

生物素-酪胺信号放大试剂盒

原理介绍:一抗与组织上的抗原特异性结合后，加入多聚辣根过氧化物酶蛋白 (HRP) 二抗，HRP 将生物素标记 Tyramide 活化，后者与相邻的蛋白上的酪氨酸残基生成稳定的共价结合，目的蛋白上会富集大量带有生物素标记的酪胺，使信号放大，生物素与 HRP 酶标记的亲素发生特异性反应，使信号进一步放大，是检测免疫细胞化学 (ICC)、免疫组织化学 (IHC) 和原位杂交 (ISH) 中低丰度目标的最灵敏方法。

试剂盒规格: 100T

试剂盒货号: RC0086Plus-B01R

有效期: 一年有效

试剂盒组成:

名称	货号	规格	保存条件
多聚 HRP-山羊抗兔二抗	RCA054	即用型, 5mL	4℃
TYR-Biotin	RCB01A	浓缩型, 200X 50ul	4℃
信号放大稀释液	RCB01B	6mL	4℃
HRP-链霉亲和素	RCB01C	浓缩型, 100X 50ul	4℃
3%过氧化氢	RC012	10mL	4℃

注: TYR-Biotin用信号放大稀释液按1: 200比例稀释 (若一抗孵育时间常温 1h-3h内, 建议稀释比例 1:100-1:200, 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), 浓缩型HRP-链霉亲和素用PBS或者抗体稀释液1: 100稀释。

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 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0.1-0.5% 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0.1-0.5% 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、**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2h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- 6、**加多聚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30min, PBS洗三次, 每次5min。
- 7、**加生物素-酪胺**: 切片稍甩干后在圈内滴加50-100ul生物素-酪胺工作液 (TYR-Biotin 用信号放大稀释液按1: 200比例稀释) 室温孵育10min, PBS洗三次, 每次5min。
- 8、**加HRP-链霉亲和素**: 切片稍甩干后在圈内滴加50-100ul HRP-链霉亲和素工作液 (浓缩型HRP-链霉亲和素用PBS或者抗体稀释液100倍稀释) 室温孵育10min, PBS洗三次, 每次5min。
- 9、**DAB显色**: 切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的DAB显色液, 显微镜下控制显色时间, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色。
- 10、**复染细胞核**: Harris苏木素复染3min左右, 自来水洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 返蓝, 镜检。
- 11、**脱水封片**: 将切片依次放入75%酒精6min-85%酒精6min --无水乙醇 I 6min -无水乙醇 II 6min -二甲苯 I 5min 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树胶封片
- 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。