四色多重荧光染色试剂盒（三标四色）

原理介绍: 酪酰胺信号放大(TSA，Tyramide signal amplification)技术是一类利用辣根过氧化酶（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 H202 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。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。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。

试剂盒组成：TYR-520 荧光染料(绿光)(即用型，5mL),-20℃；TYR-570 荧光染料（红光）(即用型，5mL)，-20℃； TYR-690 荧光染料(即用型，5mL)，-20℃；TSA+增强剂，100ul， -20℃（可选）；

高敏多聚 hrp 山羊抗兔/鼠通用二抗（5mL） **4℃。**

备注：TYR-520 荧光染料 、TYR-570 荧光染料 、TYR-690 荧光染料 在-20 度下 ，均为固体，使用之前需解冻。

备注：TYR-520 荧光染料 、TYR-570 荧光染料 在-20 度下 ，均为固体，使用之前需解冻。

TSA+增强剂 使用方法：TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号强度 5-10 倍，TSA+增强剂：TYR 荧光染料=1:500，使用 TSA+增强剂不是必须的选项，可以根据具体的情况（荧光信号弱的靶标/表达丰度低的靶标）选择添加或者选择不添加（信号过强的靶标/表达丰度高的靶标），同时尽可能控制整个 TYR 荧光染料反应时间。

TSA+增强剂注意事项：TSA+增强剂在 4 度或者-20 度是固体状态，使用之前需要解冻；将增强剂按比例加入到 TYR-XXX 荧光染料中，反应信号进一步提高 5-10 倍，适用于信号比较弱的情况，TSA+增强剂不一定要加入到荧光反应体系中，是可选择的，根据具体情况而定，具体使用方法：TSA+增强剂：TYR 荧光反应液=1:500 （也可以用 1：1000）

操作流程：

1、**石蜡切片脱蜡至水**：依次将切片放入二甲苯Ⅰ15min-二甲苯Ⅱ15min-无水乙醇Ⅰ5min-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、**加一抗**：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、**加 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 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**：**TYRXXX 荧光染料**反应 10-15min，PBS 洗三次。

8、**重复 2-7 步骤（换用另外一种 TYRXXX 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。

染料	激发波长	发射波长
DAPI 蓝色	350	420
TYR-480	450	480
TYR-520 绿色	490	520
TYR-570 红色	550	570
TYR-620	590	620
TYR-690	630	690
TYR-780	750	780

文章引用试剂盒/方法：Co-staining of A, B and C was performed using a Four-color Fluorescence kit (Recordbio Biological Technology, Shanghai, China) based on the tyramide signal amplification (TSA) technology according to the manufacture's instruction.