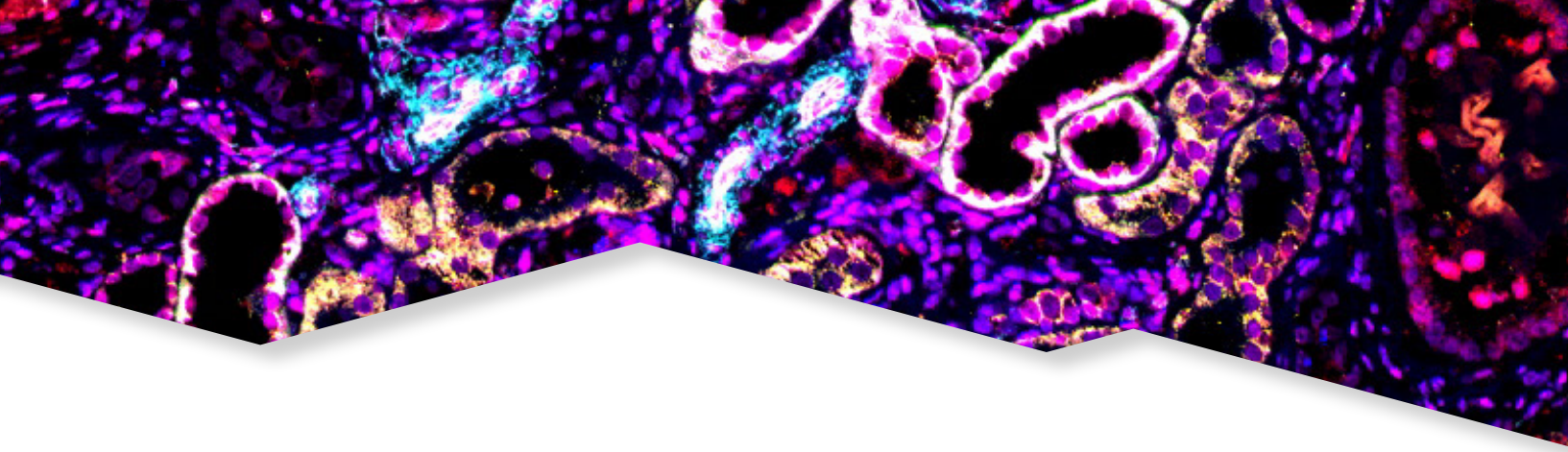
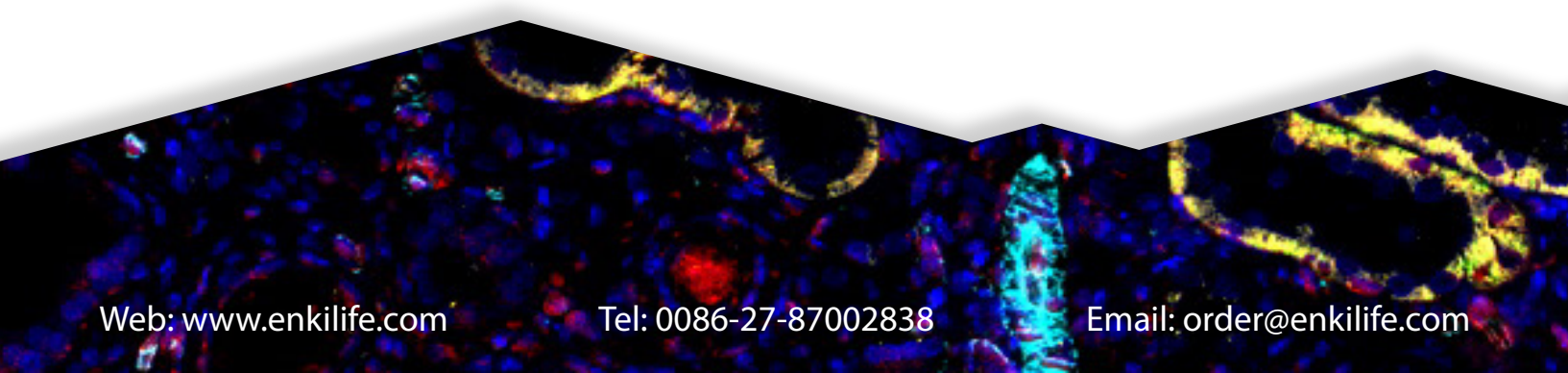


EnkiLife
Life is now and future

酪酰胺信号放大 (TSA) 技术手册



Web: www.enkilife.com Tel: 0086-27-87002838 Email: order@enkilife.com

目录

01 技术背景

02 技术简介

03 检测原理

04 操作流程

05 典型应用场景

06 常用分析软件

07 与传统方法对比

08 实验常见FAQ

09 参考文献

一. 技术背景

传统病理学一直是疾病诊断的基石，依靠对组织切片进行定性或半定量的视觉检查来检测病理变化。单重免疫组化（IHC）虽然能有效检测特定生物标志物，但常受限于单一标志物，这限制了其捕捉组织环境复杂性的能力。为了突破明场染色的局限，荧光多重染色应运而生。不再使用有色染料，而是给抗体偶联荧光基团。不同靶点的荧光基团波长不同，在荧光显微镜下，这些基团会各自发光，哪怕同时标记好几个靶点，也能清晰区分它们的位置，尤其适合观察多个靶点的空间关系。但荧光染色也有短板。如，信号强度不足，难以捕捉低丰度靶点；荧光易串色干扰判读；荧光基团易淬灭，信号稳定性差，不利于长期成像与数据保存。

酪酰胺信号放大(TSA，Tyramide signal amplification)技术的问世，为荧光多重染色提供了高效的信号放大解决方案，有效突破了传统技术面临的诸多局限。从根源上突破传统染色瓶颈，带来更灵敏、更清晰、更稳定的多重荧光检测体验。

二. 技术简介

酪酰胺信号放大（TSA，Tyramide Signal Amplification）技术是一类基于酶促催化反应的高灵敏度原位检测技术，其核心机制是利用辣根过氧化物酶（HRP）的高效催化活性，对样本中的靶蛋白或核酸分子进行特异性、高密度标记。作为突破传统检测技术灵敏度瓶颈的关键手段，TSA技术通过独特的信号放大效应，在荧光免疫细胞化学（ICC）、免疫组化（IHC）和原位杂交（FISH）等多个核心应用场景中，能显著增强靶标相关荧光信号的强度。

