

슈퍼시그널 증폭 기술에 의한 파라핀 매몰조직의 면역조직화학염색

윤용갑¹ · 이장천² · 장선일*

서정대학교 피부미용과, 1: 원광대학교 한의과대학 방제학교실, 2: 상지대학교 한의과대학 방제학교실

Immunohistochemistry of Paraffin-embedded Tissues by Super-signal Induction Method

Young Gab Yun¹, Jang Cheon Lee², Seon Il Jang*

Department of Skin & Beauty, Seojeong College, Yangju 482-777, Republic of Korea

1: Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University, Iksan, Republic of Korea

2: Department of Oriental Medical Prescription, Sangi University, Wonju, Republic of Korea

The classical ABC (avidin-biotin peroxidase complex) method for immunohistochemistry in the paraffin-embedded tissues bring into being disadvantage such as low sensitivity of antigen detection and highly background. The biotinyl-tyramide conjugation recently introduced for sensitive immunohistochemistry was applied to light microscopy in paraffin-embedded pancreatic and liver tissues. The protocol consists of an indirect method in which 4-5 μ m tissue sections are reacted successively within a specific primary antibody, followed by a biotinylated secondary antibody, streptavidin-horseradich peroxidase (HRP), and then finally with biotinyl-tyramide. The labeling obtained for insulin and collagen antigen tested in pancreatic and liver tissues, respectively, was found to be highly specific with the labeling for each antigen confined to its particular cellular compartment. In this study, fish (flounder) serum was specially applied to remove nonspecific binding. Background levels and nospecific deposition of the staining were negligible. This results suggest that super-signal induction method by biotinyl-tyramide conjugate can readily applied to antigen detection of the paraffin-embedded tissues.

Key words : Biotinyl-tyramide, super-signal, paraffin embedded tissues, insulin, collagen

서 론

면역조직화학염색법(immunohistochemistry)은 발현조직의 부위 즉 형태(morphology)를 밝힐 수 있는 방법으로 western blotting 방법이 발현 여부만을 알 수 있는 기술검사라면, 면역조직화학염색은 조직의 어떤 부위에서 단백질이 발현되는가를 정확히 육안으로 관찰하는 일종의 분석검사라고 할 수 있다. 면역조직화학염색은 지금까지 형태학적인 소견만으로는 진단을 내리기 어려운 점을 보완해 주고 있으며, 형태학적 변화가 미세하거나 경계성 병변(borderline lesion)인 경우에 정확한 진단을 내릴 수 있도록 객관적인 정보를 제공해주고 있다는 장점이 있다. 그

러므로 보다 정확한 정보를 얻기 위하여 새로운 면역조직화학염색법이 개발되고 있다¹⁻¹⁰⁾.

Avidin-biotin peroxidase complex (ABC)법은 현재까지 일반적으로 사용되는 면역조직화학염색방법으로 주로 신선한 동결 조직을 대상으로 한다. 그러나 paraffin 매몰 조직의 경우, 영구적으로 보관할 수 있다는 장점이 있지만, 항원성이 떨어지기 때문에 이 조직을 대상으로 분자(molecule)의 정보를 얻고자할 때 ABC법은 적용되는 범위가 한정되어 있다. 즉, 항원에 대한 분석 민감성이 약하고, 비특이적 반응이 높기 때문에 정확한 항원에 대한 정보를 얻는데 문제점이 제기되고 있다. 또한 labeled streptavidin-biotin (LAB)법은 기존 ABC법 보다 민감성이 높고, 빠르며, 비특이적 반응이 최소화되는 효과를 얻을 수 있다는 장점이 있어 현재 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 LAB법 역시 낮은 항원성을 가진 paraffin 매몰 조직에 적용하기에는 문제점

* 교신저자 : 장선일, 경기도 양주시 은현면 용암리 681-1, 서정대학 피부미용과

· E-mail : sonjiang@seojeong.ac.kr, · Tel : 031-860-5085

· 접수 : 2004/04/22 · 수정 : 2004/05/28 · 채택 : 2004/06/30

이 제기 되고 있다^{1-3,10-14}.

