

Cy3 TSA Fluorescence System Kit 酪酰胺信号放大试剂盒

产品简介

酪酰胺信号放大 (TSA) 系统可用于检测荧光免疫细胞化学 (ICC)、免疫组织化学 (IHC) 和原位杂交 (ISH) 技术中的低丰度靶点, 可将信号灵敏度提高 100 倍。TSA 荧光试剂盒使用辣根过氧化物酶 (HRP) 直接催化固定化酶周围的荧光基团共价沉积, 该标记过程迅速 (小于 10min), 沉积标记可直接在标准或共聚焦显微镜下观察。TSA 试剂盒可与传统染色方法结合使用用于多色成像, 也可以顺序进行两个或更多个酪酰胺反应以标记一个样品上的不同靶标。

TSA 技术可用于酶缀合物和合适的生色底物的明场显微镜检查, 也可以与抗荧光素酶结合物组合使用。与普通实验相比, 使用 TSA 试剂可显著提高信号灵敏度, 同时保持稳定的特异性和分辨率。此外, TSA 试剂盒可以显著减少一抗或探针的消耗量。

Yeasen 酪酰胺信号放大 (TSA) 系列产品包括三款试剂盒: 试剂盒 60405ES 荧光标记信号为 fluorescein, 在激发和发射波长 494 nm/517 nm 下显微检测信号; 试剂盒 60406ES 荧光标记信号为 Cyanine 3, 在激发和发射波长 550 nm/570 nm 下显微检测信号; 试剂盒 60407ES 荧光标记信号为 Cyanine 5, 在激发和发射波长 648 nm/667 nm 下显微检测信号。

本试剂盒可使用 100~300 sides。

产品信息

货号	60406ES03
规格	1 kit

组分信息

组分编号	组分名称	产品编号/规格	储存条件
		60406ES03 (100~300 sides)	
60406-A	1X Amplification Diluent	30 mL	2~8°C, 避光
60406-B	Cyanine 3 Tyramide	dry, dissolve in 60 μ L DMSO	-25~-15°C, 避光
60406-C	Blocking Reagent	6 g	2~8°C, 避光

储存条件

1X Amplification Diluent 和 Blocking Reagent, 2~8°C, 避光保存, 有效期 6 个月。

Cyanine 3 Tyramide, 粉末状态, -25~-15°C 保存, 有效期 6 个月。溶于 DMSO 后, 2~8°C, 避光保存。

使用说明 (仅供参考)

一. 自备试剂

- (1) 1× PBS (Cat#41403ES) / 1× D-PBS (Cat#60152ES)
- (2) DMSO (Cat#60313ES)
- (3) 多聚甲醛固定液 (Cat#60536ES)
- (4) Triton X-100 (Cat#20107ES)
- (5) 改进型柠檬酸钠抗原修复液(50X) (Cat#36319ES)
- (6) 30% H₂O₂

(7) 一抗和 HRP 偶联的二抗

(8) 下列试剂仅用于 Biotin-Tyramide 系列实验:

- a. 生物素封闭清洗缓冲液: 含 1% BSA 和 0.05% Tween 20 (Cat# 60305ES) 的 PBS
- b. 未标记的链霉亲和素溶液: 含 0.1 mg/mL 链霉亲和素的生物素封闭清洗缓冲液
- c. 生物素溶液: 含 0.5 mg/mL 生物素的生物素封闭清洗缓冲液。

以下参考步骤, 可用于细胞或组织切片的酪酰胺染色, 每个样品使用 100 μ L-300 μ L 酪酰胺染色液 (足以覆盖 96 孔板的一个孔或约 1 cm^2 的组织部分), 可以根据不同的样本尺寸增加或减少酪酰胺染色液的量。

二. 溶液配制

1. 酪酰胺荧光储存液: 组分 B 溶解于 60 μ L DMSO, 配制成储存液, 储存液置于 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存。
2. 酪酰胺荧光工作液: 每次实验前, 需要用组分 A 按照 1:50-1:500 的比例稀释酪酰胺荧光储存液, 配置成含有 0.3% 的 H_2O_2 的酪酰胺荧光工作液 (不同的实验目的, 稀释比例需要调整以达到最优的结果)。每个载玻片大约需要 100-300 μ L 的酪酰胺荧光工作液。