相较于传统检测方法，该技术的核心优势突出：

一是信号放大能力强劲，可有效捕捉到低丰度靶标——包括样本中微量表达的功能蛋白、稀有细胞表面标志物、低拷贝核酸片段等传统手段难以检出的目标分子；

二是多重标记能力出色，聚合反应具有严格区域特异性，避免信号交叉干扰，兼容多种荧光染料，可同步标记多个靶点，实现多靶点全景式解析；

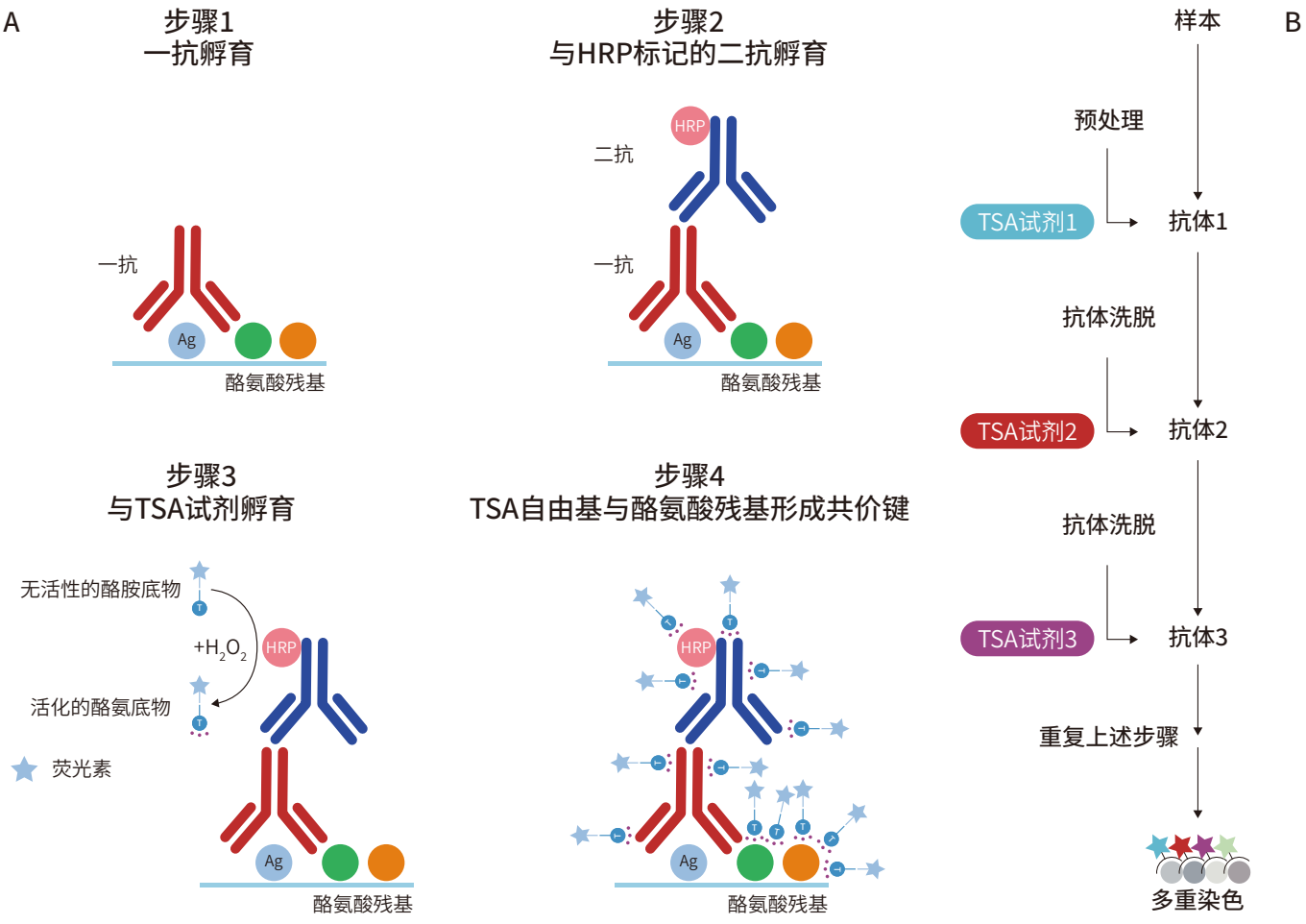
三是操作温和，以Enkilife试剂盒为例，温和洗脱剂无需高温处理步骤，可实现多轮循环染色，保护样本完整性，提升结果稳定性，最大化利用珍贵样本；

