三色多重荧光染色试剂盒 Plus（双标三色）

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。之后用热修复法或者抗体洗脱液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-480Plus，TYR-520Plus，TYR-570Plus，TYR-620Plus，TYR-690Plus，TYR-780Plus。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。

试剂盒规格：100T

试剂盒货号：RC0086Plus-23RM

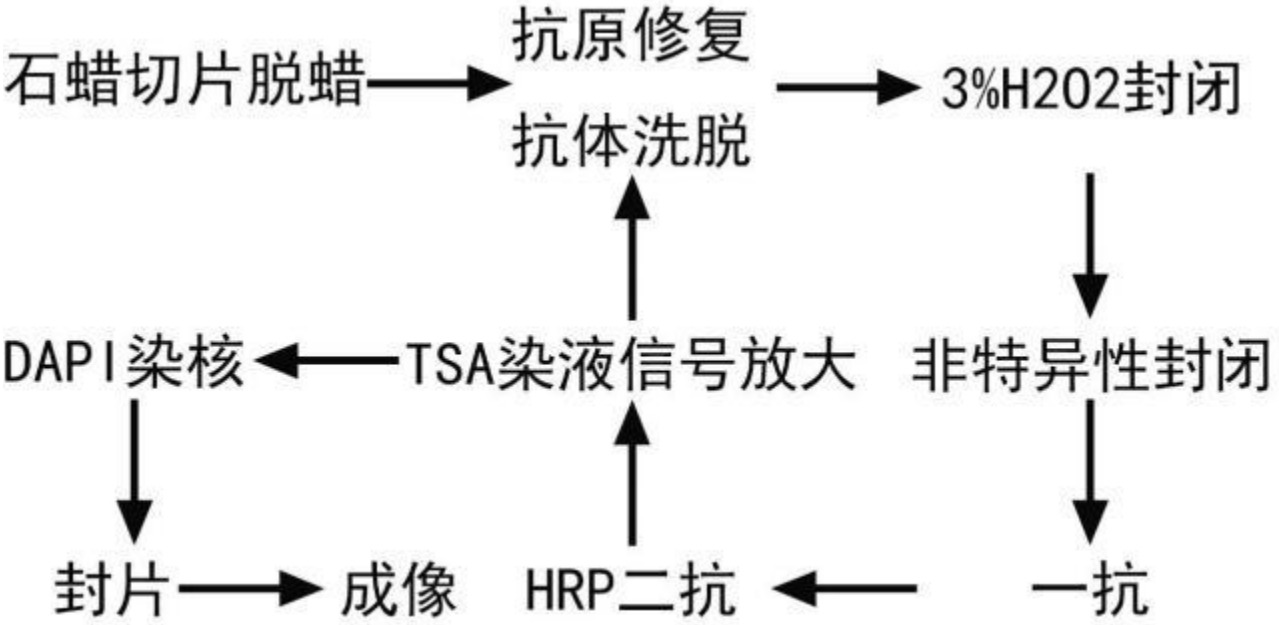
储存温度：4 度，一年有效

试剂盒组成：

名称	货号	规格	保存条件
TYR-520Plus 荧光染料	RC001	浓缩型，50ul，200x	4℃
TYR-570Plus 荧光染料	RC002	浓缩型，50ul，200x	4℃
TSA buffer	RCB0086	12mL	4℃
HRP 山羊抗兔/鼠通用二抗	RCB054	10mL	4℃
Dapi 染液（即用型）	RC05	10mL	4℃
抗体稀释液	RCT002	20mL	4℃
3%过氧化氢	RC012	20mL	4℃

染料使用方法：TSA 荧光染料反应液 =TYR-xxxPlus 荧光染料+TSA buffer；TYR-xxxPlus 荧光染料：TSA buffer=1：200；TYR-xxxPlus 荧光染料与 **TSA buffer** 的稀释比例可以根据具体情况灵活调整优化，最佳范围为 1:50--1:400(1:200 大部分情况能得到最佳结果）；一般建议若一抗孵育时间常温 1h-3h 内，建议稀释比例 1:50-1:200, 若一抗孵育时间 4 度过夜（12h 或以上），建议稀释比例 1:200-1:400 或更高。

操作流程简图：



详细操作步骤

1、样本准备：

1）石蜡切片：依次将切片放入二甲苯Ⅰ15min-二甲苯Ⅱ15min-无水乙醇Ⅰ5min-无水乙醇Ⅱ5min-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 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，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%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**抗体稀释液**（或者其他封闭液 3%BSA 或者山羊血清）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、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。**额外说明：**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、TSA 荧光染料反应液反应：浓缩型荧光染料与 TSA buffer 按照 1:50-1:200 的比例混合均匀，切片滴加配好的 **TSA 荧光染料反应液**均匀覆盖组织室温反应 1-15min（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 度水浴 25-40min（根据不同抗体亲和力 灵活调整时间）或者滴加适量 37 度预热至完全溶解的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 度放置 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 度放置 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 3-7 步骤（换用另外一种 TYR-XXXPLus 荧光染料）---第二轮标记

