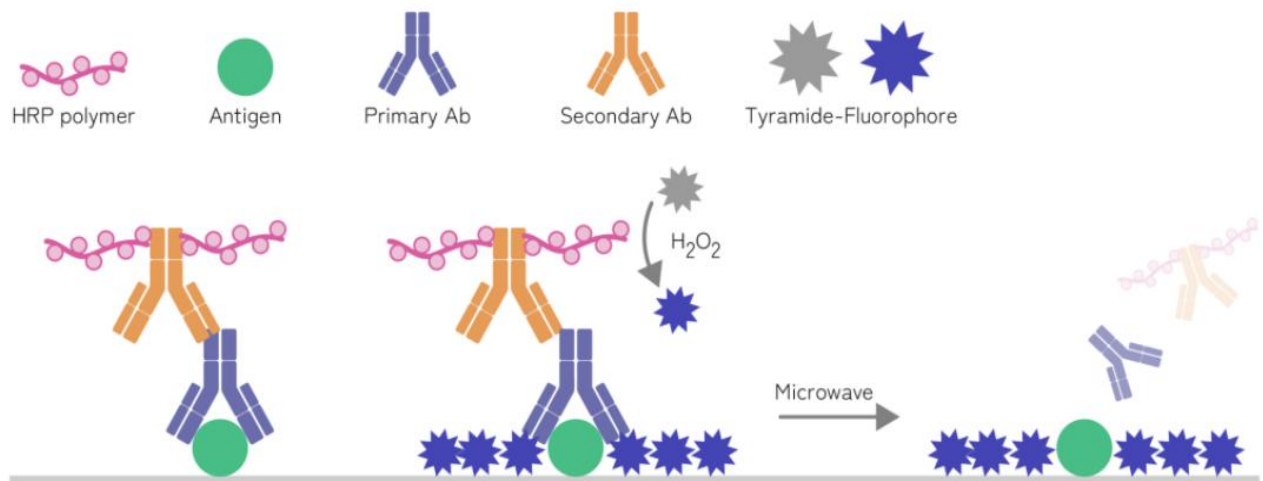


## 三标多重免疫荧光试剂盒(冰冻切片)

### 产品介绍

酪胺信号放大技术 (Tyramide Signal Amplification, TSA) 主要是利用酪胺的过氧化物酶反应。酪胺非活性荧光素底物在HRP和过氧化氢的作用下, 会被激活产生活化荧光底物, 同时形成共价键结合位点, 共价结合在蛋白抗原表面或附近的酪氨酸残基上, 抗原和抗体的结合部位就会有大量的酪胺荧光素沉积, 使抗原位点处的荧光信号增强。

酪胺荧光素底物-抗原酪氨酸共价稳定结合, 故TSA信号不会受微波影响, 可用热修复法清除第一轮与抗原非共价结合的抗体复合物(冰冻切片, 细胞爬片样本请试用抗体洗脱液洗脱法清除), 并能在抗体去除后保留与抗原相关的荧光信号。然后, 再用第二种一抗进行第二轮孵育, 同时更换另一种酪胺荧光素底物, 多次循环反复, 不同的酪胺荧光素进行标记就可实现多重免疫组化染色。



TSA原理示意图

### 产品组成成分

名称	AWI0698a 20T	AWI0698b 100T	保存条件
TSA-520 荧光染料	1 ml	5 ml	-20℃, 避光
TSA-570 荧光染料	1 ml	5 ml	-20℃, 避光
TSA-690 荧光染料	1 ml	5 ml	-20℃, 避光
抗体洗脱液	6 ml	30 ml	RT
内源性过氧化物酶阻断剂	3 ml	15 ml	4℃, 避光
超敏酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物	3 ml	15 ml	4℃, 避光

### 保存条件

荧光染料 -20℃避光保存, 12个月

内源性过氧化物酶阻断剂、超敏酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 4℃避光保存, 12个月

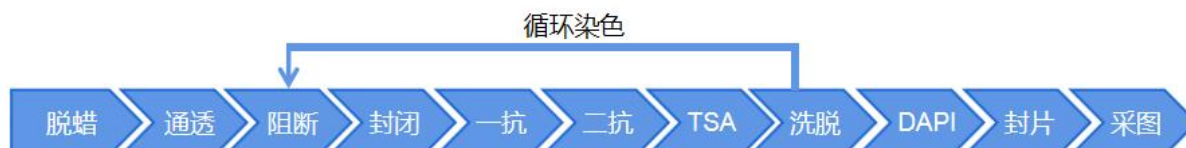
抗体洗脱液 RT 保存, 12个月

## 实验前材料准备

- 1、PBS缓冲液、柠檬酸钠抗原修复液（或其他修复液）；
- 2、推荐可用于IHC-P的单克隆抗体；
- 3、DAPI染色液（推荐浓度：5 $\mu$ g/mL 货号：AWC0298）

## 操作步骤

### 1、操作流程简图



### 2、详细操作步骤

- (1) 冰冻切片准备：冰箱取出冰冻切片恢复至室温晾干水分后固定10-30min，PBS洗5min重复3次。
- (2) 切片破膜：滴加破膜液通透20min，PBS洗5min重复3次。
- (3) 抗原修复：切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液（PH9.0）的修复盒中60℃水浴30min，自然冷却，PBS洗5min重复3次（此步骤可选做，修复有助于暴露抗原和去除内源性过氧化物酶）。
- (4) 阻断内源性过氧化物：切片放入内源性过氧化物酶阻断剂，室温避光孵育15min，将玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。
- (5) BSA封闭：切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用5% BSA-PBS（或者其他封闭液）均匀覆盖组织，室温封闭30min。
- (6) 加一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗X，切片平放于避光湿盒内4℃孵育过夜或者37℃1-2h。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）
- (7) 加免疫组化HRP二抗：玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的免疫组化HRP二抗覆盖组织，避光室温孵育30-50min，PBS洗三次。
- (8) 荧光染料反应：TSA-520荧光染料反应3-10min，PBS洗三次。
- (9) 上一轮抗体洗脱：滴加适量37℃预热至完全溶解的抗体洗脱液覆盖样本，37℃放置5-20分钟，弃去洗脱液，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本37℃放置5-20分钟，弃去洗脱液，PBS洗三次，每次5分钟。
- (10) 重复4-9步骤（换用另外一种TSA-XXX荧光染料）。
- (11) DAPI复染细胞核：玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加DAPI染液，避光室温孵育10min。
- (12) 封片：玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。
- (13) 镜检拍照：切片于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。

染料	激发波长	发射波长
DAPI	350nm	420nm
TSA-480	450nm	480nm
TSA-520	490nm	520nm
TSA-570	550nm	570nm
TSA-620	590nm	620nm
TSA-690	630nm	690nm
TSA-780	750nm	780nm

### 注意事项

- 1、试剂初次使用前请置于4℃解冻，解冻后于4℃短期保存，避免反复冻融，请尽快使用。
- 2、为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
- 3、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

### 相关产品

货号	名称
AWC0298	DAPI染色液(50 µg/mL)
AWI0692	双标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0693	三标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0694	四标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0695	五标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0697	双标多重免疫荧光试剂盒(冰冻切片)
AWI0702	双标多重免疫荧光试剂盒(细胞爬片)
AWI0703	三标多重免疫荧光试剂盒(细胞爬片)
AWC0215	磷酸缓冲盐溶液(1×PBS,无钙镁)
AWI0206	柠檬酸钠抗原修复液(50×)
AWI0117	EDTA抗原修复液