四是适配性广泛，可兼容石蜡切片、冷冻组织、细胞样本、类器官等多种样本类型，与常用检测设备适配，打破种属限制，降低应用门槛。

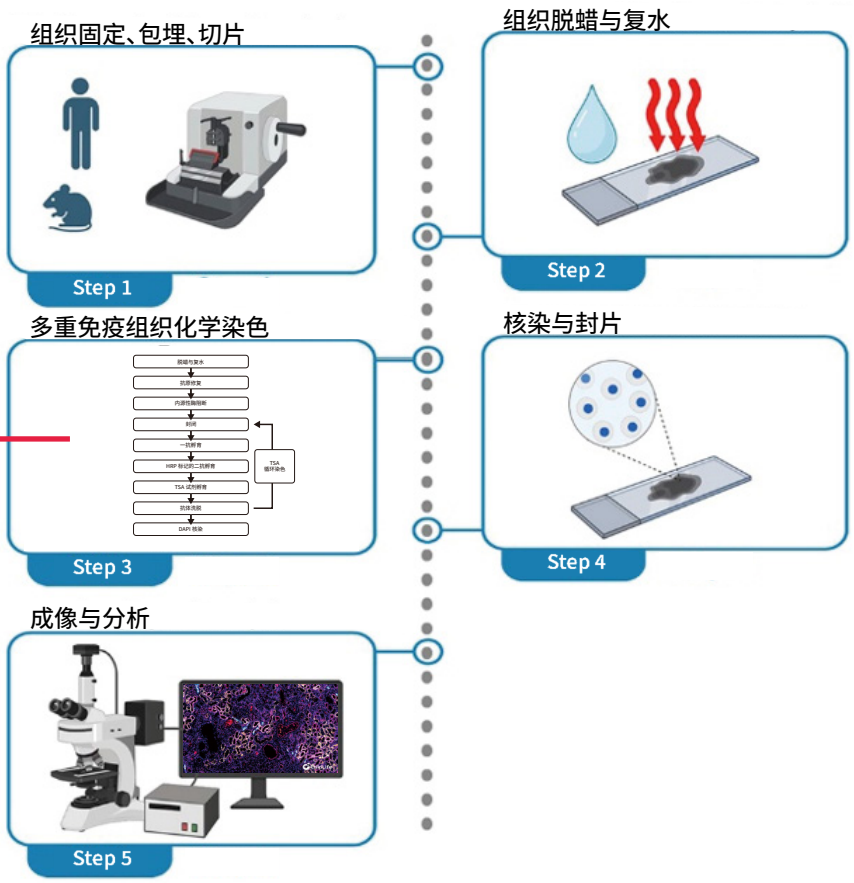
TSA技术为生命科学研究与临床诊断提供了更精准、更全面的检测解决方案，适配基础科研、临床诊断等多个领域，为相关研究和精准诊断提供有力支撑。

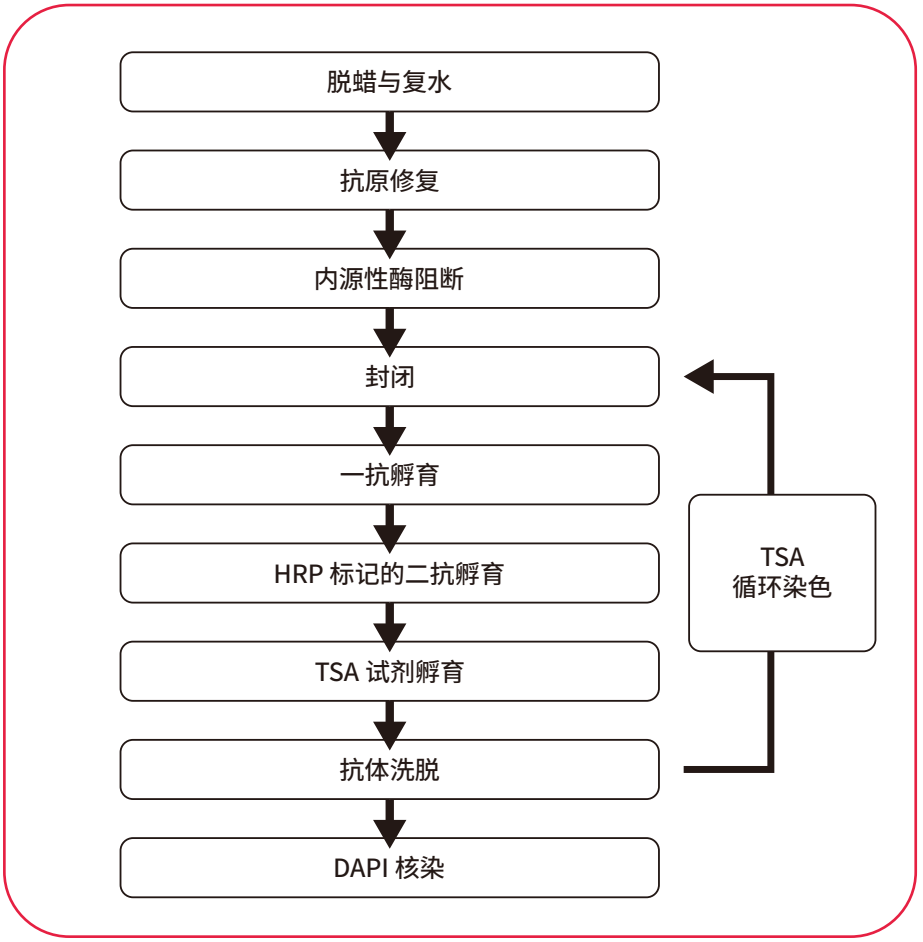
三. 检测原理

TSA技术是利用酪胺盐在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，使其检测信号得到10-100倍增强。简单来说，是利用二抗上带有的HRP，来催化后续添加入体系的非活性荧光素。荧光素在HRP和H2O2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。之后洗去非共价结合的一抗-二抗-HRP复合物，重复下一种一抗-二抗-HRP进行第二轮孵育，换另一种酪胺荧光素底物，如此往复就可实现多重标记。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。借助TSA技术，可利用高特异性的兔单克隆一抗与单一通用抗兔 HRP 二抗联用，对同一组织切片上的所有靶标进行检测，并实现显著的信号放大。



四. 操作流程


组织固定、包埋、切片
Step 1
组织脱蜡与复水
Step 2
多重免疫组织化学染色
Step 3
核染与封片
Step 4
成像与分析
Step 5


脱蜡与复水
抗原修复
内源性酶阻断
封闭
一抗孵育
HRP 标记的二抗孵育
TSA 试剂孵育
抗体洗脱
DAPI 核染
TSA
循环染色

关键技术要点

1. 抗原修复：

抗原修复通常使用1×柠檬酸（pH6.0）作为修复液，高温高压修复，将切片置于高压锅中，加入适量的修复液，关上高压锅，待上汽后计时 2min，冷却至室温，修复完毕。【如遇表达较弱的指标，则可用EDTA（pH9.0）作为修复液进行抗原修复。如遇骨组织、脑组织等易掉片组织，则采用微波修复，修复温度控制在80°C左右，修复液可用2×柠檬酸（pH6.0）。】

2. 内源性酶阻断：

配制3%H2O2溶液，将切片放于溶液中，室温孵育20min。如遇易掉片组织，可适当降低H2O2浓度和孵育时间。若样本含血红蛋白（如肝脏、脾脏），可根据实际情况延长孵育时间。