10、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。

11、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）。

12、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-480Plus	450	480
TYR-520Plus 绿色	490	520
TYR-570Plus 红色	550	570
TYR-620Plus	590	620
TYR-690Plus	630	690
TYR-780Plus	750	780

FAQ（经常问到的一些问题）：

1. 问：为什么会串色？

答：串色与多种因素有关系：A 可能与成像设备滤光片带宽有关系，尽量选用窄波长带宽的滤光片；B 可能与上一轮抗体未被完全洗脱关系，对于一些亲和力比较高的抗体比如 CK 等，抗体洗脱条件需要延长（提高洗脱温度 时间等）；C 可能与信号不平衡有关系，比如相邻两个通道染料，一个强度过高，一个过低，导致强的信号发生外溢；D 其他可能存在的原因，比如抗体弄混，下一轮抗体忘记洗脱/修复等。

2. 问：TYR-xxxPlus 荧光染料与 TSA buffer 稀释比例怎样优化？

答：本试剂盒灵敏度比较高，是常规 TSA 试剂盒的 10-50 倍，注意信号不要过强；信号过强 则降低染料浓度/反应时间/一抗浓度，信号过低 提高染料浓度/反应时间/一抗浓度；本试剂盒的特点，浓度越高，将成指数倍增强信号；1:50 能获得最强信号，1:500 相当于常规 TSA 信号。

3. 问：抗原修复方式/抗体洗脱方式怎么选择？

答：建议第一轮抗原修复 9.0 EDTA,95 度 15-25min；第二轮或以上抗体洗脱/抗原修复，建议柠檬酸 6.0 95 度 25min-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（我司有卖：mIHC 专用抗体洗脱液），抗体洗脱液时间过长可能会导致抗原识别降低/dapi 核弱染，注意把控抗体洗脱液时间（一般室温或者 37 度 5-15min，1-2 次能到到比较理想的结果）。

4. 问：染料是否需要避光？

答：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暗环境中操作，但不能在太阳光下照射。

5. 问：做多标时，指标/抗体顺序如何选择？

答：难以洗脱的抗体，摆在最后一轮，不然容易串色，比较难做的指标放在前面几轮做（比如 foxp3），第一轮通常做适合 EDTA 9.0 修复的指标；根据我司经验，第一轮通常采用 EDTA 9.0/高压 6.0 第二轮及其以上通常采用 6.0，多抗建议 6.0 。

6. 问：为什么有时候有非特异性或者非特异是怎么产生的以及怎样改善？

答：非特异的产生有几种可能，A：抗体是多克隆的，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来改善；B:信号放大过强，可以降低染液反应时间或者浓度；C：一抗浓度过高或者修复过度，采用比较低的稀释抗体比例，或降低修复强度（温度或者时间或者修复液 PH）。

7. 问：做石蜡切片 mIHC,抗体应该怎样选择？

答：尽量选用单克隆抗体，抗体应用选用 IHC /mIHC/ IHC-P,优先选用经过敲除验证的抗体等。

8. 问：本试剂盒对于其他进口/国产试剂盒优势在哪里？

答：A：超高的性价比，其他品牌试剂盒动辄过万，我司试剂盒价格在 2k-1w 之间；B 稳定性好：即使试剂盒不小心被放在常温，也能在一个月的放置后，可以继续使用 以及检测信号灵敏度无差异，茹创生物开发的此款试剂盒，采用了最新配方，有各种保护剂 防腐剂 H2O2 稳定剂等成分，极大提高了试剂盒稳定性；C 超高灵敏度：最高灵敏度可以达到市场其他公司的 10-50 倍。

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

近年用茹创试剂盒发表的文章：

1.Zhang Hao,Wang Yifan,Zhao Yihan et al. PTX3 mediates the infiltration, migration, and inflammation-resolving-polarization of macrophages in glioblastoma.[J] .CNS Neurosci Ther, 2022, 28: 1748-1766.

2.Qin Zhen,Wang Peng-Yuan,Wan Jing-Jing et al. MicroRNA124-IL6R Mediates the Effect of Nicotine in Inflammatory Bowel Disease by Shifting Th1/Th2 Balance Toward Th1.[J] .Front Immunol, 2020, 11: 235.

3.Su Ruopeng,Chen Lei,Jiang Zhou et al. Comprehensive analysis of androgen receptor status in prostate cancer with neuroendocrine differentiation.[J] .Front Oncol, 2022, 12: 955166.

4.Lin Ka-Na,Zhang Kan,Zhao Wei et al. Insulin-like Growth Factor 1 Promotes Cell Proliferation by Downregulation of G-Protein-Coupled Receptor 17 Expression via PI3K/Akt/FoxO1 Signaling in SK-N-SH Cells.[J] .Int J Mol Sci, 2022, 23: undefined.