



## TSA 加强型四标五色荧光染色试剂盒 (440+488+594+647+DAPI) C0038

**描述:** 多重荧光免疫组化 TSA(Tyramide signal amplification)即酪酰胺信号放大技术是一类利用辣根过氧化物酶 (HRP) 对靶蛋白或核酸进行高密度原位标记的酶学检测方法。可实现在同一组织切片上多个靶标蛋白共同染色, 通过荧光图像分析挖掘组织微环境中的复杂信息, 如定量、共表达确定细胞分型、空间关系分析等。反应原理是: 荧光标记的酪胺分子在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 环境下被 HRP 催化激活, 产生大量酪胺反应, 使荧光素在抗原-抗体结合部位与组织周围的蛋白残基结合, 形成大量的荧光素沉积, 实现信号放大。

普利莱 TSA 系列检测试剂盒基于酪酰胺信号放大技术, 可用于相同来源或不同来源抗体的荧光染色, 石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片、细胞涂片等样本均可。具有灵敏度高、信号稳定、节省抗体、无抗体种属限制、低丰度蛋白也可适用等特点。除试剂盒内提供的荧光染料外, 用户也可根据荧光成像系统光源配置选择其他合适的荧光染料进行搭配开展实验。

### 普利莱 TSA 系列试剂盒荧光染料信息:

荧光染料类型	激发波长/nm	发射波长/nm	颜色
DAPI	359	457	蓝色
TSA Tyramide-440	434	480	蓝色
TSA Tyramide-488	491	516	绿色
TSA Tyramide-555	557	570	橙红
TSA Tyramide-594	588	604	红
TSA Tyramide-647	656	670	远红光

### 试剂盒组成:

组份	100 次	储存和效期
TSA Tyramide-440 (500X)	12. ul	-20℃ 避光保存, 一年有效
TSA Tyramide-488 (500X)	12. ul	-20℃ 避光保存, 一年有效
TSA Tyramide-594 (500X)	12 ul	-20℃ 保存, 一年有效
TSA Tyramide-647 (500X)	12 ul	-20℃ 保存, 一年有效
Tyramide 稀释液	50ml	2-8℃ 避光保存, 一年有效
免疫荧光抗体洗脱液	15ml	2-8℃ 保存, 一年有效
DAPI 染色液	5 ml	2-8℃ 避光保存, 一年有效
自发荧光淬灭剂	5 ml	室温保存, 一年有效
抗荧光衰减封片剂	2.5 ml	-20℃ 避光保存, 一年有效



## 自备试剂:

1. 抗原修复液 (柠檬酸钠抗原修复液 (pH 6.0) (B1054)、EDTA 抗原修复液 (pH 8.0) (B1055)、Tris-EDTA 抗原修复液 (pH 9.0) (B1300) ;
2. 自备 0.01M pH7.4 PBS 缓冲液 (B1201)、TBST 缓冲液 (B1009)、3%过氧化氢溶液和 0.3%过氧化氢溶液

## 操作步骤:

### 一、样本处理

#### 1、石蜡切片

1.1 脱蜡至水: 依次将切片放入二甲苯中脱蜡 10min; 更换新鲜二甲苯脱蜡 10min; 无水乙醇脱蜡 10min; 更换新鲜无水乙醇脱蜡 10min; 更换新鲜无水乙醇脱蜡 5min; 蒸馏水洗 5min。

1.2 抗原修复: 根据组织类型及抗体种类, 选择适合的抗原修复液及修复方式。注意防止修复液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS 中置于托盘摇床洗涤 3 次, 每次 5min。

#### 2、冰冻切片、细胞爬片或细胞涂片

2.1 固定和洗涤: 用 4%组织细胞固定液(B1057)室温固定样本 15 分钟。PBS 洗 3 次, 每次 5min。

2.2 通透和洗涤: 用 0.1% Triton X-100 室温通透样本 5min, PBS 洗 3 次, 每次 5min, 也可根据实验需求选择合适的固定方法。

### 二、封闭

3、内源过氧化物酶封闭: 切片稍甩干后用免疫组化笔沿组织周围画圈, 一般距离组织约 3mm 左右, 画圈干燥后用 PBS 润洗一次, 之后将切片放入 3%双氧水溶液中, 室温避光孵育 25min, 封闭内源性的过氧化物酶。封闭完成后将玻片置于 PBS 缓冲液中托盘摇床洗涤 3 次, 每次 5min。

4、背景封闭: 切片稍甩干后, 适用 3%BSA 或血清室温孵育样本 30min, 具体根据一抗及二抗种属决定封闭试剂。

### 三、抗体孵育

5、一抗孵育: 参考一抗使用说明书将抗体稀释至合适浓度, 置于抗体孵育盒中与样本共同室温孵育 2 小时或 4° C 孵育过夜。

6、HRP 标记的二抗孵育: PBS 洗涤样本 3 次, 每次 5min。稀释一抗所对应种属的二抗至合适浓度, 室温与样品孵育 40-60min。孵育结束后, 洗涤液洗涤样品 3 次, 每次 5min。

**温馨提示:** 抗体孵育时, 需同时优化一抗和二抗工作浓度, 可在推荐稀释比例基础上再进一步稀释 (一抗建议再继续稀释 5-10 倍), 以减少非特异性结合的背景荧光。初次检测时建议设置一抗和二抗不同稀释比例进行优化。同时确保每轮孵育使用的二抗都匹配一抗的种属来源。