3. 抗体选择与稀释

优先使用单克隆抗体，避免使用多克隆抗体。如果是小鼠样本，尽量避免选用小鼠来源一抗，若选择小鼠一抗，二抗除了与一抗结合，还会结合组织内源性的IgG，产生非特异性着色。一抗稀释比例需通过预实验确定，浓度过高易导致非特异性结合，过低则信号微弱。建议设置浓度梯度筛选最佳条件。

4. TSA 染料使用规范：

TSA 染料为光敏性物质，工作液需现配现用。低表达靶标选择荧光强度高、抗淬灭性强的染料（如 Cy5、AF594），利用 TSA 信号放大效应提高检出率。高表达靶标选择荧光强度适中的染料（如 FITC、Cy3），避免信号饱和掩盖细节。

5. 避免光谱重叠：

选择发射波长间隔≥50nm 的染料组合，例如：DAPI（461nm）+ AF488（519nm）+ Cy3（570nm）+ Cy5（670nm），可有效减少串色。避免同时使用 FITC（520nm）和 AF488（519nm）、Cy3（570nm）和 AF594（617nm）。

6. 结合成像设备：

荧光型 TSA 需确认荧光通道是否与实验室显微镜波长兼容。使用普通荧光显微镜时，优先选择可见光区染料（FITC、Cy3、DAPI），避免远红外染料（Cy5）。使用共聚焦或多光谱显微镜时，可使用远红外染料（Cy5、AF647），利用多光谱分离技术进一步降低串色。

7. 抗体洗脱效率：

如果有些抗体效价高，亲和力较强，不易洗脱彻底，可增加洗脱次数。抗体洗脱液流动性强，切片未水平放置时，试剂易流出圈外，影响洗脱效果，需在操作过程中注意切片平放。易脱片样本可降低洗脱液温度或缩短孵育时间。

五、典型应用场景

TSA 技术的优势并非停留在理论层面，其在实际应用中的卓越表现，进一步印证了选择它的必要性：

1.肿瘤免疫微环境研究

大量高分研究文献均采用 TSA 多重荧光标记技术，可在单张组织切片中同步检测肿瘤细胞、免疫检查点及各类浸润免疫细胞标志物，有效克服传统单靶点 IHC 信号偏弱、难以实现多指标共定位的缺陷，广泛应用于肿瘤免疫逃逸机制、免疫治疗耐药机制解析及预后标志物筛选研究。