이러한 낮은 항체-항원 복합체의 분자정보를 보다 정확히 알아내기 위해서 biotinyl-tyramide coupling 방법이 소개되었다. 이 방법은 Blobrow 등¹⁻³에 의해서 처음 알려진 이래 광학현미경을 이용한 새로운 면역조직화학염색법으로 알려졌다. 그러나 이 방법 역시 매우 높은 시그널 증폭으로 인해 비특이적 배경염색이 높다는 문제점이 제기되고 있다.

따라서 본 연구는 biotinyl-tyramide coupling 방법을 새롭게 고안하여, 낮은 항원성을 가진 paraffin 매몰 조직 또는 간조직을 대상으로 insulin 또는 collagen을 비특이적 반응 없이 뚜렷한 정보를 얻을 수 있는 방법에 대해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Rabbit anti-mouse IgG, horseradish peroxidase(HRP), sodium metaperiodate, ethylene glycol, sodium borohydrate, sodium carbonate buffer, biotin, tyramine-HCl, Sephacryl-200, cellulose membrane sac(CMS), 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC), 등은 Sigma-Aldrich사(USA)로부터 구입했다. ABC와 LAB immunohistochemistry kit은 Dako (USA), 10X phosphate buffered saline(PBS), carbonate-bicarbonate buffered saline은 Gibco BRL사(USA)로부터 구입했다. N-hydroxysuccinimide esters of biotin [sulfosuccinimidyl-6-(biotinimide) hexanoate](BIO-NHS), triethylamine, dimethylformamide, streptavidin-horseradish peroxidase는 Pierce사(USA)로부터 구입했다.

2. Biotinyl-tyramide 합성

활성 결합체의 제조는 BIO-NHS 1 μ g을 dimethylformamide (DMF) 100 μ l에 용해하고, tyramine-HCl 용액은 tyramine-HCl 10 mg을 DMF 1 ml에 용해하여 제조한 후 BIO-NHS 용액 100 μ l에 289 μ l의 tyramine-HCl 용액을 갈색 반응병(Pierce, USA)에 주입하고 2시간 동안 자석교반기를 이용해 반응시켰다. 합성된 tyramine 결합 용액에 ethanol로 용해된 triethylamine (1 mg/ml) 872 μ l을 첨가하여 pH를 9.5로 적정하여 반응을 중지시킨 후 chromatography법으로 Biotinyl-tyramide 합성 결합체를 분리하였다.

3. Blocking buffer의 제조

비특이적 결합을 최소화하고 지금까지 알려지지 않은 blocking buffer를 제조하기 위해서, 국내산 어류인 넙치(flounder)의 심장으로부터 채혈하여 혈청을 분리하였다. 3 % skim milk 용액에 넙치 혈청의 농도가 5 %되게 하여 면역조직화학염색에 있어서 blocking buffer로 사용했다.

4. 간섬유화 유도 및 간조직 제조

CCl₄와 동량의 corn oil을 충분히 교반한 후 루이스 랫트(250 g) 복강에 1주에 1회씩(2 ml/마리) 4주간 주입한 후 총 8주간 사

육하면서 간섬유화를 유도하였다. 간섬유화가 유도된 랫트는 에테르로 충분히 마취한 후 미정맥에 헤파린을 주입한 후 조심스럽게 복강을 절개하고 헤파린이 함유된 500 ml의 PBS를 심장에 통과시켜 간조직의 혈액을 제거하였다. 혈액이 제거된 간조직을 적출하여 4 % paraformaldehyde (pH 7.4)을 주입하고 18시간 이상 고정된 다음 일련의 paraffin 조직 매몰 과정을 통하여 체장 조직표본을 제작하였다.

5. 체장 조직

18시간 이상 절식시킨 정상 루이스 랫트(200 g)를 에테르로 충분히 마취하여 희생시킨 다음 복부를 절개하여 체장조직을 핀셋으로 조심스럽게 드러낸 다음 4 % paraformaldehyde을 주입하고 18시간 이상 고정된 다음 일련의 파라핀 조직 매몰 과정을 통하여 체장 조직표본을 제작하였다.

6. 조직표본의 슬라이드 제작

파라핀 매몰 간 또는 체장조직을 microtome (Histotronic hm330, USA)을 이용해 4-5 μ m로 절편하여 슬라이드에 부착시킨 다음 xylene을 이용해 paraffin을 제거한 후 일련의 과정을 거쳐 면역조직화학염색용 슬라이드를 제작하였다.

