

Super Tyramide – 488、555、594、647、700 Multiplex IHC Kit

(Mouse source)

产品信息:

Super Tyramide-488 Multiplex IHC Kit (Mouse source)	M-488
Super Tyramide -555 Multiplex IHC Kit (Mouse source)	M-555
Super Tyramide -594 Multiplex IHC Kit (Mouse source)	M-594
Super Tyramide -647 Multiplex IHC Kit (Mouse source)	M-647
Super Tyramide -700 Multiplex IHC Kit (Mouse source)	M-700

	Component (100 Slides and 200 Slides)	Storage	Amount1	Amount2
A:	Super Tyramide -488(555、594、647、700) conjugate	-20°C	100 µL	200 µL
B:	TSA Reaction Buffer	2-8°C	10mL	20mL
C:	Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (HRP Conjugate)	-20°C	100 µL	200 µL
D:	Stabilized 3% Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	2-8°C	10mL	10mL

	Ex (nm)	Em (nm)
Super Tyramide -488	491	516
Super Tyramide -555	557	570
Super Tyramide -594	588	604
Super Tyramide -700	690	713
Super Tyramide -647	656	670

原理：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-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。Tyramide 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，共价结合的荧光素复合体稳定共价结合在样本蛋白上。再换一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同源抗体。搭配同一支 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一下其中一种或者多种：Super Tyramide -488，Super Tyramide -555，Super Tyramide -594，Super Tyramide -647，Super Tyramide -700。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。

自备试剂:

1× PBS

Paraformaldehyde fixative(4% Paraformaldehyde in PBS)

0.5% Triton X-100 in PBS

0.1 M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0)

3% H₂O₂ : TSA H₂O₂ 制备母液 (将 90 µL 的 ddH₂O 加入 10 µL 3% H₂O₂ 中。注：在使用当天准备新鲜的 100X H₂O₂ 溶液，做到现用现配。)

封闭缓冲液：可将 1 g BSA 溶于 100 mL 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中配置成封闭缓冲液

DAPI 染色液

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

样本准备

石蜡组织切片

将石蜡切片放置在60°C的烘箱中45-60 min。

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。

室温下将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗2次每次5 min。

室温下将切片样本连续浸没在不同浓度梯度的乙醇（95%、90%、80%、70%）中，每种浓度各漂洗1次，每次1 min。

室温下将切片浸没于纯水中漂洗2次，每次3 min，再将切片浸没于1×PBS中漂洗1次，每次3 min，用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。

用免疫组化笔在切片样本周围描绘样品轮廓，以便下游通透与标记。

抗原修复：将0.1M 柠檬酸盐缓冲液（PH=6.0）用微波炉加热至沸腾，将脱蜡及复水好的片子置于缓冲液中，间断煮沸10 min。注意此过程中玻片上组织要一直浸没于缓冲液中，以保证组织的抗原修复效果。抗原修复持续时间过后，取出放于室温中让其慢慢地降温。注：需根据不同的样本选择不同的抗原修复方法。

1×PBS 清洗两次。

内源性过氧化物酶灭活：通过加入足够量的3%Hydrogen Peroxide 覆盖样品并在室温下孵育20 min淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

免疫标记

封闭：用封闭缓冲液室温封闭30min。

用封闭缓冲液将一抗稀释至适当的浓度。将样品与一抗在室温下孵育1-2h 或4°C过夜。

室温下1×PBS 洗涤3次，每次5 min。

在封闭缓冲液中将HRP-conjugated secondary antibody 以1:100 稀释。用该溶液在室温下孵育1 h。

室温下1×PBS 洗涤3次，每次5 min。

以后所有步骤均需避光

TSA Reaction Buffer:每1 mL 反应缓冲液需要10ul Super Tyramide -488 conjugate (100X) 和10ul H₂O₂ 母液(100X) 来制备染色液。每个样品准备100 μL 染色液。染色液在室温下避光保存。现配现用

将样品与TSA 工作液在室温下孵育10 min 后，1×PBS 洗涤3次，每次5 min。

单色染色完成，多染由sop >抗原修复<开始，循环下来

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。

全部染色后，盖上盖玻片并密封，显微镜成像。

注意事项：

1 与常规荧光二抗相比，Tyramide 试剂盒显示出更高的灵敏度和更强的信号。因此，实验时一抗的使用浓度较低，这样可以降低非特异性结合带来的背景荧光。

2 如果需要考虑背景荧光，建议设置未与一抗孵育的阴性对照确保该阴性对照在孵育和洗涤过程中没有被阳性样品中的试剂交叉污染。对于组织样品，我们还建议对未染色的对照（不添加抗体或酪酰胺）进行成像，以确定组织自发荧光对背景的影响。