

双重荧光染色（TSA）试剂盒

货号：RK05879

规格：50T

◆ 产品简介

本产品双重荧光（TSA）染色试剂盒，适用于石蜡切片免疫荧光双重染色，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。还可以通过多次重复免疫标记，使用不同的荧光酪胺实现多重荧光染色。

TSA 系列荧光染色试剂盒相关荧光染料的荧光光谱数据如下：

| 荧光染料类型 | Ex/Em |
|----------------|---------|
| iF488-Tyramide | 491/516 |
| iF555-Tyramide | 557/570 |
| iF647-Tyramide | 656/670 |

◆ 产品组成

| 产品编号 | 名称 | 规格 | 保存条件 |
|-----------|----------------|------------|------------------|
| RK05879-1 | iF488-Tyramide | 25 μ L | -20 $^{\circ}$ C |
| RK05879-2 | iF555-Tyramide | 25 μ L | -20 $^{\circ}$ C |
| RK05879-3 | Tyramide 稀释液 | 100mL | 4 $^{\circ}$ C |

| | | | |
|-----------|-----------------|------|-------|
| RK05879-4 | DAPI (即用型) | 10mL | 4°C |
| RK05879-5 | 组织自发荧光淬灭剂 (苏丹黑) | 10mL | 室温 |
| RK05879-6 | 抗荧光淬灭封片剂 | 5mL | -20°C |
| | 说明书 | 1 份 | |

◆ 保存条件

试剂盒内各组分按各自所需条件保存，冰袋 (wet ice) 运输。12 个月有效。

◆ 实验前准备

1. 自备 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH7.0-7.4) , 3% H₂O₂ 和 0.3% H₂O₂;
2. 自备一抗及相应 HRP 标记二抗, 抗原修复液 (根据抗体及组织类型选择合适的抗原修复液);
3. 根据用量, 按照下表比例配制 TSA 染色工作液。

| TSA 染色工作液 | 试剂名称 | 体积 |
|---------------|------------------------------------|------|
| TSA-488 染色工作液 | Tyramide 稀释液 | 1mL |
| | 0.3% H ₂ O ₂ | 10μL |
| | iF488-Tyramide | 2μL |
| TSA-555 染色工作液 | Tyramide 稀释液 | 1mL |
| | 0.3% H ₂ O ₂ | 10μL |
| | iF555-Tyramide | 2μL |

注：荧光 Tyramide 融化后离心机短时离心，干净吸头吹吸混匀后取用。TSA 染色工作液建议现配现用，需 4°C 避光保存，24h 内有效。

◆ 操作步骤

以组织切片为例，以下实验步骤中的实验用水均为纯水：

1. 组织切片脱蜡至水；
2. 抗原修复：根据所使用的一抗及样本类型，采用合适方式对组织切片进行抗原修复；
3. PBS 清洗 3 次，每次 5min，然后用免疫组化笔对组织画圈标记；
4. 灭活内源性过氧化物酶：向切片上滴加 3% H₂O₂ 覆盖组织，室温避光孵育 25min，阻断内源性过氧化物酶，以减少非特异性背景染色。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
5. 封闭：切片水分稍微甩干后，向组织上滴加 3% BSA 或血清封闭 30min，具体根据一抗及二抗种属决定封闭试剂；
6. 一抗孵育：用 PBS（或其他抗体稀释液）将一抗稀释至适当浓度。轻轻甩掉切片上的液体，滴加稀释好的一抗覆盖组织，切片平放于加水的湿盒内 4°C 孵育过夜。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
7. 对应 HRP 二抗孵育：用 PBS（或其他抗体稀释液）将二抗稀释至适当浓度，向组织上滴加二抗，室温孵育 50min。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
8. 向组织上滴加 50-100μL TSA-488 染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育 10min。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
9. 微波处理：组织切片置于盛满抗原修复液（根据组织类型及抗体选择合适的抗原修复液）的修复盒中进行微波加热处理，去除已经结合的一抗二抗。（加热的温度和时间建议：加热到 95°C 以上，维持 15min）此步骤中需防止液体过度蒸发导致的干片；
10. 重复步骤 6，进行第二个一抗的孵育：用 PBS（或其他抗体稀释液）将需检测的第二个抗体（一抗）稀释至适当浓度。轻轻甩掉切片上的液体，滴加稀释好的抗体覆盖组织，切片平放于加水的湿盒内 4°C 孵育过夜。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
11. 重复步骤 7，进行对应 HRP 二抗孵育：用 PBS（或其他抗体稀释液）将二抗稀释至适当浓度，向组织上滴加二抗，室温孵育 50min。PBS 清洗 3 次，每次 5min；

12. 向组织上滴加 50-100 μ L TSA-555 染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育 10min。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
13. 细胞核复染 DAPI：切片稍甩干后在组织上滴加 DAPI（即用型）染色液，避光室温孵育 10min。PBS 清洗 3 次，每次 5min；
14. 组织自发荧光淬灭（可选）：向组织上滴加组织自发荧光淬灭剂（苏丹黑），室温孵育 5min，流水冲洗 3min；
15. 封片及镜检：切片稍甩干后滴加抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察并采集图像。切片置于避光切片盒内 4 $^{\circ}$ C 可保存 15 天。

◆ 注意事项

1. 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再扩大 5-10 倍，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；
2. 如背景荧光较强，建议增加组织自发荧光淬灭步骤；
3. 荧光 Tyramide 的建议稀释比是 1:500，可根据实验结果调整稀释比例（调整范围 1:200 - 1:1000）；
4. 如进行多重荧光标记，建议先孵育多抗，后孵育单抗；先孵育低丰度目的蛋白对应的抗体，再孵育高丰度目的蛋白对应的抗体；
5. 本产品仅限科研使用。