7. 면역조직화학염색

조직 표본은 3 % H₂O₂ 용액으로 5분간 내재성 peroxidase를 제거한 다음 본 연구에서 제작된 어류혈청(5 %)과 skim milk(3 %)혼합액 (blocking buffer)으로 15분간 blocking한 다음 간조직에는 anti-collagen (1:200) 1차 항체를 주입하고, 체장조직에는 anti-insulin (1:500) 1차 항체를 가하여 실온에서 60분간 반응시킨 후 PBS로 충분히 세척하였다. 그 후 비특이성 반응을 완전히 제거하기 위해서 blocking buffer를 가하여 다시 15분간 blocking하였다. PBS로 충분히 세척한 다음 biotinyl-Rabbit anti-mouse IgG 2차 항체를 주입하고 실온에서 30분간 반응한 후 PBS로 충분히 세척한 다음 streptavidin-HRP를 가하고 15분간 반응시켰다. 다시 PBS로 충분히 세척한 후 biotinyl-tyramide을 주입하고 15분간 방치한 후 다시 streptavidin-HRP를 첨가하여 15분간 방치하였다. 이와 같이 제작된 표본은 HRP의 chromogen-substrate인 AEC를 첨가하여 발색하고 밀봉하여 Olymus 광학현미경(Japan)으로 검경하였다.

결 과

1. 파라핀 매몰 조직에서 ABC법과 LAB법의 시그널 비교

파라핀 매몰 조직에서 ABC법과 LAB법의 항원-항체 복합체 시그널의 강도를 비교하기 위해서 본 연구는 간조직과 체장조직을 대상으로 각각 collagen과 insulin 항체를 1차항체로 부착하여 Dako사가 제시하는 방법에 따라 면역조직화학염색을 수행하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 ABC법 보다 LAB법에 의한 간조직의 collagen과 체장조직의 insulin에 대한 시그널 강했다. 본 연구에서는 일반적으로 나타나는 기존회사의 blocking 방법을 개선하

고자 3 % skim milk 용액에 5 %의 넘치 혈청을 첨가하여 높은 비특이성 반응을 제거했다. 그러나 좀더 확실한 항원에 대한 정보를 얻기 위해서는 LAB법에 의한 시그널 보다 더욱 증폭된 방법이 요구되어 다음과 같은 실험이 필요했다.

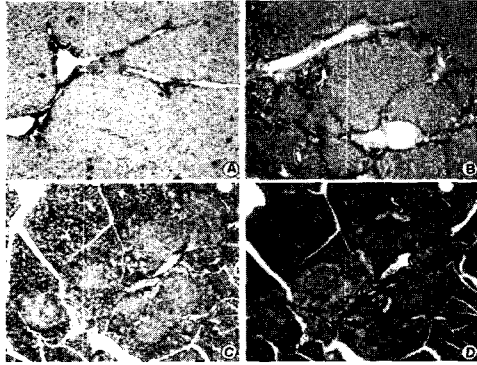


Fig. 1. The Microscopic finding on liver-collagen (A and B) and pancreatic-insulin (C and D) in paraffin-embedded tissues by ABC (A and C) or LAB (B and D) method. Immunohistochemistry was determined as described in material and methods. A and B: $\times 40$; C and D: $\times 200$.

2. 파라핀 매물 간조직에서 LAB법과 biotinyl-tyramide의 시그널 비교

항원성이 낮은 파라핀 매물조직에서 LAB법 보다 증폭된 항원-항체 복합체의 시그널을 얻기 위해서 biotinyl-tyramide의 방법을 도입하여 간조직에서 collagen에 대한 항체를 대상으로 기존 회사에서 제공하는 blocking buffer를 사용하여 비교조사하였다. 그 결과 200배 현미경시야에서 LAB법(Fig. 2B)보다 biotinyl-tyramide법(Fig. 2A)에 의한 염색법이 항원-항체 복합체의 시그널이 매우 강했다. 그러나 기존의 회사에서 제시하는 blocking 방법을 이용한 결과 비특이적 반응이 매우 강해 정확하고 뚜렷한 정보를 얻는데는 문제점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 biotinyl-tyramide의 강한 시그널을 유지하고 비특이적 반응을 제거하기 위해서 3 % skim milk 용액에 5%의 넘치 혈청을 이용해 LAB법과 biotinyl-tyramide법에 의한 항원-항체 복합체의 비특이적 반응 정도를 분석했다. 그 결과 biotinyl-tyramide법에 의한 높은 시그널이 유지되고 비특이적 반응이 매우 효과적으로 제거되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 넘치의 혈청을 이용하여 비특이적 반응을 제거한 다면 기존의 면역조직화학염색법보다 우수한 새로운 면역조직화학염색법이 되리라 사료된다.