2.临床病理诊断与分型

临床病理相关文献常采用 TSA 对石蜡切片进行低丰度标志物检测，用于肿瘤精准分型、早期微小病灶鉴别、疑难病例病理判读，弥补常规 IHC 灵敏度不足。

3.神经科学与退行性疾病研究

多篇神经领域文献运用 TSA 检测脑组织低丰度功能蛋白、神经元标志物、胶质细胞分型，适配脑冷冻 / 石蜡切片，用于阿尔茨海默病、脑损伤、神经元调控机制研究。

4.干细胞、类器官与发育生物学

类器官、干细胞分化相关文献多用 TSA 做多靶点谱系标记，实现细胞亚型定位与分化轨迹追踪；依托 TSA 样本损耗低、可多轮染色优势，节约珍贵类器官样本。

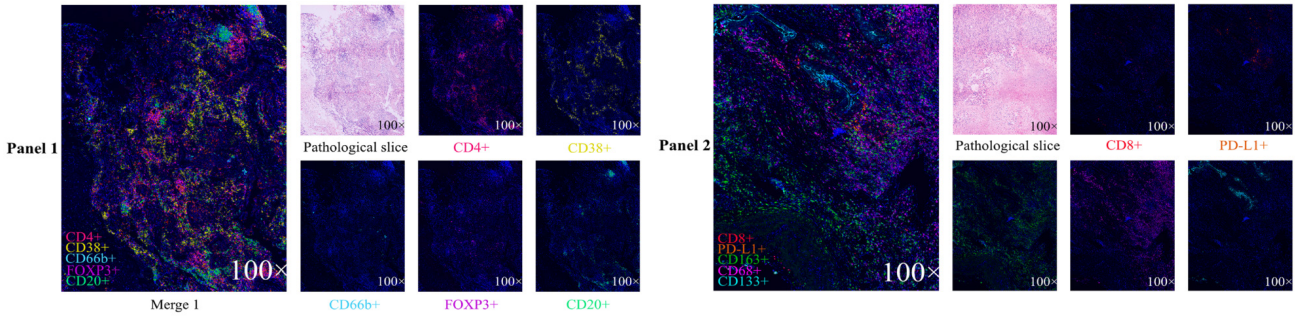
5.低拷贝核酸原位杂交（FISH）

引用 FISH 相关技术文献，TSA 可放大核酸杂交微弱信号，用于基因拷贝变异、病毒核酸定位、微量 RNA 原位表达水平检测。



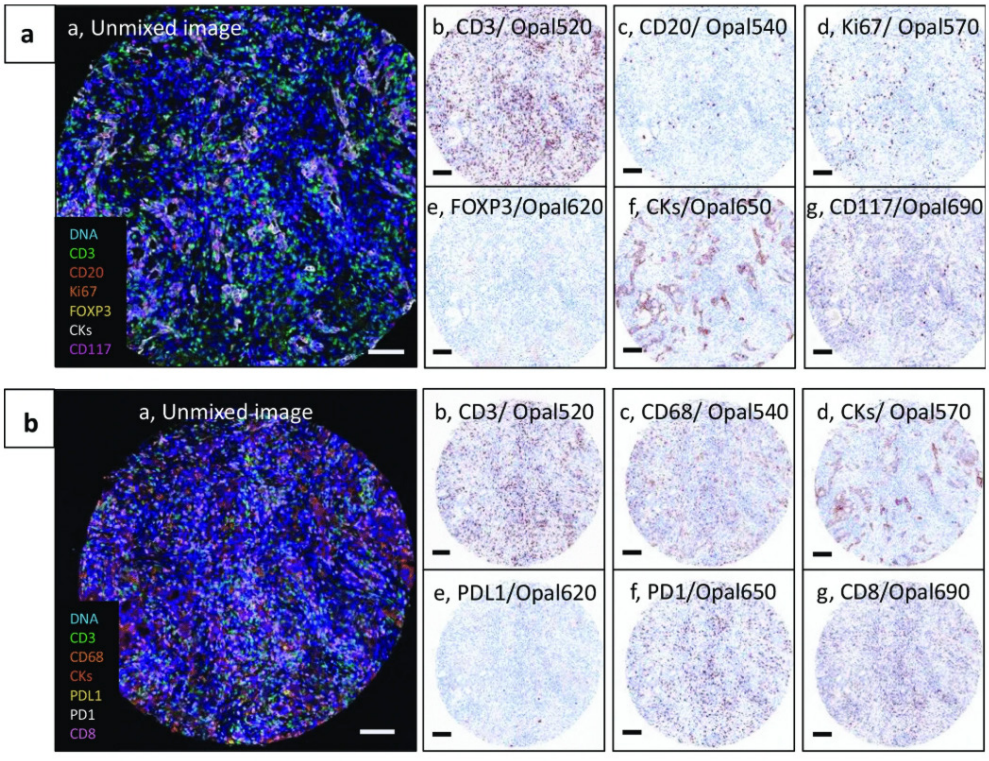
TSA多重免疫荧光效果图示例

1 通过多色荧光标记，清晰勾勒出NSCLC的肿瘤免疫景观及细胞互作网络



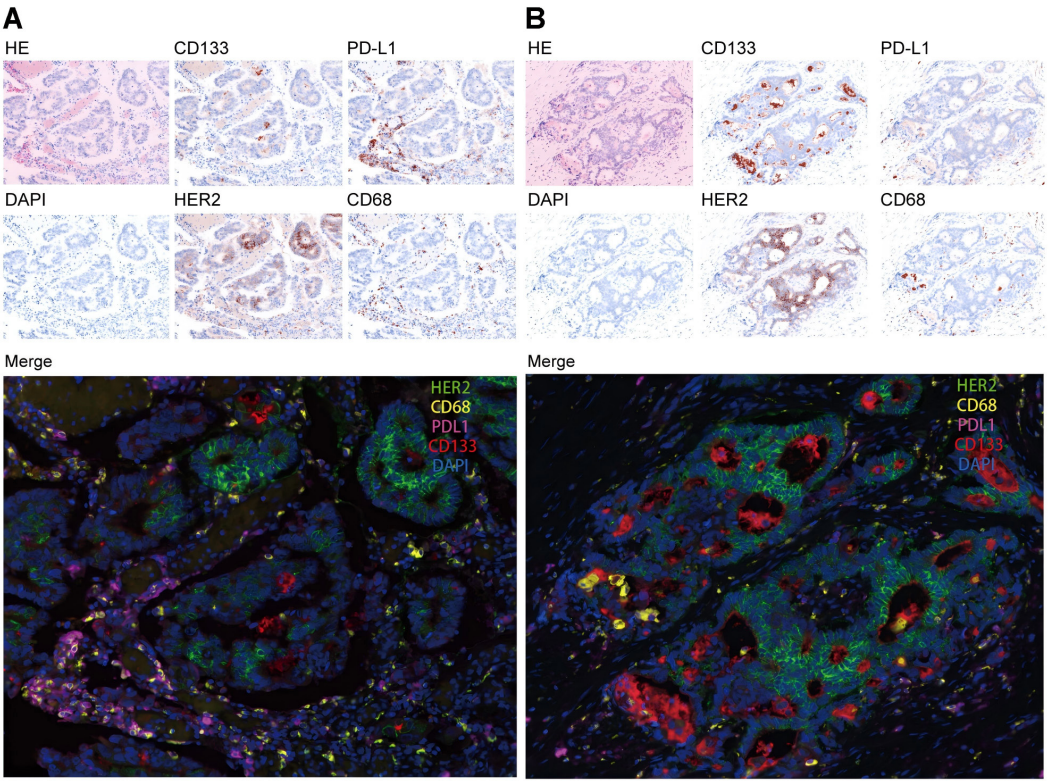
非小细胞肺癌中 10 种免疫生物标志物mIHC染色[1].

2 多重免疫荧光方案与组织芯片相结合，高效的实现了多类型肿瘤样本 TME 细胞组成、功能状态及免疫分子互作的系统性解析



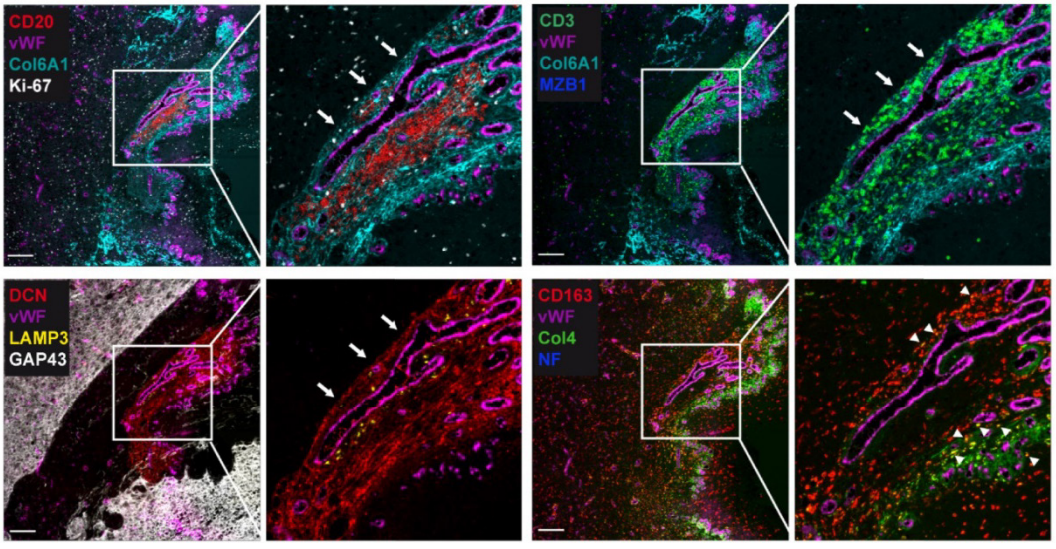
人支气管气道活检组织芯片 (TMA) mIHC染色[2].