### 四、TSA 染色工作液配制和 TSA 标记

7、根据样本数量 (每个样本需 50ulTSA 染色工作液), 按下表配制 TSA 染色工作液。注意: 荧光 Tyramide 融化后离心机短暂离心, 干净吸头吹吸混匀后取用。TSA 染色工作液建议现配现用, 4° C 避光保存, 当天使用。



TSA 染色工作液	所需试剂	体积
Tyramide-440 染色工作液	Tyramide 稀释液	1ml
	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10ul
	Tyramide-440 (500X)	2ul
Tyramide-488 染色工作液	Tyramide 稀释液	1ml
	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10ul
	Tyramide-488 (500X)	2ul
Tyramide-594 染色工作液	Tyramide 稀释液	1ml
	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10ul
	Tyramide-594 (500X)	2ul
Tyramide-647 染色工作液	Tyramide 稀释液	1ml
	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10ul
	Tyramide-647 (500X)	2ul

8、加 Tyramide-440 染色工作液标记: Tyramide-440 染色工作液室温与样品避光孵育 10min。孵育结束后, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。可在荧光显微镜下确认染色效果, 也可所有抗体及 TSA 染色结束后, 再进行镜检。

**五、抗体洗脱** (以下两种方式均可, 优先推荐使用试剂盒自带的抗体洗脱液进行洗脱)

9、微波处理: 组织切片置于盛满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。(建议: 加热到 95℃ 以上, 维持 15 分钟, 最佳条件请结合样本特点自行摸索。) 此过程应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min;

**免疫荧光抗体洗脱液处理:** 切片稍晾干后将恢复至室温的抗体洗脱液铺满整个组织, 室温孵育 5min 后去除抗体洗脱液, 再次滴加足量的抗体洗脱液完全覆盖组织, 37° C 孵育 30min, 孵育完成后将玻片置于 TBST 中洗涤 3 次, 每次 5min。

**六、第二轮 TSA 标记**

10、重复步骤 4、5、6 更换第二种一抗和对应二抗。

11、加 Tyramide-488 染色工作液标记: Tyramide-488 染色工作液室温与样品避光孵育 10min。孵育结束后, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。可在荧光显微镜下确认染色效果, 也可完成全部标记后再镜检。

12、重复步骤 9, 进行第三轮标记前需抗体洗脱。

**七、第三轮 TSA 标记**

13、重复步骤 4、5、6 更换第三种一抗和对应二抗。

14、加 Tyramide-594 染色工作液标记: Tyramide-594 染色工作液室温与样品避光孵育 10min。孵育结束后, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。可在荧光显微镜下确认染色效果, 也可完成全部标记后再镜检。

15、重复步骤 9, 进行第四轮标记前需抗体洗脱。



## 八、第四轮 TSA 标记

16、重复步骤 4、5、6 更换第四种一抗和对应二抗。

17、加 Tyramide-647 染色工作液标记: Tyramide-647 染色工作液室温与样品避光孵育 10min。孵育结束后, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。可在荧光显微镜下确认染色效果, 也可后续步骤完成后再镜检。

## 八、后续步骤

15、DAPI 染色: 切片稍甩干后滴加 DAPI 染色液覆盖样本, 室温避光孵育 10min, 去除 DAPI, PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。

16、自发荧光淬灭: 吸除 PBS, 用蒸馏水短暂冲洗切片, 每个切片滴加 30-50ul 自发荧光淬灭剂, 保证完全覆盖整个切片, 室温避光孵育 5min, 蒸馏水冲洗 5-10min。**注意:** 特定类型的组织样品通常必须优化孵育时间, 以最大限度地淬灭自发荧光, 而不明显影响特异性的免疫荧光。

17、封片: 吸除蒸馏水, 用抗荧光衰减封片剂封片。

18、镜检拍照: 使用荧光显微镜、共聚焦或多光谱成像系统在相应的荧光通道下观察并采集图像。

### 注意事项:

1. 荧光 Tyramide 建议稀释比 1:500, 也可根据实验结果调整稀释比例 (调整范围 1:200 - 1:1000)。
2. 如果有些抗体效价高, 亲和力较强, 不易洗脱彻底, 可提高洗涤温度至 50°C 30min 或增加洗脱次数, 即加入抗体洗脱液 37°C 孵育 30min 后, 去掉抗体洗脱液, 再加入新的抗体洗脱液, 继续 37°C 孵育 30min。
3. 抗体洗脱液流动性强, 需在操作过程注意切片平放。
4. 为保证抗体洗脱效果和荧光多重标记效果, 正式标记前建议分别做各个抗体的 TSA 单标测试 (即一抗—HRP 二抗—对应多标中的 TSA), 确定每个抗体单标都能得到较理想的阳性结果后再确定多标的抗原修复条件, 抗体顺序等。
5. 操作时请穿实验服, 佩戴一次性手套。
6. 本品仅用于科研, 不得用于临床。

相关产品推荐	
C0034	TSA 加强型双标三色荧光染色试剂盒 (绿光 488+橙红光 555+DAPI)
C0035	TSA 加强型双标三色荧光染色试剂盒 (绿光 488+红光 594+DAPI)
C0036	TSA 加强型三标四色荧光染色试剂盒 (488+555+647+DAPI)
C0039	TSA Tyramide-440 荧光染料 (500X)
C0040	TSA Tyramide-488 荧光染料 (500X)
C0041	TSA Tyramide-555 荧光染料 (500X)
C0042	TSA Tyramide-594 荧光染料 (500X)
C0043	TSA Tyramide-647 荧光染料 (500X)