3. 파라핀 매물 췌장조직에서 LAB법과 biotinyl-tyramide의 시그널 비교

항원성이 낮은 파라핀 매물조직에서 LAB법 보다 증폭된 항원-항체 복합체의 시그널을 얻기 위해서 biotinyl-tyramide의 방법을 도입하여 췌장조직에서 insulin에 대한 항체를 대상으로 본 연구에서 개발된 어류혈청을 이용한 새로운 blocking buffer의 효능을 비교 조사하였다. 그 결과 40배와 200배 현미경시야에서 LAB법(Fig. 3C와 D)보다 biotinyl-tyramide법(Fig. 3A와 B)에 의한 염색법이 항원-항체 복합체의 시그널이 매우 강했다. 또한 효

과적으로 비특이성 반응을 제거했다. 따라서 biotinyl-tyramide의 강한 시그널을 유지하고 비특이적 반응을 제거하는데 있어서, 어류의 혈청이 매우 유용하였다.

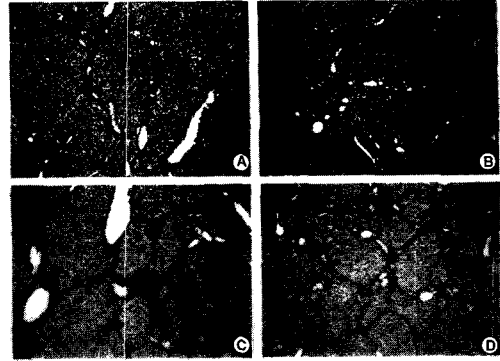


Fig. 2. The Microscopic finding on liver-collagen in paraffin-embedded tissues by biotinyl-tyramide (A and C) or LAB (B and D) method. Immunohistochemistry was determined as described in material and methods. $\times 40$.

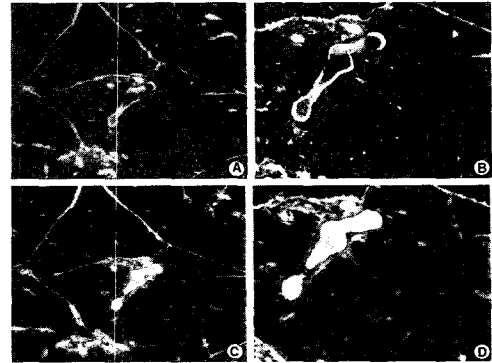


Fig. 3. The Microscopic finding on pancreatic-insulin in paraffin-embedded tissues by biotinyl-tyramide (A and B) or LAB (C and D) method. Immunohistochemistry was determined as described in material and methods. A and B: $\times 40$; C and D: $\times 200$.

고 찰

Biotinyl-tyramide는 biotin과 tyramine을 상호 연결하여 얻어지는 새로운 화합물로 최근에 항원-항체 복합체의 시그널을 증폭하기 위해서 많은 연구가 이루어지고 있다¹⁵⁻²¹⁾. 특히 광학현미경뿐만 아니라 전자현미경에도 활용되고 있는 면역조직화학염색법으로 알려지고 있다. 이 기술은 biotin이 부착된 항원-항체 복합체 표면에 HRP-stratavidin을 결합하고, stratavidin 한분자에 biotin 4분자가 자연스럽게 결합하는 원리를 이용하여 biotinyl-tyramide를 결합하고, 다시 HRP-stratavidin 복합체를 결합시켜 HRP의 발색강도를 최대로 증폭시키는 원리에 바탕을 두고 있다^{1-8, 13-15)}. 이러한 항원-항체 결합체의 정보를 증폭시키기 위한 응용 기술로는 fluorescent-tyramide법과 in situ hybridization법이 개발되었다¹⁶⁻²¹⁾. 그러나 이 방법을 적용할 경우 시그널은 증폭되지만 비특이성 반응도 동시에 높아지기 때문에 이를 제어하는 기술개발이 요구되고 있다. 특히 paraffin 매물 조직의 경우 항원성이 떨어지기 때문에 이 조직을 대상으로 분자(molecule)의 정보를 얻고자 할 때 ABC법 또는 LAB법에 의한 염색으로는 한계성이 있다.

