五标六色酪胺信号放大试剂盒 TSA

产品货号 TSA09

原　理：

酪胺信号放大系统（Tyramide Signal Amplification,TSA）是一种用于检测低丰度或者低表达靶标的信号放大技术。TSA 技术可以将检测灵敏度提供 50-200 倍。

偶联有辣根过氧化物酶（HRP）的二抗和一抗结合后，将邻近区域的荧光染料分子的酪胺基团活化，活化后的染料分子可与靶标分子及靶标分子周围的芳香类氨基酸残基（如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等）共价结合并聚集，从而在靶标区域形成高密度荧光信号。由此实现对低丰度靶标分子的检测和荧光成像。

样本可以在抗原修改或者再次通透后进行多重免疫荧光显色，而不受一抗来源限制。

产品包装明细：

产品编号	产品名称	包装	保存温度
TSA09-1	4%多聚甲醛固定液	30ml	室温
TSA09-2	TSA Buffer	30ml	4℃
TSA09-3	0.3% H_2O_2	2ml	4℃
F440-TSA	F440 Tyramide荧光染料	30ul	-20℃
F488-TSA	F488 Tyramide荧光染料	30ul	-20℃
F550-TSA	F550（Cy3） Tyramide荧光染料	30ul	-20℃
F594-TSA	F594 Tyramide荧光染料	30ul	-20℃
F647-TSA	F647（Cy5）Tyramide荧光染料	30ul	-20℃
TSA09-4	HRP Conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit/mouse IgG (H+L)	20ul	-20℃
TSA09-5	DAPI	20ul	-20℃

自备试剂

一抗、抗原修改液、荧光防淬灭剂、盖玻片、山羊血清、免疫组化笔、H_2O_2 等

使用说明：

1. 一抗浓度高低对染色结果有直接影响，建议做预实验，摸索一抗浓度；
2. 荧光染料可以按照 1: 200-500 稀释，一般 1:200 就可以达到满意结果。如果低表达的

靶标可以适当提供荧光染料浓度；

3. 多重免疫荧光染色建议先孵育多抗后孵育单抗；
4. 由于要多次抗原修复，所以对样本切片要求高，一定要做好前期样本固定包埋工作，保证切到高质量的切片；

实验流程

1、 样本准备

1）、贴壁细胞：细胞培养到实验要求时间点后用 PBS 洗 3 次，清洗掉培养基和药物等。用 4%多聚甲醛固定 20min，去除固定液 PBS 洗 2 遍，蒸馏水洗 1 遍。放 60 度烤箱烤片 15min。放-20 度或者 4 度长期保存（细胞汇合度 60-70%最佳）。

2）、悬浮细胞在收集细胞后离心去上清加适量 4%多聚甲醛（PFA）固定 20min，去除固定液 PBS 洗 2 遍，蒸馏水洗 1 遍。用适量蒸馏水调整调整细胞浓度，吸取 200ul 细胞悬液涂在防脱片载玻片上，室温晾干或者 60 度烤箱烤干。剩余细胞收集后放甲醇中长期保存。涂片细胞密度不要太高

3）、冰冻切片：样本离体后立即放 4%多聚甲醛中固定 20min，转入 15%蔗糖溶液 4 度冰箱过夜，再转入 30%蔗糖溶液中过夜，然后冰冻切片。切片厚度最好控制在 5-8um。切片后放 60 度烤箱烤干，-20 度冰箱长期保存。这样处理的冰冻切片可以进行热抗原修复，对于低表达的指标效果更好。

4）、石蜡切片：石蜡切片 4um 厚度，60 度烤箱烤片 10min。依次入二甲苯 2 次，每次 8min；无水乙醇 2 次，每次 5min；90%乙醇 1 次 5min；80%乙醇 1 次 5min；PBS 洗 3 遍。

2、 抗原修复：组织切片或冰冻切片入 Triste-EDTA pH9.0 抗原修复液或者柠檬酸钠 pH6.0 抗原修复液中热抗原修复。室温放凉后 PBS 洗 3 遍，每遍 5min。在多重染色是建议第一次抗原修复用 Triste-EDTA pH9.0 抗原修复液，后续用柠檬酸钠 pH6.0 抗原修复液。

3、封闭内源性过氧化物酶：用免疫组化笔在样本边缘画圈，防止液体流出。滴加 3%过氧化氢溶液，室温避光反应 10min，PBS 洗 3 遍，每遍 5min。（过氧化氢溶液也可以自己配制，80%甲醇+10%蒸馏水+10%的 30%商品化过氧化氢）

4、封闭蛋白非特异结合位点：在样本上滴加一抗稀释液或者 0.2%山羊血清溶液，均匀覆盖样本，室温 1h 或者 37℃30min。

5、孵一抗：去掉封闭液直接滴加适当浓度的一抗覆盖样本，37℃反应 1h 或者 4 度冰箱

过夜。

6、一抗洗脱：PBST 洗 2 遍，每遍 5min，PBS 洗 1 遍 5min；

7、孵育二抗：用 0.2%山羊血清 1:500 稀释与一抗对应种属 HRP 标记二抗，直接滴加在样本上，室温反应 1h 或 37℃30min。（实践证明用浓缩型二抗稀释比即用型二抗可靠性更高）PBST 洗 2 遍，每遍 5min，PBS 洗 1 遍 5min；

8、TSA 染色：按照每个样本 100ul 体积计算反应液体积，并按照下表体积比配制反应液：

TSA 工作液	试剂名称	体积
F440 Tyramide 荧光染料工作液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H2O2	10ul
	F440 Tyramide 荧光染料	2ul
F488 Tyramide 荧光染料工作液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H2O2	10ul
	F488 Tyramide 荧光染料	2ul
F546（Cy3） Tyramide 荧光染料工作液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H2O2	10ul
	F546（Cy3）Tyramide 荧光染料	2ul
F594 Tyramide 荧光染料工作液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H2O2	10ul
	F594 Tyramide 荧光染料	2ul
F647 Tyramide 荧光染料工作液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H2O2	10ul
	F647 Tyramide 荧光染料	2ul

滴加染色反应液，室温反应 5-10min（染色时间也可以根据靶标分子的丰度适当调整）。PBST 洗 2 遍，每遍 5min，PBS 洗 1 遍 5min。

9、TSA 多重染色：石蜡切片或冰冻切片选用柠檬酸钠 pH6.0 抗原修复液热抗原修复，细胞爬片选择 0.3-0.5% Triton X-100 对细胞再次通透，去除前一次染色所使用的抗体后重复 3-8 步。

10、DAPI 染核：DAPI 用 PBS 1:1000 稀释，滴加样本上室温孵育 10min，PBS 洗 3 遍，每遍 5min。也可以使用实验室自己熟悉的 DAPI 染色液。

11、用荧光防淬灭剂封片。注意避免产生气泡。-20℃冰箱保存。使用荧光显微镜或其他荧光成像设备拍片或扫片。

染料名称	激发波长（Ex）nm	发射波长（Em)nm
F440-TSA	439	485
F488-TSA	496	519
F550（Cy3）-TSA	550	564
F555-TSA	553	580
F594-TSA	590	617
F647(Cy5)-TSA	649	672