3 多重荧光免疫技术揭示结直肠癌生物标志物



结直肠癌组织mIHC染色[3].

4 多重荧光免疫组化用于功能性三级淋巴结构胶质瘤亚群的空间解析



vWF⁺ 血管周边 Col6A1⁺ 致密 ECM 中三级淋巴结构mIHC 染色[4].

六、常用分析软件

TSA依托各类分析软件，如 HALO、Oncotopix、QuPath 等主流平台，既能精准识别组织样本中目标抗原的种类与表达状态，清晰明确其在细胞及亚细胞水平的具体分布位置，又能通过标准化定量分析获取抗原表达的精准数值，同时还能深入探究不同抗原之间的空间邻近关系与功能互作模式，让科研与临床工作者在单张切片上即可获得多维度、立体化的生物分子信息。

软件名称	软件属性	核心功能特点	优势亮点	局限性
HALO	商业付费数字病理定量分析平台	支持图像配准、组织区域分割、单细胞分割、细胞计数、蛋白表达定量、热图绘制、分子空间分布分析、组织芯片（TMA）批量分析、连续切片联动分析；搭载多款专用功能插件，可实现 FISH 与免疫荧光联合定量分析。	1. 插件体系完善，功能模块覆盖多重染色全流程 2. 兼容 JPG、TIF、SVS、CZI 等主流数字切片格式 3. 原生适配 Vectra、Insituplex 成像设备，多重荧光图谱分析适配度高	综合性能均衡无明显缺陷，是目前多重病理荧光染色领域主流商用分析软件。
Oncotopix	商业付费AI数字病理分析软件	整合图像算法、机器学习与人工智能模型，支持大批量数据集运算、实验数据统一管理、分析报告自动生成；可对接实验室 LIS 信息系统；内置浸润性肿瘤智能识别模块，能够定位病变热点、定量标志物表达水平、可视化肿瘤异质性特征。	1. 具备 IVD 体外诊断合规资质，可用于乳腺、肺部肿瘤等临床病理标准化检测 2. 兼容全类型切片图像，自动化分析流程成熟稳定 3. 肿瘤病灶智能识别、肿瘤异质性解析能力优异	软件授权采购成本较高；产品侧重临床合规诊断场景，面向科研的自定义分析功能灵活性不足。
HistoCAT	免费开源高维多重组织交互式分析平台	针对单细胞分辨率多重染色组织样本开发，支持高维荧光图谱可视化、细胞表型自动分型、细胞互作网络构建、细胞空间邻近关系显著性统计。	1. 免费开源，适合经费有限的基础科研项目 2. 擅长解析细胞空间互作、组织微环境细胞交互规律 3. 可定量分析细胞间非随机邻近分布特征	软件原生不具备完整组织分割能力，需搭配 CellProfiler 等工具提前完成细胞分割预处理。
QuPath	免费开源全切片高通量图像分析软件	支持超大数字切片原图无损读取、批量样本自动化处理、自定义脚本二次开发、大规模队列病理指标定量统计。	1. 免费开源无图像尺寸限制，无需对大图裁剪下采样 2. 批量处理效率高，适配大样本量科研队列研究 3. 支持脚本编写，可按需拓展定制化分析流程	针对 PD-L1、错配修复蛋白等弥散斑驳、多细胞混杂表达的标志物，自动判读评分精度有限，难以精准区分不同细胞群的信号强弱。

七、与传统方法对比

在病理原位检测领域，传统检测技术（以免疫组化 IHC、常规免疫荧光 IF 为代表）与酪胺信号放大（TSA）多重免疫荧光技术，核心差异集中在信号生成与检测模式上。传统检测技术以酶促显色或直接荧光标记为核心，信号强度依赖靶标蛋白天然丰度与抗体结合效率，多以单靶标检测为主，仅能实现少量靶点同步分析。而 TSA 技术依托 HRP 酶促级联信号放大与多轮循环标记机制，不仅能高效提升信号强度，还可在同一张组织切片上完成多靶点高通量原位检测，在检测灵敏度、多指标同步分析能力上，与传统检测技术形成鲜明对比，成为更具优势的新型检测手段。

传统方法

以免疫组化 IHC、常规免疫荧光 IF 为代表的传统方法采用酶促显色或直接荧光标记，信号强弱受靶蛋白固有丰度及抗体结合效率影响；大多仅适用于单靶点检测，能够同步分析的生物标志物数量十分有限。

TSA

酪胺信号放大技术依托辣根过氧化物酶介导的酶级联信号放大，并结合多轮循环染色。该技术不仅能够显著提升信号强度，还可在单张组织切片上实现多靶点高通量原位检测。凭借优异的检测灵敏度与多生物标志物同步分析能力，TSA 技术作为先进优选方案，优于传统病理检测手段。

	EnkiLife TSA kits	Traditional methods
灵敏度	高	低
单切片 可检测标志物数量	3-7 种	2–3 种
样品损伤程度	温和洗脱，组织保护性好	损伤较大，需高温修复
抗体种属限制	兼容兔源 / 鼠源一抗， 无种属交叉限制	限制严格
荧光稳定性	可稳定保存 12 个月	易淬灭
操作难度	即用型试剂盒，操作简便	流程复杂