본 연구는 항원성이 낮은 파라핀 매물 조직을 대상으로 biotinyl-tyramide의 시그널 증폭을 그대로 유지하고 비특이적 반응을 최소화하기 위한 연구를 수행했다. 그 결과 항원성이 비교적 높은 간조직의 collagen을 정확히 염색할 수 있었다. 특히 본 연구에서 적용한 어류의 혈청으로 비특이적 반응을 제어한 결과 매우 정확한 조직내 collagen 정보를 얻을 수 있었다(Fig. 2C). 또한 횡장조직에서 insulin에 대한 정보도 간조직에서와 같이 매우 뚜렷한 정보를 얻을 수 있었다(Fig. 3A와 B).

한편 solid phase 상태의 면역분석법에 비특이적 반응을 억제하는 blocking buffer는 일반적으로 non-ionic detergent, non-fat dry milk, bovine serum albumin(BSA), mammalian serum, fish gelatin 등이 사용되고 있다. 그러나 non-fat dry milk는 값이 싸고 low covalent가 있다는 장점이 있으나 그 질(quality)이 변화가 많아 효과적으로 비특이성 반응을 억제시키지 못하는 단점이 있고, BSA는 protein A와 경쟁적으로 반응하고 비특이적 반응을 억제하는 효과가 있는 반면, fatty-acid가 완전히 제거되지 않아 그 질이 일정하지 않다는 단점이 있다. 또한 포유동물의 혈청도 비특이적 반응을 억제시키는 효과가 좋으나, protein A와 반응할 뿐만 아니라 IgG antibody가 존재하기 때문에 비특이적 반응을 효과적으로 제어하지 못하는 것으로 알려졌고, 어류의 gellatin은 protein A와 경쟁적으로 반응하기 때문에 비특이적 반응을 제거하는 효과가 있으나 상태가 고르지 않다는 단점이 있다²²⁾. 따라서 상기의 단점을 극복할 수 있는 blocker를 개발해야 biotinyl-tyramide에 의한 증폭된 시그널을 면역조직화학염색법에 적용할 수 있을 것이다.

본 연구는 항원성이 낮은 파라핀 매물 조직을 대상으로 biotinyl-tyramide의 시그널 증폭을 그대로 유지하고 비특이적 반응을 최소화하기 위해서 어류의 혈청을 이용했다. 어류의 혈청은 면역글로불린 IgM이 존재하지만 포유동물의 면역글로불린과는 전혀 상호결합반응이 일어나지 않는다. 또한 protein A와 상호경쟁적으로 반응하기 때문에 비특이적 반응을 최소화 할 수 있었다²²⁾. 납치는 우리나라에서 양식되는 대표적인 어류로 어류 혈청을 구입하는데 문제가 없을 뿐만 아니라 값이 싸기 때문에 면역분석방법에 이용하는데 어려움이 없다. 따라서 본 연구에서 개발된 biotinyl-tyramide의 시그널 증폭 방법과 비특이적 반응을 제어하는데 어류의 혈청을 이용한 다면 항원성이 낮은 조직에서 정확하고 뚜렷한 분자 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

파라핀 매물 조직을 ABC(avidin-biotin peroxidase complex)으로 면역조직화학염색을 할 경우 항원에 대한 민감성이 낮고 비특이적 반응이 높아 문제가 제기되고 있다. 본 연구는 최근에 알려진 biotinyl-tyramide법을 파라핀 매물 간조직과 횡장조직을 대상으로 면역조직화학염색에 적용하였다. 4-5 μ m 조직을 대상으로 1차 항체를 결합한 후에 biotin이 부착된 2차 항체를 결합시킨 다음 streptavidin-horseradich peroxidase (HRP)를 결합시켰다. 그 후 biotinyl-tyramide를 부착시킨 다음 다시 streptavidin-HRP

를 결합시켜 발색 시그널을 증폭시켰다. 간조직과 횡장조직을 대상으로 각각 collagen과 insulin을 염색한 결과 발색반응이 매우 정확하고 뚜렷하였다. 본 연구는 비특이적 반응을 제거하기 위해서 특별히 어류(납치)의 혈청을 적용한 결과 비특이적 반응을 최소화할 수 있는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 biotinyl-tyramide에 의한 슈퍼시그널 유도법이 항원성이 낮은 파라핀 매물조직에서 정확한 생물분자 정보를 얻는데 많이 활용될 수 있다는 것을 제시해주었다.

