

## YF®/YO/Biotin Tyramide (YF®/YO/Biotin 酪胺)

### 产品货号

货号	产品名称	Ex/Em (nm)	规格
YT0069S	YF®350 Tyramide	347/448	10 µL
YT0069L	(YF®350 酪胺), 200×		100 µL
YT0094S	YO 425 Tyramide	429/475	10 µL
YT0094L	(YO 425 酪胺), 200×		100 µL
YT0070S	YF®488 Tyramide	490/513	10 µL
YT0070L	(YF®488 酪胺), 200×		100 µL
YT0076S	YF®532 Tyramide	523/545	10 µL
YT0076L	(YF®532 酪胺), 200×		100 µL
YT0071S	YF®555 Tyramide	550/561	10 µL
YT0071L	(YF®555 酪胺), 200×		100 µL
YT0072S	YF®594 Tyramide	585/609	10 µL
YT0072L	(YF®594 酪胺), 200×		100 µL
YT0077S	YF®620 Tyramide	617/639	10 µL
YT0077L	(YF®620 酪胺), 200×		100 µL
YT0086S	YF®633 Tyramide	630/650	10 µL
YT0086L	(YF®633 酪胺), 200×		100 µL
YT0073S	YF®640 Tyramide	641/658	10 µL
YT0073L	(YF®640 酪胺), 200×		100 µL
YT0074S	YF®680 Tyramide	679/700	10 µL
YT0074L	(YF®680 酪胺), 200×		100 µL
BT0075S	Biotin Tyramide	/	10 µL
BT0075L	(Biotin 酪胺), 200×		100 µL

### 产品规格

10 µL, 100 µL

### 储存条件

YF®640 Tyramide 放置 4°C 保存, 其它类别酪胺 -20°C 避光保存, 有效期见外包装。

### 产品介绍

酪胺信号放大技术 (Tyramide Signal Amplification) 又称催化信号放大技术 (Catalyzed Signal Amplification), 是一类利用 HRP 对靶抗原进行高密度原位标记的酶学检测方法, 其不但可以用于 IF/IHC 的信号放大, 亦可用于 Elisa、ISH 等检测。

酪胺信号放大技术可以用于检测用传统方法无法检出的低丰度靶标。基于酪胺的信号放大技术能够提供极强的灵敏度、检测极微量的目的抗原。酪胺信号放大技术极大的降低抗体的用量, 节约抗体。酪胺信号放大试剂盒可与传统染色方法结合使用以多色成像, 也可以顺序进行两个或更多个酪胺反应以标记一个样品上的不同靶标。

### 使用方法

#### 实验材料 (自备)

- (1) 1×PBS
- (2) 多聚甲醛 (4%多聚甲醛 in PBS)
- (3) 促渗试剂(0.5% Triton X - 100 in PBS)
- (4) 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)

- (5) 一抗, 二抗
- (6) 1×Tyramide Amplification Buffer (含过氧化氢)
- (7) 30%过氧化氢
- (8) 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, 也可选择市面上在售封闭缓冲液。

#### 下列组分仅用于 Biotin-Tyramide 试剂盒中

- (1) 生物素封闭清洗缓冲液: 含 1% BSA 和 0.05% Tween 20 的 PBS。
- (2) 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。
- (3) 生物素溶液: 含 0.5 mg/mL 生物素的生物素封闭清洗缓冲液。
- (4) 以下参考步骤, 可用于细胞或组织切片的酪胺染色, 每个样品使用 100 µL 染色液 (足以覆盖 96 孔板的一个孔或约 1 cm<sup>2</sup> 的组织部分)。可根据不同的样本尺寸增大或缩小体积。

#### 实验步骤

##### 1. 样本准备

- (1) 细胞样品
  - 可选: 准备一份阴性对照样本 (不孵育一抗的样本)。
  - 1×PBS 清洗细胞两次。
  - 细胞固定: 加入适量 4%多聚甲醛 (pH7.4) 溶液, 4°C 放置 15 min。
  - 1× PBS 清洗细胞两次。
  - 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。
  - 1×PBS 清洗细胞两次。

##### (2) 石蜡组织切片

- 将石蜡切片放置在 60°C 的烘箱中 30 min。
- 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次, 每次 5 min, 以彻底脱蜡石蜡。  
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 5 min。
- 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× 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 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液 (PH = 6.0), 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。

注: ①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。

②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。
- (可选) 内源性过氧化物酶灭活  
如果需要, 可加入足够量的 3% Hydrogen Peroxide 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。
- (可选) 内源性生物素阻断  
进行链霉亲和素/生物素检测时, 我们建议阻断样品中的内源性生物素以减少背景。对于标记 YF®和 YO 染料的酪胺和 HRP 二抗的试剂盒来说, 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, 然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。

## 6. 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。

注：如果使用含有 HRP - Streptavidin 的试剂盒，请使用生物素偶联的一抗。

- (3) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (4) 在封闭缓冲液中将 HRP - conjugated 以 1 : 200 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) 用 1×Tyramide Amplification Buffer 以 1:200 稀释 Tyramide Stock Solution, 200× 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，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-酪酰胺试剂盒，可使用荧光标记的链霉亲和素进行荧光显色，也可使用含 HRP 的链霉亲和素标记，后使用 DAB 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. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 与荧光二抗相比，TSA 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，我们建议梯度设置一抗浓度以找到最佳浓度。
3. 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。
4. 建议使用 5 μg/mL 的 HRP 结合物，降低浓度可能会影响信号强度和灵敏度。
5. 建议 1:200 稀释 YF®/YO/Biotin - Tyramide。较高的浓度可能会导致信号过强或背景高，可以从 1:100 到 1:1000 摸索以找到最佳浓度。
6. 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。
7. 若做多色标记时，依据抗原密度不同选择不同荧光素（低密度抗原选择强染料；高密度抗原选择较弱染料）。标记顺序对最终标记效果有一定影响，需自行摸索。