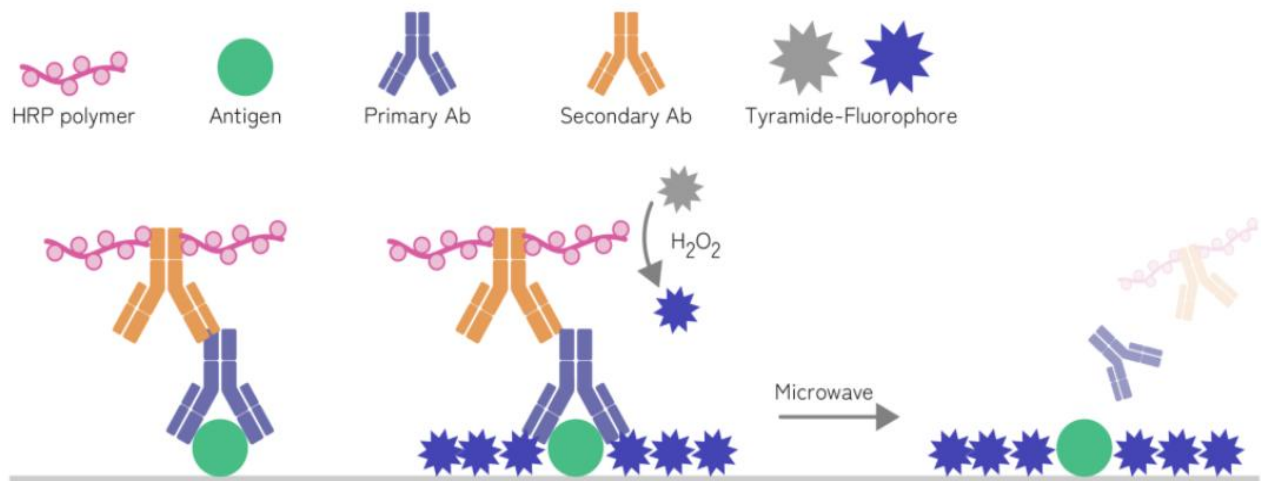


## 四标多重免疫荧光试剂盒(细胞爬片)

### 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                  | AWI0704a<br>20T | AWI0704b<br>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-620 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         | 4 ml            | 20 ml            | 4℃, 避光   |
| 超敏酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 | 4 ml            | 20ml             | 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ICC/IF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) 爬片准备：多聚甲醛固定 15min，PBS 洗涤三次，每次 5min，通透液破膜 15min，PBS洗涤 3 次，每次 5min。

(2) 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 15 min，将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

(3) BSA 封闭：细胞孔板内滴加用 5% BSA-PBS（或者其他封闭液）均匀覆盖细胞，室温封闭 30min（如果爬片盖玻片较大可用组化笔在盖玻片四周画圈）。

(4) 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 $^{\circ}$ C 孵育过夜或者 37 $^{\circ}$ C 1-2h。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

(5) 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。

(6) 荧光染料反应：TSA-520 荧光染料反应 3-10min，PBS 洗三次。

(7) 上一轮抗体洗脱：滴加适量 37 $^{\circ}$ C 预热至完全溶解的抗体洗脱液覆盖样本，37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 放置 5-20 分钟，弃洗脱液，PBS 洗 3 次每次 5 分钟。

(8) 重复 2-7 步骤（换用另外一种 TSA-XXX 荧光染料）。

(9) 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。

(10) 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。

(11) 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)  |
| AWI0698 | 三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)  |
| 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          |