**（或者其他封闭液 3%BSA 溶液）均匀覆盖组织，室温封闭 30min。**额外说明**：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四度保存（在常温下也可以保存一个月之久）
- 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℃ 孵育过夜或者 37℃ 孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
- 6、**孵育多聚 HRP 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多聚 HRP 二抗覆盖组织，避光室温孵育 50min，PBS 洗三次。**额外说明**：本公司可提供**多聚 HRP 山羊抗鼠/兔通用二抗为即用型 (AFIHC001)**，具有超高灵敏度，随时可用，无需配置。
- 7、**TSA 荧光染料反应液反应**：直接滴加 50  $\mu$ l 即用型 TYR-XXX 荧光染料，**TSA 荧光染料反应液**均匀覆盖组织室温反应 3-15min（最佳时间 5min-10min），PBS 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进行下一步）。
- 8、**抗体洗脱**：石蜡切片置于抗原修复液中 100℃ 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℃ 预热至完全溶解的 **mIHC 专用抗体洗脱液**（冰冻切片/爬片/骨组织建议用）覆盖样本，37℃ 放置 5-20 分钟，弃去洗脱液，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本 37℃ 放置 5-20 分钟，弃洗脱液，PBS 洗三次，每次 5 分钟（石蜡切片可用热修复洗脱或者抗体洗脱液洗脱，细胞及冰切切片需用抗体洗脱液进行洗脱）
- 9、**重复 3-8 步骤**（换用另外一种 TYR-XXX 荧光染料）---第二轮标记
- 10、**重复 3-7 步骤**（换用另外一种 TYR-XXX 荧光染料）---第三轮标记
- 11、**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 即用型染液**，避光室温孵育 5min-20min。
- 12、**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（我司有相应产品）。
- 13、**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	激发波长	发射波长
DAPI	350	420
TYR-480	450	480
TYR-520	490	520
TYR-570	550	570
TYR-620	590	620
TYR-690	630	690
TYR-780	750	780

### 结果判读

在阴阳性对照和空白对照显色正常的前提下：

阳性：组织切片中预期细胞阳性部位显对应颜色的荧光，无背景染色。

阴性：组织切片中预期细胞阳性部位无荧光染色。

### 检测方法局限性

- 实验操作任一环节的不规范操作都可能影响最终的实验结果。
- 专业的操作人员、经过认证的实验室将有助于实现检测过程的标准化，从而减少由于各种外界因素造成的染色偏差。
- 在测试中如出现阴性结果，表示未检测出抗原，而不是经测定的细胞或者组织中不存在该抗原。

### 产品性能指标

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

### 注意事项

- 本试剂仅用于科学研究，不作其他用途。
- 开始实验前，应仔细阅读此说明书。
- 本试剂仅限有专业经验或经专业培训的人员使用。
- 避免试剂接触眼睛和粘膜，如接触到敏感区域，立即用大量清水冲洗。

## 基本信息

注册企业	湖南艾方生物科技有限公司
注册地址	长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
生产地址	长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
电 话	073185584686
网 址	www.afantibody.cn
说明书版本	编制日期：2022.2.1