참고문헌

1. Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., Litt, G.J., Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods* 125, 279-285. 1989.
2. Bobrow, M.N., Litt, G.J., Shaughnessy, K.J., Mayer, P.C., Conlon, J. The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J. Immunol. Methods* 150, 145-149. 1992.
3. Bobrow, M.N., Shaughnessy, K.J., Litt, G.J. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification, II. Application to membrane immunoassays. *J. Immunol. Methods* 137, 103-112. 1991.
4. Adams, J.C. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1457-1463. 1992.
5. Bendayan, M. Concentration of amylase along its secretory pathway in the pancreatic acinar cell as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Histochem. J.* 16, 85-108. 1984.
6. Bendayan, M. Ultrastructural localization of insulin and C-peptide antigenic sites in rat pancreatic B-cell applying the quantitative high resolution protein A-gold approach. *Am. J. Anat.* 185, 205-216. 1989.
7. Bendayan, M., Shore, G.C. Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 139-147. 1982.
8. Berghom, K.A., Bonnett, J.H., Hoffman, G.E. cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1635-1642. 1994.
9. Merz, H., Malisius, R., Mannweiler, S., Zhou, R., Hartmann, W., Orscheschek, K., Moubayed, P., Feller, A.C. Immunomax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab. Invest.* 73, 149-156. 1995.
10. Sanno, N., Teramoto, A., Sugiyama, M., Itoh, Y., Osamura, R.H. Application of catalyzed signal amplification in immunodetection of gonadotropin subunits in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 106, 16-21. 1996.

11. Shindler, K.S., Roth, K.A. Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 1331-1335. 1996.
12. Plenat, F., Picard, E., Antunes, L., Vignaud, J.M., Marie, B., Chalabreysse, P., Muhale, F. L amplification des réactions immunologiques per dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann. Pathol.* 17, 17-23. 1997.
13. De Haas, R.R., Verwoerd, N.P., van Der Corput, M.P., van Gijlswijk, R.P.M., Siitari, H., Tanke, H.J. The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 1091-1099. 1996.
14. Hunyady, B., Krempels, K., Harta, G., Mezey, E. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 1353-1362. 1996.
15. Gross, A.J., Sizer, I.W. The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxydase. *J. Biol. Chem.* 234, 1611-1614. 1959.
16. Kerstens, H.M.J., Poddighe, P.J., Hanselaar, A.G.J.M. A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 347-352. 1995.
17. Macechko, P.T., Krueger, L., Hirsch, B., Erlandsen, S.L. Comparison of immunologic amplification vs enzymatic deposition of fluorochrome-conjugated tyramide as detection systems for FISH. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 359-363. 1997.
18. Van heusden, J., de Jong, P., Ramaekers, F., Bruwiere, H., Borgers, M., Smets, G. Fluorescein-labeled tyramide strongly enhances the detection of low bromodeoxyuridine incorporation levels. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 315-319. 1997.
19. Velez Granell, C.S., Arias, A.E., Torres Ruiz, J.A., Bendayan, M. Molecular chaperones in pancreatic tissue: presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J. Cell Sci.* 107, 539-549. 1994.
20. Zehbe, I., Hacker, G.W., Su, H., Hauser Kronberger, C., Hainfeld, J.F., Tubbs, R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-nanogold, and silver acetate autometallography. *Am. J. Pathol.* 150, 1553-1561. 1997.
21. Evans, M.F., Aliesky, H.A., Cooper, K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin. Pathol.* 3, 1-17. 2003.
22. Sawyer, E.S., Sawyer, P.J. Fish serum as a blocking reagent. United States Patent No. 5602041. 1997.