TSA试剂盒核心优势

一张切片释放 7 重信息

7 色荧光底物覆盖 480–750 nm，可按实验需求自由搭配。

一抗选择自由度高

兼容兔源、鼠源一抗，不受种属搭配限制。

适用样本类型广泛

支持石蜡切片、冰冻切片、细胞样本及类器官等多种样本体系。

完整即用型试剂盒体系

包含HRP-山羊抗兔/鼠IgG、缓冲液、配套试剂与封片剂，组分齐全。

温和抗体洗脱工艺

专用洗脱液温和去除抗体，最大程度保留抗原结构与组织完整性。



Product Overview

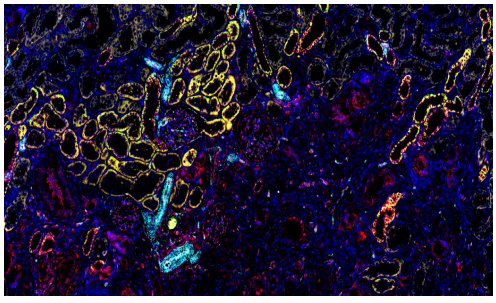
成分与规格

RA10012 TSA六标七色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

组 份	规 格			稀释比例
	20T	50T	100T	
TSA-CY3	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA-FITC	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA-680	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA-430	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA-594	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA-CY7	10μL	20μL	50μL	1:200
TSA 稀释液	12mL	30mL	60mL	即用型
3% H_2O_2	2mL	5mL	10mL	即用型
封闭液	12mL	30mL	60mL	即用型
一抗稀释液	12mL	30mL	60mL	即用型
抗体洗脱剂	10mL	25mL	50mL	即用型
HRP-山羊抗兔 / 鼠 IgG	12mL	30mL	60mL	即用型
DAPI 染液	2mL	5mL	10mL	即用型
抗荧光淬灭封片剂	2mL	5mL	10mL	即用型

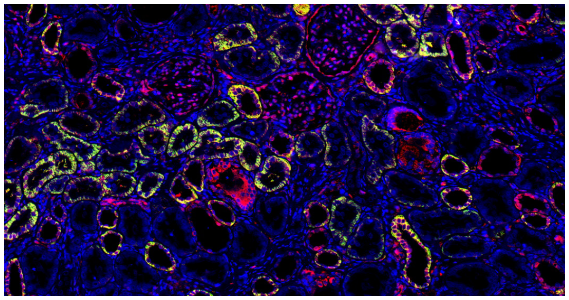
实验示意图

检测样本：大鼠肾脏



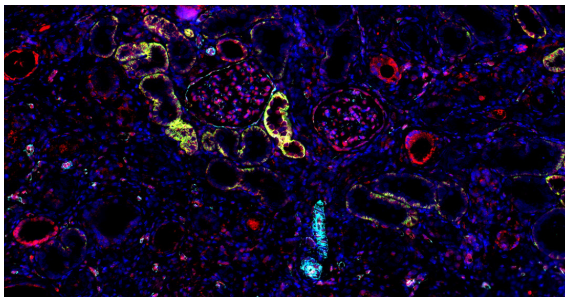
AQP4：在内髓集合管和皮质 / 外髓集合管的主细胞可见阳性染色；
CD31：广泛用于标记血管内皮，肾小球毛细血管内皮、各级血管内皮中均有表达；
TGF β 1：在高血压、纤维化模型中表达显著上调，肾小球上皮细胞（主要是足细胞）、间质成纤维细胞中表达；
Zo-1：作为紧密连接支架蛋白，维持肾小球滤过屏障和肾小管极性；
Collagen I：在纤维化或硬化模型中大量沉积于间质及肾小球。

指标	荧光素	激发波长	发射波长	颜色	滤光片	图片颜色
AQP4	TSA-430	430nm	480nm		Aqua 通道	黄色
CD31	TSA-FITC	490nm	520nm		FITC 通道	绿色
TGF β 1	TSA-CY3	550nm	570nm		CY3 通道	红色
Zo-1	TSA-594	590nm	620nm		Red 通道	青色
Collagen I	TSA-680	680nm	700nm		CY5/CY5.5 通道	紫色



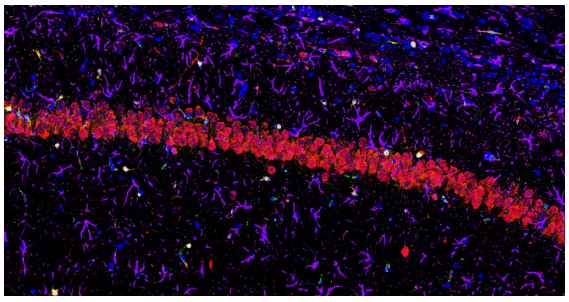
TSA双标三色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

货号: RA10008
规格: 20T, 50T, 100T



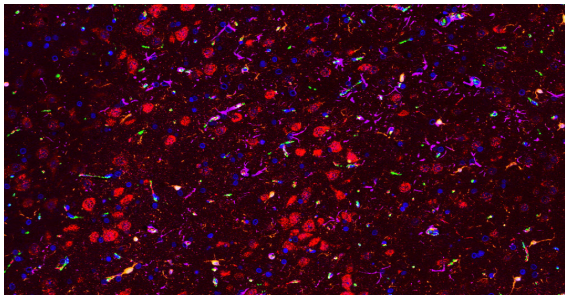
TSA三标四色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

货号: RA10009
规格: 20T, 50T, 100T



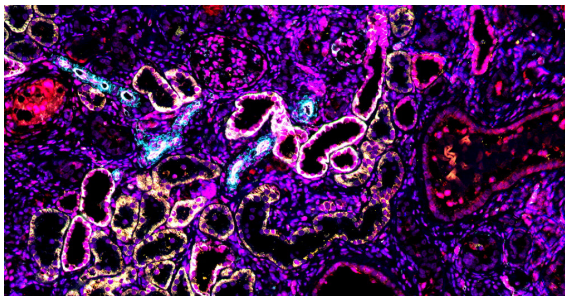
TSA四标五色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

货号: RA10010
规格: 20T, 50T, 100T



TSA五标六色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

货号: RA10011
规格: 20T, 50T, 100T



TSA六标七色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

货号: RA10012
规格: 20T, 50T, 100T

实验常见FAQ

Q: 能否使用冰冻漂片进行TSA实验?
A: TSA试剂盒不适用于漂片。因为漂片厚度太厚，不利于试剂的渗透。在染色过程中切片易发生卷曲、褶皱，破坏组织形态

Q: 做石蜡切片 mIHC,抗体应该怎样选择?
A: 优先选用单克隆抗体，需选择标注适配 IHC、mIHC、IHC-P 应用场景的产品，条件允许时优先使用经基因敲除验证的特异性抗体。