【注】保证配置酪酰胺荧光工作液用到的 H_2O_2 新鲜有效。每次实验操作结束以后, 请丢弃未用完的酪酰胺荧光工作液。

3. 封闭缓冲液: 可取组分 C 按照每 1g 溶于 100 mL 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中的比例, 配置成封闭缓冲液。组分 C 的用量根据实际情况进行取用, 按照上述比例进行配置即可。

三、样本处理

1. 细胞样本

- (1) 可选: 准备一份阴性对照样本 (不孵育一抗的样本)。
- (2) 1 \times PBS 清洗细胞两次。
- (3) 细胞固定: 加入适量 4% 多聚甲醛固定液 (pH 7.4), 4 $^{\circ}$ C 放置 15 min。
- (4) 1 \times PBS 清洗细胞两次。
- (5) 通透细胞: 用配制于 PBS 中的 0.5% Triton X-100 溶液通透, 室温放置 10 min。或者加入冰上预冷的 70% 乙醇, 在 -20 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。细胞能在 70% 乙醇中 -20 $^{\circ}$ C 的条件下保存一周。
- (6) 1 \times PBS 清洗细胞两次。

2. 石蜡组织切片

- (1) 将石蜡切片放置在 60 $^{\circ}$ C 的烘箱中 30 min。
- (2) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次, 每次 5 min, 以彻底脱蜡。
【注】二甲苯有毒, 易挥发, 请在通风橱中操作。
- (3) 室温下, 将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次, 每次 5 min。
- (4) 室温下, 将切片样本按照顺序依次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 5 min。
- (5) 室温下, 将切片浸没于纯水中漂洗 1 次, 每次 3 min, 再将切片浸没于 1 \times 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。
- (6) 用铅笔在切片样本周围描绘样品轮廓, 以便后续进行通透与标记。
- (7) 抗原修复: 将改进型柠檬酸钠抗原修复液 (50X) 用微波炉加热至沸腾, 将脱完蜡及复水好的片子置于缓冲液中, 间断煮沸 10 min。抗原修复后取出于室温中缓慢降温。

【注】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。不同的样本选择不同的抗原修复方法。

- (8) 1 \times PBS 清洗两次。

3. 内源性过氧化物酶灭活 (可选)

加入 3%过氧化氢覆盖样品并在室温下孵育 60 min, 淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

4. 内源性生物素阻断 (可选)

进行 Biotin-tyramide/Streptavidin 检测时, 建议阻断样品中的内源性生物素以减少背景。对于 Fluorescein/Cyanine 3/Cyanine 5-Tyramide 的试剂盒来说, 可省略此步骤。

(1) 在室温下, 将样品与未标记的链霉亲和素溶液一起孵育 15 min。之后使用生物素封闭清洗缓冲液将样品在室温下洗涤 3 次, 每次 5 min。

(2) 在室温下将样品与生物素溶液孵育 30 min, 以封闭链霉亲和素上多余的生物素结合位点。之后用生物素封闭清洗缓冲液洗涤样品 3 次, 每次 5 min。

5. 免疫标记

(1) 封闭: 用封闭缓冲液室温封闭 1 h。

(2) 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 h 或 4°C 过夜。

(3) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min

(4) 在封闭缓冲液中将 HRP 偶连的二抗稀释。用该溶液在室温下孵育上述样品 1 h。

(5) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。

(6) 每个样品准备 100 μL-300 μL 酪酰胺荧光工作液。染色液在室温下避光保存, 最长可保存 24 h。

(7) 将样品与染色液在室温下孵育 10 min。

(8) 在室温下用 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。

(9) 可选: 如果使用 Biotin-tyramide 进行标记, 可使用荧光标记的 Streptavidin 进行荧光显色

(10) 显微镜成像。对于载玻片上的组织样本, 请盖上盖玻片并密封后, 再显微镜成像。

注意事项

1. 不同的荧光试剂盒请按照对应建议波长进行操作。

2. 与荧光二抗相比, TSA 试剂盒显示出更高的灵敏度和信号。因此, 实验时一抗的使用浓度较低, 可以降低非特异性结合带来的背景荧光, 我们建议设置一抗浓度梯度以找到最佳浓度。

3. 如需考虑背景荧光, 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。

4. 较高的浓度可能会导致信号过强或背景高, 可以从 1:50 到 1:500 摸索以找到最佳浓度。

5. 可以在每个酪酰胺反应后通过进行 HRP 淬灭或抗体剥离, 依次使用多个酪酰胺扩增试剂盒来标记同一样品上的不同靶标。

6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

7. 本产品仅用于科研用途, 禁止用于人身上。