产品名称：TSA 四标五色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

产品货号：RA10010

产品介绍

本产品 TSA 四标五色多重荧光染色试剂盒，适用于石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片、细胞涂片、类器官等组织样本的免疫荧光双重染色，尤其适用于相同来源一抗的双重荧光免疫标记，也可用于不同来源抗体的双重荧光免疫标记。主要原理是基于酪胺信号放大（TSA，Tyramide signal amplification），以下简称 TSA 技术。TSA 技术主要原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应（即荧光标记的酪胺盐在 HRP 催化 H_2O_2 下形成共价键结合位点），产生大量的酶促反应，该产物能与周围的蛋白残基（包括色氨酸、组氨酸、酪氨酸残基）结合，在抗原-抗体结合部位形成大量的荧光素沉积，实现信号放大。

产品信息

产品形态	液体
产品规格	20T、50T、100T
储存条件	2-8℃
运输条件	低温
有效期	12 个月

组 分	规 格			稀 释 比 例
	20T	50T	100T	
TSA-550	10μL	25μL	50μL	1：200
TSA-490	10μL	25μL	50μL	1：200
TSA-680	10μL	25μL	50μL	1：200
TSA-430	10μL	25μL	50μL	1：200
TSA 稀释液	8mL	20mL	40mL	即用型
3%H_2O_2	2mL	5mL	10mL	即用型
封闭液	8mL	20mL	40mL	即用型
一抗稀释液	8mL	20mL	40mL	即用型
抗体洗脱剂	6mL	15mL	30mL	即用型
HRP-山羊抗兔/鼠 IgG	8mL	20mL	40mL	即用型

产品名称：TSA 四标五色多重荧光染色试剂盒（mIHC）

产品货号：RA10010

DAPI 染液	2mL	5mL	10mL	即用型
抗荧光淬灭封片剂	2mL	5mL	10mL	即用型

实验流程

A.石蜡切片

1.脱蜡：将切片依次浸泡于二甲苯 1（15min）、二甲苯 2（15min）、无水乙醇 1（5min）、无水乙醇 2（5min）、95%乙醇（5min）、85%乙醇（5min）、75%乙醇（5min），最后用水漂洗片子。

2.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，将切片至于高压锅中，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℃左右，修复液可用 2×柠檬酸（PH6.0）。】

3.内源性酶阻断：滴加 3%H_2O_2 溶液，室温孵育 20min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。（PS：如遇易掉片组织，可适当降低 H_2O_2 浓度和孵育时间。）

4.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。

5.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，在组织上滴加抗体工作液，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

6.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

7.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-550，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

8.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

9.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。

10.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

11.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

12.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-490，37℃孵育 30min。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

13.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

14.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。

15.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

16.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

17.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

18.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

19.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
20.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
21.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
22.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
23.DAPI 染核：将 DAPI 工作液滴加到组织上，室温孵育 5min。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。将液体甩干，在组织上滴加抗荧光淬灭封片剂，盖上盖玻片。将做好的荧光切片置于 4℃避光保存。

B.冰冻切片
1.复温：将冰冻切片，置于室温，恢复至室温状态，备用。
2.抗原修复：
(1)固定样本制作的冰冻切片：
将切片至于装有修复液的修复盒中，用微波炉加热至 60-70℃，维持该温度约 5-10min，冷却至室温，即完成抗原修复。
(2)新鲜组织制作的冰冻切片：
将切片置于固定液中，室温固定 10-15min，用 PBS 洗片子 2-3 次，后续实验可不用进行抗原修复。
3.内源性酶阻断：滴加 3%H_2O_2 溶液，室温孵育 20min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。如遇易掉片组织，可适当降低 H_2O_2 浓度和孵育时间。
4.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
5.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
6.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
7.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-550，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
8.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
9.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
10.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
11.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
12.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-490，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
13.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
14.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
15.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

16.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
17.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
18.抗体洗脱：在组织上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
19.封闭：在组织上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
20.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
21.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
22.孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
23.DAPI 染核：将 DAPI 工作液滴加到组织上，室温孵育 5min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。将液体甩干，在组织上滴加抗荧光淬灭封片剂，盖上盖玻片。将做好的荧光切片置于 4℃避光保存。

C.细胞爬片

1.抗原修复（选择性使用，如果细胞固定时间过长，可选择抗原修复）
将修复液加热至 60-70℃，然后将加热后的修复液，滴加到爬片上，自然冷却至室温。
2.细胞通透：细胞爬片，需用 0.5%Triton-100，进行破膜，室温处理 20min。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
3.内源性酶阻断：滴加 3%H_2O_2 溶液，室温孵育 20min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。如遇易脱落细胞爬片，可适当降低 H_2O_2 浓度和孵育时间。
4.封闭：在爬片上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
5.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，滴加在爬片上，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
6.二抗孵育：在组织上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
7.孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-550，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
8.抗体洗脱：在爬片上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
9.封闭：在爬片上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
10.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，滴加在爬片上，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
11.二抗孵育：在爬片上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
12.孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-490，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
13.抗体洗脱：在爬片上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
14.封闭：在爬片上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
15.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，滴加在爬片上，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

16.二抗孵育：在爬片上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
17.孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
18.抗体洗脱：在爬片上滴加抗体洗脱剂，室温孵育 15-25min（37℃孵育更佳）。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
19.封闭：在爬片上滴加封闭液，37℃孵育 30min。
20.一抗孵育：使用抗体稀释液按照适宜浓度稀释一抗，滴加在爬片上，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
21.二抗孵育：在爬片上滴加 HRP 酶标记的二抗，37℃孵育 1h。再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
22.孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
23.DAPI 染核：将 DAPI 工作液滴加到爬片上，室温孵育 5min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。在载玻片上，滴加抗荧光淬灭封片剂，将爬片倒扣置载玻片上，适当晾干，将做好的荧光片子置于 4℃避光保存。

荧光素信息

荧光素名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	显微镜下颜色	滤光片
TSA-490	490	520	绿色	FITC 通道
TSA-550	550	570	橙红色	CY3 通道
TSA-680	680	700	深红色	CY5/CY5.5 通道
TSA-430	430	480	青色	Aqua 通道

注意事项

1.一抗的选择

1.1 一抗优先选择单克隆抗体，其次选择多克隆抗体；

1.2 如果是小鼠样本，尽量避开选择小鼠来源一抗，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；

2.若组织容易掉片，修复时可采用 60℃水浴方式进行修复。

3.与荧光二抗相比，TSA 试剂盒有更高的灵敏度和更强的信号。因此一抗使用浓度需降低，一般在抗体说明书建议的稀释比基础上适当扩大稀释倍数，以减少非特异性结合导致的背景荧光。建议设置一抗梯度浓度获得最佳效果。

4.如背景荧光较强，建议增加组织自发荧光淬灭步骤。

5.为保证抗体洗脱效果及荧光多重标记效果，建议正式多重标记之前分别做各个抗体的 TSA 单标测试，确定每个抗体单标都能做出较理想的阳性后再根据单标测试结果去确定多标的抗原修复条件、抗体顺序等实验条件。

6.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。

7.抗体洗脱液流动性强，片子未水平放置时，试剂易流出圈外，影响洗脱效果，需在操作过程注意切片平放。

8.操作时需带好手套，口罩，穿好实验服，避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触到敏感区域，立即用大量清水冲洗。