Q: 为什么会产生非特异性结合?
A: ①多克隆抗体易产生非特异背景，可更换单克隆抗体，或降低一抗稀释浓度、减弱抗原修复强度；
②TSA 信号放大程度过高，可缩短酪胺底物孵育时间、降低底物工作液浓度；
③一抗工作浓度过高或抗原修复过度，可提高一抗稀释比例，或降低抗原修复强度。

Q: 切片出现脱片，如何避免?
A: ①载玻片未做防脱处理：更换商品化防脱载玻片，或提前对玻片进行防脱包被处理；
②组织固定、脱水不充分：优化样本前处理流程，适当延长固定与脱水时长；
③高温抗原修复过度：改用温和微波修复，温度控制在 80°C及以下，修复液可选 2× 柠檬酸缓冲液（pH6.0）；
④抗体洗脱液温度偏高：降低洗脱液温度，或缩短洗脱孵育时间。

Q: 为什么会串色?
A: ①成像设备滤光片带宽过宽，建议选用窄带宽滤光片；
②上一轮抗体洗脱不彻底；针对 CK 等高亲和力抗体，需延长洗脱条件（提升洗脱温度、增加洗脱时长）；
③各通道荧光信号强度失衡，相邻通道一强一弱，强光信号易发生光谱外溢；
④操作失误，如抗体混用、未完成洗脱直接进入下一轮染色等。

Q: 样本为小鼠，是否可以选择小鼠来源的一抗?
A: 通常不推荐。若一抗为小鼠源，配套二抗需选用抗小鼠二抗，该二抗会与小鼠组织内源性 IgG 发生交叉反应，引发非特异性染色。
若实验必须使用同种属一抗，建议增设阴性对照：不加一抗、仅孵育二抗，判断是否存在非特异荧光信号。

Q: 做多标时，指标/抗体顺序如何选择？

A: ①难洗脱的抗体放在最后一轮孵育，避免残留造成串色；实验可交替使用兔源、鼠源一抗；

②表达难度高、低丰度的靶标放在前几轮染色；低表达指标搭配高荧光强度、抗淬灭性能优异的染料；

③高丰度靶标选用荧光强度适中的染料，防止信号过饱和掩盖细胞细节；

④若两种蛋白存在共表达，优先选择发射波长差值大的荧光染料配对。

Q: 传统荧光染色和TSA多重免疫荧光能否搭配使用？

A: 可以搭配，但传统荧光染色需安排在最后一轮。TSA 循环染色中，抗体洗脱步骤会清除切片上所有一抗、二抗复合物，若提前做传统荧光，信号会被洗脱消失。

Q: 实验操作过程需要避光吗？染好的片子可以保存多久？

A: Enklife TSA 试剂盒配套荧光染料抗淬灭性能优异，常规室内日光灯下操作无需避光，也不用全程暗环境处理。不过，请注意避免试剂盒暴露在太阳光下直射。完成封片的染色切片置于 4°C避光保存，有效期可达 6–12 个月。

参考文献

[1] Peng H, Wu X, Zhong R, Yu T, Cai X, Liu J, Wen Y, Ao Y, Chen J, Li Y, He M, Li C, Zheng H, Chen Y, Pan Z, He J, Liang W. Profiling Tumor Immune Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer Using Multiplex Immunofluorescence. Front Immunol. 2021 Nov 4;12:750046. doi: 10.3389/fimmu.2021.750046. PMID: 34804034; PMCID: PMC8600321.

[2] Mori H, Bolen J, Schuetter L, Massion P, Hoyt CC, VandenBerg S, Esserman L, Borowsky AD, Campbell MJ. Characterizing the Tumor Immune Microenvironment with Tyramide-Based Multiplex Immunofluorescence. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2020 Dec;25(4):417-432. doi: 10.1007/s10911-021-09479-2. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33590360; PMCID: PMC7960613.

[3] Zhang W, Song ZJ, Zhang BY, Wang JL, Guo Q, Sun ZW, Tang H. Multiplex immunohistochemistry indicates biomarkers in colorectal cancer. Neoplasma. 2021 Nov;68(6):1272-1282. doi: 10.4149/neo_2021_210312N324. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34459208.

[4] Cakmak P, Lun JH, Singh A, Macas J, Schupp J, Schuck J, Mahmoud Z, Köhler M, Starzetz T, Burger MC, Steidl E, Hasse LM, Hattingen E, Plate KH, Reiss Y, Imkeller K. Spatial immune profiling defines a subset of human gliomas with functional tertiary lymphoid structures. Immunity. 2025 Nov 11;58(11):2847-2863.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2025.09.018. Epub 2025 Oct 21. PMID: 41125076.

EnkiLife 相关产品

货 号	产品名称
RA10002	抗体稀释液
RA10015	抗体稀释液（病理级）
RA20080	苏木素染色液
PA10003	DAB显色试剂盒(棕色，50x)
PA10004	AEC显色试剂盒(红色，20x)
PA10005	内源性过氧化物酶阻断剂
PA10006	柠檬酸抗原修复液（20x，PH6.0）
PA10007	Tris-EDTA抗原修复液（20x，PH9.0）
PA10008	PBS缓冲液 (10x)
PA10009	PBST缓冲液 (10x)
PA10010	TBS缓冲液 (10x)
PA10019	柠檬酸抗原修复液（10x，PH6.0）
PA10012	Tris-EDTA抗原修复液（10x，PH9.0）
PA10013	一步法脱蜡/抗原修复缓冲液（20x，PH6.0）
PA10018	一步法脱蜡/抗原修复缓冲液（20x，PH9.0）
PA10020	极速·超敏免疫组化试剂盒（pH 6.0）
PA10021	极速·超敏免疫组化试剂盒（pH 9.0）
PA10014	免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠)
PA10015	免疫组化(IHC)检测试剂盒(兔)
PA10016	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠)
PA10017	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(兔)
PA10001	免疫组化双染试剂盒（DAB/AEC）（小鼠/兔）
PA10002	Polymer-HRP 免疫组化双染试剂盒（DAB/AEC）（小鼠/兔）
RA10006	免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠/兔)
RA10007	Polymer-HRP 免疫组化(IHC)检测试剂盒(小鼠/兔)

Thank you for choosing us!